



**HAL**  
open science

# Apports de la géochimie des isotopes non-traditionnels à la biologie. Aspects cliniques et fondamentaux

Aline Lamboux

## ► To cite this version:

Aline Lamboux. Apports de la géochimie des isotopes non-traditionnels à la biologie. Aspects cliniques et fondamentaux. Sciences de la Terre. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSEN091 . tel-03663355

**HAL Id: tel-03663355**

**<https://theses.hal.science/tel-03663355v1>**

Submitted on 10 May 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Numéro National de Thèse : 2021LYSEN091

**THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON**

opérée par

**l'École Normale Supérieure de Lyon**

**École Doctorale N° 341**

**Évolution Écosystèmes Microbiologie Modélisation (E2M2)**

**Discipline de doctorat : Sciences de l'univers**

**Spécialité de doctorat : Géochimie isotopique**

Soutenue publiquement le 13/12/2021, par :

**Aline LAMBOUX**

---

**Apports de la géochimie des isotopes  
non-traditionnels à la biologie.  
Aspects cliniques et fondamentaux**

---

Devant le jury composé de :

MOYNIER, Frédéric	Professeur des universités	Université de Paris Diderot	Rapporteur
LOREAL, Olivier	Directrice de recherche	INSERM	Rapporteur
BOST, Muriel	Praticienne Hospitalière	HCL	Examinatrice
BULTEAU, Anne-Laure	Docteure	LVMH	Examinatrice
LEVERRIER, Yann	Chargé de recherche	INSERM	Examinateur
BALTER, Vincent	Directeur de recherche	CNRS	Directeur de thèse



## Résumé

Depuis une vingtaine d'années, grâce à la grande précision qu'offre les spectromètres de masse à plasma induit et à multi collection, les mesures d'isotopes stables et particulièrement celles du Cu, sont étudiées dans les domaines de la biologie fondamentale et de la clinique. L'homéostasie des métaux pouvant être perturbée en conditions pathologiques, des modifications de compositions isotopiques dans ces conditions particulières ont été mises en évidence, permettant même d'envisager les mesures isotopiques comme outil de diagnostic ou pronostic pour certaines pathologies.

Parmi les pathologies liées à un dysfonctionnement du métabolisme des métaux, la maladie de Wilson entraîne une surcharge en cuivre principalement dans le foie. Dans cette thèse est détaillée une étude montrant que le rapport isotopique du cuivre peut être un bon outil de pronostic de la maladie de Wilson. Les traitements administrés aux malades de Wilson visent à réduire la charge corporelle en cuivre mais présentent des effets indésirables. La recherche se penche donc sur des chélateurs plus spécifiques et entraînant moins d'effets secondaires. Une partie de cette thèse est consacrée à montrer comment les rapports isotopiques du cuivre ont permis de mettre en évidence l'efficacité d'un chélateur innovant ainsi que son mécanisme d'action.

Les études portant sur les compositions isotopiques réalisées jusqu'à maintenant dans le domaine de la biologie clinique reposent sur l'analyse d'échantillons tels que du sérum sanguin, des érythrocytes, du sang total et également des organes. Dans la dernière partie de cette thèse, une approche innovante consistant à étudier les compositions isotopiques des compartiments cellulaires est présentée. En envisageant cette approche dans différents organes, que ce soit en conditions normales ou pathologiques, les résultats ouvrent de nombreuses perspectives qui permettront de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans le métabolisme des métaux.





# Remerciements

Après une longue hésitation, l'idée a finalement mûrie, et l'envie de travailler différemment sur les projets recherche m'a poussé à débiter cette thèse. Il y a évidemment eu des hauts et bas au cours de ma thèse, un stress permanent, surtout de ne pas obtenir des échantillons, et de ne pas pouvoir poursuivre les projets. Maintenant que c'est fini, je vois évidemment les choses différemment, je suis ravie d'avoir franchi le pas. J'ai beaucoup appris au cours de cette thèse, que je vois maintenant comme un tremplin.

Je remercie tout d'abord Vincent Balter pour m'avoir proposé de réaliser cette thèse sous sa direction. Merci de m'avoir incité à travailler en collaboration avec des médecins, des biologistes, des biochimistes tout au long de ma thèse, ceci a été scientifiquement et humainement très enrichissant. Merci pour tous tes conseils que ce soit pour le traitement des données, la rédaction des articles, et bien évidemment merci pour la confiance que tu m'as accordée tout au long de ma thèse. Les projets vont se poursuivre, d'autres vont débiter, et j'ai encore beaucoup de choses à apprendre.

Je tiens également à remercier Emanuela Mattioli, directrice du laboratoire lorsque j'ai débuté ma thèse, pour avoir accepté que je fasse cette thèse en parallèle de mon travail au laboratoire en tant qu'ingénieure d'études, merci pour ta confiance et le soutien que tu m'as apporté tout au long de ma thèse.

J'adresse toute ma gratitude aux membres de mon jury de thèse, Frédéric Moynier et Olivier Loréal pour avoir accepté d'être mes rapporteurs, Muriel Bost, Anne-Laure Bulteau et Yann Leverrier pour avoir accepté d'être mes examinateurs. Merci pour vos critiques, suggestions et conseils, ainsi que pour les perspectives que vous avez ouvertes lors de ma soutenance.

J'adresse également ma reconnaissance aux membres de mon comité de suivi de thèse, Laurent Simon, Anne-Laure Bulteau, Muriel Bost et Virginie Brun, pour votre écoute, vos recommandations et toutes les idées que vous m'avez apportées.

J'adresse mes chaleureux remerciements à Francis Albarède, pour tous ses précieux conseils et son soutien, avant, pendant, et j'espère encore après ma thèse. Je remercie aussi très sincèrement Philippe Télouk, qui m'a recruté au laboratoire en 2007, et sans qui je ne serais pas là aujourd'hui. Un très grand merci à Chantal Douchet, même si elle a quitté le laboratoire bien

avant que je commence ma thèse, merci de m'avoir épaulée lors de mes premières années au laboratoire, pour m'avoir formée en salle blanche et sur les machines, ainsi que pour ton amitié. Merci à Emmanuelle Albalat pour m'avoir épaulé lors de la mesure du Fe sur le Neptune Plus. Un grand merci à mon maître magnésium, Samuel Le Goff, pour toute l'aide pour la chimie et la mesure du Mg.

Un grand merci à Florent Arnaud-Godet avec qui je partage le bureau depuis de nombreuses années, merci pour ton aide sur les machines, ton soutien, ton amitié, tes bons plans, nos discussions...

Un très grand merci aussi à Salomé Ansanay-Alex, mon coach de thèse et co-bureau pendant quelques années. Merci pour nos discussions scientifiques et surtout non scientifiques, ton soutien, tes encouragements, ton amitié...

J'adresse également toute ma sympathie à mes collègues du LGL. Ainsi qu'à mes collègues temporaires : merci de détendre l'atmosphère du laboratoire et pour les moments légers. Un spécial merci à Eloïse Godfroy, qui était au laboratoire au début de ma thèse, merci pour ton soutien, ton amitié, tes encouragements, merci pour être même venue spécialement à ma soutenance.

Au cours de cette thèse j'ai eu l'opportunité de collaborer avec de nombreuses personnes que je tiens à remercier :

- L'équipe du CRMR de l'HFME : Alain Lachaux, Olivier Guillaud, Muriel Bost, Adbelouahed Belmalih, Eduardo Couchonnal-Bedoya, pour les réunions durant lesquelles j'ai beaucoup appris sur la maladie de Wilson, pour les échantillons et pour les discussions sur les résultats.
- Elisabeth Mintz du CEA de Grenoble, pour m'avoir intégré au projet sur Chel2, pour nos échanges et discussions sur les résultats, pour m'avoir donné l'occasion de travailler sur des échantillons exotiques (dopés en  $^{65}\text{Cu}$ ). Je remercie également Virginie Brun qui a fait la transition lors du départ à la retraite d'Elisabeth.
- Anne-Laure Bulteau, pour m'avoir formée à la technique de séparation des mitochondries, pour toutes tes idées pertinentes et tes précieux conseils.
- Yann Leverrier pour les échantillons de souris méticuleusement préparés, ton professionnalisme et tes conseils avisés.
- Olivia Guillin et Laurent Chavatte pour m'avoir formée et aidée lors de la réalisation des western blot.
- Jean-Marc Vanacker et Violaine Tribollet, pour m'avoir formée et permis de réaliser des cultures cellulaires au début de ma thèse. Je remercie également Victor Bondanese qui a été le premier à me former à la culture cellulaire, merci pour nos discussions et tes conseils.

Je tiens particulièrement à remercier mes parents Sylvie et Hervé Lamboux, qui m'ont toujours soutenue et encouragée, sans leur confiance je ne me serais certainement jamais lancée dans l'aventure de cette thèse, merci pour tout ce que vous avez toujours fait pour moi. Merci à mon frère Matthieu Lamboux pour s'être toujours intéressé à mon travail. Merci à mon mari Cédric Robert, pour me supporter au quotidien, c'est déjà beaucoup, merci pour ton soutien, ta disponibilité, tes encouragements. Enfin, je dédie cette thèse à mes deux asticots d'amour, Nathan et Léna.



## Liste des abréviations

AD : Alzheimer disease

CCO : Cytochrome c oxydase

CP : Céruloplasmine

CTR1 : Copper transporter 1

DMT1 : Divalent metal transporter

ICP-AES : Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry

ICP-MS : Inductively coupled plasma mass spectrometry

MC-ICP-MS : Multicollection inductively coupled plasma mass spectrometry

MD : Menkes disease

MT : Métallothionéine

NASH : Non alcoolic steato hepatitis

PrP : Protéine prion

SLA : Sclérose latérale amyotrophique

SOD : Super oxyde dismutase

STEAP : Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate member

REC : Relative exchangeable copper (rapport du cuivre sérique échangeable sur le cuivre sérique total)

ROS : Reactive oxygen species

WT : Wild type

WD : Wilson disease



# Table des matières

<b>Introduction générale</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 Le cuivre en biologie</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1 Biochimie</b> .....	<b>11</b>
<b>1.2 Le fractionnement isotopique</b> .....	<b>12</b>
1.2.1 Les compositions isotopiques du cuivre chez la souris.....	16
1.2.2 Les compositions isotopiques du cuivre chez l'Homme.....	23
<b>1.3 Le cuivre chez l'Homme et les besoins alimentaires</b> .....	<b>30</b>
1.3.1 Le cuivre dans l'intestin .....	31
1.3.2 Le cuivre dans le sang .....	31
1.3.3 Le cuivre dans le foie .....	31
1.3.4 Le cuivre dans les reins .....	32
1.3.5 Le cuivre dans le cerveau.....	32
1.3.6 Les besoins alimentaires en cuivre .....	33
<b>1.4 Métabolisme du cuivre</b> .....	<b>34</b>
<b>1.5 Les protéines à cuivre</b> .....	<b>36</b>
1.5.1 Quelques définitions .....	36
1.5.2 La superoxyde dismutase (SOD) .....	37
1.5.3 La cytochrome c oxydase (CCO) .....	38
1.5.4 La céruloplasmine (CP) .....	39
1.5.5 Les métallothionéines (MTs) .....	40
<b>1.6 Les pathologies liées au dérèglement du métabolisme du cuivre</b> .....	<b>42</b>
1.6.1 Les cancers.....	42
1.6.2 Les maladies hépatiques .....	45
1.6.3 Les maladies neuro-dégénératives.....	46
1.6.3.1 La sclérose latérale amyotrophique (SLA).....	46
1.6.3.2 La maladie d'Alzheimer (AD) .....	47
1.6.3.3 Les maladies à prions .....	48
1.6.4 Les maladies génétiques .....	49
1.6.4.1 La maladie de Menkès (MD) .....	49
1.6.4.2 La maladie de Wilson (WD) .....	50
<b>Chapitre 2 Matériels et Méthodes</b> .....	<b>57</b>
<b>2.1 Les échantillons</b> .....	<b>61</b>
2.1.1 Les échantillons d'origine humaine .....	61
2.1.1.1 Les échantillons de sang de malades de Wilson .....	61
2.1.1.2 Les échantillons de sang d'enfants contrôles.....	62
2.1.2 Les échantillons d'origine animale .....	62
2.1.2.1 Les organes et fluides biologiques de souris <i>Atp7b</i> <sup>-/-</sup> .....	62



2.1.2.2	Les foies de souris.....	63
2.1.3	Les cellules.....	63
<b>2.2</b>	<b>Préparation des échantillons .....</b>	<b>64</b>
2.2.1	L'isolation des mitochondries .....	64
2.2.1.1	Les réactifs .....	64
2.2.1.2	Le protocole.....	64
2.2.1.3	Le Western Blot.....	66
2.2.2	Minéralisation des échantillons.....	69
2.2.2.1	Les échantillons de sang total.....	69
2.2.2.2	Les échantillons provenant des souris <i>Atp7b</i> <sup>-/-</sup> .....	69
2.2.2.3	Les échantillons provenant de l'isolation des mitochondries des cellules MDA et des foies de souris 70	
2.2.3	Séparation et purification des éléments.....	71
2.2.3.1	Principe de la chromatographie sur résine échangeuse d'ions en phase liquide.....	71
2.2.3.2	Séparation des éléments chimiques.....	73
2.2.3.3	Effet de la température sur la séparation des éléments.....	76

**Article publié dans Rapid Communications in Mass Spectrometry**  
**Absence of temperature effect on elution profiles on anionic and cationic ion-exchange resins from 4 °C to 28 °C**

<b>2.3</b>	<b>Les analyses par spectrométrie .....</b>	<b>85</b>
2.3.1	Mesure des éléments majeurs .....	86
2.3.1.1	Principe de l'ICP-AES.....	86
2.3.1.2	Protocole de mesure des éléments majeurs.....	86
2.3.2	Mesure des éléments traces .....	87
2.3.2.1	Principe de l'ICP-MS.....	87
2.3.2.2	Protocole de mesure des éléments mineurs .....	88
2.3.3	Mesure des compositions isotopiques.....	88
2.3.3.1	Principe de la MC-ICP-MS.....	88
2.3.3.2	Protocoles de mesure des compositions isotopiques du Cu, du Zn, du Fe et du Mg.....	89
2.3.3.3	Protocole de mesure des compositions isotopiques du Fe.....	92
2.3.3.4	Protocole de mesure des compositions isotopiques du Mg.....	92
2.3.3.5	Précision et reproductibilité des mesures .....	93

**Chapitre 3 Les isotopes du cuivre dans la maladie de Wilson : un indicateur de l'atteinte hépatique..... 95**

**Article publié dans Metallomics**

**The blood copper isotopic composition is a prognostic indicator of the hepatic injury in Wilson disease**

**Chapitre 4 Mise en évidence de l'effet et du mécanisme de fonctionnement d'un chélateur innovant..... 109**

<b>4.1</b>	<b>Mise en évidence de l'effet de Chel2 sur l'excrétion du cuivre.....</b>	<b>113</b>
4.1.1	Structure de Chel2 .....	113
4.1.2	Matériels et méthodes.....	114
4.1.3	Résultats.....	115

4.1.4	Conclusion .....	117
<b>4.2</b>	<b>Etude du mécanisme de fonctionnement de Chel2 grâce aux mesures isotopiques du cuivre .....</b>	<b>118</b>
4.2.1	Mise en évidence d'une modification de la composition isotopique du cuivre du foie de souris après injection de <sup>65</sup> Cu .....	118
4.2.1.1	Précautions prises pour l'analyse d'échantillons dopés en <sup>65</sup> Cu .....	119
4.2.1.2	Calcul de l'excès de <sup>65</sup> Cu .....	120
4.2.1.3	Modification de la composition isotopique en Cu du foie et des fèces chez la souris <i>Atp7b</i> <sup>-/-</sup> après administration de <sup>65</sup> Cu .....	121
4.2.2	Mise en évidence du flux de Cu chez les souris <i>Atp7b</i> <sup>-/-</sup> traitées par Chel2.....	123
4.2.2.1	Descriptif des expérimentations .....	123
4.2.2.2	Article .....	125
<b>Article publié dans Metallomics</b>		
<b>A liver-targeting Cu(I) chelator relocates Cu in hepatocytes and promotes Cu excretion in a murine model of Wilson's disease</b>		
<b>Chapitre 5</b>	<b>Fractionnement isotopique du Cu, du Zn, du Fe et du Mg dans les compartiments cellulaires .....</b>	<b>137</b>
<b>5.1</b>	<b>Etude préliminaire sur des cellules de cancer du sein .....</b>	<b>141</b>
5.1.1	Détermination des blancs.....	141
5.1.2	Détermination de la quantité de cellules nécessaire.....	142
5.1.3	Résultats.....	143
<b>5.2</b>	<b>Etude préliminaire sur des foies de souris .....</b>	<b>144</b>
5.2.1	Résultats.....	144
<b>5.3</b>	<b>Article en préparation « Copper, zinc, iron and magnesium isotopic fractionation in cellular compartments » .....</b>	<b>147</b>
<b>Conclusion et perspectives.....</b>		<b>169</b>
<b>Bibliographie .....</b>		<b>175</b>
<b>Annexes.....</b>		<b>187</b>
Annexe 1-	Concentration en Cu chez les personnes atteintes de cancer .....	189
Annexe 2 -	Données du chapitre 3 .....	191
Annexe 3 -	Données du chapitre 4.1.3 .....	194
Annexe 4 -	Supplementary Information chapitre 4.2.2.2 .....	196



# **Introduction générale**



Les géologues ont été les premiers à démontrer l'intérêt des isotopes stables pour quantifier les flux de matière entre les différentes enveloppes terrestres, mais depuis une vingtaine d'années, émergent de plus en plus de travaux portant sur l'apport des isotopes stables dans les domaines de la biologie végétale (Bolou-Bi et al., 2010; Moynier et al., 2009), la biologie animale (Martin et al., 2015, 2018) ainsi que la biomédecine (Albarède et al., 2017a; Bondanese et al., 2016).

Des fractionnements isotopiques ont été observés durant les processus biologiques chez l'Homme et l'animal pour les éléments tels que le calcium, le fer, le cuivre et le zinc. L'influence de certains facteurs comme le sexe (Jaouen et al., 2012), l'âge (Jaouen et al., 2013a; Sauzéat et al., 2018a) et le régime alimentaire (Jaouen et al., 2013b; Van Heghe et al., 2012) sur les variations de la composition isotopique de ces métaux dans les fluides et tissus biologiques ont été étudiés. De récents travaux ont montrés que la composition isotopique des éléments peut sensiblement varier dans le cadre de pathologies liées au métabolisme des métaux. Il a été démontré que l'étude des variations isotopiques des isotopes stables, et particulièrement du cuivre, pourrait avoir un intérêt pour le diagnostic ou le pronostic de certaines maladies (Aramendía et al., 2013; Costas-Rodríguez et al., 2016; Télouk et al., 2015). Le cuivre est étudié chez les personnes atteintes de maladies hépatiques (Costas-Rodríguez et al., 2015, 2019), de cancers (Balter et al., 2015; Lobo et al., 2017) et encore de maladies neuro-dégénératives (Miller et al., 2016; Sauzéat et al., 2018b). Parmi les maladies hépatiques, je me suis particulièrement intéressée au cours de cette thèse, à apporter la contrainte isotopique sur la dérégulation du métabolisme du cuivre dans la maladie de Wilson.

La maladie de Wilson est une maladie génétique rare qui se caractérise par une accumulation de cuivre principalement dans le foie et dans le système nerveux central. Le cuivre s'accumulant d'abord au niveau du foie, les malades de Wilson présentent en premier lieu des symptômes de pathologies hépatiques. Si la maladie n'est pas diagnostiquée et donc non traitée, le cuivre continue de s'accumuler et peut atteindre le cerveau entraînant alors une forme neurologique. Le diagnostic repose sur plusieurs arguments cliniques, ainsi que sur les anomalies moléculaires associées. Les traitements administrés aux malades de Wilson visent à limiter la charge corporelle en cuivre, ce sont principalement des chélateurs ou des traitements à base de zinc, qui doivent être pris à vie. Je montrerai dans cette thèse que la mesure de la composition isotopique du cuivre peut constituer un bon outil de pronostic de la maladie de Wilson. Je détaillerai également comment les mesures de la composition isotopique du cuivre ont permis de mettre en évidence l'efficacité d'un traitement innovant. Ces deux premières études constitueront le volet clinique de cette thèse.

Les études portant sur les compositions isotopiques réalisées jusqu'à maintenant dans le domaine de la biomédecine reposent sur l'analyse d'échantillons tels que du sérum sanguin, des érythrocytes, du sang total et également des organes. Les compositions isotopiques des métaux, sont spécifiques de chaque organe (Balter et al., 2013), et ce "paysage" isotopique est plus ou moins figé en conditions normales, mais il peut être fortement perturbé en conditions pathologiques. Ceci ouvre la question de l'hétérogénéité des compositions isotopiques des métaux dans les différents compartiments cellulaires.

Je propose dans cette thèse une approche innovante qui consiste à séparer différents compartiments cellulaires, et à en mesurer les compositions isotopiques de différents métaux. L'objectif est d'avoir une vision plus détaillée des variations isotopiques et de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans le métabolisme des métaux. Cette approche pourra être envisagée pour différents organes, mais aussi en cultures cellulaires, en conditions normales et pathologiques et ouvre ainsi de nombreuses perspectives. Cette dernière étude constituera le volet fondamental de cette thèse.

Le travail effectué au cours de cette thèse est présenté en cinq parties :

Je ferai dans une première partie, l'état de l'art sur l'apport des mesures de la composition isotopique du cuivre dans le domaine de la biologie fondamentale et la clinique. J'évoquerai ensuite la répartition du cuivre chez l'Homme et ses besoins alimentaires. Puis je détaillerai le métabolisme du cuivre chez l'Homme, et les principales protéines à cuivre. Enfin j'exposerai les principales maladies liées au dérèglement du métabolisme du cuivre.

Dans une deuxième partie, je m'attacherai à présenter le matériel sur lequel les études de cette thèse ont été réalisées. Il s'agit notamment d'échantillons biologiques, tels que le sang de malades de Wilson et d'individus sains, ainsi que des organes et fluides biologiques d'un modèle murin de la maladie de Wilson. Enfin je détaillerai la technique employée pour la séparation des compartiments cellulaires. Tous ces échantillons ont été analysés en vue de déterminer les compositions isotopiques du cuivre et pour certains échantillons également du zinc, du fer et du magnésium. Je présenterai donc les protocoles de séparation de ces métaux par chromatographie sur résines échangeuses d'ions, ainsi que les méthodes d'analyse utilisées au cours de cette thèse.

Une étude de 2013 a montré que le sérum de malades de Wilson était enrichi en isotopes légers par rapport à celui d'individus sains (Aramendía et al., 2013). Les auteurs ont alors proposé que le rapport isotopique du cuivre pouvait constituer un outil de diagnostic de la maladie de Wilson. Je contesterai ces résultats dans la troisième partie et détaillerai comment le rapport isotopique du cuivre peut par contre être un bon outil de pronostic de la maladie de Wilson.

Les traitements administrés actuellement aux malades de Wilson présentant des inconvénients et entraînant des effets indésirables, la recherche se penche sur des chélateurs plus spécifiques. J'exposerai dans une quatrième partie, comment les mesures de concentration et de composition isotopique du cuivre ont permis de montrer l'efficacité et le mécanisme de fonctionnement d'un nouveau chélateur conçu au CEA de Grenoble.

Enfin dans une cinquième partie, je montrerai qu'en adaptant un protocole de séparation des compartiments cellulaires, j'ai déterminé les rapports isotopiques du Cu, du Fe, du Zn et du Mg de différents compartiments cellulaires de foie de souris. Cette approche pourra permettre de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans le métabolisme des métaux au niveau cellulaire, et ouvre de nombreuses perspectives.





# **Chapitre 1**

---

---

## **Le cuivre en biologie**

---

---



# Introduction

---

Avec une abondance dans la croûte terrestre de 68 ppm, le cuivre est le 25<sup>ème</sup> élément. Le cuivre (Cu) est un métal de transition, sa configuration électronique est [Ar] 4s<sup>1</sup>3d<sup>10</sup> et son numéro atomique 29. Il est situé dans la colonne 11 et sur la 4<sup>ème</sup> période de la classification périodique de Mendeleïev. En solution, il a deux états d'oxydation Cu<sup>+</sup> et Cu<sup>2+</sup> et une grande facilité de coordination.

Ce premier chapitre, divisé en six parties, est dédié à la présentation du cuivre en biologie. Dans une première partie, je présenterai la biochimie du cuivre et notamment son pouvoir réducteur. J'aborderai ensuite le fractionnement du cuivre en détaillant les compositions isotopiques du cuivre chez la souris et chez l'Homme. Dans la troisième partie, je ferai l'inventaire du cuivre chez l'Homme et évoquerai ses besoins alimentaires. La quatrième partie sera consacrée à présenter le cuivre comme oligo-élément essentiel au métabolisme humain. Nous verrons que le cuivre intervient comme cofacteur de plusieurs métalloprotéines et qu'il est responsable de la respiration cellulaire, du transport du fer ou encore qu'il permet de lutter contre le stress oxydatif. Je présenterai dans la cinquième partie les principales protéines à cuivre. Enfin dans la sixième partie j'aborderai les dérèglements liés au cuivre dans le cas des cancers, je montrerai que la perturbation de l'homéostasie du cuivre peut entraîner des maladies neurodégénératives et que des mutations de protéines à cuivre sont à l'origine de maladies génétiques.

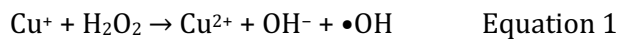
---



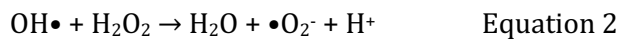
## 1.1 Biochimie

En solution, le cuivre forme essentiellement, d'une part des ions cuivreux  $\text{Cu}^+$  qui sont obtenus par la perte d'un électron de la couche 4s, d'autre part des ions cuivriques  $\text{Cu}^{2+}$  qui sont obtenus par la perte d'un second électron sur la couche 3d. Ces deux degrés d'oxydation I et II donnent de très nombreux complexes de coordination et d'intérêt biologique. A faible dose le cuivre est un oligoélément essentiel, en excès il peut être très toxique.

Le cuivre (I) a tendance à s'oxyder facilement et donc à perdre un électron sur sa couche « d ». C'est un réducteur puissant qui, en biologie, peut réagir avec  $\text{H}_2\text{O}_2$  et engendrer un radical hydroxyle  $\text{HO}\cdot$  qui est un oxydant très puissant et donc extrêmement toxique pour l'organisme, et un ion hydroxyde ( $\text{OH}^-$ ) (Prousek, 2007) selon la réaction de Fenton :



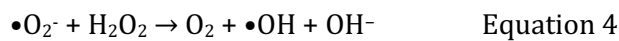
Il peut alors se former un radical superoxyde selon la réaction suivante :



$\text{Cu}^{2+}$  peut alors être réduit par le radical superoxyde selon la réaction suivante :



La somme des réactions 1 et 3 est appelée la réaction d'Haber Weiss qui est catalysée par  $\text{Cu}^+$  :



Il faut noter que dans ces réactions,  $\text{Cu}^+$  peut être remplacé par  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$  par  $\text{Fe}^{3+}$ .

Le radical hydroxyle ( $\cdot\text{OH}$ ), l'anion superoxyde ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) font partie des dérivés réactifs à l'oxygène communément appelés ROS pour reactive oxygen species en anglais.

Les mitochondries représentent la source principale des ROS (Andreyev et al., 2005; Balaban et al., 2005; Cadenas and Davies, 2000). A l'intérieur des mitochondries, l' $\text{O}_2$  se réduit et forme l'anion superoxyde  $\text{O}_2\cdot^-$  qui par dismutation formera  $\text{H}_2\text{O}_2$  utilisé dans le mécanisme de Fenton (Loschen et al., 1974).

Sous conditions normales, l'effet des ROS est régulé par les antioxydants cellulaires (enzymes antioxydantes et réductrices) (Sauer et al., 2001). Les principaux antioxydants cellulaires sont la glutathion réductase (Masella et al., 2005) et les catalases qui permettent le contrôle du peroxyde d'hydrogène et également la superoxyde dismutase (Afonso et al., 2007) qui permet le contrôle de l'anion superoxyde. Ainsi en chélatant le Cu, la glutathion réductase participe à la détoxification et au métabolisme intracellulaire du Cu (Meister and Anderson, 1983), elle permet aussi de maintenir le Cu sous sa forme réduite. D'autres molécules apportées par

l'alimentation présentent également des propriétés anti-oxydantes. Il s'agit par exemple des vitamines A, C et E ou encore des polyphénols.

Le cuivre en excès favorise donc la production de ROS. Lorsque celle-ci devient trop importante et n'est plus régulée par le métabolisme cellulaire, la concentration intracellulaire de ROS augmente, et on parle de « stress oxydant ».

Le stress oxydant est un facteur d'inflammation, il est lié au vieillissement (Finkel and Holbrook, 2000), aux cancers (Valko et al., 2006), aux maladies neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer et de Parkinson et la sclérose latérale amyotrophique (Sayre et al., 2001), aux maladies cardiovasculaires (Dhalla et al., 2000)... Les radicaux libres peuvent être à l'origine de dommages à l'ADN dans divers tissus cancéreux (Valko et al., 2004).

Le cuivre en temps que cofacteur de protéines a donc un rôle catalytique et une importance cruciale dans le transfert d'électrons ainsi que dans l'activation et le transport de l'oxygène.

## 1.2 Le fractionnement isotopique

Le cuivre possède un noyau qui compte un certain nombre de protons. Ce nombre de protons est le numéro atomique de l'élément noté Z (= 29). Chaque élément possède le même nombre de protons que d'électrons ce qui assure la neutralité de l'atome. Par contre, le nombre de neutrons peut varier pour un même élément. C'est ce que l'on appelle isotope.



X : élément chimique

A : masse atomique (nombre de protons + nombre de neutrons)

Z : numéro atomique (nombre de protons)

Les isotopes d'un élément chimique ont donc le même nombre de protons mais un nombre de neutrons différent, et donc des masses différentes.

Le cuivre a deux isotopes stables : le  $^{63}\text{Cu}$  qui possède 34 neutrons et a une masse atomique de  $62,929 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  et le  $^{65}\text{Cu}$  qui possède 36 neutrons et a une masse atomique de  $64,927 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Ils sont respectivement dans des proportions de 69,17 % et 30,83 % (figure 1).

Certains éléments ont également des isotopes instables (ou radioactifs). Il s'agit d'isotopes possédant des noyaux instables qui se décomposent plus ou moins rapidement. Le cuivre possède 27 radio-isotopes dont le  $^{64}\text{Cu}$  et le  $^{67}\text{Cu}$  pour lesquels les demi-vies sont de 12.7 et 61.8 heures et sont les plus stables.

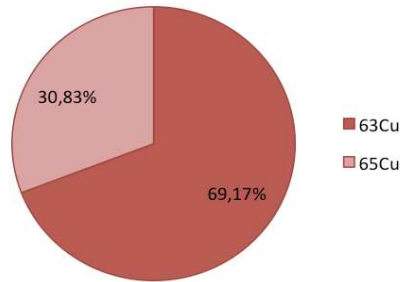


Figure 1 : Abondances isotopiques naturelles du cuivre

Les isotopes d'un élément chimique ayant le même nombre d'électrons, ils possèdent des propriétés physico-chimiques très voisines. Par contre la différence de masse entre les différents isotopes entraîne des énergies de liaison et des propriétés cinétiques légèrement différentes. Au cours de réactions physico-chimiques chimiques, une légère variation des abondances naturelles des éléments est observée, c'est ce que l'on appelle le fractionnement isotopique.

L'amplitude d'un fractionnement peut être définie par le facteur de fractionnement  $\alpha$  pour une réaction entre A et B :

$$\alpha_{A-B} = \frac{({}^iX/{}^jX)_A}{({}^iX/{}^jX)_B}$$

${}^iX$  et  ${}^jX$  expriment l'abondance des isotopes i et j de l'élément X dans les composés ou les phases A et B. Par convention, les isotopes lourds (i) sont généralement au numérateur et les isotopes légers (j) au dénominateur.

Par définition,  $\delta$  estime la variation entre le rapport isotopique pour le composé (ou la phase) A et un standard de référence :

$$\delta^iX_A = \left[ \frac{({}^iX/{}^jX)_A}{({}^iX/{}^jX)_{std}} - 1 \right] \times 1000$$

Le fractionnement entre 2 composés ou 2 phases A et B est noté  $\Delta_{A-B}$ . Il est défini de la manière



suivante :

$$\Delta_{A-B} = \delta^i X_A - \delta^i X_B \approx 1000 \ln (\alpha_{A-B})$$

Deux processus peuvent être à l'origine d'un fractionnement isotopique :

- **Le processus thermodynamique** : les masses des isotopes affectent les fréquences de vibration des liaisons modifiant ainsi les énergies de liaison et les constantes d'équilibre thermodynamique.

En effet, l'énergie d'une liaison chimique augmente avec la fréquence de vibration qui elle-même diminue avec la masse atomique de l'isotope. Ainsi, l'isotope le plus lourd ( $^{65}\text{Cu}$ ) montre une préférence pour les liaisons chimiques les plus rigides et les plus fortes (Bigeleisen and Mayer, 1947; Urey, 1947). Les composés oxydés présentent un plus fort champ électrostatique que les composés réduits. Ainsi les composés oxydés ( $\text{Cu}^{2+}$ ) sont enrichis en isotope lourd ( $^{65}\text{Cu}$ ) par rapport aux composés réduits ( $\text{Cu}^+$ ).

Les énergies de liaison dépendent également de la température, le fractionnement isotopique décroît selon  $1/T^2$ .

Le fractionnement isotopique varie en fonction de la différence de masse entre les isotopes selon  $\Delta m/m^2$ , avec  $\Delta m$  la différence de masse des isotopes et  $m$  la masse atomique de l'élément. Ainsi, pour une même différence de masse entre les isotopes, plus l'élément aura une masse élevée, plus le fractionnement sera faible.

- **Le processus cinétique** : au cours de réactions irréversibles ou uni-directionnelles, les vitesses de réaction et de diffusion dépendent de la masse de l'isotope. Le fractionnement cinétique est conservé lorsque le produit de ces réactions est isolé des réactifs (Richter et al., 2009; Schauble, 2004). Les vitesses de réaction sont liées à l'énergie d'activation des isotopes. En règle générale, l'isotope le plus léger ( $^{63}\text{Cu}$ ) réagit le plus rapidement.

L'enrichissement ou l'appauvrissement d'un isotope par rapport à un autre est faible, de l'ordre du millième. On quantifie les variations relatives d'abondance isotopique en utilisant la notation  $\delta$  (delta) exprimée en pour mille (‰). C'est le rapport des deux isotopes d'un élément normalisé par rapport à un standard international et multiplié par 1000 pour une lecture et une manipulation plus aisées. Pour le cuivre, le standard de référence est le NIST 976. La composition isotopique est exprimée par la formule suivante :

$$\delta^{65}\text{Cu} = \left[ \frac{\left(\frac{^{65}\text{Cu}}{^{63}\text{Cu}}\right)_{ech}}{\left(\frac{^{65}\text{Cu}}{^{63}\text{Cu}}\right)_{std}} - 1 \right] * 1000$$

Par définition les valeurs de delta des standards internationaux ou standards de référence sont égales à 0. La valeur absolue des abondances de ces standards n'a aucune importance pratique. Lorsque le delta est positif, on parle de cuivre lourd, d'enrichissement en isotope lourd ou d'appauvrissement en isotope léger par rapport au standard de référence. A l'inverse, lorsque le delta est négatif on parle de cuivre léger, d'enrichissement en isotopes léger ou d'appauvrissement en isotope lourd par rapport au standard de référence.

Jusqu'au milieu des années 90, l'erreur sur les mesures d'abondance isotopique du cuivre, essentiellement obtenues par spectrométrie de masse à thermo-ionisation, était du même ordre de grandeur que la variation naturelle de ces abondances. L'introduction dans les années 1990 de la spectrométrie de masse à plasma induit et à multi-collection (MC-ICP-MS) a permis de réduire le biais analytique en masse et de mesurer avec une très grande précision ces compositions isotopiques pour des applications dans les domaines de la géologie et de la cosmochimie, notamment pour déterminer les âges des roches et minéraux ou comme marqueur des processus géologiques. Puis dans les années 2000 des équipes de recherche commencent à s'intéresser au domaine de la biologie afin de mettre en évidence des processus biochimiques dans le corps humain grâce au fractionnement isotopique. Les métaux tels que le Ca, le Mg, le Cu, le Fe et le Zn ayant un rôle fonctionnel dans ces processus biochimiques sont particulièrement étudiés. Je m'attacherai ici à présenter uniquement le cas du cuivre.

Le fractionnement isotopique du cuivre est lié à son état d'oxydation, à sa coordination et à la nature des ligands qui le lient. Des calculs *ab-initio* de la densité électronique, grâce à la théorie de la fonctionnelle de la densité, permettent en premier lieu de comprendre les mécanismes régissant la distribution des isotopes du cuivre dans les systèmes biologiques. Des facteurs de fractionnements isotopiques le ligands monomères ont ainsi été estimés, les données sont présentées sous forme de rapports de fonctions  $\beta$  de partitions réduites (généralement  $\ln\beta$ ) et l'amplitude de l'enrichissement isotopique à l'équilibre entre deux composés 1 et 2 peut être estimé par  $\ln\beta_1 - \ln\beta_2$  (Albarède et al., 2017b). Ainsi, il a été déterminé que des composés possédant des liaisons avec le cuivre oxydé ( $\text{Cu}^{2+}$ ) ont des compositions isotopiques plus lourdes que les composés possédant des liaisons avec le cuivre réduit ( $\text{Cu}^+$ ) (Albarède et al., 2016; Balter et al., 2013). Aussi, les composés liant le Cu par des ligands à forte électronégativité comme

l'oxygène (lactate, phosphate, sulfate) et l'azote (histidine) ont des compositions isotopiques plus lourdes que les composés liant le Cu par des ligands à plus faible électronégativité comme le soufre (cystéine, glutathion, métallothionéine) (Albarède et al., 2016; Fujii et al., 2014). Par ailleurs, le principe du bilan de masse indique qu'il doit y avoir des réactions physiques ou chimiques pour que se produise un fractionnement isotopique. Si tous les atomes d'un élément sont transportés d'une source vers une cible, aucun fractionnement isotopique ne se produit. Pour qu'il y ait un fractionnement isotopique, le composé métallique doit passer d'un état physique ou d'une composition chimique à un autre entre sa source et sa ou ses cibles.

### **1.2.1 Les compositions isotopiques du cuivre chez la souris**

Bien que l'utilisation de méthodes *in-vitro* apporte un certain nombre d'informations, l'utilisation de modèles animaux en recherche fondamentale reste indispensable pour appréhender la complexité des processus biologiques. L'utilisation de modèles animaux permet notamment des expérimentations irréalisables chez l'Homme, comme par exemple à partir d'ablation d'organes. Les modèles animaux présentent également l'avantage d'être très contrôlés (génétique, conditions environnementales, alimentation...). Cette partie aborde les études de compositions isotopiques du Cu dans des modèles animaux et plus particulièrement murins.

Dans le corps, chaque compartiment (organe ou fluide corporel) peut être considéré comme un « réservoir » où l'absorption et l'excrétion de Cu est régulée par les processus métaboliques (Balter et al., 2013). Il a été montré que chez des souris wild type (WT), chaque compartiment a une signature isotopique particulière dépendante également de l'espèce (Balter et al., 2013) (figure 2). Pour chaque organe, la plage de valeurs de  $\delta^{65}\text{Cu}$  est assez restreinte. Le cuivre est particulièrement lourd dans le rein de souris et les humains présentent des valeurs  $\delta^{65}\text{Cu}$  dans le foie plus faibles que les souris (Balter et al., 2013).

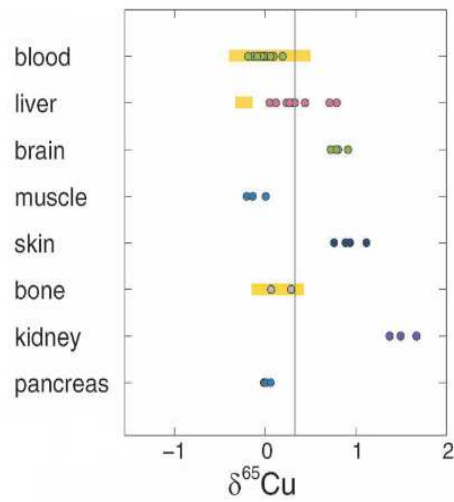


Figure 2 : Variation de la composition isotopique du cuivre dans différents organes de souris. Les variations observées chez l'homme apparaissent surlignées en jaune. D'après Balter et al. 2013.

Des résultats similaires chez des souris contrôles ont été reportés par Costas-Rodríguez *et al.* et Sauzéat (données non publiées). En reportant les valeurs de  $\delta^{65}\text{Cu}$  en fonction de la concentration, on peut voir que le sang et certains organes possèdent une signature isotopique caractéristique (figure 3). Ainsi, le sang, le cœur et les muscles se caractérisent par leur concentration en Cu, alors que le rein, le cerveau et le foie se caractérisent par leur composition isotopique du Cu (figure 3).

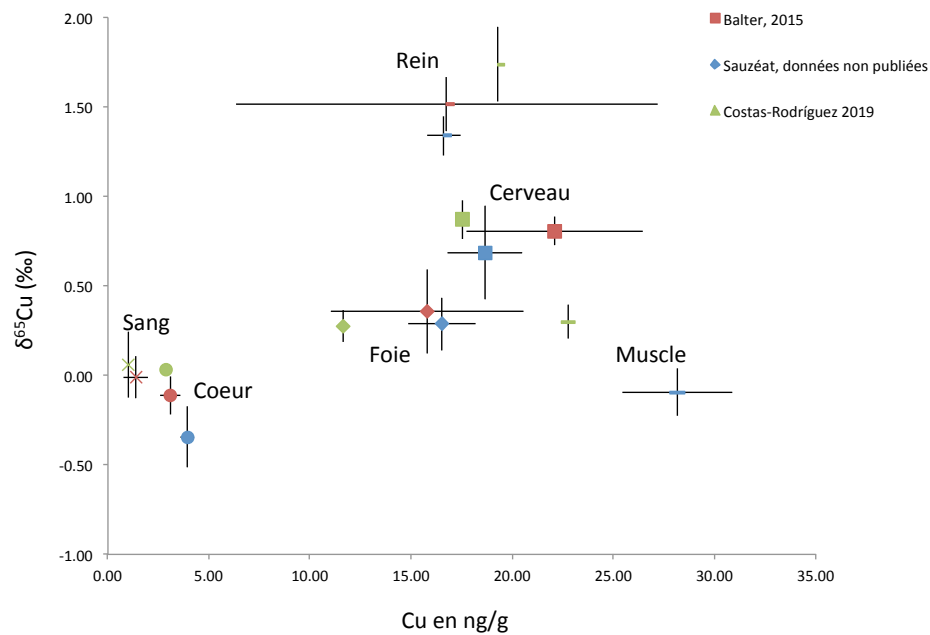


Figure 3 : Compilation de  $\delta^{65}\text{Cu} = f(\text{Cu})$  dans le rein, le cerveau, le foie, le muscle, le cœur et le sang des études de Balter et al. (2015), Costas-Rodríguez *et al.* (2019) et des données non publiées de Sauzéat.

Ce "paysage" isotopique est plus ou moins figé en conditions normales, mais il peut être fortement perturbé en conditions pathologiques. Comme nous le verrons dans le chapitre 1.6, des pathologies telles que la maladie d'Alzheimer, les maladies à prions, la maladie de Wilson, mais également les maladies hépatiques et les cancers sont liées à des dérèglements du métabolisme du cuivre.

Ainsi, par exemple, les compositions isotopiques du cuivre dans le foie présentent la plus large gamme de valeurs, allant de -1.86 ‰ pour des souris *Atp7b*<sup>-/-</sup> (modèle de la maladie de Wilson) à 1.92 ‰ pour des souris *Cu-del* (souris chez lesquelles les sites de liaison au cuivre de la région octarepeat ont été mutés constituant un modèle de la sclérose latérale amyotrophique) (figure 4). Dans le foie de ces dernières souris transgéniques, un enrichissement en isotope lourd du Cu (<sup>65</sup>Cu) par rapport à des souris WT a été observé (figure 4) ainsi qu'un écart caractéristique entre les valeurs de  $\delta^{65}\text{Cu}$  dans sérum et  $\delta^{65}\text{Cu}$  dans le foie ( $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{foie-sérum}}$ ) (Miller et al., 2016). Les auteurs mettent ainsi en évidence que la modification des niveaux d'expression de la protéine prion peut modifier la distribution isotopique du cuivre dans le corps chez les souris transgéniques. Cependant ces variations sont très ténues par rapport aux variations qui peuvent être observées dans le cadre de maladies hépatiques telles que la cholestase ou la maladie de Wilson (figure 4). Chez les souris Wilson, le  $\delta^{65}\text{Cu}$  dans le foie diminue avec l'âge et donc avec l'atteinte hépatique,  $\delta^{65}\text{Cu} = -0.53$  ‰ dans le foie des souris âgées de 11 à 12 semaines, et

$\delta^{65}\text{Cu} = -0.86 \text{ ‰}$  dans le foie des souris âgées de 45 semaines (Lamboux et al., 2020) (figure 4) ; ces résultats seront détaillés dans le chapitre 3. Les souris WT de l'étude de Miller *et al.* ont des valeurs de  $\delta^{65}\text{Cu}$  dans le foie plus élevées que celles des études de Balter *et al.*, Costas-Rodríguez *et al.* et Sauzéat (données non publiées) qui sont similaires (figure 4). Pourtant la composition isotopique du cuivre dans l'alimentation des études de Balter *et al.* et Miller *et al.* était similaire. L'alimentation ne semble donc pas être le seul facteur déterminant la composition isotopique des souris WT dans le foie. Ceci montre la complexité de comparer les différentes études entre elles, et l'importance de correctement décrire l'ensemble des paramètres dans le cadre d'une étude sur un modèle animal.

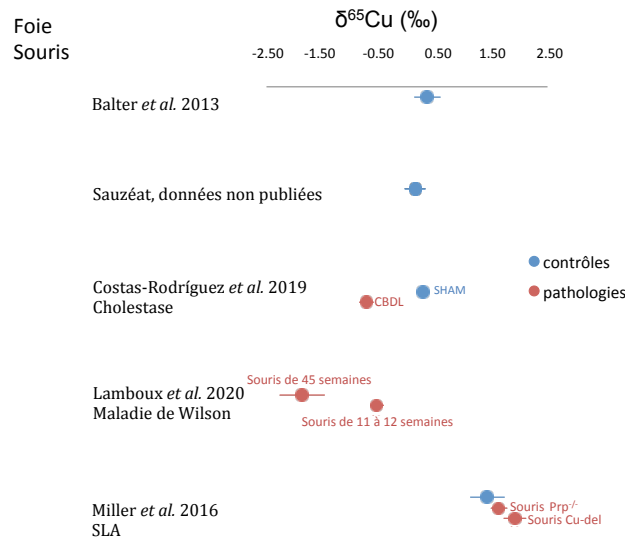


Figure 4 : Variation de la composition isotopique du cuivre dans le foie de souris. CBDL correspond aux souris ayant subi une ligature de la voie biliaire. SHAM correspond aux souris ayant subi une opération fictive. SLA signifie sclérose latérale amyotrophique. Cu-del correspond aux souris pour lesquelles les sites de liaison du cuivre de la région octapereat ont été mutés. PrP<sup>-/-</sup> correspond aux souris pour lesquelles la protéine prion est supprimée.

Les sérums présentent également une gamme de valeurs de  $\delta^{65}\text{Cu}$  relativement large. Les modèles de souris de maladies hépatiques (souris CBDL et souris Atp7b<sup>-/-</sup> de 45 semaines) ont les valeurs de  $\delta^{65}\text{Cu}$  dans le sérum les plus basses (figure 5). Grâce à l'utilisation d'un modèle de souris ayant subi une ligature de la voie biliaire (CBDL), Costas-Rodríguez *et al.* ont pu mettre en évidence l'effet de la cholestase (maladie hépatique entraînant une diminution de la sécrétion

biliaire). Les auteurs ont comparé les compositions isotopiques en cuivre du sérum mais aussi de différents organes de souris ayant subi une ligature de la voie biliaire à celles de souris ayant subi une opération fictive (SHAM). Les résultats montrent que le sérum et l'ensemble des organes des souris ayant subi la ligature de la voie biliaire sont enrichis en isotope léger ( $^{63}\text{Cu}$ ) en comparaison des souris n'ayant pas subi la ligature (figure 4, figure 5 et figure 6) (Costas-Rodríguez et al., 2019). De la même manière que ce qui a été décrit dans le foie, la composition isotopique du cuivre dans le sérum diminue avec l'atteinte hépatique chez la souris Wilson,  $\delta^{65}\text{Cu} = -0.31 \text{ ‰}$  dans le sérum des souris âgées de 11 à 12 semaines, et  $\delta^{65}\text{Cu} = -1.63 \text{ ‰}$  dans le sérum des souris âgées de 45 semaines (Lamboux et al., 2020) (figure 5).

Un effet du sexe sur la composition isotopique du Cu dans le sérum a été observé par Moynier *et al.* ; en effet, la composition isotopique du Cu dans le sérum des souris mâles est plus faible que celle des femelles (Moynier et al., 2019) (figure 5). Ceci a été attribué à une différence de spéciation du Cu et à l'abondance relative du Cu dans le sérum. Il n'y a pas de différence significative de la composition isotopique du Cu chez les souris Alzheimer par rapport aux contrôles (Moynier et al., 2019; Solovyev et al., 2021). Par contre la concentration en Cu dans le sérum des patients atteints de la maladie d'Alzheimer est plus élevée que celle des contrôles (Squitti et al., 2005). Le génotype des souris Alzheimer semble jouer un rôle important dans la composition isotopique du cuivre dans le sérum de souris. En effet les souris transgéniques amyloïdes ont une composition isotopique du Cu dans le sérum plus faible que les souris transgéniques Tau (figure 5), alors que la composition isotopique de l'alimentation de ces deux groupes de souris n'était pas statistiquement différente (elle était même plus faible pour le premier groupe de souris) (Solovyev et al., 2021). Concernant la SLA, le génotype ne semble pas affecter la composition isotopique du Cu dans le sérum, les compositions isotopiques du Cu des souris PrP<sup>-/-</sup> (souris chez lesquelles la protéine prion est supprimée) et les souris Cu-del ne sont pas statistiquement différentes.

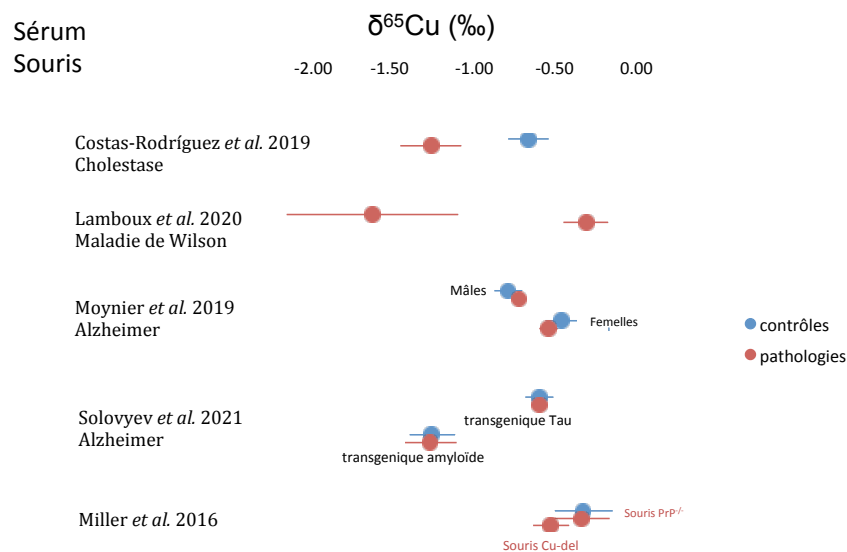


Figure 5 : Variation de la composition isotopique du cuivre dans le sérum de souris. CBDL correspond aux souris ayant subi une ligature de la voie biliaire. SHAM correspond aux souris ayant subi une opération fictive. SLA signifie sclérose latérale amyotrophique. Cu-del correspond aux souris pour lesquelles les sites de liaison du cuivre de la région octapeptate ont été mutés. PrP<sup>-/-</sup> correspond aux souris pour lesquelles la protéine prion est supprimée.

Les cerveaux présentent une gamme de valeurs de  $\delta^{65}\text{Cu}$  plus restreinte (figure 6). Büchl *et al.* n'ont pas trouvé de différence significative dans les compositions isotopiques du Cu dans les cerveaux de souris WT provenant de 4 lignées différentes, mais la plage de valeurs était relativement large (de -0.78 à -0.12 ‰) (Büchl et al., 2008). Ces valeurs sont beaucoup plus faibles que celles reportées dans d'autres études (Balter et al. 2013; Costas-Rodríguez et al. 2019; Moynier et al. 2019, Sauzéat données non publiées), qui sont très similaires entre elles (figure 6). Cette différence pourrait venir de l'alimentation apportée aux souris.

L'expression de la protéine prion modifie le rapport isotopique du Cu dans les cerveaux des souris ; en revanche que la protéine soit supprimée (les souris PrP<sup>-/-</sup>) ou surexprimée (les souris TG20) n'a pas d'impact (Büchl et al., 2008) (figure 6). Il n'y a pas non plus de différence significative de la composition isotopique du Cu dans les cerveaux de souris provenant de la lignée Harry qui sont des souris pour lesquelles la transformation génétique n'a pas de relation avec le Cu (ni avec le Zn) (Büchl et al., 2008) (figure 6). Par contre, la composition isotopique du Cu dans les cerveaux des souris C4 (souris pour lesquelles la protéine prion est dépourvue de la



région octarepeat), est plus élevée que pour les autres souris (Büchl et al., 2008) (figure 6). Ceci montre bien l'implication de la protéine prion dans les mécanismes de régulation du Cu.

Des mesures de  $\delta^{65}\text{Cu}$  dans les cerveaux de différents modèles de souris de la maladie d'Alzheimer ont été comparées à celles de souris WT et n'ont pas montré de différence significative (Moynier et al., 2019; Solovyev et al., 2021) (figure 6). Par contre, des compositions isotopiques du Cu plus faibles dans le sérum par rapport à celles du cerveau de ces souris ont été reportées (Moynier et al., 2019; Solovyev et al., 2021). Mais de manière générale, les valeurs de  $\delta^{65}\text{Cu}$  dans le sérum (de -1.63 à -0.31 ‰) sont plus faibles que celles dans le cerveau (-0.44 à 0.87 ‰) (figure 5 et figure 6).

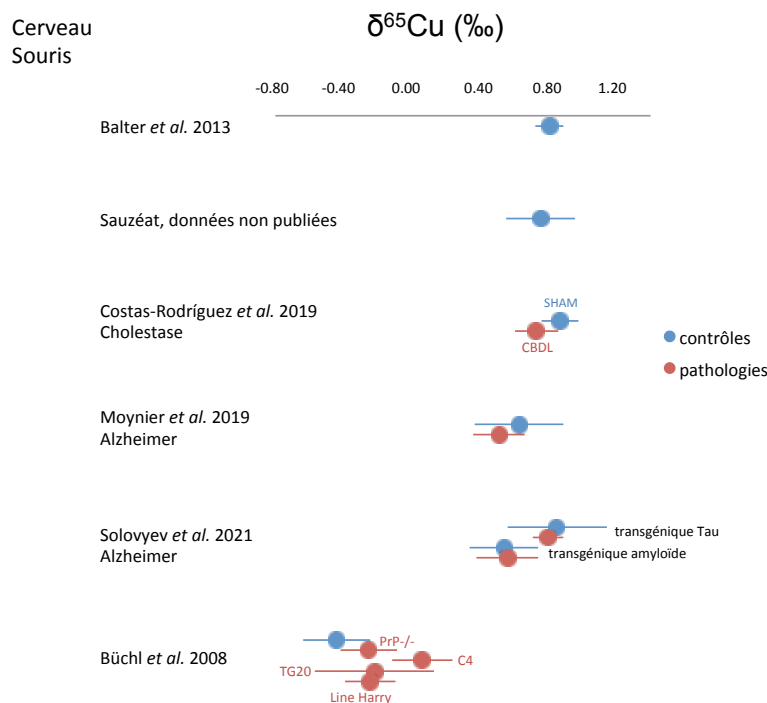


Figure 6 : Variation de la composition isotopique du cuivre dans le cerveau de souris. CBDL correspond aux souris ayant subi une ligation de la voie biliaire. SHAM correspond aux souris ayant subi une opération fictive. C4 correspond aux souris pour lesquelles la protéine prion est dépourvue de la région octarepeat. Line Harry est une lignée de souris pour laquelle la modification génétique n'a aucun lien avec le Cu. Cu-del correspond aux souris pour lesquelles les sites de liaison du cuivre de la région octapereat ont été mutés.

L'ensemble de ces études montre que chaque organe ou fluide biologique a une signature isotopique particulière qui dépend de l'espèce et probablement de l'alimentation. Aussi, des variations à différents niveaux peuvent être observées dans le cas de pathologies liées au métabolisme du cuivre. Une modification mineure dans un système biologique peut faire varier sensiblement la distribution isotopique du système. Dans le foie, qui constitue l'organe de stockage du cuivre, une diminution importante des valeurs de  $\delta^{65}\text{Cu}$  est observée dans le cas d'une pathologie hépatique, et cette diminution est corrélée à l'atteinte hépatique.

## 1.2.2 Les compositions isotopiques du cuivre chez l'Homme

Chez l'Homme, la composition isotopique du cuivre des érythrocytes est plus élevée que celle du sérum, la différence est d'environ 0,8 ‰ (Albarède et al., 2011). Les auteurs reportent des valeurs chez les individus sains pour les sérums de  $\delta^{65}\text{Cu}$  de  $-0,26 \pm 0,40$  ‰ ( $n = 49$ ) (figure 7), pour les érythrocytes de  $0,56 \pm 0,5$  ‰ ( $n = 49$ ) (figure 8). Costas-Rodríguez *et al.* reportent des valeurs de  $\delta^{65}\text{Cu}$  similaires pour les sérums :  $-0,29 \pm 0,27$  ‰ ( $n = 29$ ) (Costas-Rodríguez et al., 2015) (figure 7). La composition isotopique du Cu peut également varier avec le régime alimentaire (Jaouen et al., 2013b; Van Heghe et al., 2012). En étudiant les compositions isotopiques dans les échantillons de sang total de la population yakoute (dont le régime alimentaire est peu diversifié) âgée de 18 à 74 ans, Jaouen *et al.* mettent en évidence une diminution de la composition isotopique du Cu avec l'âge. Plus précisément les femmes pré-ménopausées présentent une valeur de  $\delta^{65}\text{Cu}$  dans le sang de  $-0,52 \pm 0,22$  ‰ ( $n = 14$ ), alors qu'après la ménopause,  $\delta^{65}\text{Cu}$  est de  $-0,84 \pm 0,34$  ‰ ( $n = 17$ ), comparable à celles des hommes qui est de  $-0,74 \pm 0,30$  ‰ ( $n = 8$ ) (Jaouen et al., 2013a) (figure 8). Cependant une autre étude montre que la composition isotopique du Cu tend à augmenter dans le sang chez les femmes après la ménopause (Van Heghe et al., 2014). Chez les femmes la mise en place de la ménopause entraîne une modification de la composition isotopique du cuivre dans le sang (Jaouen et Balter 2014; Jaouen et al. 2013; Van Heghe et al. 2014) mais il est possible que le facteur ethnique et le régime alimentaire puissent jouer un rôle important. Afin de s'affranchir de ces facteurs, les modèles animaux restent donc particulièrement intéressants.

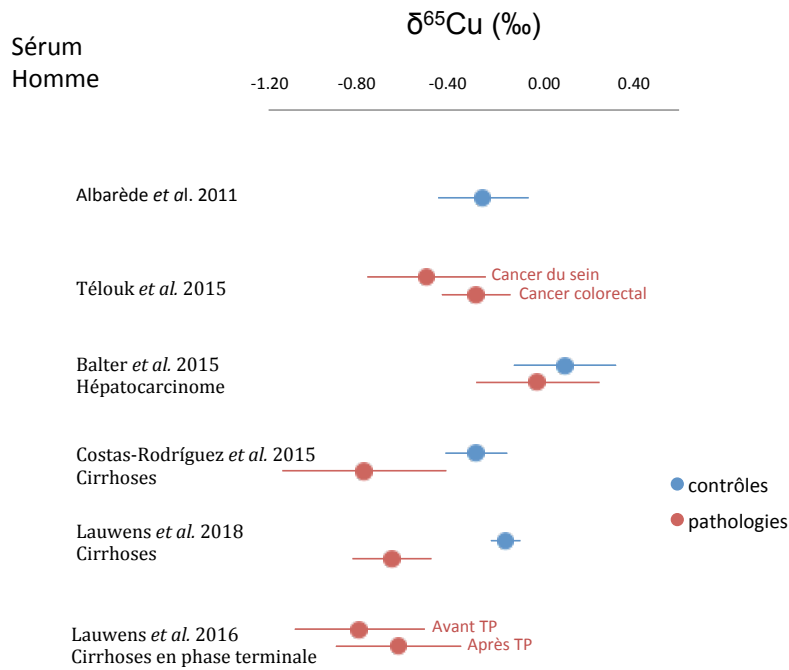


Figure 7 : Variation de la composition isotopique du cuivre dans le sérum humain. TP signifie transplantation

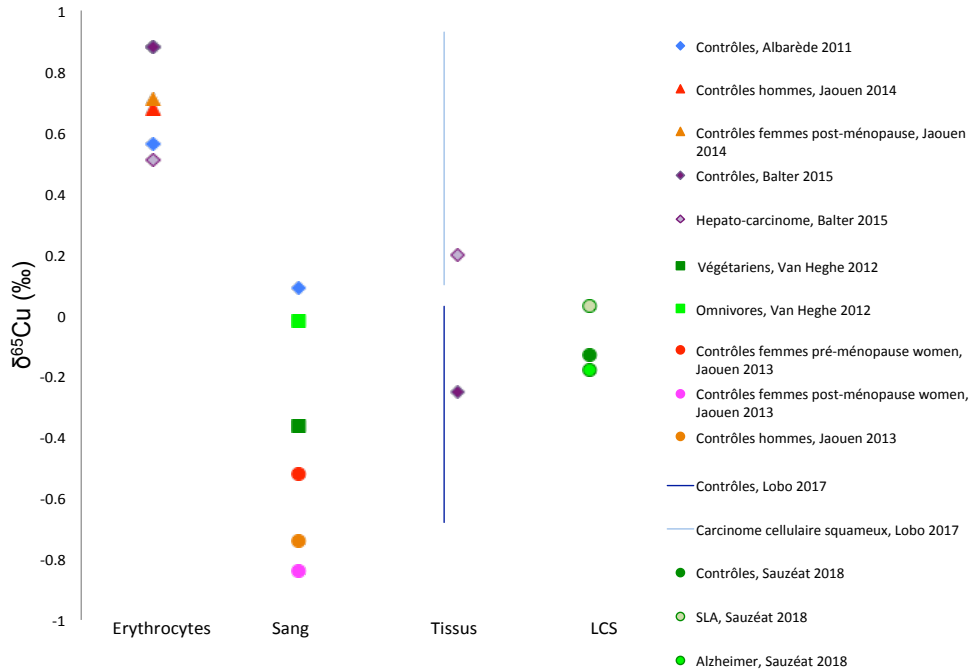


Figure 8 : Variation de la composition isotopique du cuivre chez l'Homme dans les érythrocytes, le sang total, les tissus et le liquide cébrospinal (LCS). ALS signifie amyotrophic lateral sclerosis. Les traits bleus correspondent à des plages de mesure.

#### Les compositions isotopiques du cuivre au sein même des protéines :

Les calculs *ab-initio* permettent de prédire les valeurs de compositions isotopiques des protéines à cuivre. Ils ont notamment permis de montrer que des isotopes lourds ( $^{65}\text{Cu}$  dans le cas du cuivre) se lient préférentiellement à des composés possédant des ligands à forte électronégativité comme l'oxygène (sulfate, phosphate, lactate) ou des groupements azotés (histidine). A l'inverse les isotopes légers ( $^{63}\text{Cu}$  dans le cas du cuivre) se lient préférentiellement aux composés possédant des ligands à faible électronégativité comme des composés soufrés (cystéine, méthionine) (Albarède et al., 2016). Aussi les composés liant du cuivre oxydé (Cu II) seront enrichis en isotopes lourds alors que les composés liant du cuivre réduit (Cu I) seront enrichis en isotopes légers (Balter et al., 2013).

Les ions cuivriques ( $\text{Cu}^{2+}$ ) liés à la céruloplasmine sont réduits en ions cuivreux ( $\text{Cu}^+$ ) par STEAP1 (Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate member 1) avant leur absorption dans les cellules intestinales par CTR1 (copper transporter 1) ce qui entraîne un

enrichissement en isotopes légers au sein des cellules. Aussi l'échange du cuivre entre la céruloplasmine et ATP7B a un impact significatif sur le fractionnement du cuivre sérique. En supposant que le cuivre sérique est lié à 90 % à la céruloplasmine et 10 % à l'albumine et que  $\delta^{65}\text{Cu}_{(\text{sérum})} = 0,52 \pm 0,08 \text{ ‰}$ , les calculs *ab-initio* permettent d'établir que  $\delta^{65}\text{Cu}_{(\text{céruloplasmine})} = 0,54 \pm 0,1 \text{ ‰}$ , et  $\delta^{65}\text{Cu}_{(\text{albumine})} = 0,08 \pm 0,25 \text{ ‰}$  (Tennant et al., 2017).

Au sein des cellules hépatiques un fractionnement se produit entre les différentes protéines à cuivre. Ainsi les protéines couplées à l'ion cuivrique comme la céruloplasmine (CP), la superoxyde dismutase (SOD1) et la cytochrome c oxydase (CCO) sont enrichies en isotopes lourds par rapport à celles liées à l'ion cuivreux comme la métallothionéine (MT), les métallochaperones (CCS, ATOX1, Cox17), ATP7B et ATP7A.

Aussi dans des cellules de levure, la composition isotopique du Cu dans la MT possédant des liaisons Cu-S, est plus faible ( $\delta^{65}\text{Cu}_{(\text{MT})} = -2,13 \text{ ‰}$ ) que celle dans la SOD1 ( $\delta^{65}\text{Cu}_{(\text{SOD1})} = -1,6 \text{ ‰}$ ) (Zhu et al., 2002). En étudiant la composition isotopique du Cu dans les cerveaux de patients post-mortem, Larner *et al.* ont également montré que la SOD1 est enrichie en isotopes lourds par rapport à la MT (Larner et al., 2019). Ce qui confirme que les composés avec des ligands azotés (SOD) favorisent les liaisons avec les isotopes lourds, alors que les composés avec des ligands soufrés (MT) favorisent plutôt les liaisons avec les isotopes légers.

#### Les compositions isotopiques du cuivre chez les patients atteints de cancer :

Les niveaux élevés en cuivre observés chez les patients atteints de cancer (cf. détails chapitre 1.6.1 ) ont incité les équipes de recherche à s'intéresser aux variations isotopiques du cuivre chez ces malades. De plus, les biomarqueurs utilisés traditionnellement à des fins de diagnostic et de pronostic sont généralement spécifiques à un cancer et nécessitent bien souvent une biopsie. Une étude portant sur les compositions isotopiques du cuivre dans le sérum de patients atteints de cancer du sein et de cancer colorectal montre que les abondances du cuivre permettent de prédire la mortalité chez ces patients. On observe une diminution significative ( $p\text{-value} < 0,05$ ) du  $\delta^{65}\text{Cu}$  chez les patients atteints de cancer du sein et cancer colorectal par rapport aux contrôles (Télouk et al., 2015). L'abondance isotopique du cuivre permettrait de prédire la mortalité dans le cas de cancer colorectal avec une probabilité d'erreur de 0,018, et dans le cas de cancer du sein avec une probabilité d'erreur de 0,006 (Télouk et al., 2015). La plupart des patientes atteintes de cancer du sein considérées dans cette étude avec un  $\delta^{65}\text{Cu}$  dans le sérum inférieur au seuil de  $-0,35 \text{ ‰}$  n'ont pas survécu au delà de quelques mois (Télouk et al., 2015) (figure 9). Cette diminution de la composition du cuivre chez les personnes atteintes de cancer colorectal et cancer du sein a été attribuée à la chélation du cuivre par le lactate cytosolique. En effet, en conditions hypoxiques, les cellules cancéreuses produisent de l'ATP par

glycolyse, ce qui entraîne une production de lactate, ceci est connu sous le nom d'« effet Warburg ». Une quantité importante de lactate (favorisant les isotopes lourds) produit par effet Warburg semble donc entraîner une accumulation d'isotopes lourds au sein des cellules tumorales (Télouk et al., 2015). Il convient de noter que la valeur seuil retenue ici (-0.35 ‰) n'a pas été déterminée en prenant en compte des paramètres tels que l'âge ou encore le régime alimentaire qui sont connus pour modifier la composition isotopique du Cu dans le sang.

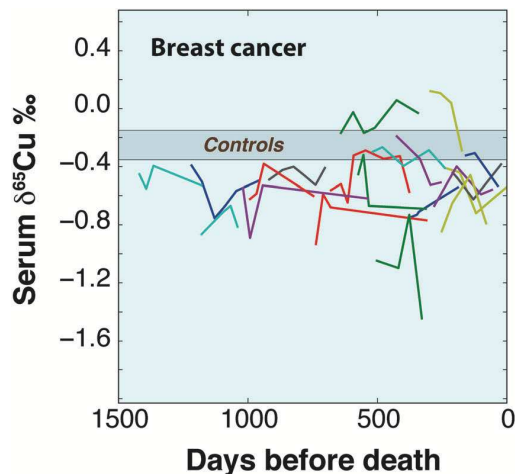


Figure 9 : Suivi longitudinal de la composition isotopique du cuivre ( $\delta^{65}\text{Cu}$ ) sérique de 20 patientes atteintes de cancer du sein. Chaque ligne représente une patiente. La bande grise représente les limites de  $\delta^{65}\text{Cu}$  75 % de contrôles femmes. D'après Télouk et al. 2015

Par ailleurs, dans le sérum et les érythrocytes de patients atteints d'hépatocarcinome, les concentrations en cuivre sont très significativement plus élevées, et les compositions isotopiques plus faibles, comparées à celles des contrôles (Balter et al., 2015). Les tissus tumoraux sont quand à eux enrichis en isotopes lourds par rapport aux tissus péri-tumoraux et ce de manière extrêmement significative (Balter et al., 2015) (figure 8). Les variations de la composition isotopique du Cu dans le sérum et les érythrocytes de patients atteints d'hépatocarcinome semblent donc bien corrélées avec les variations de la composition isotopique du Cu dans la tumeur elle-même. Cette variation des compositions isotopiques du cuivre chez ces patients a notamment été attribuée à la mobilisation massive dans le corps du cuivre lié à la MT riche en cystéine (favorisant les isotopes légers) entraînant un enrichissement en  $^{65}\text{Cu}$  dans la tumeur et un appauvrissement dans le sang (Balter et al., 2015).

Une autre étude portant sur les personnes atteintes de carcinome cellulaire squameux montre également que les tissus tumoraux ont une concentration en Cu plus élevée et une composition isotopique du Cu enrichie en isotopes lourds par rapport aux tissus non tumoraux

(p-value = 0.0017) (Lobo et al., 2017) (figure 8).

Plus récemment des expériences ont été menées sur des cultures cellulaires pour tenter de montrer les mécanismes sous-jacents aux fractionnements observés. Ainsi, Bondanese *et al.* ont montré que la composition isotopique du Cu de cellules d'hépatocarcinome humain (HepG2) est plus élevée lorsque les cellules sont cultivées en conditions hypoxiques comparativement à celles cultivées en milieu normal (Bondanese et al., 2016). L'absorption accrue du Cu par les transporteurs de haute affinité hCTR1 serait à l'origine de cet enrichissement en isotopes lourds en conditions hypoxiques chez le modèle de cellules eucaryotes *Saccharomyces cerevisiae* (Cadiou et al., 2017). Or un environnement hypoxique favorise la formation de ROS. En comparant les variations isotopiques de cellules d'hépatocarcinome cultivées en conditions de stress oxydatif versus en conditions normales, Flórez *et al.* ont d'ailleurs montré que le stress oxydatif était à l'origine d'une augmentation des valeurs  $\delta^{65}\text{Cu}$  au sein des cellules (Flórez et al., 2018). L'accumulation intracellulaire de ROS incite donc les cellules à excréter le cuivre léger et ainsi certainement limiter la charge en  $\text{Cu}^+$  afin de se protéger de la formation de radicaux libres qui pourraient se former par réaction de  $\text{Cu}^+$  avec  $\text{H}_2\text{O}_2$  selon le mécanisme de Fenton et induire un stress oxydatif.

#### Les compositions isotopiques du cuivre chez les patients atteints de maladies hépatiques :

Les récents travaux portant sur l'analyse des isotopes du cuivre ont également permis de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans certaines hépatopathies. Costas-Rodríguez *et al.* ont montré que le  $\delta^{65}\text{Cu}$  du sérum variait avec la sévérité de la maladie hépatique et qu'il était plus faible chez les personnes atteintes de cirrhose ( $\delta^{65}\text{Cu} = -0,78 \pm 0,72 \text{ ‰}$ , n=25) par rapport à un groupe de contrôles ( $\delta^{65}\text{Cu} = -0,29 \pm 0,27 \text{ ‰}$ , n=29) (Costas-Rodríguez et al., 2015) (figure 8). Ceci pourrait être attribué à une mauvaise incorporation du cuivre dans la céruloplasmine, ou à une altération de l'excrétion biliaire du cuivre, ou encore à une modification des conditions redox. Les résultats montrent que les patients avec une complication ou en phase terminale avaient les valeurs de  $\delta^{65}\text{Cu}$  les plus faibles et la dispersion des mesures était plus importante. Aussi, la composition isotopique du Cu dans le sérum des patients atteints d'une hépatopathie en phase terminale, accompagné ou non d'un carcinome hépatocellulaire n'est pas significativement différente mais la différence avec les contrôles est significative (Lauwens et al., 2016) (figure 8). De plus, après une transplantation du foie, la composition isotopique du Cu dans le sérum a augmenté, et s'est normalisée montrant que les fonctions hépatiques sont restaurées (Lauwens et al., 2016) (figure 8).

La mesure de la composition isotopique du Cu dans le sérum semble donc être un outil puissant pour apprécier les fonctions hépatiques.

Les compositions isotopiques du cuivre chez les patients atteints de maladies neuro-dégénératives :

La composition isotopique du Cu dans le liquide cébrospinal (ou liquide céphalo-rachidien) est enrichie en isotope lourd ( $^{65}\text{Cu}$ ) chez les patients atteints de sclérose latérale amyotrophique comparée à celle des patients atteints d'Alzheimer et des contrôles (Sauzéat et al., 2018b) (figure 8). Cette signature isotopique du Cu est attribuée à une agrégation anormale des protéines dans le parenchyme cérébral, et pourrait constituer un nouveau marqueur de diagnostic de la maladie.

L'ensemble de ces études montre que la composition isotopique du cuivre dans le sang, les érythrocytes et le sérum varie en fonction de différents paramètres tels que le sexe, l'âge ou le régime alimentaire. D'importantes variations ont été observées dans le cas de pathologies telles que les cancers, les maladies hépatiques et neuro-dégénératives. La composition isotopique du cuivre est notamment plus faible dans les sérums de personnes atteintes de cancers que celles des contrôles. Par contre les tissus tumoraux ont une composition isotopique du Cu plus élevée que les mêmes tissus non-tumoraux. Les variations de la composition isotopique du Cu semblent également être liées à l'atteinte hépatique. Ces résultats ont conduit à proposer l'analyse isotopique du Cu comme outil de diagnostic ou pronostic à partir d'échantillons prélevés de manière relativement peu invasive.

Cependant, les mécanismes biochimiques à l'origine de ces fractionnements isotopiques ne sont à l'heure actuelle pas encore tout à fait élucidés. La question de savoir par quel mécanisme le sang porte la signature isotopique d'une tumeur reste en suspens. Le modèle humain étant très complexe, des modèles animaux, essentiellement murins, ont été utilisés dans plusieurs études. Bien que ces modèles animaux s'approchent seulement de l'humain et ne le représentent pas parfaitement, ces études ont permis de décrire des mécanismes liés au fractionnement des isotopes du Cu. Les modèles cellulaires représentent un outil de choix qui tend à être de plus en plus exploité par les équipes de recherche pour expliquer les mécanismes cellulaires.



## 1.3 Le cuivre chez l'Homme et les besoins alimentaires

Le cuivre est un élément bio-essentiel. Après le fer et le zinc, le cuivre est l'élément trace le plus abondant dans le corps humain. Au total on retrouve 75 à 100 mg de Cu dans le corps humain répartis dans tous les tissus et la plupart des fluides corporels dont la concentration est donnée dans le tableau 1.

Concentration en cuivre en  $\mu\text{g/g}$  \*

Tissus / organe	Hamilton, 1973	Linder, 1991	Lech et Sadlik, 2007
Rein	2.1 ± 0.4 (8)	12 ± 7 (19)	2.2 ± 0.9 (76)
Foie	15 ± 4 (9)	6.2 ± 0.8 (9)	3.5 ± 1.5 (79)
Cerveau	5.6 ± 0.2 (2)	5.2 ± 1.1 (10)	3.3 ± 1.5 (43)
Cœur		4.8 ± 1.9 (14)	3.3 ± 0.6 (5)
Os		4.1 ± 1.3 (8)	
Estomac			1.1 ± 0.8 (65)
Rate		1.5 ± 0.4 (14)	1.2 ± 0.3 (3)
Poumons	2.2 ± 0.2 (11)	1.3 ± 0.4 (11)	1.9 ± 1.3 (27)
Sang	1.2 ± 0.02 (168)	1.1 ± 0.1 (5)	0.9 ± 0.2 (73)
Muscle	0.7 ± 0.02 (7)	0.9 ± 0.3 (7)	
Peau		0.8 ± 0.4 (9)	
Cheveux		2 ± 6 (21)	
Ongles		20 ± 17 (10)	
Intestins			1.5 ± 1.2 (25)

\* Moyenne ± SD (n)

Tableau 1 : Concentration en cuivre dans les organes et fluides corporels humain (Hamilton et al., 1973; Lech and Sadlik, 2007; Linder, 1991)

Environ 50 % du Cu est localisé dans les os et les muscles, 15 % dans la peau, 15 % dans la moelle épinière, entre 8 et 15 ‰ dans le foie et 8 ‰ dans le cerveau (Angelova et al., 2011). Par ailleurs, la concentration sanguine de Cu augmente avec l'âge (Malavolta et al., 2015; Mezzetti et al., 1998) et l'inflammation (Milanino et al., 1993).

En tant que cofacteur d'enzymes métaboliques, il joue un rôle essentiel dans le métabolisme humain, agit dans la synthèse de neurotransmetteurs, permet la détoxification de radicaux, a un rôle dans le métabolisme du fer ainsi que dans d'autres processus physiologiques. Son temps de séjour dans le corps humain est inférieur à 20 jours. Après absorption du Cu dans l'intestin, il est

acheminé par le sang vers le foie qui constitue un véritable réservoir à Cu et qui le distribue aux autres organes (reins, cerveau, cœur...) et l'excrète via la bile.

### **1.3.1 Le cuivre dans l'intestin**

L'entrée du Cu dans les entérocytes est réalisée par hCTR1 au niveau du pôle basolatéral (Zimnicka et al., 2007) et par DMT1 (Divalent Metal Transporter 1) au niveau du pôle apical (Arredondo et al., 2003). Le Fe peut alors entrer en compétition avec le Cu ; le transport de l'un influençant celui de l'autre (Linder et al., 2003). Le Cu est ensuite transporté principalement par la métallothionéine (MT) et ATOX1. L'excrétion du Cu est régulée par ATP7A situé dans l'appareil de Golgi (Monty et al., 2005). Le Cu est ensuite transporté par les protéines sanguines vers le foie.

### **1.3.2 Le cuivre dans le sang**

Dans le sérum, 40 à 70 % du Cu est lié à la céruloplasmine (appelée également ferroxidase I), 10 à 15 % à l'albumine et 5 à 15 % à l'alpha-2-macroglobulin (Linder, 2016). La céruloplasmine a pour fonction d'oxyder le fer ferreux ( $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$ ) qui est nécessaire pour obtenir la liaison du fer à la transferrine (Linder and Hazegh-Azam, 1996). Elle a également des fonctions antioxydantes. L'albumine est le principal transporteur de cuivre échangeable.

### **1.3.3 Le cuivre dans le foie**

Le cuivre est distribué au pôle sinusoidal des hépatocytes sous forme  $Cu^{2+}$ , d'où il sera distribué de manière hétérogène (Luza and Speisky, 1996) aux transporteurs de haute affinité hCTR1 et hCTR2. Il est alors réduit sous forme  $Cu^+$ , ce qui est indispensable pour l'assimilation du Cu par les hépatocytes. Les chaperonnes intracellulaires captent le Cu pour le distribuer aux organites. Au niveau de l'appareil de Golgi,  $Cu^+$  est oxydé en  $Cu^{2+}$  et il est ensuite incorporé à la CP produite à l'intérieur des vésicules pour le transport du Cu dans le sang (Healy and Tipton, 2007). Les hépatocytes sont également responsables de l'excrétion biliaire de l'excès de Cu grâce à ATP7B situé dans l'appareil de Golgi. Lorsque les concentrations de Cu cellulaire augmentent, le Cu

agrégé dans les vésicules et redistribué par l'ATP7B dans les canalicules biliaires, déversant ainsi le Cu dans l'intestin grêle (Schaefer et al., 1999).

### **1.3.4 Le cuivre dans les reins**

La teneur en Cu dans les reins est avec celle dans le foie parmi les plus élevées dans le corps (Linder and Hazegh-Azam, 1996). Les 2 transporteurs du Cu, ATP7A et ATP7B, contribuent principalement à la régulation du Cu dans les reins (Linz et al., 2008). L'ATP7A permet l'excrétion du Cu en excès dans les reins via les membranes basolatérales (Linz et al., 2008). Les 2 protéines sont présentes dans les glomérules, et ATP7B est également présente dans la médullaire rénale (Moore and Cox, 2002). CTR1 est également présente dans les cellules rénales et favorise l'absorption du Cu (Nose et al., 2006).

### **1.3.5 Le cuivre dans le cerveau**

Le Cu est essentiel au développement du système nerveux central (Madsen and Gitlin, 2007). Il a un rôle crucial dans la synthèse des neurotransmetteurs, dans la production de myéline et dans le contrôle de la communication entre les neurones (Opazo et al., 2014). Plusieurs études ont montré que le Cu était inégalement réparti dans le cerveau, en général, les concentrations en Cu dans la matière grise sont plus élevées que dans la matière blanche (Scheiber et al., 2014).

Le cuivre est délivré au cerveau par CTR1 présent dans le plasma. Il est alors transporté à travers 2 membranes, la barrière hémato-encéphalique et la barrière sang - liquide céphalorachidien (Zheng and Monnot, 2012) qui permettent d'isoler le système nerveux central de la circulation sanguine.

Les protéines ATP7A et ATP7B jouent un rôle central dans la distribution du Cu dans les différents compartiments du système nerveux central (Crisponi et al., 2010). Dans la maladie de Menkes qui est due à une mutation du gène ATP7A, le transport du Cu dans le cerveau est altéré et entraîne une démyélinisation (destruction de la gaine de myéline qui entoure et protège les fibres nerveuses) et une dégénérescence (Madsen and Gitlin, 2007). Dans la maladie de Wilson due à une mutation du gène ATP7B, le Cu après s'être accumulé dans le foie, peut s'accumuler dans le cerveau et entraîner des troubles neurologiques (tremblements, dysarthrie, dystonie...) et psychiatriques (dépression, psychose...). La protéine précurseur amyloïde et la protéine

prion lient le Cu et sont les principaux régulateurs de l'homéostasie neuronale (Crisponi et al., 2010).

D'autres enzymes telles que SOD1, la tyrosinase, CP, l'héphaestine ou encore CCO dépendent du Cu pour leur fonction dans le cerveau.

### 1.3.6 Les besoins alimentaires en cuivre

La déficience ou l'excès de Cu, en tant qu'oligo-élément essentiel, peuvent être préjudiciable à la santé. La recommandation alimentaire en Cu pour un adulte est de 0,9 mg par jour (Micronutrients, 2001). Une alimentation normale et équilibrée apporte généralement entre 1 et 3 mg de Cu par jour et assure ainsi les apports nécessaires. Entre 55 % et 75 % du Cu ingéré est absorbé au cours de la digestion (Linder and Hazegh-Azam, 1996). Le reste étant directement éliminé dans les selles. Les principales sources de Cu de l'alimentation se retrouvent dans les abats, en particulier le foie, suivis des fruits de mer, des noix et des graines. Les concentrations en Cu dans divers produits alimentaires sont présentées dans le tableau 2.

Type d'aliment	Concentration en Cu en µg/g
Fruits de mer (poissons, crustacés et mollusques)	1,49
Viandes (bœuf, porc, agneau, volaille)	3,92
Oeufs et produits laitiers (beurre, lait)	1,76
Légumes (pois, carottes, betteraves, navet...)	1,17
Fruits (noix de coco, pommes, papaye...)	0,82
Graines et céréales	2,02
Huiles et graisses	4,63
Noix	14,82
Condiments et épices	6,76
Boissons (vin, bière)	0,44

Tableau 2: Concentrations moyennes en cuivre dans divers aliments (Schroeder et al., 1966)

## 1.4 Métabolisme du cuivre

Dans le corps humain, Cu est présent sous ses deux états d'oxydation : le cuivre cuivreux ( $\text{Cu}^+$ ) et le cuivre cuivriques ( $\text{Cu}^{2+}$ ) (Kim et al., 2008) que l'on retrouve dans un très grand nombre d'enzyme. Au cours des processus chimiques,  $\text{Cu}^+$  aura une préférence pour les ligands donneurs de soufre tels que la cystéine ou la méthionine, alors que  $\text{Cu}^{2+}$  préfère des donneurs d'azote tels que l'histidine ou des donneurs d'oxygène tels que le glutamate ou l'aspartate (Kim et al., 2008). Après digestion des aliments dans l'estomac et le duodénum, Cu est absorbé principalement (ou exclusivement) dans l'intestin grêle (Linder and Hazegh-Azam, 1996). L'assimilation du Cu se fait par la traversée de la membrane apicale des entérocytes par un transporteur de haute affinité hCtr1 (Zhou and Gitschier, 1997). Le cuivre se lie alors à 2 protéines, l'albumine et la transcupréine dans le liquide interstitiel et le plasma sanguin (Linder and Hazegh-Azam, 1996). Rapidement, la majeure partie de ce Cu lié est déposé dans le foie (Linder and Hazegh-Azam, 1996) par le même transporteur hCtr1, le reste est déposé dans les reins et d'autres tissus. Le foie joue un rôle essentiel dans l'homéostasie du Cu, notamment en permettant l'excrétion de l'excès de Cu en dehors du corps. Alors que dans les cellules intestinales c'est l'ATPase ATP7A qui reçoit Cu, dans les cellules hépatiques c'est ATP7B (Lutsenko et al., 2007). Elles ont toutes les deux le même rôle qui est de distribuer le Cu aux protéines dans l'appareil de Golgi et d'excréter le Cu en excès hors de la cellule. Le foie constitue un véritable réservoir de Cu. En effet grâce à ATP7B, le foie distribue alors aux autres organes et par la circulation sanguine le Cu lié à la CP (Collins et al., 2010) une ferroxidase sécrétée par les hépatocytes. ATP7B a également pour rôle de réguler la concentration intracellulaire du Cu. Comme nous le verrons plus loin une mutation du gène *ATP7B* qui code la protéine du même nom est à l'origine de la maladie de Wilson. C'est lorsque la concentration intracellulaire en Cu atteint un niveau de toxicité, qu'ATP7B se déplace de l'appareil de Golgi vers le pôle apical de la cellule. Le cuivre est alors déversé dans la canicule biliaire où il est excrété avec la bile puis transporté vers les intestins afin d'être éliminé en majeure partie par les fèces. Le Cu peut être également éliminé en très faible proportion par les urines.

Un schéma du cycle du cuivre est représenté sur la figure 10, modifiée d'après (Sauzéat, 2018).

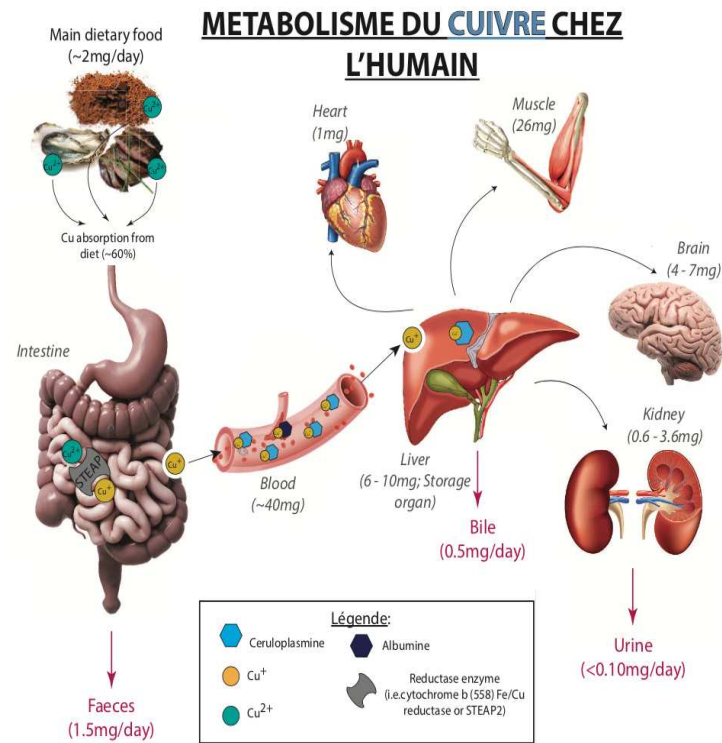


Figure 10 : Métabolisme du cuivre chez l'Homme ; simplifié d'après Sauzéat (2018)

A l'échelle cellulaire, Cu est transporté par la protéine Ctr1 (Prohaska and Gybina, 2004). A l'intérieur des cellules, il est acheminé vers les différentes organelles par des protéines chaperons ou métallo chaperons. Notamment la CCS qui transporte et donne le cuivre (I) à SOD1 dans le cytosol et COX17 qui transporte et donne son cuivre à la (CCO) située dans les mitochondries. CCO est une enzyme jouant un rôle dans la chaîne respiratoire mitochondriale (Horn and Barrientos, 2008; Iwata et al., 1995). Et la protéine métallo chaperon ATOX1 qui délivre son cuivre à une ATPase située dans l'appareil de Golgi ATP7A ou ATP7B (dans les hépatocytes).

Dans le cytosol, ATOX1 interagit directement avec les ATPases de transport du cuivre et joue un rôle essentiel dans l'homéostasie du Cu (Hamza et al., 2003). Par ailleurs, il existe d'autres protéines, les MT qui ont pour rôle de séquestrer Cu et d'autres métaux en excès dans les cellules (Daniel, 2004). Dans les hépatocytes, le cuivre lié à la CP est alors sécrété dans la voie circulatoire du sang. L'excès de Cu cytosolique est alors excrété dans la bile. La figure 11 schématise le cycle du Cu à l'échelle cellulaire.

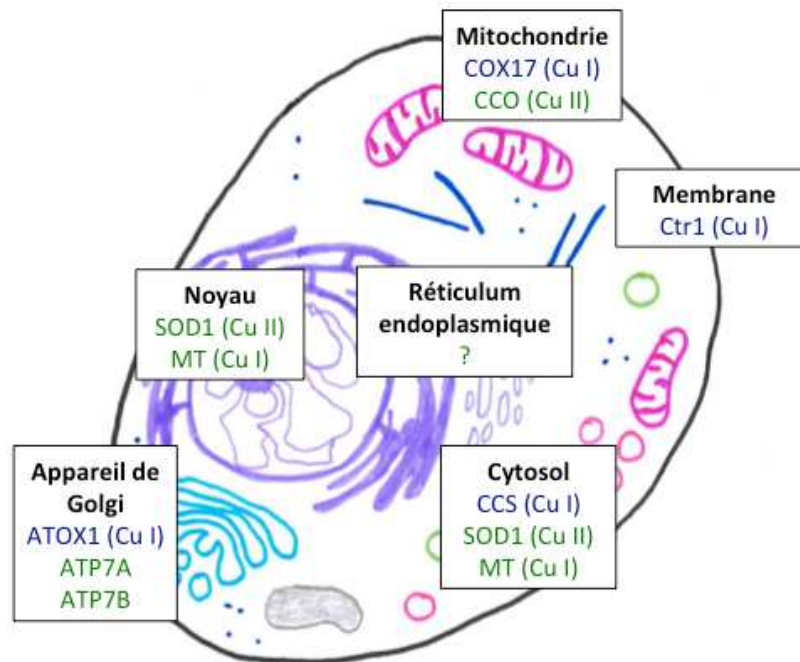


Figure 11: Schéma cellulaire de localisation des protéines à cuivre. Les protéines de transport sont indiquées en bleu.

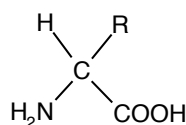
## 1.5 Les protéines à cuivre

### 1.5.1 Quelques définitions

Les protéines sont des molécules formées par une ou plusieurs *chaînes polypeptidiques*.

Une chaîne polypeptidique est une chaîne *d'acides aminés* reliés par des *liaisons peptidiques*.

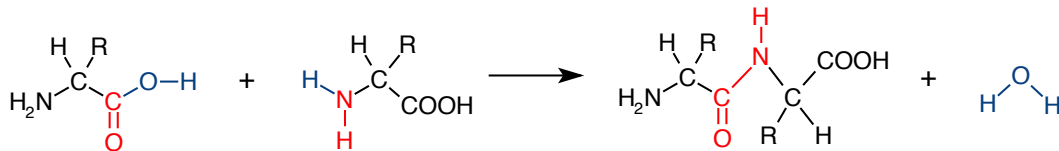
Un acide aminé est un composé organique possédant un carboxyle (-COOH) et un groupement amine (-NH<sub>2</sub>) :



Parmi les 22 acides aminés que l'on retrouve dans les protéines, la cystéine, l'histidine et la méthionine sont par exemple présentes dans les protéines à cuivre :



La liaison peptidique est une liaison chimique qui se forme entre la fonction carboxyle (-COOH) d'un premier acide aminé et la fonction amine (-NH<sub>2</sub>) de l'acide aminé suivant avec formation d'une molécule d'eau :

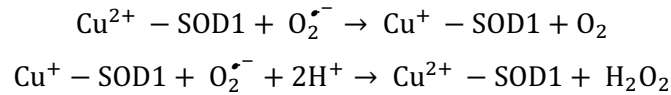


## 1.5.2 La superoxyde dismutase (SOD)

Il existe plusieurs formes de superoxyde dismutases. Je détaillerai ici uniquement des formes présentes chez l'Homme et plus particulièrement SOD1 (figure 12) qui est une des deux formes CuZn-SOD. La deuxième forme des CuZn-SOD est SOD3, c'est une protéine extracellulaire, qui peut se lier à la surface des membranes cellulaires et protège ainsi les cellules du stress oxydant exogène. Chez l'homme, il existe également une troisième forme : la Mn-SOD (SOD2) qui se situe au niveau des mitochondries. SOD1 est une protéine que l'on retrouve principalement dans le cytosol, mais également au niveau des lysosomes et dans l'espace intermembranaire mitochondrial (1 à 5 %) (Okado-Matsumoto and Fridovich, 2001). Elle a un poids moléculaire de 32000 Da, et est composée de 2 sous-unités, l'une comportant un ion Cu<sup>2+</sup> (complexé à 4 histidines), l'autre un ion Zn<sup>2+</sup> (complexé à l'une des histidines) (Fridovich, 1975). SOD1 est encodée par le gène SOD1 présent sur le chromosome 21.

La respiration cellulaire engendre des radicaux libres de l'oxygène (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) très toxiques pour les cellules. SOD1 catalyse la réaction de dismutation du superoxyde en formant du dioxygène et du peroxyde d'oxygène suivant les réactions suivantes :





Des mutations de SOD1 peuvent être à l'origine de la forme familiale de la SLA (Deng et al., 1993; Rosen et al., 1993).

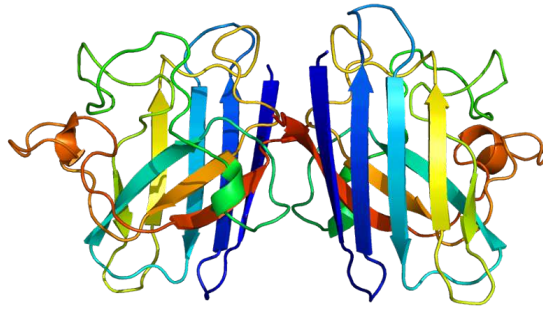
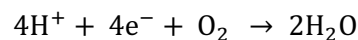


Figure 12 : Structure de la SOD1  
Source : Wikipedia

### 1.5.3 La cytochrome c oxydase (CCO)

CCO est également appelée complexe IV, c'est une protéine localisée dans la membrane interne mitochondriale, elle termine la chaîne respiratoire mitochondriale et a pour rôle de catalyser le transfert d'électron du cytochrome C à  $\text{O}_2$  en le réduisant en  $\text{H}_2\text{O}$  selon la réaction suivante :

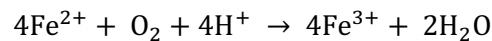


Elle est composée de 13 sous-unités dont certaines sont encodées par des gènes nucléaires d'autres par des gènes mitochondriaux. CCO contient 2 fragments hèmes (a et  $\text{a}_3$ ) et 2 centres de cuivre ( $\text{Cu}_A$  et  $\text{Cu}_B$ ). L'hème a est porté par 2 résidus histidine ; le  $\text{Cu}_A$  qui est binucléaire (2 ions), 2 histidines et 2 cystéines ; l'hème  $\text{a}_3$ , 1 histidine ; et le  $\text{Cu}_B$ , 3 histidines (Capaldi, 1990). En plus des 2 centres Cu, CCO possède également des centres de Mg et Zn, ainsi que 2 centres Fe (Tsukihara et al., 1996). C'est la chaperonne COX17 qui permet l'incorporation du Cu à la CCO.

## 1.5.4 La céruloplasmine (CP)

CP (figure 13) est une ferroxidase isolée pour la première fois en 1948 (Holmberg et al., 1948). Cette protéine de 132 kDa (Takahashi et al., 1984) est composée de 6 domaines. Elle possède 3 sites mononucléaires, (dans les domaines 2, 4 et 6) dans lesquels 4 atomes de Cu sont liés à 2 histidines, une cystéine et une méthionine (Bielli and Calabrese, 2002; Zaitseva et al., 1996) et un site trinuéaire (entre les domaines 1 et 6) avec 3 atomes de Cu liés à 4 paires d'histidines (Zaitseva et al., 1996).

Plus de 90% du Cu plasmatique est porté par la CP, elle a d'ailleurs longtemps été considérée comme la protéine responsable du transport du Cu. Pourtant, il est maintenant reconnu qu'elle n'a aucun rôle essentiel dans le transport ou le métabolisme du Cu. La CP a une action anti-oxydante, elle catalyse l'oxydation du Fe(II) en Fe(III) avec la réduction de l'O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O (Stoj and Kosman, 2003) selon la réaction suivante :



C'est une glycoprotéine principalement synthétisée par les hépatocytes. Dans le foie, ATP7B transporte le Cu dans la voie de sécrétion pour son incorporation dans la CP et son excrétion dans la bile (Hellman and Gitlin, 2002). Il a été montré qu'en l'absence de CP, l'activité de transport d'ATP7B est insuffisante pour éliminer efficacement le Cu des hépatocytes (Meyer et al., 2001). Le taux de céruloplasmine est plus élevé chez la femme que chez l'homme, du fait que son excrétion soit favorisée par les œstrogènes. La concentration de CP plasmatique augmente d'ailleurs en période de grossesse, mais également en présence d'un syndrome inflammatoire.

Par ailleurs, une mutation du gène codant la céruloplasmine est à l'origine de l'acéruloplasminémie, une maladie génétique à transmission autosomique récessive très rare (1 personne sur 2 à 3 millions). Les patients présentent des signes d'homéostasie du fer anormale avec une surcharge en fer systémique et cérébrale due au dysfonctionnement ou à l'absence de CP, ainsi qu'une concentration sérique en fer réduite à environ la moitié de la normale. La biopsie du foie révèle une accumulation significative de fer dans les hépatocytes, mais aucun signe de lésion hépatique. Bien que la CP porte plus de 90% du Cu plasmatique, les patients atteints d'acéruloplasminémie ne semblent pas présenter de dysfonctionnement du métabolisme du Cu. Les premiers symptômes sont le diabète et l'anémie puis un peu plus tard, vers l'âge de 50 ans, les patients présentent des symptômes neurologiques (démence, dysarthrie, dystonie).

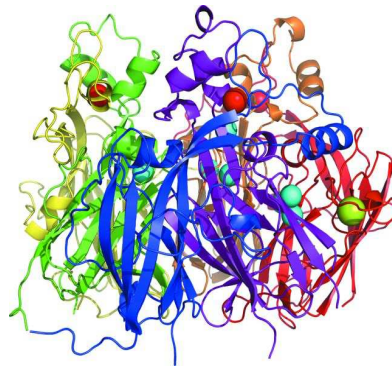


Figure 13 : Structure de la céruloplasmine. Les domaines 1 à 6 sont respectivement représentés en rouge, orange, jaune, vert, bleu et violet. Les sphères bleues représentent les ions  $\text{Cu}^{2+}$ , la sphère verte l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  et les sphères rouges les ions  $\text{Na}^+$ .  
Source : (Bento et al., 2007)

### 1.5.5 Les métallothionéines (MTs)

Les MTs ont été isolées pour la première fois par Margoshes et Vallee en 1957 à partir d'un rein de cheval (Margoshes and Vallee, 1957). Chez les mammifères, ce sont des chaînes polypeptidiques de faible poids moléculaire (< 7000 Da) composées de 61 à 68 acides aminés et qui contiennent 20 résidus cystéines (Coyle et al., 2002; Miles et al., 2000). Leurs structures peuvent être Cys-X-Cys, Cys-X-Y-Cys ou Cys-Cys (Kägi & Schäffer, 1988) où X et Y sont des acides aminés non-cystéines. Chez les mammifères elles sont essentiellement localisées dans le cytosol et plus particulièrement au niveau du foie, des reins, et de l'intestin (Kägi and Kojima, 1987). Du fait qu'elles soient riches en thiol (groupement R-SH des cystéines), les MTs se lient avec nombre d'ions métalliques selon les affinités suivantes :  $\text{Zn}^{2+} < \text{Pb}^{2+} < \text{Cd}^{2+} < \text{Cu}^+ < \text{Ag}^+ = \text{Hg}^{2+} = \text{Bi}^{3+}$  (Kägi and Kojima, 1987). Il est à noter que  $\text{Cu}^{2+}$  ne peut pas se lier aux MTs. Elles ont la capacité de fixer jusqu'à 7 ions métalliques divalents (figure 14) et 12 monovalents (comme  $\text{Cu}^+$ ). Elles sont dépourvues d'acide aminés aromatiques, d'histidine et de pont disulfure. En régulant la rétention et/ou l'excrétion des métaux, elles contribuent à la détoxification métallique des organes et des cellules.

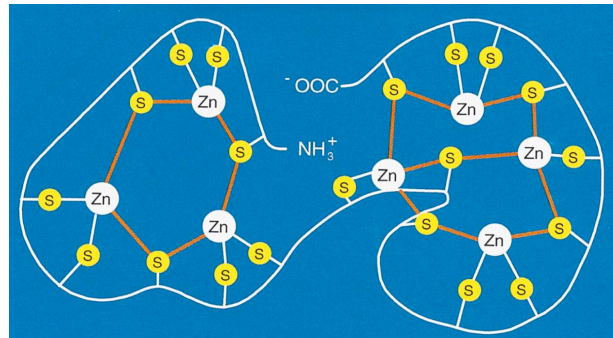


Figure 14 : Schéma de structure de la métallothionéine liant le Zn  
D'après (Fischer & Davie, 1998)

Le tableau 3 résume les principales protéines à cuivre, leur localisation, leur fonction et l'état d'oxydation du Cu.

Protéines	Localisation	Fonction	Etat d'oxydation
Céruleoplasmine	Sang	Transport du Cu dans le sérum	Cu (II)
Albumine	Sang	Transport du Cu dans le sérum	Cu (I)
Superoxyde dismutase 1	Cytosol, espace intermembranaire mitochondrial, noyau, lysosomes,	Dismutation de l'anion superoxyde produit par la respiration mitochondriale	Cu (II)
Cytochrome c oxydase	Mitochondrie	Catalyse la réaction de réduction de l'O <sub>2</sub>	Cu (II)
Métallothionéine	Cytosol, noyau	Détoxication métallique des cellules	Cu (I)
CTR1	Espace intermembranaire	Incorporation du Cu dans la cellule	Cu (I) et Cu (II)

Tableau 3 : Principales protéines à cuivre, leur localisation, leurs fonctions et l'état d'oxydation du Cu.

## 1.6 Les pathologies liées au dérèglement du métabolisme du cuivre

Comme nous l'avons vu précédemment, Cu joue un rôle essentiel dans le métabolisme humain. Il intervient en temps que cofacteur d'enzymes et est impliqué dans un grand nombre de processus biologiques. Un dérèglement de l'homéostasie du Cu que ce soit par accumulation, déficit ou mutation d'un gène peut être source de pathologies. Certaines de ces enzymes sont par exemple impliquées dans le développement de tumeurs et de différents troubles notamment neuro-dégénératifs, comme la SLA, les maladies de Creutzfeld-Jacob, d'Alzheimer ou de Parkinson. Des niveaux de concentrations en Cu élevés ont été identifiés chez les malades atteints de cancer (Warburg O. and Krebs H.A., 1927), de SLA (Hozumi et al., 2011) ainsi que dans les cerveaux de malades d'Alzheimer (Hozumi et al., 2011; James et al., 2012; Lovell et al., 1998), chez les malades de Parkinson (Pall et al., 1987) ou encore dans les maladies à prion (Siggs et al., 2012). D'autres types de maladies liées au dérèglement de l'homéostasie du Cu existent. Ce sont des maladies génétiques dues à des mutations des gènes codant les protéines ATP7A (maladie de Menkes) et ATP7B (maladie de Wilson). Je détaillerai dans cette partie les mécanismes impliquant le Cu dans ces maladies. Une grande partie de ce travail de thèse a été conduite dans le cadre de la maladie de Wilson, qui sera donc plus particulièrement détaillée.

### 1.6.1 Les cancers

Le terme « cancer » rassemble un ensemble de maladies provoquées par la transformation de cellules et la prolifération excessive et anarchique de celles-ci. Ces cellules anormales peuvent alors former une masse appelée « tumeur maligne ». La tumeur grandit et certaines cellules peuvent alors s'échapper de leur tissu d'origine. Elles migrent alors par les vaisseaux sanguins ou lymphatiques et peuvent envahir petit à petit les tissus voisins formant des tumeurs secondaires appelées « métastases ».

Un cancer peut être dû à des facteurs externes (expositions environnementales telles que tabac, UV, amiante, alcool...) qui agissent au niveau de notre ADN et peuvent provoquer des altérations ou des états inflammatoires favorisant l'apparition de cellules cancéreuses. La formation dans notre organisme de molécules telles que des ROS peut constituer une origine interne d'un cancer.

Les cellules cancéreuses se caractérisent par 10 capacités distinctives faisant référence à des capacités fonctionnelles acquises ou à des propriétés (Hanahan and Weinberg, 2011), elles sont représentées sur la figure 15.

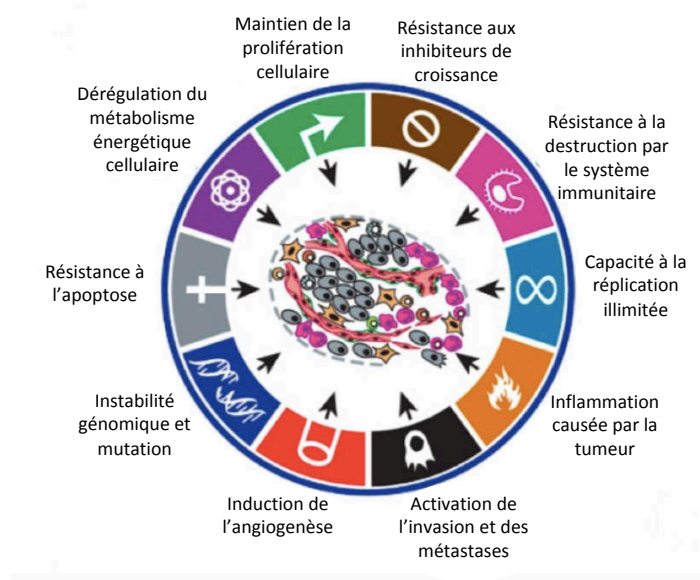


Figure 15 : Les 10 caractéristiques distinctives des cellules cancéreuses.  
D'après Hanahan and Weinberg, 2011

En 1927, Warburg et Krebs ont montré que la concentration en Cu dans le sérum augmente dans le cas de certains types de cancers (Warburg O. and Krebs H.A., 1927). Depuis, de nombreuses études ont montré qu'à la fois le sérum (figure 16) et les tissus tumoraux (figure 17) ont des niveaux de Cu significativement plus élevés chez des patients atteints de cancer comparativement à des individus sains (Gupte and Mumper, 2009). Des tableaux de ces données de concentrations sont présentés en annexe.

Les cellules cancéreuses en prolifération ont une demande en Cu plus accrue que les cellules normales (Denoyer et al., 2015). La concentration élevée en Cu semble donc corrélée au développement de la tumeur.

L'excès de Cu est d'ailleurs connu pour être un puissant oxydant provoquant la génération de ROS dans les cellules, et des niveaux élevés de stress oxydatif ont été mis en évidence dans diverses tumeurs, probablement en raison de la combinaison de facteurs tels qu'un métabolisme actif élevé, une mutation mitochondriale, des cytokines et une inflammation.

Le Cu est également un des facteurs favorisant l'angiogenèse (Lowndes and Harris, 2005). Des chélateurs du Cu comme la D-penicillamine (Brem et al., 1990), la trientine (Yoshii et al., 2001)

ou encore le tétrathiomolybdate (Goodman et al., 2004) ont d'ailleurs été étudiés pour limiter l'angiogénèse et ainsi traiter les cancers.

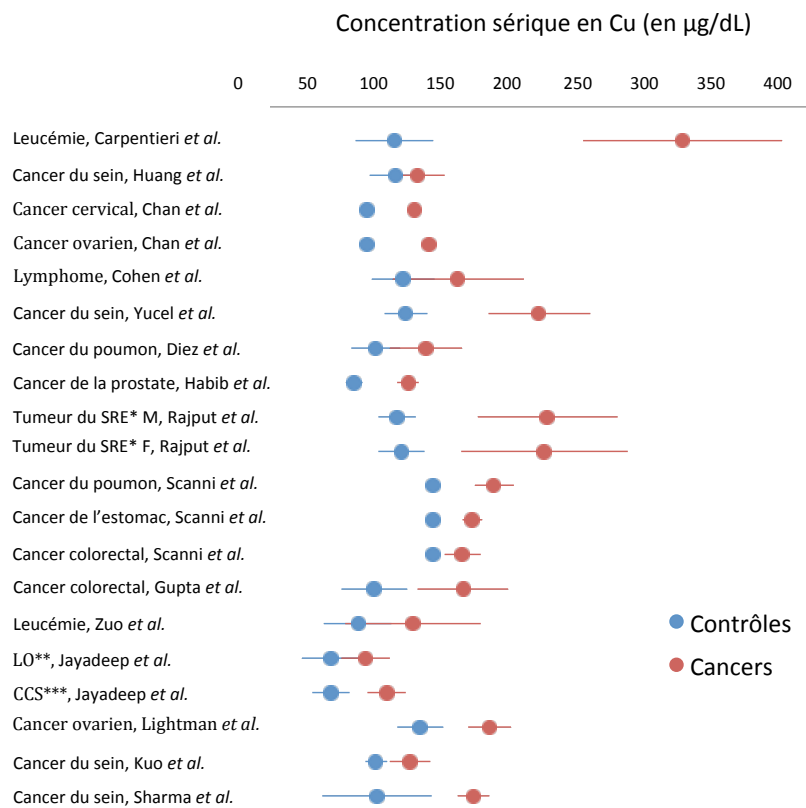


Figure 16 : Concentration sérique en cuivre en µg/dL. D'après Gupte et Mumper, 2009

\* SRE = Système réticulo endothélial

\*\* LO = Leucoplasie orale

\*\*\* CCS = Carcinome cellulaire squameux

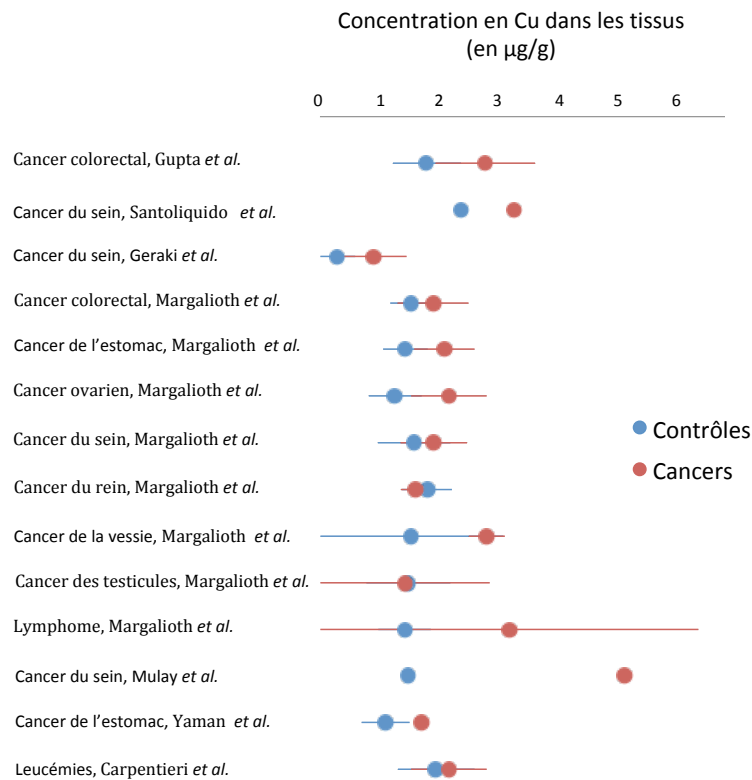


Figure 17 : Concentration en cuivre dans les tissus en  $\mu\text{g/g}$ . D'après Gupte et Mumper, 2009

## 1.6.2 Les maladies hépatiques

Les cellules hépatiques, appelées aussi hépatocytes forment en grande partie le foie. Il est le plus gros organe abdominal, et permet le stockage et le transport du sang, la sécrétion de la bile et l'épuration du sang. Il joue également un rôle important dans l'homéostasie du Cu, et est l'organe de stockage du Cu. Une hépatopathie entraîne donc une modification du métabolisme du Cu. Les maladies du foie sont nombreuses, elles peuvent être chroniques ou aiguës. On peut citer les cancers du foie dont l'hépatocarcinome, l'hépatite alcoolique, les hépatites virales, la cirrhose, la stéatose hépatique, la stéatose hépatique non alcoolique (NASH) ou encore, la maladie de Wilson.



### 1.6.3 Les maladies neuro-dégénératives

Les maladies neuro-dégénératives sont des pathologies chroniques et progressives qui affectent le cerveau et déclenchent l'apoptose des cellules nerveuses. La perturbation de l'homéostasie du Cu peut entraîner le développement de ces maladies.

#### 1.6.3.1 La sclérose latérale amyotrophique (SLA)

La SLA est plus couramment appelée maladie de Charcot du nom du médecin français qui l'a découverte au 19<sup>ème</sup> siècle. Elle est également appelée maladie de Lou Gehrig notamment aux Etats-Unis et au Canada du nom d'un joueur de Baseball mort de cette maladie en 1941.

Elle touche 5 à 7 personnes sur 100000 et les premiers signes apparaissent généralement entre 50 et 70 ans. Du fait du diagnostic tardif et de l'évolution rapide de la maladie, la durée de vie moyenne des malades est de 3 à 5 ans.

C'est une maladie neuro-dégénérative incurable caractérisée par la dégénérescence progressive des motoneurons (cellules qui constituent la voie finale de tout acte moteur) présents dans le cortex cérébral, ainsi que dans la corne antérieure de la moelle épinière. Il existe deux formes de la maladie : la forme spinale et la forme bulbaire (figure 18). Dans la forme spinale, la dégénérescence commence par l'extrémité des membres puis évolue vers le reste des membres et le tronc. Alors que la forme bulbaire touche les neurones moteurs de la face et du pharynx, ce qui entraîne des troubles de déglutition ou de langage.

A ce jour une méconnaissance des causes à l'origine de la dégénérescence neuronale impliquée dans la SLA persiste. Dans plus de 90 % des cas, l'origine de la maladie est sporadique alors que dans 5 à 10 % des cas elle est d'origine familiale (Taylor et al., 2016).

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer l'atteinte des motoneurons. Dans 2 % des cas (Beckman et al., 2001) la SLA peut être due à des mutations du gène codant la CuZn-SOD cytosolique (Rosen et al., 1993). Une altération de la CP pourrait également être à l'origine de la maladie (Conti et al., 2008). Une mutation du gène C90ORF72 a également été observée chez des malades atteints de SLA (Dolgin, 2017). Le mécanisme repose sur des défauts de repliements des protéines mutées qui s'agrègent avec d'autres protéines dans les cellules. Ces agrégats ainsi formés peuvent par exemple entraîner un dysfonctionnement des mitochondries et l'apoptose. Une autre hypothèse est l'excitotoxicité du glutamate (Shaw and Ince, 1997). Ce phénomène serait dû à la stimulation anormale des neurones par une trop grande production ou une

mauvaise élimination du glutamate qui est un neurotransmetteur. Une exposition aux éléments traces pourrait être un facteur de risque (Bergomi et al., 2002), des concentrations élevées en Cu ont d'ailleurs été mesurées dans le sang (Peters et al., 2016) et les érythrocytes (Vinceti et al., 2002) mais aussi dans les liquides céphalo-rachidiens (Roos et al., 2013). Le rôle direct du Cu est suspecté dans le processus de génération accrue de radicaux libres (Madsen and Gitlin, 2007).

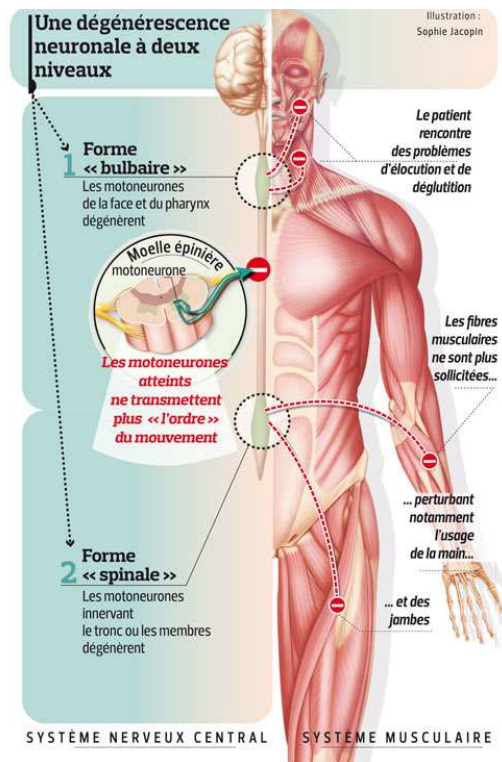


Figure 18 : Schéma représentant la SLA. Source : [www.arsla.org](http://www.arsla.org)

### 1.6.3.2 La maladie d'Alzheimer (AD)

AD a été décrite pour la première fois en 1906 par le médecin allemand Alois Alzheimer qui lui donna son nom. C'est une maladie neuro-dégénérative irréversible qui entraîne un dysfonctionnement des connexions entre les neurones. Aujourd'hui en France on comptabilise près d'un million de malades, et 225000 nouveaux cas sont diagnostiqués par an. Dans la plupart des cas, AD touche les personnes de plus de 65 ans, mais des cas plus précoces peuvent exister. Environ 15 % de la population de plus de 80 ans est atteinte par AD.

Les symptômes les plus fréquents sont les troubles de la mémoire, mais des troubles dans les fonctions exécutives sont également souvent observés. Des problèmes dans le temps et dans

l'espace ou encore plus rarement des troubles du langage ou de la vision peuvent être des symptômes.

Au niveau cellulaire deux processus sont observés :

- au niveau extracellulaire, une accumulation du peptide  $\beta$ -amyloïde provoquant la formation des plaques amyloïdes (Games et al., 1995; Hardy and Allsop, 1991).
- au niveau intracellulaire, un dépôt de la protéine Tau provoquant la formation de neurofibrilles (Yan et al., 1994).

La formation de plaques amyloïdes ainsi que l'enchevêtrement neurofibrillaire entraînent peu à peu le dysfonctionnement des neurones et leur mort.

Des concentrations en Cu élevées dans les plaques amyloïdes (Lovell et al., 1998) et dans le sérum de patients atteint d'AD (Squitti et al., 2005) ont été mises en évidence. L'homéostasie du Cu (mais aussi du Zn et du Fe) est largement perturbée dans les cerveaux de personnes atteintes d'AD et peut entraîner un stress oxydant (formation de radicaux OH•) responsable de la destruction des neurones. Mécaniquement, la protéine transmembranaire précurseur de l'amyloïde, qui possède de multiples sites sélectifs de liaison au Cu, a une forte affinité pour se lier au Cu, le réduit en Cu<sup>+</sup> et génère H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Opazo et al., 2002).

### 1.6.3.3 Les maladies à prions

Les maladies à prions, également appelées encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST), sont des maladies neuro-dégénératives rares. La plus connue est la maladie de Creutzfeldt-Jacob, mais on peut également citer l'insomnie fatale familiale ou encore le syndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker. Entre 100 à 150 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année en France. L'évolution des maladies à prions est rapide et fatale puisqu'il n'existe à l'heure actuelle pas de traitement. Elles se développent chez l'adulte et se caractérisent par une démence.

Ces maladies se caractérisent par une accumulation de la protéine prion « scarpie » (PrP<sup>sc</sup>) qui est une altération de la protéine prion (PrP) (Frost and Diamond, 2010). On retrouve notamment la protéine prion, qui possède des sites de liaison au Cu, dans le système nerveux central mais son rôle est encore mal connu. On sait cependant qu'elle joue un rôle dans le transport cellulaire du Cu (Millhauser, 2007; Toni et al., 2005). Les PrP<sup>sc</sup> s'agrègent et se multiplient à l'intérieur des cellules neuronales. De plus elles sont capables de transmettre leur anomalie à des PrP adjacentes, ce qui entraîne une propagation rapide de l'anomalie.

## 1.6.4 Les maladies génétiques

Les maladies de Menkès et de Wilson sont deux maladies génétiques rares. Les gènes impliqués dans ces maladies sont *ATP7A* pour la maladie de Menkès et *ATP7B* pour la maladie de Wilson. Ces deux gènes étant impliqués dans le transport cellulaire du cuivre, il en résulte un dysfonctionnement de l'homéostasie du cuivre.

### 1.6.4.1 La maladie de Menkès (MD)

MD est une maladie rare qui touche une naissance sur 300000 en Europe (Tønnesen et al., 1991). C'est une maladie incurable et les malades décèdent généralement avant leurs 4 ans. Elle se manifeste par une neurodégénérescence accompagnée de cheveux caractéristiques qui sont clairsemés, courts, légèrement pigmentés et « en fils de fer » (figure 19).

MD est une maladie génétique de transmission récessive liée au chromosome X. De ce fait la plupart des malades sont de sexe masculin. Elle est due à une mutation du gène *ATP7A*, et à ce jour, plus de 300 mutations ont été reportées (Caicedo-Herrera et al., 2018). Le gène *ATP7A* code la protéine du même nom impliquée dans le transport du Cu des cellules intestinales vers le sang. Il en résulte un désordre de l'homéostasie du Cu. Chez les malades de Menkès on observe donc une accumulation du Cu dans les cellules intestinales et les reins et une absence de Cu dans le sang ainsi que dans le cerveau et le foie. L'activité des enzymes liant le Cu telles que CCO, la dopamine-hydrolase et la tyrosinase est réduite. Pour limiter les effets, Cu sous forme histidine-cuivre est administré afin de favoriser l'assimilation du Cu par l'organisme (Sarkar, 1997; Sarkar et al., 1993).

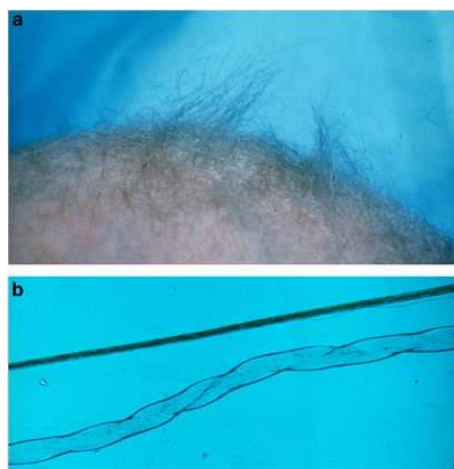


Figure 19 : a : cheveux d'un malade de Menkès ; b : image au microscope (\*100) d'un cheveu normal (au dessus) et d'un cheveu de malade de Menkès (au dessous). Source (Tümer et Møller 2010)

### 1.6.4.2 La maladie de Wilson (WD)

WD est une maladie génétique autosomique récessive qui se caractérise par une accumulation de Cu, principalement dans le foie et dans le système nerveux central. Il s'agit d'une maladie rare, puisque l'incidence estimée en France est de 1/30000 à 1/100000 nouveau cas par an. Cette maladie résulte d'une mutation du gène *ATP7B* porté par le chromosome 13. Les patients atteints de la maladie de Wilson peuvent présenter des formes hépatiques, neurologiques ou psychiatriques. Le diagnostic précoce pose problème et repose sur plusieurs arguments cliniques, ainsi que sur les anomalies moléculaires associées. Les traitements utilisés sont des chélateurs du Cu ou des traitements à base de zinc qui permettent de limiter la charge corporelle en Cu.

#### 1.6.4.2.1 Historique

Aussi connue sous le nom de dégénérescence lenticulaire progressive, WD a été décrite pour la première fois par Samuel Alexander Kinnier Wilson en 1912 (Wilson, 1912). Elle était mortelle avant la découverte des premiers traitements dans les années 50. Le premier traitement apparu en 1951 est le British Anti-Lewisite (BAL or 2,3-dimercatopropanol) (Cumings, 1951). En 1956, Walshe introduit la D-penicillamine comme nouveau traitement de WD (Walshe, 1956). Ce nouveau chélateur administré par voie orale facilite le traitement parce que le BAL nécessitait des injections et présentait beaucoup d'effets secondaires. Certains patients présentant une intolérance à la D-penicillamine, Walshe introduit en 1969, la triéthylène tétramine dihydrochloride aussi appelée trientine, comme nouveau chélateur (Walshe, 1969).

En 1961 dans sa thèse, Schouwink décrit pour la première fois l'utilisation du zinc pour traiter WD. Quelques années plus tard, Hoogenraad *et al.* publieront leurs travaux portant sur l'utilisation du zinc pour traiter WD (Hoogenraad *et al.*, 1979). Plus récemment, Brewer propose un traitement à base de tétrathiomolybdate (TTM) (Brewer, 2009). La Food and Drug Administration (FDA) a autorisé son utilisation aux USA, mais à l'heure actuelle l'utilisation du TTM pour traiter WD n'est pas autorisée en France.

#### 1.6.4.2.2 Mécanisme

Le gène responsable de WD est porté par le chromosome 13. La transmission de WD est autosomique récessive. Ceci signifie que les deux chromosomes 13 d'une personne doivent être porteurs du gène Wilson pour que cette personne soit atteinte de la maladie. Ceci induit que

deux parents porteurs sains du gène muté ont un risque sur quatre à chaque naissance de transmettre la maladie (figure 20).

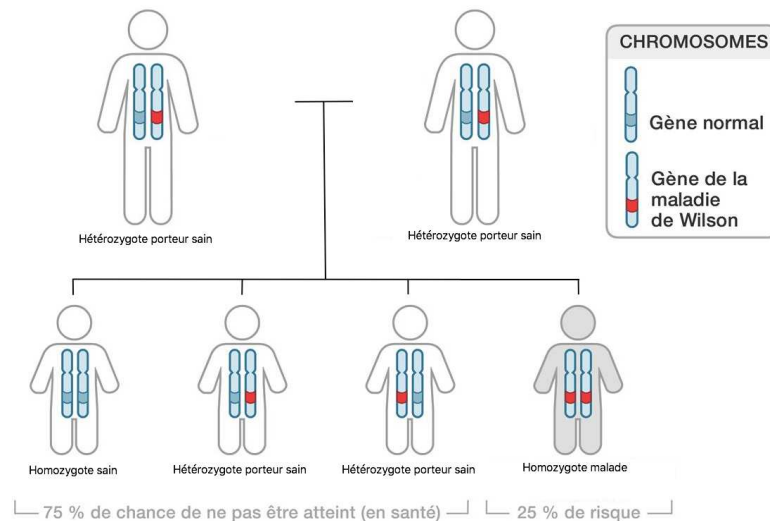


Figure 20 : Illustration de la transmission de la maladie de Wilson  
Source : [www.aboutkidshealth.ca](http://www.aboutkidshealth.ca)

Plus de 500 anomalies de ce gène sont connues à ce jour. La plupart des malades sont hétérozygotes composites, c'est à dire qu'une mutation différente du gène est présente sur chacun de leur chromosome 13.

Le gène *ATP7B* code une protéine de type ATPase nommée APT7B qui intervient dans le transport cellulaire du Cu. Cette protéine est principalement localisée dans le foie, le cerveau et le rein et permet l'élimination du Cu dans la bile. Une mutation du gène *ATP7B* entraîne donc l'accumulation de Cu à l'intérieur des cellules. La comparaison du mécanisme de transport du Cu chez un sujet sain et chez un sujet atteint de la maladie de Wilson est présentée sur la figure 21.

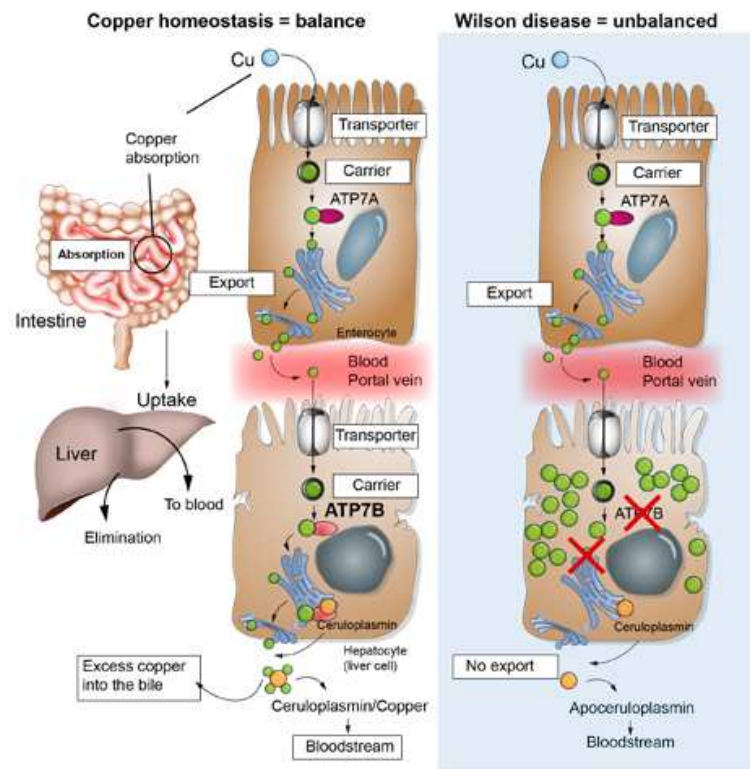


Figure 21 : Représentation schématique de l'accumulation du cuivre.  
D'après [www.swissliver.ch](http://www.swissliver.ch)

### 1.6.4.2.3 Manifestations

Bien que l'accumulation du Cu commence dès la naissance, les signes cliniques apparaissent bien plus tard, à différents âges, et sont le plus souvent hépatiques ou neurologiques. Les symptômes hépatiques se manifestent généralement une dizaine d'années avant les symptômes neurologiques.

#### La forme hépatique

Les formes hépatiques de WD sont présentes dans 40 à 50 % des cas. Les manifestations sont variables et peuvent aller d'une hépatite aiguë, sévère voire fulminante, hépatite chronique voire cirrhose.

#### La forme neurologique

Les formes neurologiques de WD concernent 40 à 50% des patients. Les symptômes apparaissent généralement plus tard que pour les formes hépatiques, vers l'âge de 20 ans. Les

patients présentent des troubles neurologiques tels que tremblements, dysarthrie (trouble de la parole), dystonie (troubles moteurs), troubles de l'écriture, troubles de la déglutition. Les symptômes neurologiques peuvent être accompagnés de troubles psychiatriques en particulier de syndromes dépressifs.

Il est à noter que lorsqu'une forme neurologique existe, elle succède toujours une forme hépatique.

#### L'anneau de Kayser Fleischer

Chez les malades de Wilson, une atteinte ophtalmique caractérisée par une coloration verte marron claire de la périphérie de la cornée typique d'un dépôt de Cu (figure 22) peut être observée. Un anneau de Kayser Fleischer est présent chez la plupart des patients atteints de forme neurologique de la maladie, et chez environ 50 % des patients atteints de la forme hépatique.



Figure 22 : Anneau de Kayser Fleischer d'après [www.wilsonsdisease.org](http://www.wilsonsdisease.org)

#### Autres manifestations

Plus rarement d'autres organes peuvent être touchés, on observe notamment dans de rares cas des atteintes hématologiques, rénales, ostéo-articulaires et même cardiaques.



L'ensemble des manifestations observées chez les malades de Wilson est représenté sur la figure 23

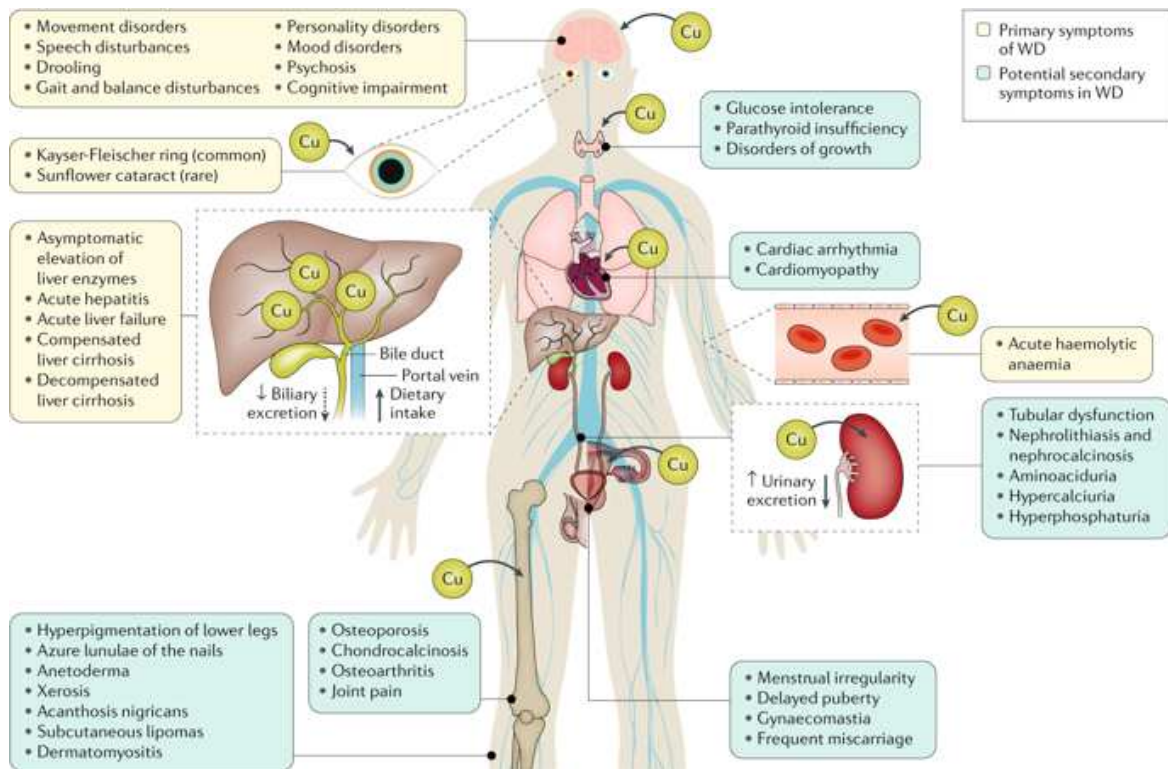


Figure 23 : Schéma représentant les différentes manifestations de la maladie de Wilson d'après Członkowska et al. 2018.

#### 1.6.4.2.4 Diagnostic

A ce jour, aucun test ne permet de confirmer ou d'infirmer le diagnostic de WD avec une certitude de 100 %. Celui-ci repose sur un faisceau d'arguments cliniques (Ferenci et al., 2003). Un dosage de la céruloplasmine sanguine est effectué. Le taux de céruloplasmine est généralement très bas chez les malades de Wilson et peut être inférieur à 0,1g/L alors qu'il est de 0,2 à 0,4 g/L chez les sujets sains. La cuprurie (dosage du cuivre urinaire) est aussi un paramètre très important, il est très élevé chez les malades de Wilson, presque toujours supérieur à 1,5  $\mu\text{mol}$  par 24 heures, alors qu'il est inférieur à 0,8  $\mu\text{mol}$  par 24 heures chez les sujets sains. La détermination du REC (Relative Exchangeable Copper) est également un outil utilisé pour le diagnostic de la maladie de Wilson (El Balkhi et al., 2011; Guillaud et al., 2018). Le REC est le rapport du cuivre sérique échangeable sur le cuivre sérique total. Une IRM cérébrale peut aussi être pratiquée afin de repérer les atteintes au niveau du cerveau.

En montrant que la composition isotopique du Cu dans le sérum de personnes atteintes de la maladie de Wilson est plus faible que chez les contrôles, Aramendía *et al.* proposent le  $\delta^{65}\text{Cu}$  comme outil de diagnostic de la maladie de Wilson (Aramendía *et al.*, 2013). J'exposerai dans le chapitre 3 une étude contredisant ces résultats.

#### **1.6.4.2.5      Traitement**

Il n'existe pas de traitement curatif pour WD. Tout d'abord un régime alimentaire limitant les apports en cuivre doit être respecté. La consommation d'aliments tels que les crustacés, fruits secs, abats, chocolat noir, et champignons doit être limitée.

Un traitement à vie est administré, celui-ci permet de limiter la charge en Cu dans le corps et de faciliter l'élimination du Cu. Comme indiqué précédemment, les traitements administrés actuellement ont été découverts dans les années 50-60. La bonne compliance au traitement est essentielle pour un effet à long terme. Le suivi des patients est primordial pour vérifier l'efficacité du traitement grâce à la mesure du Cu sérique, de la cuprurie et du REC.

##### La D-penicillamine (Trolovol)

En première intention, la D-penicillamine est administrée. C'est une cystéine qui possède un groupe sulfhydryle libre qui agit comme chélateur du Cu (Roberts and Schilsky, 2008). Elle favorise la séquestration du Cu intra-hépatique non toxique et permet l'excrétion du Cu par les urines. Elle participe à la détoxification en induisant la synthèse de MT (Scheinberg *et al.*, 1987) qui facilite la séquestration du Cu intra-entérocytaire et intra-hépatique.

##### Le triéthylène tétramine dihydrochloride (trientine)

Lorsque le patient est intolérant au Trolovol, la trientine est administrée en seconde intention. Elle possède une structure de polyamine dans laquelle le Cu est chélaté avec les quatre groupements azote (Roberts and Schilsky, 2008). Bien que ces propriétés chélatrices soient moindres que celle du Trolovol, elle augmente l'excrétion urinaire du Cu et diminue son absorption intestinale.

##### Le zinc (Wilzin)

En dernière intention, le zinc est également utilisé comme traitement de WD. Il induit la synthèse de métallothionéines qui fixent préférentiellement le Cu et empêchent son passage dans le sang (Brewer, 2009), et accroît l'excrétion fécale.

Une transplantation hépatique peut être réalisée en dernier recours. Elle peut être réalisée lorsque les formes hépatiques sont fulminantes ou en cas de résistance au traitement. Ce traitement reste rare puisqu'il concerne environ 5 % des cas. La survie post transplantation est très bonne puisque le taux de survie à 5 ans est de 80 %.

# **Chapitre 2**

---

---

## **Matériels et Méthodes**

---

---



# Introduction

---

Ce travail de thèse porte sur les analyses élémentaires et isotopiques du Cu, du Fe, du Zn, et du Mg par spectrométrie de masse dans des matrices biologiques. Dans ce chapitre divisé en trois parties, je commencerai par décrire les échantillons qui sont d'origine animale et humaine. Je détaillerai ensuite les différentes étapes de préparation nécessaires à réaliser en vue des analyses par spectrométrie de masse. Je présenterai notamment ici, le protocole de séparation des compartiments cellulaires qui a été appliqué sur des échantillons de cellules de cancer du sein et de foies de souris, en vue d'étudier les fractionnements isotopiques des compartiments cellulaires. Enfin la troisième partie de ce chapitre sera consacrée à la description des techniques d'analyses employées pour mesurer les concentrations des éléments traces et majeurs ainsi que les compositions isotopiques.

---



## 2.1 Les échantillons

### 2.1.1 Les échantillons d'origine humaine

#### 2.1.1.1 Les échantillons de sang de malades de Wilson

Une partie de ce travail de thèse s'est inscrite dans le cadre d'une collaboration avec le Centre de Référence Maladies Rares (CRMR) : maladie de Wilson et autres maladies rares liées au cuivre dirigé par le Pr Alain Lachaux. Pour réaliser cette étude, des échantillons de sang ont été prélevés sur des malades de Wilson entre 2012 et 2018. Les prélèvements ont été effectués par les médecins au cours des visites des patients au CRMR Wilson à l'Hôpital Femme Mère Enfant (HFME) à Bron. Les échantillons de sang ont été récoltés dans plusieurs types de tubes :

Des tubes « à bouchon bleu foncé » : ils contiennent un anti coagulant et permettent d'obtenir le sang total. Ils sont utilisés pour le dosage des éléments traces. Cependant, au cours du temps la coagulation progressive s'effectue, ils sont donc soigneusement agités avant de prélever l'échantillon pour procéder à la minéralisation.

Des tubes « à bouchon rouge » : ils ne contiennent aucun anticoagulant, mais seulement un activateur de coagulation (des microparticules de silice). Ils sont généralement utilisés pour récupérer le sérum après centrifugation. Ici, ils n'ont pas été centrifugés et contiennent donc le sang total.

Des tubes « à bouchon jaune » : ils ont les mêmes propriétés que les tubes « à bouchon rouge » avec en plus un gel. Après centrifugation, ce gel permet au sérum et aux cellules rouges de rester séparés. Ici, ils n'ont pas été centrifugés et contiennent donc le sang total.

Des tubes « à bouchon violet » : ils contiennent de l'EDTA qui permet de bloquer la coagulation du sang et ainsi obtenir le sang total.

Des études préalables ont permis de montrer que ces différents tubes ne contiennent pas de traces de Cu, Fe et Zn détectables. Ils ne présentent donc pas de risque de contamination. Aussi, pour quelques patients, plusieurs tubes de sang de types différents ont été utilisés pour le prélèvement et ont présentés des résultats similaires que ce soit en concentrations d'éléments traces et en mesure de compositions isotopiques du cuivre.

Après prélèvement, tous les échantillons ont été conservés dans un réfrigérateur à 4°C à l'HFME avant le transfert régulier au Laboratoire de Géologie.



### 2.1.1.2 Les échantillons de sang d'enfants contrôlés

Afin de compléter une population contrôle issue de la littérature, j'ai analysé des échantillons de sang d'enfants âgés de 1 à 13 ans. Ces échantillons de sang total proviennent du Laboratoire d'Analyse de Traces et Métaux Toxiques à Pierre Bénite dirigé par Muriel Bost. Ces échantillons ont été initialement prélevés dans des tubes « à bouchon bleu foncé » en vue de détecter une exposition au plomb. J'ai donc récupéré ces tubes de sang qui avaient été conservés dans un réfrigérateur à 4°C.

## 2.1.2 Les échantillons d'origine animale

### 2.1.2.1 Les organes et fluides biologiques de souris *Atp7b*<sup>-/-</sup>

Une partie de ce travail de thèse s'est inscrite dans le cadre d'une collaboration avec une équipe du CEA de Grenoble pilotée par Elisabeth Mintz. Ce travail a essentiellement porté sur des souris *Atp7b*<sup>-/-</sup>.

Les souris *Atp7b*<sup>-/-</sup> constituent le modèle murin de la maladie de Wilson développé en 1999 (Buiakova et al., 1999). Tout comme les malades de Wilson, ces souris *Atp7b*<sup>-/-</sup> accumulent du cuivre au niveau du foie et leurs urines sont concentrées en cuivre (Lutsenko, 2008). Ce modèle a été fourni par le Professeur Svetlana Lutsenko et le Docteur Dominik Huster. Des souris hétérozygotes *Atp7b*<sup>+/+</sup>, maintenues sur un fond génétique mixte 129S6/SvEv C57BL/6J, ont été élevées dans l'animalerie du CEA de Grenoble et utilisées pour générer des souris *Atp7b*<sup>-/-</sup>. L'élevage, l'hébergement et les expérimentations de souris ont été réalisés selon les protocoles approuvés par les comités d'éthique (C2EA – 12 Comité d'éthique ComEth Grenoble et C2EA – 44 CETA – CEA DSV IdF), les autorités vétérinaires, et le Ministère de la Recherche. Les souris ont été maintenues sur un cycle lumière/obscurité de 12 h/12 h et nourries avec de la nourriture sèche d'entretien #3469 (Kliba Nafag CH), contenant 14 mg.kg<sup>-1</sup> de Cu. Les souris ont été transférées dans des cages à métabolisme pour un jeûne de 24 heures et une collecte des urines et fèces. Ensuite, les souris ont été exposées au dioxyde de carbone, avant prélèvement sanguin dans des tubes traités à l'héparine de sodium (Becton Dickinson) par ponction cardiaque et dissection hépatique. Dans l'heure suivant le prélèvement, les échantillons de sang ont été centrifugés à 2000 g et 41 °C pendant 15 minutes pour recueillir les surnageants plasmatiques. Les échantillons de bile, de foie, de plasma et de fèces ont été conservés à -20 °C puis expédiés dans de la carboglace au Laboratoire de Géologie. Dès réception, ils ont été placés à -20°C jusqu'à analyse.

### 2.1.2.2 Les foies de souris

Au cours de cette thèse, un projet consistant à séparer les compartiments cellulaires des cellules de foies de souris a été réalisé en collaboration avec Anne-Laure Bulteau et Yann Leverrier. Les foies de souris traités pour l'étude préliminaire du chapitre 5 proviennent de souris wild type élevées et euthanasiées à l'animalerie de l'Institut Génomique Fonctionnelle de Lyon (IGFL), à l'ENS de Lyon. Les foies de souris utilisés pour l'étude du chapitre 5.3 (échantillons F3 à F10) proviennent de souris de la lignée C57BL/6 CD45.1 âgées de 12 à 14 semaines et élevées au Plateau de Biologie Expérimental de la Souris (PBES), à l'ENS de Lyon. Ces souris ont eu un accès illimité à la nourriture et à l'eau de boisson et sont maintenues sur un cycle lumière/obscurité de 12 h/12 h. Les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale. Les cellules sanguines du foie ont été éliminées par injection intracardiaque de 10 ml de PBS (GIBCO) puis injection dans le foie de 10 mL de PBS. Un volume de 5 mL de tampon mannitol a été injecté dans les foies qui ont été prélevés et placés dans un tube avec 2 mL de tampon mannitol placé dans de la glace avant de procéder à la séparation des compartiments cellulaires.

### 2.1.3 Les cellules

Des cellules de cancer du sein (MDA) ont été utilisées pour l'étude préliminaire du chapitre 5 Les cellules MDA ont été cultivées et récoltées à l'IGFL à l'ENS de Lyon.

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de Petri avec le milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) de Invitrogen, supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal, 10 U/mL pénicilline et 10 µg/L streptomycine. Les cellules sont placées dans un incubateur dans une atmosphère de 5 % en CO<sub>2</sub> et une température de 37°C.

Les cellules sont régulièrement repiquées lorsqu'elles sont entre 80 et 90 % de confluence. Pour cela, les cellules sont lavées avec 10 mL de PBS (Phosphate Buffered Salin). Le PBS est retiré, puis 2 mL de trypsine sont ajoutés, la boîte de Petri est alors placée 3 minutes dans l'incubateur afin de décoller les cellules du fond de la boîte de Petri. 8 mL du milieu complet sont alors ajoutés pour neutraliser la trypsine, puis par aspirations et refoulements à l'aide d'une pipette, la suspension cellulaire est homogénéisée. Enfin un dixième du volume est déposé dans de nouvelles boîtes de Petri avec du milieu complet puis celles-ci sont placées dans l'incubateur pour un nouveau cycle.

Lorsque les cellules doivent être récoltées, on procède la même façon mais cette fois, la suspension cellulaire est déposée dans un tube pour procéder à une centrifugation à 1500 trs

pendant 5 min. Les cellules sont lavées avec 11 mL de PBS (1 mL sera utilisé pour le comptage des cellules) puis à nouveau centrifugées afin de récupérer le culot cellulaire et pouvoir appliquer le protocole d'isolement des mitochondries. Un aliquot des cellules sera prélevé pour procéder à la minéralisation de l'échantillon de départ (le « bulk »).

## 2.2 Préparation des échantillons

### 2.2.1 L'isolement des mitochondries

J'aborderai dans le chapitre 5 une étude portant sur les fractionnements isotopiques dans les compartiments cellulaires. Pour cette étude un protocole d'isolement des mitochondries a été appliqué sur les cellules MDA et les foies de souris.

#### 2.2.1.1 Les réactifs

La séparation des compartiments cellulaires a été réalisée en vue des mesures de compositions isotopiques. Je me suis donc assurée que les réactifs utilisés apportaient le moins possible de métaux. Pour cela, j'ai mesuré la concentration en éléments traces de plusieurs produits et j'ai retenu ceux qui présentaient des concentrations en Fe, Cu, Zn et Mg les plus faibles. Les réactifs ont été achetés chez Sigma Aldrich®, ce sont les suivants :

D-Mannitol  $\geq 99.9999$  %

MOPS Bio performance certified, cell cultured tested  $\geq 99.5$  %

Sucrose BioXtra  $\geq 99.5$  %

Un litre de tampon d'homogénéisation (« tampon mannitol ») a été préparé en pesant 38,26 g de mannitol (210 mM), 1,05 g de MOPS (5 mM) et 24 g de sucrose (70 mM). Le pH est ajusté à 7,4 avec de la soude (NaOH de Acros Organics®) puis la solution est conservée à 4 °C.

#### 2.2.1.2 Le protocole

Les tubes à centrifuger Falcon ainsi que l'homogénéiseur de Dounce et les pilons Kimble Kontes sont préalablement lavés dans un bain HCl 20 % pendant au moins 48 h.

La séparation des compartiments cellulaires a été effectuée sur des cellules MDA et sur des foies de souris fraîchement prélevés afin de conserver les cellules intactes.

Le protocole détaillé ci-dessous concerne les foies de souris. Pour les cellules MDA, le protocole est le même. La quantité de cellules était d'environ 50 millions et le volume de tampon pour chaque étape de broyage, de 2 mL.

Les cellules du foie sont broyées mécaniquement à l'aide d'un homogénéiseur de Dounce de 7 mL (figure 24) placé dans de la glace. L'homogénéiseur de Dounce est composé d'un cylindre et de deux pistons (A et B) dont la taille est légèrement différente. Il permet de broyer les cellules sans altérer les organelles.



Figure 24 : Homogénéiseur Dounce constitué d'un cylindre et de 2 pistons (A et B)

Environ 0.3 g de foie est déposé dans le Dounce avec 7 mL de tampon mannitol, puis les pilons A et B sont actionnés 10 fois chacun. L'homogénat est alors versé dans un tube à centrifuger. Cette opération est répétée 2 à 3 fois selon la taille des foies. L'homogénat final est centrifugé à 1 000 g pendant 5 minutes à 4 °C. Le surnageant (n°1) est mis de côté dans un autre tube à centrifuger, et le culot est repris avec 7 mL de tampon mannitol puis le broyage des cellules est répété dans de la glace avec les pilons A et B. L'homogénat est à nouveau centrifugé à 1 000 g pendant 5 minutes, à 4 °C. Le culot ainsi obtenu contient les noyaux. Le surnageant (n°2) est ensuite rassemblé au précédent puis centrifugé à 10000 g pendant 15 minutes à 4 °C. Le culot contient alors les mitochondries purifiées, et le surnageant contient le cytosol. Ce protocole est schématisé sur la figure 25. A l'issue de ce procédé les fractions obtenues sont appelées « Mito », « Noyaux » et « Cytosol ».

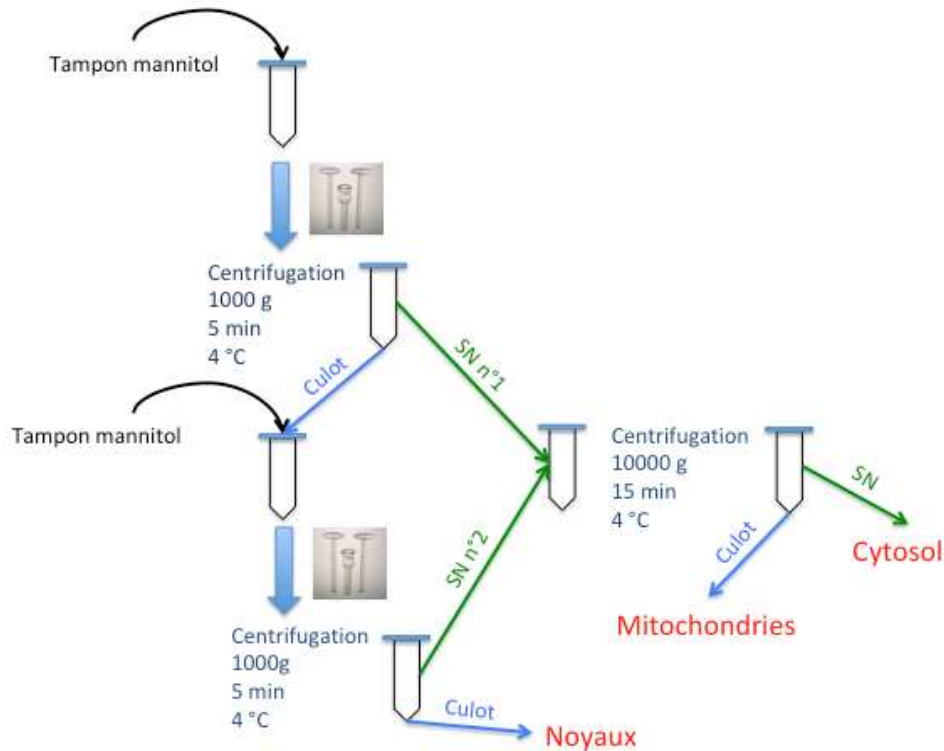


Figure 25 : Schéma du protocole de séparation des mitochondries

### 2.2.1.3 Le Western Blot

Pour certains échantillons de foie de souris (F7 à F10) un western blot a été réalisé afin de vérifier que des protéines spécifiques de ces compartiments cellulaires sont bien présentes dans les fractions séparées (« Mito », « Noyaux » et « Cytosol »).

Pour cela, un petit aliquot du foie ainsi que des culots (noyaux et mitochondries) a été prélevé et placé dans un tampon de lyse puis congelé à -18 °C. Le cytosol étant récupéré avec le tampon mannitol, il n'a pas pu être prélevé en vue de réaliser un western blot. Le western blot a été réalisé au Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI) à l'ENS de Lyon.

Les protéines présentes dans chaque fraction sont séparées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide en fonction de leur poids moléculaire. Un anticorps spécifique est ensuite utilisé pour détecter la protéine d'intérêt.

Un dosage des protéines avec un kit DC Protein Assay de Bio-Rad® est réalisé au préalable, afin de charger sur le gel la quantité de protéine adéquate. Ici, 20 µg de protéines ont été déposés dans chaque puits. Un agent réducteur d'échantillon NuPAGE® est ajouté à l'échantillon, puis un tampon de chargement d'échantillon LDS Thermo Scientific® ainsi que de l'eau distillée avant de chauffer les échantillons à 95 °C pendant 5 minutes. Les échantillons sont alors déposés dans les puits du gel de polyacrylamide précoulé Invitrogen NuPage (gradients de 4 à 12 %) lui même placé dans une cuve remplie du tampon de migration MOPS Invitrogen NuPage dans laquelle un courant de 100 V est appliqué pendant 1 h 30 à 2 h afin de séparer les protéines par électrophorèse (figure 26).

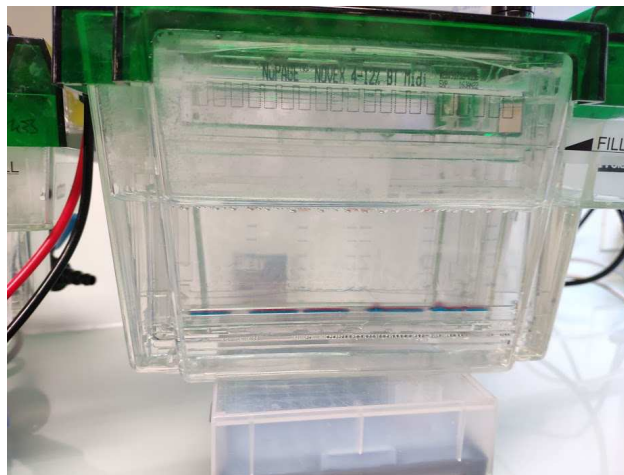


Figure 26 : Cuve d'électrophorèse

Les protéines sont ensuite transférées du gel vers une membrane de nitrocellulose pour pouvoir immunomarquer, grâce à un anticorps spécifique, la protéine d'intérêt. Le gel et la membrane sont placés entre des filtres et des éponges, elles mêmes placées entre une anode et une cathode (figure 27). Le transfert est réalisé en 7 minutes grâce au système de transfert rapide iBlot de Invitrogen.

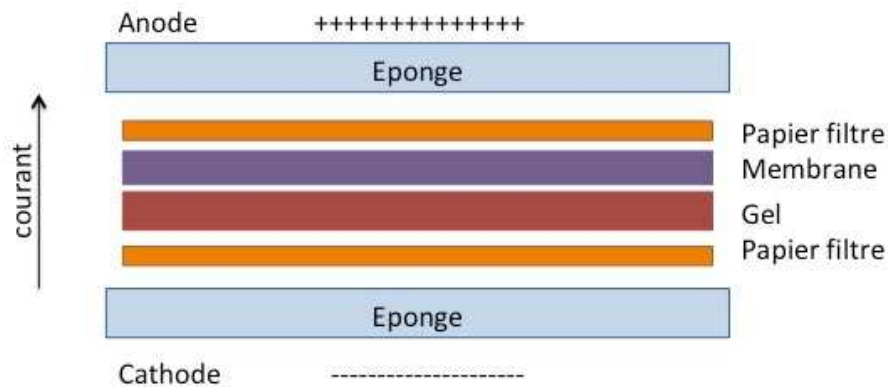


Figure 27 : Schéma de transfert des protéines du gel vers la membrane

Afin de bloquer les sites des interactions non spécifiques entre la membrane et l'anticorps, la membrane est placée dans une solution de TBST (Tris Buffered Saline with Tween 20) avec du lait à 5 % sur agitateur pendant 1 h à température ambiante. Chaque membrane est ensuite exposée au contact de l'anticorps spécifique sur agitateur une nuit à 4 °C. Les anticorps primaires utilisés sont les suivants : histone 3 (Anti-Histone H3 antibody - ab1791, Abcam, Cambridge, UK) pour la détection des noyaux, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH D16H11, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) pour la détection du cytosol et voltage dependent anion channel (VDAC D73D12, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) pour la détection des mitochondries.

Afin d'enlever les anticorps primaires non liés, les membranes sont rincées 2 fois avec une solution tampon TBST puis placées pendant 10 minutes sous agitation modérée avec du TBST. Cette opération est répétée 3 fois. Les membranes sont alors placées 1 h sous agitation modérée dans une solution de TBST contenant l'anticorps secondaire (Anti-Rabbit IgG-Peroxydase antibody produced in goat A6154, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Les étapes de rinçage des membranes sont répétées avant de procéder à la détection. Pour cela un substrat (Clarity Western ECL de Bio-Rad®) est déposé sur du parafilm avant d'y placer la membrane. Après 4 minutes, la membrane est déposée sur un support plastifié afin de procéder à la révélation des protéines par chimiluminescence, à l'aide du système d'imagerie ChemiDoc de Biorad®. Les images sont ensuite traitées grâce au logiciel Image Lab de Biorad®.

## 2.2.2 Minéralisation des échantillons

La minéralisation des échantillons est une étape cruciale de la préparation d'échantillon. Celle-ci doit être complète afin de s'assurer que tous les métaux soient mis en solution et qu'il n'y ait plus de matière organique. Dans le cas contraire un biais important dans les analyses chimiques pourrait être observé. La procédure de minéralisation est adaptée pour chaque matrice utilisée au cours de cette thèse. Les réactifs utilisés pour minéraliser les échantillons sont l' $\text{HNO}_3$  concentré (15 N) distillé au laboratoire, et l' $\text{H}_2\text{O}_2$  30 % Optima pour analyse provenant de chez Fisher Chemical. Tous les échantillons sont minéralisés en salle blanche (classe 10 000) sous une hotte à flux laminaire afin de limiter les contaminations externes. Ils sont pesés avec une balance de précision avant la minéralisation afin de pouvoir mesurer les concentrations élémentaires.

### 2.2.2.1 Les échantillons de sang total

Entre 200 et 500  $\mu\text{L}$  de sang liquide sont prélevés et déposés dans un bécher Savillex® d'une contenance de 15 mL puis minéralisés avec 1 mL d' $\text{HNO}_3$  concentré et 200  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  30 %. Les béchers, préalablement fermés, sont placés sur une plaque chauffante à environ 100 °C, pendant au moins 12 heures.

Les béchers sont alors ouverts et placés sur plaque chauffante à 100°C pour évaporation jusqu'à séchage complet.

### 2.2.2.2 Les échantillons provenant des souris *Atp7b*<sup>-/-</sup>

#### 2.2.2.2.1 Le foie et les fèces

Les échantillons de foies sont lyophilisés préalablement à la minéralisation. La lyophilisation est un procédé permettant d'enlever les molécules d'eau par sublimation (transformation de la glace en vapeur) conférant aux tissus une meilleure conservation, et facilitant également leur minéralisation. L'échantillon stocké dans un tube Eppendorf® de 2 mL, est congelé avant d'être placé dans le lyophilisateur. Le bouchon du tube Eppendorf® est percé par trois petits trous afin de laisser l'eau s'échapper.

Les foies (lyophilisés) et les fèces sont déposés dans un bécher Savillex® d'une contenance de 15 mL puis minéralisés avec 5 mL d' $\text{HNO}_3$  concentré d'abord à froid pendant au moins 48 heures, puis à 100 °C également pendant au moins 48 heures. Après refroidissement, 0,5 mL



d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % est ajouté, et les béchers fermés sont replacés sur une plaque chauffante pendant au moins 72 heures, à 100 °C. Après évaporation complète, une seconde minéralisation, suivant le même procédé, est réalisée afin d'assurer la minéralisation complète des tissus.

#### **2.2.2.2 Les urines, les biles et les plasmas**

Concernant les urines, 1 mL d'échantillon est prélevé, pesé et déposé dans un bécher Savillex® d'une contenance de 15 mL. L'échantillon est alors séché sur plaque chauffante à 100°C avant d'effectuer la minéralisation. Les échantillons de bile et de plasma sont pesés et déposés dans un bécher Savillex® d'une contenance de 15 mL. Les échantillons sont minéralisés avec 1 mL d'HNO<sub>3</sub> concentré et 200 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %, puis les béchers préalablement fermés sont placés sur une plaque chauffante à environ 100 °C, pendant au moins 12 heures. Les béchers sont alors ouverts et placés sur plaque chauffante à 100°C jusqu'à séchage complet.

#### **2.2.2.3 Les échantillons provenant de l'isolation des mitochondries des cellules MDA et des foies de souris**

Les fractions « Mito », et « Noyaux » ainsi qu'un petit morceau de foie (fraction appelée « Bulk ») sont lyophilisées pendant au moins 48 h, les fractions « Cytosol » sont lyophilisées pendant au moins 96 h. Les échantillons lyophilisés sont alors pesés puis minéralisés avec 2 mL d'HNO<sub>3</sub> concentré à température ambiante, pendant au moins 24 h. Ensuite 0,2 mL d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % est ajouté, puis les béchers sont chauffés à 100 °C, pendant au moins 24 h. Après évaporation, une seconde minéralisation est réalisée avec 1 mL d'HNO<sub>3</sub> concentré et 0,2 mL d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % à 100 °C pendant au moins 24 h.

Pour tous les échantillons, à la suite de la minéralisation, les résidus secs obtenus sont repris avec un volume d'HNO<sub>3</sub> 0,5 N défini puis placés dans un bain à ultrasons pendant environ 20 minutes jusqu'à reprise totale. Un aliquot de 50 µL est alors prélevé pour la mesure des concentrations des éléments majeurs par ICP-AES (spectroscopie d'émission atomique à plasma à couplage inductif) et des éléments traces par ICP-MS (spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif). Le reste est à nouveau évaporé pour procéder à la séparation des éléments en vue d'effectuer les mesures de compositions isotopiques. Le principe de l'ICP-AES sera détaillé dans le chapitre 2.3.1.1 et celui de l'ICP-MS, dans le chapitre 2.3.2.1.

## 2.2.3 Séparation et purification des éléments

Afin de mesurer les rapports isotopiques d'un échantillon, il faut préalablement effectuer une séparation chimique des éléments d'intérêt. Ceci est nécessaire pour limiter les interférences et éviter les effets de matrice lors de la mesure par MC-ICP-MS (spectrométrie de masse à plasma induit à multi-collection). Le principe de la MC-ICP-MS sera détaillé dans le chapitre 2.3.3.1.

La séparation des éléments est réalisée dans la salle blanche du laboratoire (classe 10000), sous atmosphère filtrée et avec une légère surpression. Ceci permet de limiter les contaminations venant du milieu extérieur. De plus, les éluions sont réalisées sous une hotte à flux laminaire et les évaporations sous hottes à reflux. Ceci permet de limiter les contaminations croisées entre les échantillons.

### 2.2.3.1 Principe de la chromatographie sur résine échangeuse d'ions en phase liquide

La chromatographie est une méthode physico-chimique qui permet de séparer des constituants d'un mélange. Il existe plusieurs types de chromatographies :

- Par nature de la phase mobile : chromatographie sur couche mince, en phase liquide ou en phase gazeuse.
- Par type d'interaction : chromatographie d'adsorption, de partage, d'échange d'ions, d'exclusion stérique...
- Par type de support : chromatographie sur colonne, sur résine, sur papier.

La méthode employée pour séparer les éléments chimiques des échantillons traités au cours de thèse, est la chromatographie sur résine échangeuse d'ions en phase liquide. Ce processus fait intervenir une phase stationnaire (la résine échangeuse d'ions), et une phase liquide mobile que constitue l'échantillon. Les éléments sont sous leur forme ionisée et vont migrer à des vitesses différentes en fonction de leur coefficient de partage avec la résine. La résine est placée dans une colonne. L'échantillon sous forme liquide sera élué par gravité. L'affinité d'un ion pour la résine dépend de sa nature, du milieu (type d'acide, concentration, degré d'oxydation) et de la nature de la résine (capacité d'échange, degré de polymérisation, taille des grains de résine, etc.)

#### 2.2.3.1.1 Les résines échangeuses d'ions

Les résines sont constituées de petites billes de diamètre fixe (et dépendant du type de résine)

de polymères organiques de styrènes et divinylbenzènes. Ces polymères sont liés en surface à des groupements fonctionnels chargés, par exemple  $\text{NH}_3^+$  pour des résines dites anioniques ou encore  $\text{SO}_3^-$  pour des résines dites cationiques. La neutralité de la résine est assurée par un contre-ion portant une charge opposée à celle des billes, généralement  $\text{Cl}^-$  pour une résine anionique, et  $\text{H}^+$  pour une résine cationique. Ce contre-ion peut être échangé de façon réversible avec un ion de même charge contenu dans la phase liquide mobile.

Par exemple, pour la séparation du Cu, du Fe, et du Zn, j'ai utilisé la résine Biorad AG<sup>®</sup>MP1 100-200 mesh. « Mesh » désigne le « maillage », c'est-à-dire la taille des billes (ici comprise entre 150 et 75  $\mu\text{m}$ ). Cette résine macroporeuse est fortement basique, avec un groupement fonctionnel  $\text{NH}_3^+$  attaché au styrène divinylbenzène. Elle est sous forme chlorure, et pourra donc échanger son contre ion  $\text{Cl}^-$  avec un ion de même charge contenu dans l'échantillon (par exemple  $\text{CuCl}_2$ ). Cette résine présente des coefficients de distribution du Cu, Fe et Zn en milieu HCl plus élevés que ceux observés pour les résines anioniques classiques. Elle présente de larges pores et une structure fortement polymérisée. Ces caractéristiques confèrent à la résine des propriétés particulières nécessitant des précautions supplémentaires lors de sa préparation. C'est une résine fragile, qui se compacte vite.

Pour la séparation du magnésium, j'ai utilisé la résine Biorad AG<sup>®</sup>50W-X12 200-400 mesh (37 à 75  $\mu\text{m}$ ). C'est une résine cationique possédant un groupement fonctionnel  $\text{SO}_3^-$  attaché au styrène divinylbenzène.

### 2.2.3.1.2 Le coefficient de distribution

L'affinité d'un ion pour la résine dépend de la nature de l'ion, du milieu et de la nature de la résine. L'affinité d'un ion  $i$  pour la résine est caractérisée par le coefficient de distribution  $D_i$ .

$D_i = \text{concentration de } i \text{ sur la résine} / \text{concentration de } i \text{ dans la solution}$

Ainsi plus  $D_i$  est élevé, plus l'ion est retenu par la résine, et plus le volume d'éluant nécessaire pour le décrocher est grand.

Suivant la relation  $D_i = (v_i - V) / V$  où:

$v_i$  est le volume de rétention, c'est-à-dire le volume d'éluant pour lequel le maximum de l'élément est élué.

$V$  est le volume interstitiel de la résine, c'est-à-dire le volume total de liquide dans ses pores pour une quantité donnée de résine.

Des tables établies pour chaque type de résine permettent de connaître la nature et la concentration des éluants nécessaires pour la séparation des éléments d'intérêts d'un échantillon (figure 28).

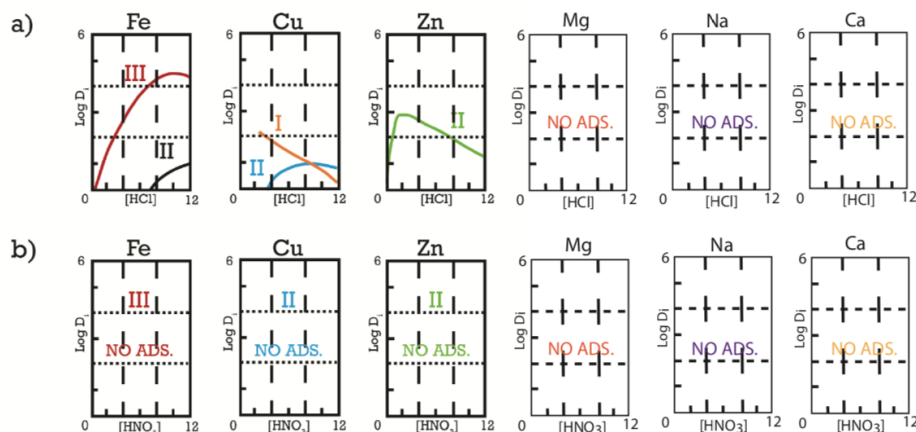


Figure 28 : Coefficients de distribution du fer, du cuivre et du zinc sur résine anionique.  
a) pour des solutions d'acide chlorhydrique (modifié d'après Kraus et Nelson 1958)  
b) pour les solutions d'acide nitrique (modifié d'après Faris et Buchanan 1964)

### 2.2.3.2 Séparation des éléments chimiques

Ce travail de thèse s'appuie essentiellement sur les mesures des compositions isotopiques du Cu. Mais nous verrons également au cours cette thèse des mesures de composition isotopique du Fe, du Zn, et du Mg. La séparation de ces éléments est donc présentée dans cette partie.

#### 2.2.3.2.1 Séparation du Cu, du Fe et du Zn

La séparation du Cu, du Zn et du Fe, s'effectue sur une colonne en quartz remplie avec 1,6 mL de résine Biorad AG<sup>®</sup>MP1 100-200 mesh selon le protocole de Maréchal *et al.* (1999) décrit dans le tableau 4 (Maréchal et al., 1999). Il est à noter ici que pour l'étude présentée au chapitre 5, le Fe est élué avec 12 mL d'HCl 2 N + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,001 %. La première fraction contenant la matrice de l'échantillon est alors récupérée afin de séparer ultérieurement le Mg. Après évaporation de toutes les fractions, celle de Zn est purifiée suivant le même protocole en récupérant la fraction Fe pour l'ajouter à la précédente. Le Cu est purifié suivant le même protocole. Le Fe est redissout avec 1 mL d'HCl 6 N pour être purifié sur une colonne Biorad<sup>®</sup> contenant 2 mL de résine AG<sup>®</sup>1-X8 suivant le protocole décrit dans le tableau 5.

1,6 mL AG-MP1 100-200 mesh

	Eluant	Volume en mL
Lavages	HNO <sub>3</sub> 0.5N	7
	H <sub>2</sub> O	3
	HNO <sub>3</sub> 0.5N	7
	H <sub>2</sub> O	3
	HNO <sub>3</sub> 0.5N	7
	H <sub>2</sub> O	3
Conditionnement	HCl 7N + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0.001 %	6
Dépôt de l'échantillon	HCl 7N + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0.001 %	1
Elution de la matrice	HCl 7N + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0.001 %	10
Elution du Cu	HCl 7N + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0.001 %	20
Elution du Fe	HCl 2N + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0.001 %	10 / 12
Elution du Zn	HNO <sub>3</sub> 0.5N	10

Tableau 4 : Protocole de séparation du Cu, du Fe et du Zn

2 mL AG1-X8 100-200 mesh

	Eluant	Volume en mL
Lavages	HNO <sub>3</sub> 0.5N	10
	H <sub>2</sub> O	5
	HNO <sub>3</sub> 0.5N	10
	H <sub>2</sub> O	5
	HNO <sub>3</sub> 0.5N	10
	H <sub>2</sub> O	5
Conditionnement	HCl 6N	10
Dépôt de l'échantillon	HCl 6N	1
Elution de la matrice	HCl 6N	10
Elution du Fe	HNO <sub>3</sub> 0.5N	10

Tableau 5 : Protocole de purification du Fe

#### 2.2.3.2.2 Séparation du Mg

La fraction matrice obtenue précédemment est évaporée afin de séparer et purifier le Mg selon le protocole décrit par Le Goff *et al.* (Le Goff et al., 2021). La première étape s'effectue sur une colonne en quartz remplie de 2 mL de résine AG®50W-X12 200-400 mesh, et le protocole est décrit dans le tableau 6. Après évaporation de la fraction Mg, 2 étapes de purification sont

réalisées sur des petites colonnes en quartz remplie de 210  $\mu$ L de résine AG®50W-X12 200-400 mesh suivant le protocole décrit dans le tableau 7.

2 mL AG50W-X12 200-400 mesh

	Eluant	Volume en mL
Lavages	HCl 6N	10
	H <sub>2</sub> O	5
	HCl 6N	10
	H <sub>2</sub> O	5
	HCl 6N	10
	H <sub>2</sub> O	5
Conditionnement	HCl 1N	10
Dépôt de l'échantillon	HCl 1N	0.5
Elution de la matrice	HCl 1N	17.5
Elution du Mg	HCl 7N + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0.001 %	29

Tableau 6 : Protocole de séparation du Mg

210  $\mu$ L AG1-X8 100-200 mesh

	Eluant	Volume en mL
Lavages	HCl 6N	3
	H <sub>2</sub> O	1
	HCl 6N	3
	H <sub>2</sub> O	1
	HCl 6N	3
	H <sub>2</sub> O	1
Conditionnement	HCl 0.4N	2.5
Dépôt de l'échantillon	HCl 0.4N	0.3
Elution de la matrice	HCl 0.4N	12.7
Elution du Mg	HCl 1N	3.5

Tableau 7 : Protocole de purification du Mg

### 2.2.3.3 Effet de la température sur la séparation des éléments

Les séparations chimiques des éléments sont toujours réalisées dans une salle blanche pressurisée et climatisée. Au cours de l'été 2018, le Laboratoire de Géologie a connu une panne de climatisation conduisant à une température dans la salle blanche avoisinant les 30 °C. Les éluions sur résines échangeuses étant calibrées à 20 °C, ces manipulations ont dû être stoppées. Cependant, j'ai tiré avantage de cette panne pour étudier l'effet de la température sur les profils d'éluion des résines anionique et cationique. Ainsi, j'ai effectué la séparation du Cu, du Fe et du Zn sur la résine macroporeuse anionique AG®MP1 et celle du Ca sur la résine cationique AG®50W-X12, à 28 °C. J'ai ensuite fait la même chose sous une hotte à flux laminaire spécialement installée dans une chambre froide à 4°C puis en salle blanche dans des conditions normales (à 20°C). Les courbes d'éluion des éléments ont ainsi été réalisées pour des standards biologiques, tels que du foie de bovin (SRM-1577c) et du sérum bovin foetal (FBS) pour la résine anionique ; la farine d'os (SRM-1486) et le standard IAPSO d'eau de mer pour la résine cationique. Ces travaux sont détaillés dans l'article ci-dessous (Absence of temperature effect on elution profiles on anionic and cationic ion-exchange resins from 4 °C to 28 °C), publié dans Rapid Communications in Mass Spectrometry. Les résultats montrent que les profils d'éluion conservent leurs caractéristiques quelle que soit la température, suggérant que les coefficients de partage entre résine et solution sont thermo-indépendants dans la gamme de température de 4 °C à 28 °C.

**PROTOCOL**

# Absence of temperature effect on elution profiles on anionic and cationic ion-exchange resins from 4°C to 28°C

Aline Lamboux<sup>1</sup> | Auguste Hassler<sup>1</sup> | Priyanka Davechand<sup>2</sup> | Vincent Balter<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Univ Lyon, ENSL, Univ Lyon 1, CNRS UMR 5276, LGL-TPE, F-69007 Lyon, France

<sup>2</sup>School of Geoscience, University of the Witwatersrand, 1 Jan Smuts Avenue, Johannesburg, 2000, South Africa

**Correspondence**

V. Balter, Univ Lyon, ENSL, Univ Lyon 1, CNRS UMR 5276, LGL-TPE, F-69007 Lyon, France  
Email: vincent.balter@ens-lyon.fr

**Rationale:** In labs devoted to the geochemistry of non-traditional isotopes, chemical elution is necessary to purify the element of interest. Elution is always performed in over-pressured and air-conditioned clean rooms. We took advantage of an air-conditioning failure in our lab during summer 2018 to study the effect of temperature on the characteristics of the elution profiles of ion-exchange resins.

**Methods:** We performed the ion-exchange separation of copper, iron and zinc on macroporous anionic AG MP-1 resin and that of calcium on cationic AG 50W-X12 resin, at 28°C, prior to the measurement of their isotopic ratios by mass spectrometry. We further performed these experiments in a clean hood in a cold room at 4°C. The elution curves were processed on biological standards, i.e. bovine liver (SRM-1577c), fetal bovine serum (FBS), bone meal (SRM-1486) and the seawater IAPSO standard.

**Results:** The elution profiles of major elements for each matrix, and those of copper, iron, zinc and calcium, were compared with those classically achieved at 20°C in air-conditioned conditions. The results show that the elution profiles preserve their characteristics whatever the temperature, suggesting that partitioning coefficients between resin and solution are thermo-independent in the range of temperature from 4°C to 28°C.

**Conclusions:** If generalized to other matrices, notably inorganic, and to other elements, notably the extreme case of the separation of Rare Earth Elements, the present results suggest that clean labs may not have to be air-conditioned. This would reduce installation and operating costs and have a positive effect on the environment, paving the way for the development of a “green geochemistry”.

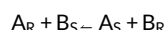
## 1 | INTRODUCTION

The measurement of metal stable isotope ratios is of wide interest in many fields, from cosmochemistry (e.g.,<sup>1–3</sup>), endogenous geochemistry (e.g.,<sup>4–6</sup>), environmental geochemistry,<sup>7–9</sup> paleoenvironments,<sup>10–12</sup> to plant biology<sup>13–15</sup> and animal biology.<sup>16–18</sup> Recent advances have even been achieved in the field of medicine.<sup>19–21</sup> Whatever the application, a preliminary step consisting of the separation of the element of interest from the matrix is necessary prior to the mass spectrometric analyses of metal isotope ratios. This step is classically achieved by means of ion-exchange chromatography. The principle is

based on electrostatic interactions between a stationary phase displaying ionic functional groups with a mobile phase containing analyte ions with the opposite charge. The stationary phase can thus be anionic or cationic. Resins containing anionic or cationic functional groups were developed in the frame of the Manhattan project for the separation and purification of strategic metals to study their nuclear properties. Series of articles describing the protocol for eluting metals were first published in the 1950s by Spedding et al for cationic resins<sup>22</sup> and Kraus and Moore for anionic resins.<sup>23</sup> These protocols have evolved since then with the commercialization of new resins, and today methods even exist for the fully automated separation of



metals (e.g.,<sup>24,25</sup>). Whatever the type of the resin (anionic or cationic) and given the reversible exchange reaction between two ions A and B between a resin R and the solution S, the equilibrium is:



and applying the mass action law gives:

$$K_{A/B}^{\ominus} = \frac{|A|_S \times |B|_R}{|A|_R \times |B|_S}$$

where  $K_{A/B}^{\ominus}$  is the equilibrium constant and  $|A|$  and  $|B|$  the activity of A and B in the resin and the solution. As for all equilibrium constants,  $K_{A/B}^{\ominus}$  is related to the standard change of the Gibbs free energy of the reaction ( $\Delta G^{\ominus}$ ) in kJ:

$$\Delta G^{\ominus} = -RT \ln K_{A/B}^{\ominus}$$

where  $R$  is the universal gas constant and  $T$  the absolute temperature in °K. The value of  $K_{A/B}^{\ominus}$  varies as a function of temperature. Conventionally, ion-exchange chromatography is carried out in air-conditioned clean rooms kept at a constant temperature, usually set between 17°C and 20°C.

In a cleanroom, the temperature is regulated with an air-conditioning unit, which is often part of a heating, ventilating and air-conditioning (HVAC) system. HVAC thus provides both over-pressured and temperature-conditioned air in a single unit, but these can be regulated by two independent units. Cleanrooms are isolated from outdoor contaminations by venting filtered air that eventually goes through an additional hood air filter to protect the workplace.

In July 2018, we experienced a HVAC breakdown at the cleanroom of the Laboratoire de Géologie de Lyon that lasted several weeks during a period of heat-wave. The temperature rapidly rose in the cleanroom and stabilized around 28°C. Most users then stopped working, but we took advantage of the situation to test the influence of the temperature on the  $K^{\ominus}$  values between metals and cationic and anionic resins. We executed the classical elution protocols and looked for changes in the elution profiles relative to those calibrated at 20°C. We then repeated the procedure at 4°C in a cold room. We performed the elution protocols at 28°C and 4°C for the separation of Cu, Fe, and Zn on AG MP-1 macroporous anionic resin following Maréchal et al.<sup>26</sup> and for the separation of Ca on AG 50W-X12 cationic resin following Tacail et al.<sup>27</sup> We constructed the elution curves for standards that are routinely used in the lab and for which we have fairly good experience at 20°C, i.e. the SRM-1577c "bovine liver" international reference material and fetal bovine liver (FBS) for the separation of Cu, Fe and Zn, and the SRM-1486 "bone meal" and IAPSO seawater international reference materials for the separation of Mg and Ca. In all cases, we also monitored the elution profiles of the associated major elements.

## 2 | EXPERIMENTAL

### 2.1 | Reagents and digestion

Ultrapure water (resistivity 18.2 MΩ cm) was produced using a Millipore Synergy system (Merck, Darmstadt, Germany). Concentrated technical grade HCl and HNO<sub>3</sub> (Carlo Erba Reagents, Milan, Italy) were distilled at low temperature in PFA equipment (Saville, Eden Prairie, MN, USA). Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30%) Suprapur was purchased from Merck. Macroporous anion-exchange resin AG MP-1 (100–200 mesh) and cation-exchange resin AG 50W-X12 (200–400 mesh) were purchased from BioRad Laboratories (Hercules, CA, USA). About 160 mg of FBS (lot number 014 M3399; Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA), 50 mg of SRM-1577c from the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA), 200 µg of SRM-1486 (NIST) and 50 µL of reference seawater provided by The International Association for the Physical Sciences of the Oceans (IAPSO) were digested using 3 mL concentrated distilled HNO<sub>3</sub> for 24 h. The vials were heated at 110°C for 3 days, then allowed to cool to room temperature. About 0.5 mL of Suprapur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) was then added to the cooled down samples. After 2 h at room temperature, the vials were heated at 110°C on a hotplate for 2 days. The solutions were then evaporated to dryness and dissolved in 6 M HCl, evaporated again and taken up for chemical separation.

### 2.2 | Elutions on anionic resin

The FBS and SRM-1577c standards were redissolved in 3.2 mL and 4 mL of 7 M HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001%, respectively. Chemical separation was then implemented according to the method of Maréchal et al.<sup>26</sup>: 1 mL of sample was loaded on a quartz column containing 1.6 mL of AG MP-1 resin previously rinsed with 0.5 N HNO<sub>3</sub> and conditioned with 7 mL 7 M HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001%. The matrix was eluted with 10 mL 7 M HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001%. Copper was eluted with 20 mL 7 M HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001%; Fe was eluted with 10 mL 2 M HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001%; and, finally, Zn was eluted with 10 mL 0.5 M HNO<sub>3</sub>. The eluted fraction was collected in a 2-mL aliquot, evaporated and taken up in 0.5 M HNO<sub>3</sub>. The elution of S, Mg, Na, K, P and Ca was monitored in addition to that of Cu, Fe and Zn.

### 2.3 | Elutions on cationic resin

The SRM-1486 and the IAPSO standards were redissolved in 200 µL 0.4 M HCl. Chemical separation was then implemented according to the method of Tacail et al.<sup>27</sup>: 10 µL and 50 µL of sample for SRM-1486 and IAPSO were loaded, respectively, on a column containing 210 µL of AG 50W-X12 resin previously rinsed with 6 mL 6 M HCl and conditioned with 3 mL 0.4 M HCl. The matrix was eluted with 13 mL 0.4 M HCl. Mg was then eluted with 3.5 mL 1 M HCl and

finally Ca and Sr were eluted with 2 mL 6 M HCl. The eluted fraction was collected in a 1-mL aliquot, evaporated and taken up in 0.5 M HNO<sub>3</sub>. The elution of Mg, S, Na, P and Sr was monitored in addition to that of Ca.

## 2.4 | Instrumentation and measurement protocols

Single-element standard solutions from SCP Science (Québec, Canada) were used for the quantification of Ca, S, Mg, Na, K, P, Fe, Cu, Zn and Sr. Scandium and In solutions from SCP Science were used for the internal standard calibration to correct for oxide interferences and instrumental drift. All measurements were performed at the Laboratoire de Géologie de Lyon. The concentrations of Cu, Fe and Zn were measured using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (7500CX; Agilent, Santa Clara, CA, USA). The concentrations of Ca, S, Mg, Na, K, P and Sr were measured using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) (iCAP 7000 Series instrument; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The concentrations were calculated using calibration curves based on multi-elemental solutions. The multi-elemental solutions were also used to monitor and correct the instrumental drift over the analytical session. The validity and reproducibility of major and trace element concentrations are estimated to be better than 10% ( $\pm 2$  sd) based on repeated measurements of the international reference materials as unknown samples.

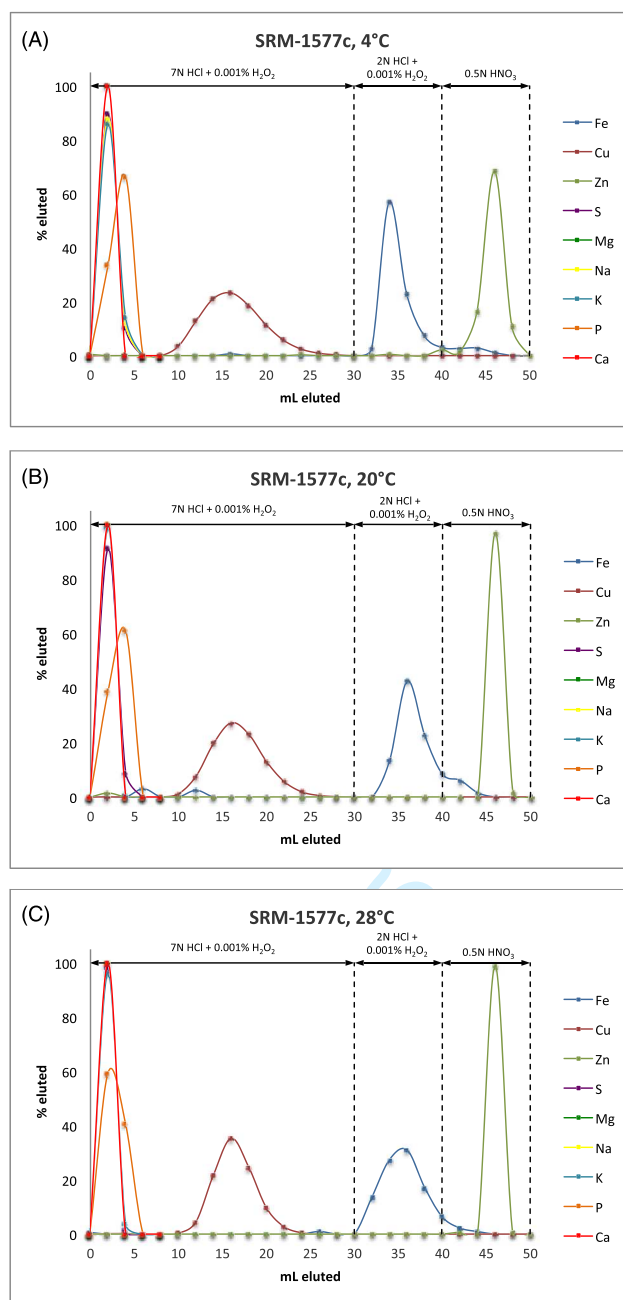
## 3 | RESULTS

### 3.1 | Elutions on anionic resin

The concentrations of Na, K, S, Ca, Mg and P, which are major elements in the matrices of the bovine liver SRM-1577c and the fetal bovine liver FBS standards, were determined along with the Fe, Cu and Zn concentrations. Elution curves for these two standards at 4°C, 20°C and 28°C are presented in Figures 1A–1C for SRM 1577c and in Figures 2A–2C for FBS. The first 10 mL of 7 M HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001% are used to discard elements present in the matrix: Na, K, S, Ca, Mg and P are totally discarded in this fraction, while Cu, Fe and Zn are still retained on the resin.

For SRM-1577c, 96.5%, 98.8%, and 99.3% of Cu are eluted with the next 20 mL of 7 M HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001% at 4°C, 20°C and 28°C, respectively. Fe is further eluted at 92.7%, 86.9% and 95.5% with the next 10 mL of 2 M HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001% at 4°C, 20°C and 28°C, respectively. Finally, 96.6%, 98.6% and 99.4% of Zn are eluted with 10 mL 0.5 M HNO<sub>3</sub> at 4°C, 20°C and 28°C, respectively.

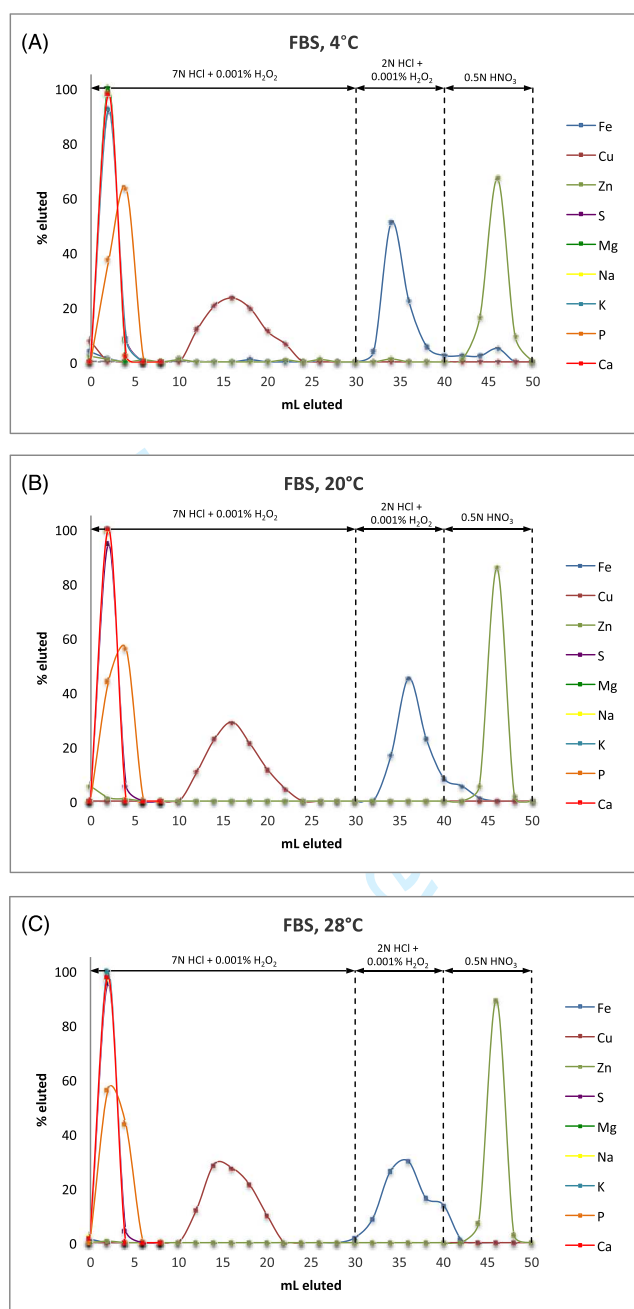
For FBS, 92.6%, 100% and 100% of Cu are eluted with the next 20 mL of 7 M HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001% at 4°C, 20°C and 28°C, respectively. Fe is further eluted at 84.6%, 93.1% and 83.6% with the next 10 mL of 2 M HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001% at 4°C, 20°C and



**FIGURE 1** Elution of matrix elements P, K, Na, Mg, S, Ca and Cu, Fe and Zn from the SRM-1577c bovine liver standard on the macroporous anionic AG MP-1 resin at A, 4°C; B, 20°C; and C, 28°C. Uncertainty on concentration measurement is  $\sim \pm 5\%$  [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

28°C, respectively. Finally, 93.1%, 92.4% and 99.5% of Zn are eluted with 10 mL 0.5 M HNO<sub>3</sub> at 4°C, 20°C and 28°C, respectively.

It is noteworthy that some proportion of Fe is eluted along with the Zn fraction: representing 6.7%, 7.7% and 3.1% of Fe for SRM-1577c at 4°C, 20°C and 28°C, respectively, and 9.2%, 6.9% and 15.2% for FBS at 4°C, 20°C and 28°C, respectively.



**FIGURE 2** Elution of matrix elements P, K, Na, Mg, S, Ca and Cu, Fe and Zn from the FBS standard on the macroporous anionic AG MP-1 resin at A, 4°C; B, 20°C; and C, 28°C. Uncertainty on concentration measurement is  $\sim \pm 5\%$  [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

### 3.2 | Elutions on cationic resin

The concentrations of P, Mg and Na, which are major elements in the matrix of the bone meal SRM-1486 standard, were determined along with Ca concentrations. Elution curves for the SRM-1486 standard at 4°C, 20°C and 28°C are presented in Figures 3A–3C. The concentrations of Na, S and Mg, which are major elements in the

matrix of the seawater IAPSO standard, were determined along with Ca and Sr concentrations. Elution curves for the IAPSO standard at 4°C, 20°C and 28°C are presented in Figures 4A–4C.

The first 13 mL of 0.4 M HCl are used to discard elements present in the matrix. The results show that Na, P and S are totally discarded. For both standards, Mg is completely eluted with 3.5 mL 1 M HCl at 4°C, 20°C and 28°C. For SRM-1486, Ca is completely eluted with 2.5 mL 6 M HCl at 4°C, 20°C and 28°C. For IAPSO, Ca and Sr are both completely eluted with 2.5 mL 6 M HCl at 4°C, 20°C and 28°C.

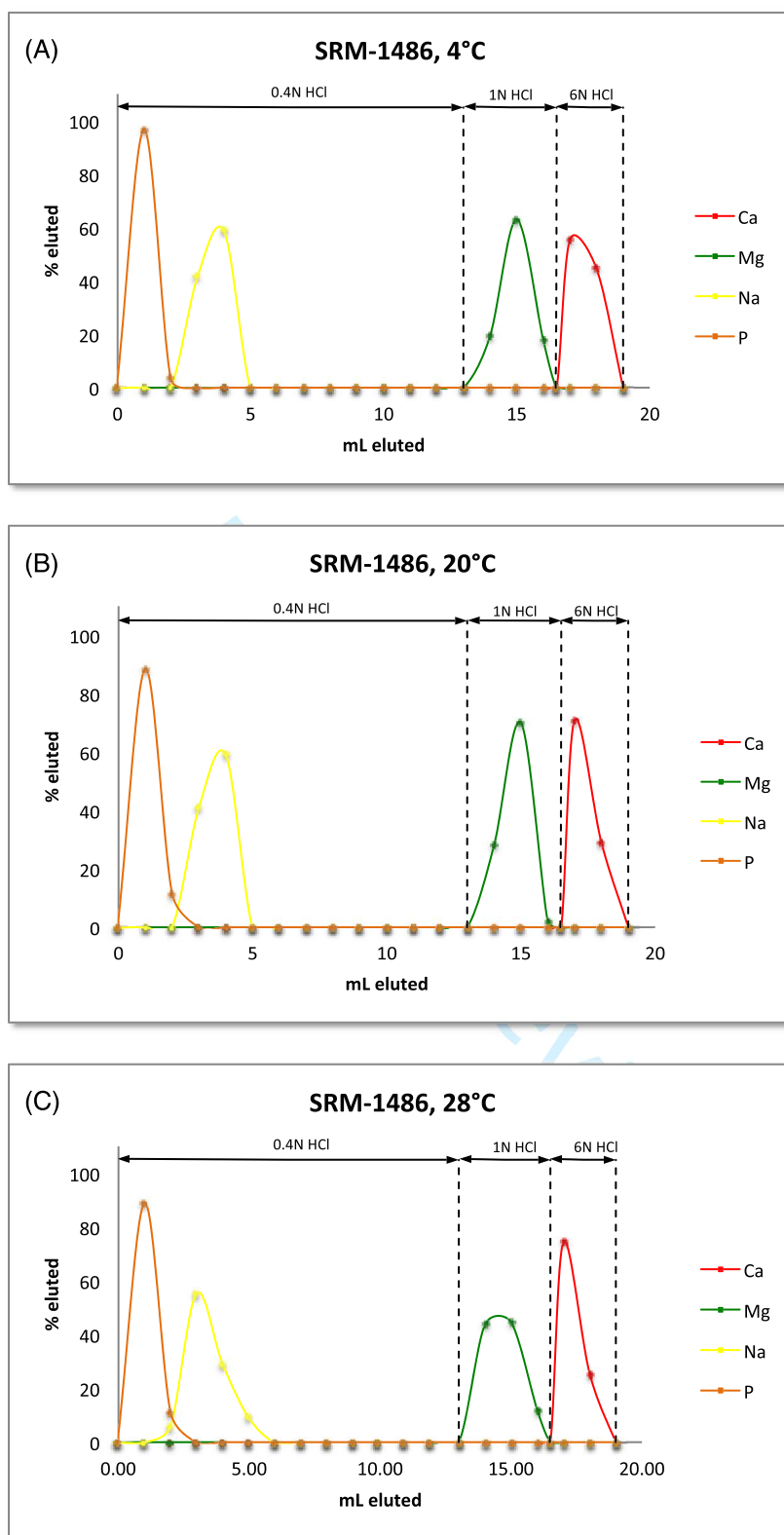
## 4 | DISCUSSION

The present results suggest some minor modifications to the protocol of Maréchal et al.<sup>26</sup> The elements of interest are mostly eluted as described by these authors for all temperatures. However, if all the matrix elements are always completely eluted with the first 6 mL 7 M HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001%, Cu begins to be eluted at the eighth mL of 7 M HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001%. To overcome any possible Cu loss, we suggest collecting the Cu fraction with 22 mL 7 M HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001% after discarding the first 8 mL of 7 M HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001% containing the matrix. Regarding Fe, a significant proportion is always retained on the resin and is eluted along with Zn in 0.5 M HNO<sub>3</sub>. To obtain a better Fe extraction yield, the initial 10 mL volume of 2 M HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001% should be extended to 15 mL.

Overall, the results show that the elution profiles for major and trace elements in various matrices, either on cationic or anionic resins, remain identical whatever the temperature between 4°C and 28°C. This suggests that the thermo-dependence of the partitioning coefficients  $K^{\ominus}$  for most the elements and cationic and anionic resins is not high enough in this range of temperature to be measured.

For a given element, the  $K^{\ominus}$  values are generally higher in anionic than in cationic resins. A comparison of  $K^{\ominus}$  values for cationic and anionic resins is given as an example in Table 1. Over a suite of elements including Cu, Zn, Cd, Fe, Ga, In, Th and U, only Th exhibits  $K^{\ominus}$  values higher in the AG MP-50 cationic resin than in the AG MP-1 and AG 1-X8 anionic resins. Some  $K^{\ominus}$  values for anionic resins are so high that this kind of resin is sometimes said to be a “stick non-stick” resin. In these conditions, it is tempting to posit that anionic resins do not exhibit any apparent sensitivity to temperature, but the results of the study of Kraus and Raridon show that this is not the case.<sup>30</sup> Using the pre-loaded column technique, i.e. the resin is equilibrated with the ion whose adsorption is to be studied prior to being uniformly loaded in the column, these authors showed that the  $K^{\ominus}$  values for Zn and Ga decreased with temperature increasing from 25°C to 150°C. These authors also published results for cationic resins showing that  $K^{\ominus}$  values increase (Be, La, Co, Zn, Eu<sup>3+</sup>) or decrease (Na, K, Ba, Rb, Cs) with increasing temperature from 2°C to 145°C.<sup>31</sup> The thermo-dependence of the  $K^{\ominus}$  values was therefore established, but no generalized thermodynamic laws have been proposed between the various ion-exchange reactions. Some elements, such as Ba, even exhibit a curved thermo-dependence relationship.<sup>31</sup> The absence of a

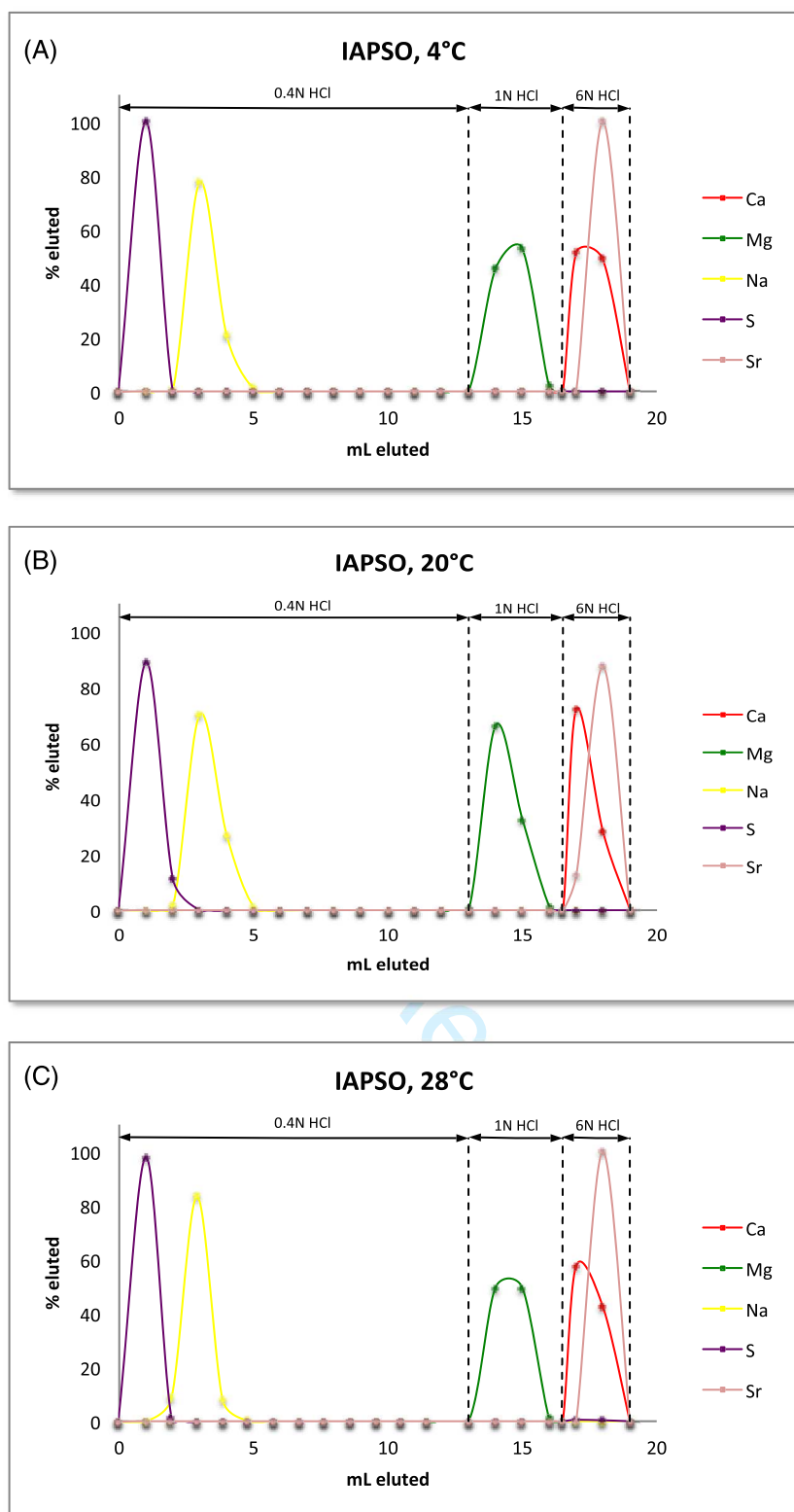
**FIGURE 3** Elution of matrix elements P, Na and Mg and Ca from the SRM-1486 bone meal standard on the cationic AG 50W-X12 resin at A, 4°C; B, 20°C; and C, 28°C. Uncertainty on concentration measurement is  $\sim \pm 5\%$  [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]



clear correlation between temperature and ion-exchange equilibria on cationic resins using the pre-loaded column technique is reinforced by results obtained using batch experiments.<sup>32–34</sup>

Theoretically, the varying temperature should have an effect not only on the value of the equilibrium constant, but also on the kinetic rate constant, i.e. with higher temperature, to a certain limit,

increasing kinetics and therefore the separation factor. Note that the kinetics is also affected by the degree of crosslinking of the resin, with higher crosslinking decreasing kinetics. There have been fewer studies aimed at manipulating temperatures to improve separation factors on cationic resins than those dedicated to evaluating the thermo-dependence of ion-exchange equilibria. The separation of Rare Earth



**FIGURE 4** Elution of matrix elements P, Na and Mg and Ca from the IAPSO seawater standard on the cationic AG 50W-X12 resin at A, 4°C; B, 20°C; and C, 28°C. Uncertainty on concentration measurement is  $\sim \pm 5\%$  [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

Elements (REEs) has long been a focus of ion chromatography development, and the effects of temperature on the REE separation factors have been tested on several occasions. Glass<sup>35</sup> tested the influence of eluting Eu, Cm, Am and Pm on AG 50W-X12 at 87°C instead at room temperature, and found that the elution peaks appeared more rapidly and were less separated, suggesting that

temperature improves kinetics and has a negative effect on the separation factor. Conversely, Strelow and Gricius<sup>36</sup> found a strong positive effect on the separation factor between La and Th on AG 50W-X8 at 50°C compared with room temperature, implying that the temperature effect on the separation factor is element-dependent.

**TABLE 1** Comparison of  $K^{\ominus}$  values for some elements on cationic and anionic resins in various HCl molarity

	Cationic resin AG MP-50 <sup>a</sup>			Anionic resin AG MP-1 <sup>b</sup>			Anionic resin AG 1-X8 <sup>b</sup>		
	1 M	3 M	5 M	1 M	3 M	5 M	1 M	3 M	5 M
Cu(II)	27.7	1.9	<1		13.2	27.2	4		13.1
Zn	19.7	1.8	<1	412	830	416	554		276
Cd	2.1	<1	<1	986	989	473	626		269
Fe(III)	87	2.2	0.7		19.6	158	35.6		340
Ga	110	5	1.9		18.6	1020	24.3		1780
In	1.4	<1	<1		17.4	29.2	20.1		19.4
Th	104	1810	285		4.1	4.5	1.7		1
U(VI)	68	12.1	5.2		33.2	234	21.1		111

<sup>a</sup>Values from Strelow.<sup>28</sup><sup>b</sup>Values from van der Walt et al.<sup>29</sup>

Here, we found no effect of the temperature on the elution profiles of ten elements for four different types of matrices (i.e. serum, bone, liver and seawater). Our results are therefore divergent from the conclusions reached from the above literature references. Some allowances must be made that could reconcile these two apparently contradictory outcomes. First, our results are representative of a very narrow range of temperature, i.e. from 4°C to up 28°C, while those mentioned above can reach 200°C, with the first temperature point above room temperature, usually at 45–50°C. Second, our results were obtained on real samples while those mentioned above were obtained using synthetic solutions. In the former case, competition of the elements for adsorption on the functional groups is certainly important, and possibly attenuates any potential temperature effects.

The installation and the maintenance of HVAC in a clean lab represent a significant cost, but the impact on the environment also has to be considered. Nowadays the clean lab impact on the environment is a critical issue that must be taken into account, and reducing this impact is the goal of green chemistry. Originally, the principles of green chemistry were established through twelve rules by Anastas.<sup>37</sup> More recently, Gałuszka et al.<sup>38</sup> extended the use of twelve hallmarks to green analytical chemistry. In all cases, the methodological developments of green chemistry involve not only reducing the samples, reagents and waste volumes production, but also minimizing the use of energy consumption, while keeping analytical performances unchanged. This represents the sixth of the twelfth principles of green chemistry proposed by Anastas “*Design for Energy Efficiency. Energy requirements of chemical processes should be recognized for their environmental and economic impacts and should be minimized. If possible, synthetic methods should be conducted at ambient temperature and pressure*”.<sup>37</sup> Because our study shows that elution curves for 12 major and trace elements are not affected by temperature in a range compatible with natural seasonal variations, this suggests that air conditioning might not be necessary in clean labs used to perform ion-exchange chromatographic experiments. It does mean that air-conditioning is

not important for comfortable working conditions. The present results should be challenged by further studies on other matrices and elements.

## 5 | CONCLUSIONS

For the ten monitored elements (S, Mg, Na, K, P, Ca, Cu, Fe, Zn and Sr), our results show no sizeable change in the elution pattern on both cationic and anionic resins as a function of the temperature. This suggests that partitioning coefficients between resin and solution are thermo-independent in the range of temperature from 4°C to 28°C, typical of seasonal variations. To complete the present study elution profiles of other elements and on other matrices should be performed, but the present results already suggest that clean labs may not need to be air-conditioned which represents, to our knowledge, the first proposition for the development of green geochemistry.

### ORCID

Vincent Balter  <https://orcid.org/0000-0002-9236-4834>

### REFERENCES

- Moynier F, Blichert-Toft J, Telouk P, Luck J-M, Albarède F. Comparative stable isotope geochemistry of Ni, Cu, Zn, and Fe in chondrites and iron meteorites. *Geochim Cosmochim Acta*. 2007;71(17):4365-4379.
- Tian Z, Chen H, Fegley B Jr, et al. Potassium isotopic compositions of howardite-eucrite-diogenite meteorites. *Geochim Cosmochim Acta*. 2019; 266, 611-632.
- Teng F-Z, Li W-Y, Ke S, et al. Magnesium isotopic composition of the earth and chondrites. *Geochim Cosmochim Acta*. 2010;77:4150-4166.
- Larson PB, Maher K, Ramos FC, Chang Z, Gaspar M, Meinert LD. Copper isotope ratios in magmatic and hydrothermal ore-forming environments. *Chem Geol*. 2003;201:337-350.
- Teng F-Z, Wadhwa M, Helz RT. Investigation of magnesium isotope fractionation during basalt differentiation: Implications for a chondritic composition of the terrestrial mantle. *Earth Planet Sci Lett*. 2007;261:84-92.



6. Chen H, Savage PS, Teng F-Z, Helz RT, Moynier F. Zinc isotope fractionation during magmatic differentiation and the isotopic composition of the bulk Earth. *Earth Planet Sci Lett.* 2013;369–370: 34–42.
7. Cloquet C, Carignan J, Libourel G, Sterckeman T, Perdrix E. Tracing source pollution in soils using cadmium and lead isotopes. *Environ Sci Technol.* 2006;40(8):2525–2530.
8. Feng X, Foucher D, Hintelmann H, Yan H, He T, Qiu G. Tracing mercury contamination sources in sediments using mercury isotope compositions. *Environ Sci Technol.* 2010;44(9):3363–3368.
9. Aucour A-M, Bedell J-P, Queyron M, Thol   R, Lamboux A, Sarret G. Zn speciation and stable isotope fractionation in a contaminated urban wetland soil–*Typha latifolia* system. *Environ Sci Technol.* 2017; 51(15):8350–8358.
10. Xu L, Lehmann B, Mao J, et al. Mo isotope and trace element patterns of lower Cambrian black shales in South China: Multi-proxy constraints on the paleoenvironment. *Chem Geol.* 2012;318:45–59.
11. Saenger C, Wang Z. Magnesium isotope fractionation in biogenic and abiogenic carbonates: Implications for paleoenvironmental proxies. *Quat Sci Rev.* 2014;90:1–21.
12. Brazier J-M, Suan G, Tacail T, et al. Calcium isotope evidence for dramatic increase of continental weathering during the Toarcian oceanic anoxic event (early Jurassic). *Earth Planet Sci Lett.* 2015;411: 164–176.
13. Moynier F, Pichat S, Pons M-L, Fike D, Balter V, Albarède F. Isotopic fractionation and transport mechanisms of Zn in plants. *Chem Geol.* 2009;267:125–130.
14. Bolou-Bi EB, Poszwa A, Leyval C, Vigier N. Experimental determination of magnesium isotope fractionation during higher plant growth. *Geochim Cosmochim Acta.* 2010;74:2523–2537.
15. Schmitt A-D, Cobert F, Bourgeade P, et al. Calcium isotope fractionation during plant growth under a limited nutrient supply. *Geochim Cosmochim Acta.* 2013;110:70–83.
16. Martin JE, Vance D, Balter V. Magnesium stable isotope ecology using mammal tooth enamel. *Proc Natl Acad Sci.* 2015; 112(2), 430–435.
17. Martin JE, Tacail T, Cerling TE, Balter V. Calcium isotopes in enamel of modern and Plio-Pleistocene east African mammals. *Earth Planet Sci Lett.* 2018;503:227–235.
18. Sauzéat L, Laurençon A, Balter V. Metallome evolution in ageing *C. elegans* and a copper stable isotope perspective. *Metallomics.* 2018; 10(3):496–503.
19. Bondanese VP, Lamboux A, Simon M, et al. Hypoxia induces copper stable isotope fractionation in hepatocellular carcinoma, in a HIF-independent manner. *Metallomics.* 2018;8:1177–1184.
20. Albarède F, Télouk P, Balter V. Medical applications of isotope metallomics. Measurements, theories and applications of non-traditional stable isotopes. *Rev Mineral Geochem.* 2017;82:851–885.
21. Sauzéat L, Bernard E, Perret-Liaudet A, et al. Isotopic evidence for disrupted copper metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *iScience.* 2018;6:264–271.
22. Spedding FH, Voigt AF, Gladrow EM, Sleight NR. The separation of rare earths by ion exchange. I. Cerium and yttrium. *J Am Chem Soc.* 1947;69(11):2777–2781.
23. Kraus KA, Moore GE. Anion exchange studies. I. Separation of zirconium and niobium in HCl-HF mixtures. *J Am Chem Soc.* 1951;73:9–13.
24. Ireland TJ, Tissot FLH, Yokochi R, Dauphas N. Teflon-HPLC: A novel chromatographic system for application to isotope geochemistry and other industries. *Chem Geol.* 2013;357:203–214.
25. Romaniello SJ, Field MP, Smith HB, Gordon GW, Kim MH, Anbar AD. Fully automated chromatographic purification of Sr and Ca for isotopic analysis. *J Anal At Spectrom.* 2015;30:1906–1912.
26. Maréchal CN, Télouk P, Albarède F. Precise analysis of copper and zinc isotopic compositions by plasma-source mass spectrometry. *Chem Geol.* 1999;156:251–273.
27. Tacail T, Albalat E, Télouk P, Balter V. A simplified protocol for measurement of Ca isotopes in biological samples. *J Anal At Spectrom.* 2014;29:529–535.
28. Strelow FEW. Distribution coefficients and ion exchange behavior of 46 elements with a macroreticular cation exchange resin in hydrochloric acid. *Anal Chem.* 1984;56:1053–1056.
29. van der Walt TN, Strelow FEW, Verheij R. The influence of crosslinkage on the distribution coefficients and anion exchange behaviour of some elements in hydrochloric acid. *Solvent Extr Ion Exc.* 1985;3:732–740.
30. Kraus KA, Raridon RJ. Anion exchange studies. XXXI. Adsorption of Zn(II) and Ga(III) from HCl solutions in the temperature range 25 to 150  C. *J Am Chem Soc.* 1960;82:3271–3276.
31. Kraus KA, Raridon RJ. Temperature dependence of some cation exchange equilibria in the range 0 to 200  . *J Phys Chem.* 1959;63: 1901–1907.
32. Bonner OD, Smith LL. The effect of temperature on ion-exchange equilibria. I. the sodium–hydrogen and cupric–hydrogen exchanges. *J Phys Chem.* 1957;61:1614–1617.
33. Bonner OD, Pruett RR. The effect of temperature on ion exchange equilibria. II. The ammonium–hydrogen and thallos–hydrogen exchanges. *J Phys Chem.* 1959;63:1417–1420.
34. Bonner OD, Pruett RR. The effect of temperature on ion exchange equilibria. III. Exchanges involving some divalent ions. *J Phys Chem.* 1959;63:1420–1423.
35. Glass RA. Chelating agents applied to ion-exchange separations of americium and curium. *J Am Chem Soc.* 1955;77:807–809.
36. Strelow FEW, Gricius AJ. Separation of thorium from lanthanum and other elements by cation-exchange chromatography at elevated temperatures. *Anal Chem.* 1972;44(11):1898–1900.
37. Anastas PT. Green chemistry and the role of analytical methodology development. *Crit Rev Anal Chem.* 1999;29:167–175.
38. Ga  uszka A, Migaszewski Z, Namie  nik J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends Anal Chem.* 2013;50:78–84.

**How to cite this article:** Lamboux A, Hassler A, Davechand P, Balter V. Absence of temperature effect on elution profiles on anionic and cationic ion-exchange resins from 4  C to 28  C. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2020;34:e8806. <https://doi.org/10.1002/rcm.8806>

## 2.3 Les analyses par spectrométrie

La spectrométrie regroupe un ensemble de méthodes d'analyse permettant de déterminer la composition et la structure de la matière.

Je me limiterai dans ce chapitre à la présentation des techniques utilisées au cours de cette thèse. Dans une première partie, j'aborderai la spectrométrie d'émission optique (ICP-AES) utilisée pour la mesure des concentrations des éléments majeurs. La deuxième partie sera consacrée à la description de la spectrométrie de masse à plasma induit (ICP-MS) utilisée pour la mesure des concentrations des éléments traces. Enfin dans la troisième partie, j'aborderai la spectrométrie de masse à plasma induit à multi-collection (MC-ICP-MS) utilisée pour la détermination des rapports isotopiques.

Pour chaque échantillon traité au cours de cette thèse, les concentrations élémentaires ont été mesurées avant les étapes de séparations des éléments. Cela permet, d'une part de déterminer les concentrations élémentaires des échantillons et ainsi avoir une vue d'ensemble de l'échantillon et de connaître les proportions des éléments mesurés. Et d'autre part, cela permet d'adapter la quantité d'échantillon chargée sur les colonnes. En effet, les résines échangeuses d'ions utilisées pour la séparation des métaux ont une certaine capacité, et il est important de connaître la quantité totale de métal chargée sur la colonne contenant ces résines afin de ne pas les saturer. La plupart du temps, des mesures de concentration sont également réalisées à la suite des séparations des éléments. Ceci permet d'abord de contrôler l'efficacité et les rendements de ces séparations. En effet, un rendement proche de 100 % est requis pour assurer des mesures de compositions isotopiques fiables. Cela permet également de pouvoir ajuster les concentrations pour les mesures par MC-ICP-MS. En effet, si l'élément mesuré est trop concentré les collecteurs des appareils risquent de saturer ; à l'inverse si la concentration est trop faible, la mesure ne sera pas fiable. De plus, lors d'une mesure par MC-ICP-MS, il est important que la concentration de l'échantillon soit identique (ou du moins très proche) à celle des standards.



## 2.3.1 Mesure des éléments majeurs

### 2.3.1.1 Principe de l'ICP-AES

Les spectromètres à émission : ICP-AES (atomic emission spectrometry) ou ICP-OES (optical emission spectrometry) permettent la mesure des éléments majeurs (de l'ordre de plusieurs ppm).

L'échantillon mis en solution est introduit par une pompe péristaltique dans un nébuliseur. Celui-ci permet de transformer la solution en aérosol composé de micro gouttelettes à l'aide d'argon gazeux. Une chambre de nébulisation permet alors d'éliminer les plus grosses gouttelettes. L'aérosol ainsi formé ne contenant plus que des gouttelettes de quelques  $\mu\text{m}$  est acheminé par un flux de gaz inerte (l'argon) dans la torche à plasma chauffée à très haute température (entre 6 000 et 10 000 K). Ceci va permettre de dissocier, atomiser et ioniser les éléments présents dans l'échantillon. Afin de faire baisser la température du système, un second flux d'argon (cooling gas) est introduit dans la torche. En retournant à leur état fondamental, les atomes ionisés dans le plasma émettent un photon dont l'énergie est caractéristique d'un élément donné. La séparation des photons se fait à l'aide d'un réseau de diffraction. Les photons sont ensuite collectés grâce à des capteurs photos fixes utilisant un dispositif de transfert de charge. Ici, ce sont donc des longueurs d'onde émises par un atome, lorsqu'il passe d'un état ionisé excité à son état stable, qui sont mesurées.

### 2.3.1.2 Protocole de mesure des éléments majeurs

Au cours de cette thèse, les appareils utilisés pour la mesure des concentrations en éléments majeurs sont les ICP-AES Thermo Scientific iCAP 7400, iCAP 6000 et iCAP PRO.

Les éléments mesurés sont Na, Ca, Mg, Fe, S, P et K. Les échantillons sont repris et dilués avec de l' $\text{HNO}_3$  0,5 N. Le scandium (Sc) à 1 ppm est utilisé comme standard interne afin de corriger la dérive instrumentale au cours du temps ainsi que les effets de matrice. Une gamme d'étalonnage externe de 0 à 5 ppm est utilisée pour la détermination des concentrations.

Au cours d'une séquence de mesure, des « blancs » (solution d' $\text{HNO}_3$  0,5 N avec le Sc à 1 ppm) et des étalons sont régulièrement mesurés (environ tous les 10 échantillons). Les mesures des « blancs » permettent de corriger d'une éventuelle contamination externe. Les mesures des étalons de contrôle permettent de corriger une éventuelle dérive de l'appareil au cours du temps.

## 2.3.2 Mesure des éléments traces

### 2.3.2.1 Principe de l'ICP-MS

La spectrométrie de masse à couplage induit (ICP-MS) est une technique d'analyse multi-élémentaire. Elle permet en quelques minutes de déterminer la concentration de nombreux éléments présents dans un échantillon à des niveaux très bas (jusqu'à l'ordre du ppt). Le principe de l'ICP-MS repose sur la séparation, l'identification et la quantification des éléments constitutifs d'un échantillon en fonction de leur masse. Elle est fondée sur le couplage d'une torche à plasma générant des ions, et d'un spectromètre de masse qui sépare ces ions en masse.

L'introduction de l'échantillon et l'ionisation des éléments sont les mêmes que pour l'ICP-AES. Une partie du plasma formé (environ 10 %) est échantillonnée par un premier cône (« le sampler ») en nickel et passe ensuite dans un deuxième cône (« le skimmer ») en nickel également. Entre ces deux cônes placés sous haute tension règne un vide primaire qui permettra de passer de la pression atmosphérique au vide secondaire de l'analyseur.

Les ions ainsi accélérés sont alors focalisés par un ensemble de lentilles électrostatiques avant d'arriver à l'analyseur. L'analyseur est un quadripôle permettant de séparer les ions suivant leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ). Ce rapport  $m/z$  est déterminé en fonction de la fréquence appliquée au quadripôle. Les quatre barres cylindriques qui le composent sont séparées en deux paires opposées et soumises à un courant continu et alternatif. Les deux paires ont des tensions continues opposées et des tensions alternatives de même amplitude et de signe opposé. Dans le plan formé par la paire positive les ions légers sont trop déviés et heurtent les barres. L'ion à analyser, et ceux ayant une masse supérieure, restent entre les deux barres. Dans ce plan, le quadripôle joue le rôle de filtre passe-haut. Dans le plan de la paire négative, ce sont les ions lourds qui sont déviés, ce qui équivaut à un filtre passe-bas. En combinant ces deux filtres, seuls les ions ayant le rapport  $m/z$  (masse/charge) désiré seront transmis au détecteur. Le détecteur est un multiplicateur d'électrons à dynodes discrètes. Pour la détection des ions positifs, une série de dynodes est soumise à une tension négative de quelques milliers de volts. A la sortie du quadripôle, un ion positif, attiré par la tension négative, heurte la surface semi-conductrice de la première dynode. Cet ion positif provoque l'émission d'un ou de plusieurs électrons secondaires qui heurtent à nouveau la paroi de la deuxième dynode et ainsi de suite. A l'extrémité de la série de dynodes, pour un ion qui heurte le détecteur, environ 100 électrons atteignent un collecteur équipé d'un préamplificateur. Le signal se traduit en nombre d'impulsions (nombre de coups).

### 2.3.2.2 Protocole de mesure des éléments mineurs

Au cours de cette thèse, les appareils utilisés pour la mesure des concentrations en éléments traces sont les ICP-MS Agilent 7500 CX et Thermo Scientific iCAP-Q.

Les échantillons sont repris et dilués avec de l'HNO<sub>3</sub> 0,5 N. L'indium (In) à 2 ppb est utilisé comme standard interne afin de corriger la dérive instrumentale au cours du temps ainsi que les effets de matrice. Une gamme d'étalonnage externe de 0 à 50 ppb est généralement utilisée pour la détermination des concentrations. De la même façon que pour les mesures des éléments majeurs, des « blancs » (solution d'HNO<sub>3</sub> 0,5 N avec l'In à 2 ppb) et des étalons sont régulièrement mesurés (environ tous les 10 échantillons).

### 2.3.3 Mesure des compositions isotopiques

#### 2.3.3.1 Principe de la MC-ICP-MS

La spectrométrie de masse à couplage induit à multi-collection (MC-ICP-MS) permet de déterminer les compositions isotopiques d'un élément. L'introduction de l'échantillon se fait par aspiration libre. La nébulisation et l'ionisation, sont les mêmes que pour l'ICP-MS. Les principes de séparation des ions et de détection sont différents. En MC-ICP-MS, il y a une double focalisation ; les ions sont séparés au sein d'un secteur électrostatique puis magnétique (figure 29). A la sortie des lentilles, les ions ont acquis une vitesse dépendante de leur masse ( $m$ ) et leur charge ( $q$ ). Le faisceau d'ions est alors soumis à une force électrostatique qui va faire dévier la trajectoire des ions suivant un cercle de rayon  $R$  proportionnel à leur énergie cinétique  $E_c$ , selon  $R = \frac{2E_c}{qE}$ . Seuls les ions de même énergie sélectionnée sortent du secteur.

Enfin, une séparation en masse est effectuée dans le secteur magnétique. Les ions de même énergie vont être déviés par un champ électromagnétique de vecteur  $B$  perpendiculaire au potentiel d'accélération  $V$ . Leur trajectoire va également suivre un arc de cercle de rayon  $r$  proportionnel à leur masse  $m$ , tel que  $r = \frac{\sqrt{2Vm}}{B\sqrt{q}}$ . Pour chaque masse d'intérêt, les ions vont donc être focalisés vers un des détecteurs du MC-ICP-MS.

Les MC-ICP-MS sont équipés de cages de Faraday. Une cage de Faraday est une boîte cylindrique allongée dans laquelle les ions vont pénétrer et ainsi communiquer leur charge en heurtant le fond de la boîte. Ce courant de décharge est ensuite amplifié et mesuré par un électromètre.

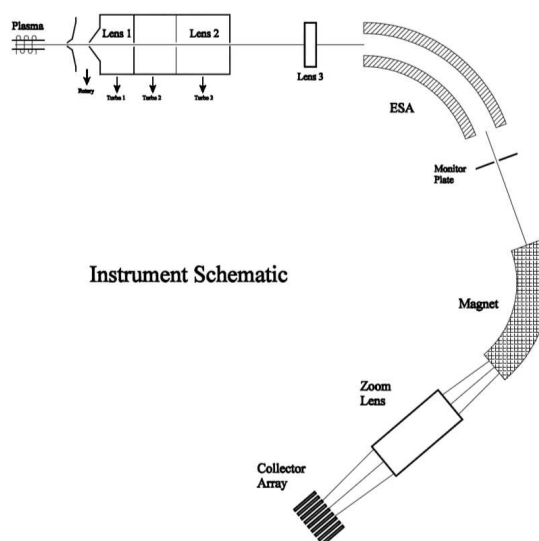


Figure 29 : Schéma représentant la double focalisation d'un MC-ICP-MS

### 2.3.3.2 Protocoles de mesure des compositions isotopiques du Cu, du Zn, du Fe et du Mg

Au cours de cette thèse, les appareils utilisés pour la mesure des compositions isotopiques du Cu et du Zn sont les MC-ICP-MS Nu Plasma HR de Nu Instrument pour les échantillons naturels et le Nu Plasma 1700 de Nu Instrument pour les échantillons enrichis en  $^{65}\text{Cu}$ . De tels échantillons enrichis en  $^{65}\text{Cu}$  n'ont jamais été mesurés au laboratoire. Afin de s'assurer qu'un éventuel effet de mémoire dû à l'ajout de  $^{65}\text{Cu}$  ne fausse pas les mesures d'échantillons naturels, le choix de l'appareil s'est porté sur le Nu1700, parce qu'il n'est traditionnellement pas utilisé pour les mesures isotopiques de Cu et de Zn.

Après séparation et purification, les fractions de Cu et de Zn sont reprises avec une solution d' $\text{HNO}_3$  0,05 N. Pour les fractions Cu, un standard de Zn est ajouté, pour les fractions de Zn, un standard de Cu est ajouté. Les standards de Zn et Cu sont alors utilisés comme standards internes pour corriger le fractionnement instrumental selon les recommandations de Maréchal *et al.* (Maréchal *et al.*, 1999). En effet, au sein du plasma, l'ionisation des isotopes lourds et des isotopes légers diffère, ce qui entraîne un fractionnement isotopique. Pour corriger ce fractionnement, on ajoute à l'échantillon une solution d'un élément qu'on appellera alors « spike » (différent de l'élément d'intérêt), dont la composition isotopique est connue. Il est nécessaire que le spike soit de masse proche, qu'il possède au moins deux isotopes stables, et que ces isotopes ne créent pas d'interférence avec les isotopes de l'élément d'intérêt. En

mesurant simultanément les compositions isotopiques de l'élément d'intérêt et du spike, on peut déterminer la valeur du fractionnement instrumental affectant les 2 éléments. Elle sera la même entre les deux à un facteur de fractionnement près.

Pour le Cu, le standard utilisé est le Cu NIST SRM 976. Pour le Zn, le standard utilisé est une solution de Zn Alfa Aesar qui a été calibrée avec le standard Zn JMC 3-0749L. Il faudra alors ajouter au résultat obtenu,  $\Delta_{std\ JMC}$  qui est la valeur du delta de Zn de la solution Alfa Aesar par rapport au standard Zn JMC 3-0749L.

Les concentrations des solutions analysées sont ajustées à 200 ppb avec un volume minimum de 0,7 mL. Pour certains échantillons, les quantités en Cu ou Zn étant trop faibles, les concentrations seront ajustées pour un volume minimum de 0,7 mL. Dans tous les cas, il est important que les concentrations des échantillons et des standards soient les mêmes.

Au cours du temps, une dérive des mesures peut survenir. Pour corriger cette dérive, la méthode dite du « standard bracketing » est appliquée. Cette méthode consiste à mesurer une solution contenant le mélange des standards de Cu et de Zn tous les 2 échantillons. Les compositions isotopiques de Cu et de Zn des échantillons sont alors définies en normalisant le rapport isotopique de l'échantillon par rapport aux rapports isotopiques des standards encadrant l'échantillon. On effectue alors une pondération de 2/3 du standard le plus proche et de 1/3 du standard le plus éloigné. Pour la mesure de  $\delta^{65}\text{Cu}$  lors d'une séquence de mesure définie comme suit : std1 - éch1 - éch2 - std2, les calculs des deltas seront :

$$\delta^{65}\text{Cu}_{éch1} = \left[ \frac{\left(\frac{^{65}\text{Cu}}{^{63}\text{Cu}}\right)_{éch1}}{\frac{2}{3} * \left(\frac{^{65}\text{Cu}}{^{63}\text{Cu}}\right)_{std1} + \frac{1}{3} * \left(\frac{^{65}\text{Cu}}{^{63}\text{Cu}}\right)_{std2}} - 1 \right] * 1000$$

$$\delta^{65}\text{Cu}_{éch2} = \left[ \frac{\left(\frac{^{65}\text{Cu}}{^{63}\text{Cu}}\right)_{éch2}}{\frac{1}{3} * \left(\frac{^{65}\text{Cu}}{^{63}\text{Cu}}\right)_{std1} + \frac{2}{3} * \left(\frac{^{65}\text{Cu}}{^{63}\text{Cu}}\right)_{std2}} - 1 \right] * 1000$$

Pour le Zn, les calculs de  $\delta^{66}\text{Zn}$  sont :

$$\delta^{66}\text{Zn}_{\text{éch1}} = \left[ \frac{\left(\frac{^{66}\text{Zn}}{^{64}\text{Zn}}\right)_{\text{éch1}}}{\frac{2}{3} * \left(\frac{^{66}\text{Zn}}{^{64}\text{Zn}}\right)_{\text{std1}} + \frac{1}{3} * \left(\frac{^{66}\text{Zn}}{^{64}\text{Zn}}\right)_{\text{std2}}} - 1 \right] * 1000 + \Delta\text{std JMC}$$

$$\delta^{66}\text{Zn}_{\text{éch2}} = \left[ \frac{\left(\frac{^{66}\text{Zn}}{^{64}\text{Zn}}\right)_{\text{éch2}}}{\frac{1}{3} * \left(\frac{^{66}\text{Zn}}{^{64}\text{Zn}}\right)_{\text{std1}} + \frac{2}{3} * \left(\frac{^{66}\text{Zn}}{^{64}\text{Zn}}\right)_{\text{std2}}} - 1 \right] * 1000 + \Delta\text{std JMC}$$

Avec  $\Delta\text{std JMC} = 0.27 \text{ ‰}$

Des paramètres de réglages de l'appareil classiquement utilisés sont détaillés dans le tableau 8.

Réglages de l'appareil	
Puissance RF	1350 W
Gaz	Ar
Flux externe	14 L/min
Flux de nébulisation	1 L/min
Résolution	basse
Cône échantillonneur	Ni
Cône écrêteur	Ni

Paramètres de mesure	
Concentration	200 ppb
Sensibilité moyenne	15 V/ppm pour Zn
	20 V/ppm pour Cu
Nombre de bloc	1
Nombre de mesure par bloc	20
Temps d'intégration	10 s/mesure

Tableau 8 : Paramètres de réglage et de mesure du Cu et du Zn sur le Nu 500 HR

### 2.3.3.3 Protocole de mesure des compositions isotopiques du Fe

Au cours de cette thèse, l'appareil utilisé pour la mesure des compositions isotopiques du Fe est le Neptune Plus de Thermo Scientific.

Après séparation et purification, les fractions de Fe sont reprises avec une solution d'HNO<sub>3</sub> 0,05 N, et les concentrations sont ajustées entre 300 et 500 ppb suivant la sensibilité de l'appareil, dans un volume de 2 mL. Ici le Ni est utilisé comme standard interne pour corriger le fractionnement instrumental, et les mesures sont réalisées en moyenne résolution avec les cônes Jet-X.

La méthode de « standard bracketing » est également appliquée en effectuant une mesure d'échantillon entre 2 mesures du standard, ainsi  $\delta^{56}\text{Fe}$  est calculé de la façon suivante :

$$\delta^{56}\text{Fe}_{\text{éch}} = \left[ \frac{\left(\frac{^{56}\text{Fe}}{^{54}\text{Fe}}\right)_{\text{éch1}}}{\frac{1}{2} * \left(\frac{^{56}\text{Fe}}{^{54}\text{Fe}}\right)_{\text{std1}} + \frac{1}{2} * \left(\frac{^{56}\text{Fe}}{^{54}\text{Fe}}\right)_{\text{std2}}} - 1 \right] * 1000$$

Le standard international est l'IRMM-014.

### 2.3.3.4 Protocole de mesure des compositions isotopiques du Mg

Au cours de cette thèse, l'appareil utilisé pour la mesure des compositions isotopiques du Mg est le Neptune Plus de Thermo Scientific.

Après séparation et purification, les fractions de Mg sont reprises avec une solution d'HNO<sub>3</sub> 0,05 N, et les concentrations sont ajustées à 500 ppb dans un volume de 1 mL. Les mesures sont réalisées en moyenne résolution avec les cônes Jet-X.

La méthode de « standard bracketing » est également appliquée en effectuant une mesure d'échantillon entre 2 mesures du standard, ainsi  $\delta^{26}\text{Mg}$  est calculé de la façon suivante :

$$\delta^{26}\text{Mg}_{\text{éch}} = \left[ \frac{\left(\frac{^{26}\text{Mg}}{^{24}\text{Mg}}\right)_{\text{éch1}}}{\frac{1}{2} * \left(\frac{^{26}\text{Mg}}{^{24}\text{Mg}}\right)_{\text{std1}} + \frac{1}{2} * \left(\frac{^{26}\text{Mg}}{^{24}\text{Mg}}\right)_{\text{std2}}} - 1 \right] * 1000$$

Le standard international est le DSM3.

### 2.3.3.5 Précision et reproductibilité des mesures

Lors d'une série de mesure d'un même échantillon les résultats de concentrations et de compositions isotopiques varient. Ces variations peuvent être dues aux conditions expérimentales, à la précision de l'opérateur, ou encore à la dérive instrumentale. Afin d'évaluer la qualité de la mesure, il convient donc d'associer à chaque valeur mesurée une incertitude.

On peut distinguer la « reproductibilité interne » et la « reproductibilité externe ».

#### 2.3.3.5.1 La « reproductibilité interne »

La « reproductibilité interne » correspond à l'erreur liée à la stabilité de l'appareil de mesure. Elle est déterminée par la mesure de la déviation d'un même standard lors d'une même session de mesure au spectromètre. Pour les mesures des compositions isotopiques de Cu et de Zn, elle est de l'ordre de 0,06 ‰.

Dans l'exemple ci-dessous le standard Cu NIST SRM 976 a été mesuré plusieurs fois au cours d'une même session (figure 30). La moyenne des valeurs est 0,01 ‰, l'écart-type est de 0,03 ‰. La reproductibilité interne qui est égale à 2 fois l'écart-type est donc de 0,06 ‰.

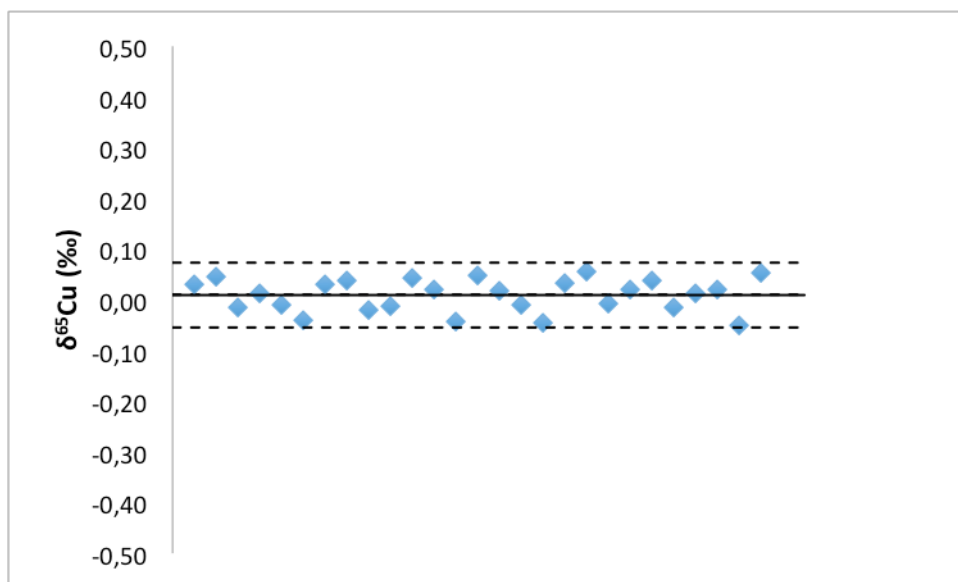


Figure 30 : Représentation de la reproductibilité interne estimée par la mesure de delta Cu du standard Cu NIST SRM 976. La ligne noire représente la moyenne. Les lignes en pointillés représentent la moyenne + et - 2\*l'écart-type.



### 2.3.3.5.2 La « reproductibilité externe »

La « reproductibilité externe » permet d'évaluer l'erreur de préparation d'un échantillon. Elle est estimée en mesurant plusieurs fois le même échantillon au cours de différentes sessions de mesure. Cet échantillon étant lui même préparé suivant le même protocole à des jours différents et sur des colonnes différentes.

Pour la mesure de  $\delta^{65}\text{Cu}$ , un standard international de foie bovin (SRM 1577c) est inclus dans chaque séquence d'échantillons afin de définir cette reproductibilité externe. Au cours de ma thèse, j'ai donc mesuré le  $\delta^{65}\text{Cu}$  du standard 1577c 26 fois, la moyenne calculée est de 0,36 ‰ et la reproductibilité externe (= 2 sd) est de 0.05 ‰ (figure 31) ce qui est en adéquation avec les valeurs reportées par Sauzéat *et al.* (Sauzéat et al., 2020).

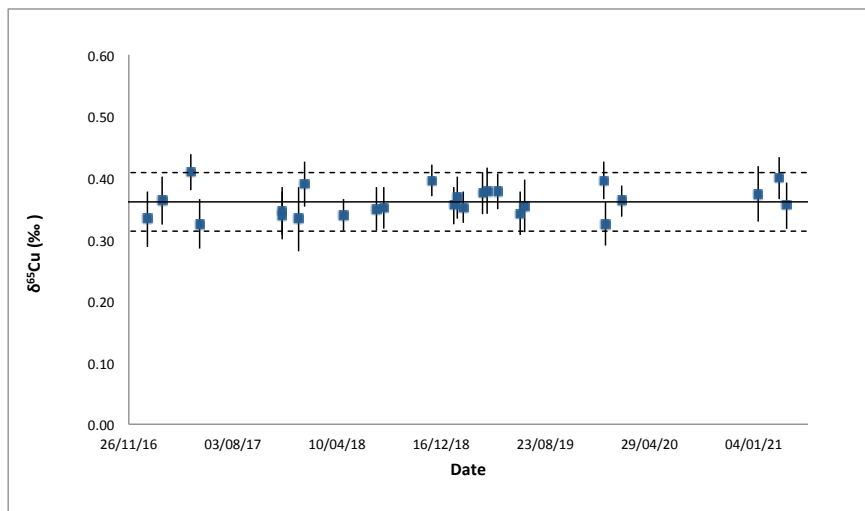


Figure 31 : Représentation de la reproductibilité externe de la mesure de  $\delta^{65}\text{Cu}$  du standard 1577c (foie bovin). Chaque point représente une mesure de  $\delta^{65}\text{Cu}$ , la ligne noire représente la moyenne et les lignes en pointillés représentent la moyenne + et - 2\*l'écart-type.

# **Chapitre 3**

---

---

**Les isotopes du cuivre  
dans la maladie de  
Wilson : un indicateur de  
l'atteinte hépatique**

---

---



# Introduction

---

Comme nous l'avons vu précédemment, différents bio-marqueurs sont utilisés pour établir le diagnostic de la maladie de Wilson. Récemment, une étude pilote a mis en évidence une différence significative entre la composition isotopique du Cu dans le sérum de patients atteints de la maladie de Wilson, et celle des individus sains. Les auteurs proposent d'utiliser le rapport de  $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$  comme outil de diagnostic de la maladie de WD. Grâce à la mesure de la composition isotopique du Cu dans le sang de patients traités ( $n = 25$ ) et de patients naïfs ( $n = 11$ ) comparée à celle de témoins sains ( $n = 75$ ), je montrerai dans ce chapitre, que le rapport de  $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$  ne peut pas être utilisé comme outil de diagnostic de la maladie de Wilson. En effet, les résultats montrent que les patients naïfs et les témoins sains présentent des rapports  $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$  indiscernables. Je montrerai ensuite que chez les malades de Wilson, le rapport isotopique du cuivre n'est pas affecté par le traitement suivi (D-pénicillamine ou triéthylènetétramine), ni sa durée. De plus, la composition isotopique du Cu ne varie pas chez les patients naïfs après le début du traitement. Cependant, le rapport  $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$  diminue avec le degré de fibrose hépatique et le gradient de la présentation phénotypique (présymptomatique, hépatique et neurologique). Pour mieux comprendre les mécanismes mis en jeu, j'ai également étudié les effets de la progression de la maladie de Wilson sur l'organisme en mesurant la concentration en Cu et la composition isotopique du Cu dans le foie, les fèces et le plasma de 2 populations de souris *Atp7b*<sup>-/-</sup> âgées de 12 et 45 semaines. Les résultats montrent que la composition isotopique du Cu diminue toujours avec l'âge. Dans l'ensemble, les résultats suggèrent que le rapport sanguin  $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$  est un indicateur de la progression de la maladie de Wilson et pourrait donc constituer un outil pour le pronostic.

Cette étude a fait l'objet d'un article publié dans *Metallomics* (The blood copper isotopic composition is a prognostic indicator of the hepatic injury in Wilson disease); ce chapitre est dédié à cet article. Les résultats détaillés sont en annexe.

---





Cite this: *Metallomics*, 2020,  
12, 1781

## The blood copper isotopic composition is a prognostic indicator of the hepatic injury in Wilson disease†

Aline Lamboux,<sup>a</sup> Eduardo Couchonnal-Bedoya,<sup>bc</sup> Olivier Guillaud,<sup>cd</sup> Chloé Laurencin,<sup>c</sup> Laurence Lion-François,<sup>c</sup> Abdelouahed Belmalih,<sup>c</sup> Elisabeth Mintz,<sup>e</sup> Virginie Brun,<sup>f</sup> Muriel Bost,<sup>cg</sup> Alain Lachaux<sup>bc</sup> and Vincent Balter<sup>\*a</sup>

Wilson disease (WD) is an autosomal recessive disorder of copper (Cu) metabolism. The gene responsible for WD, *ATP7B*, is involved in the cellular transport of Cu, and mutations in the *ATP7B* gene induce accumulation of Cu in the liver and ultimately in the brain. In a pilot study, the natural variations of copper stable isotope ratios (<sup>65</sup>Cu/<sup>63</sup>Cu) in the serum of WD patients have been shown to differ from that of healthy controls. In the present study, we challenged these first results by measuring the <sup>65</sup>Cu/<sup>63</sup>Cu ratios in the blood of treated ( $n = 25$ ), naïve patients ( $n = 11$ ) and age matched healthy controls ( $n = 75$ ). The results show that naïve patients and healthy controls exhibit undistinguishable <sup>65</sup>Cu/<sup>63</sup>Cu ratios, implying that the Cu isotopic ratio cannot serve as a reliable diagnostic biomarker. The type of treatment (D-penicillamine vs. triethylenetetramine) does not affect the <sup>65</sup>Cu/<sup>63</sup>Cu ratios in WD patients, which remain constant regardless of the type and duration of the treatment. In addition, the <sup>65</sup>Cu/<sup>63</sup>Cu ratios do not vary in naïve patients after the onset of the treatment. However, the <sup>65</sup>Cu/<sup>63</sup>Cu ratios decrease with the degree of liver fibrosis and the gradient of the phenotypic presentation, *i.e.* presymptomatic, hepatic and neurologic. To get insights into the mechanisms at work, we study the effects of the progress of the WD on the organism by measuring the Cu concentrations and the <sup>65</sup>Cu/<sup>63</sup>Cu ratios in the liver, feces and plasma of 12 and 45 week old *Atp7b*<sup>-/-</sup> mice. The evolution of the <sup>65</sup>Cu/<sup>63</sup>Cu ratios is marked by a decrease in all tissues. The results show that <sup>63</sup>Cu accumulates in the liver preferentially to <sup>65</sup>Cu due to the preferential cellular entry of <sup>63</sup>Cu and the impairment of the <sup>65</sup>Cu exit by ceruloplasmin. The hepatic accumulation of monovalent <sup>63</sup>Cu<sup>+</sup> is likely to fuel the production of free radicals, which is potentially an explanation of the pathogenicity of WD. Altogether, the results suggest that the blood <sup>65</sup>Cu/<sup>63</sup>Cu ratio recapitulates WD progression and is a potential prognostic biomarker of WD.

Received 17th July 2020,  
Accepted 16th September 2020

DOI: 10.1039/d0mt00167h

rsc.li/metallomics

### Significance to metallomics

Previous studies have revealed variations in the copper stable isotope ratios (<sup>65</sup>Cu/<sup>63</sup>Cu) in the serum or blood of patients with hepatic diseases, including the Wilson disease characterized by a loss of function of the *ATP7B* gene. Here we present for the first time the results of blood <sup>65</sup>Cu/<sup>63</sup>Cu ratio for treated and naïve WD patients that are compared to age-matched healthy controls. We propose a mechanism of Cu isotope fractionation associated to Wilson disease based on the Cu concentrations and the <sup>65</sup>Cu/<sup>63</sup>Cu ratios in the liver, feces and plasma of 12 and 45 week old *Atp7b*<sup>-/-</sup> mice. We finally suggest that the blood <sup>65</sup>Cu/<sup>63</sup>Cu ratio recapitulates the disease progression and hence could be a prognostic biomarker of Wilson disease.

<sup>a</sup> Univ Lyon, ENSL, Univ Lyon 1, CNRS UMR 5276, LGL-TPE, F-69007, Lyon, France. E-mail: aline.lamboux@ens-lyon.fr, vincent.balter@ens-lyon.fr

<sup>b</sup> Department of Pediatric Hepatology, Gastroenterology and Nutrition, Femme-Mère-Enfant Hospital, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

<sup>c</sup> Centre de référence de la maladie de Wilson et autres maladies rares liées au cuivre du CHU de Lyon, Lyon, France

<sup>d</sup> Ramsay Générale de Santé, Clinique de la Sauvegarde, Lyon, France

<sup>e</sup> Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IRIG, LCBM, Grenoble, France

<sup>f</sup> Univ. Grenoble Alpes, CEA, INSERM, IRIG, BGE, F-38000, Grenoble, France

<sup>g</sup> Centre de Biologie et d'AnatomoPathologie Sud, Pierre-Bénite, France

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d0mt00167h

## Introduction

The WD is an autosomal recessive genetic disease, which was first described by Samuel Alexander Kinnier Wilson in 1912.<sup>1</sup> It is a rare disease (from 1/30 000 to 1/100 000 births) due to mutations in the *ATP7B* gene.<sup>2</sup> This gene encodes a transmembrane protein ATPase (ATP7B) and is found on chromosome 13. The ATP7B transporter is primarily found in the liver, and in smaller amounts in the kidneys and brain. The liver plays a key role in the homeostasis of Cu and constitutes its main storage organ. After the digestion of food in the stomach and duodenum, Cu is mainly absorbed in the small intestine.<sup>3</sup> Cu assimilation occurs through the crossing of the apical membrane of enterocytes by a high affinity transporter hCTR1.<sup>4</sup> Then, Cu binds to two different proteins, albumin and  $\alpha$ 2-macroglobulin, in the extracellular medium and is finally deposited in the liver<sup>3</sup> by the same hCTR1 transporter. In liver cells, the function of ATP7B is to transfer Cu first, across the trans-Golgi membrane for delivering to apo-ceruloplasmin<sup>5,6</sup> and second, across the cellular membrane for excretion into the biliary canal out of the body.<sup>7</sup> In WD, the loss of ATP7B function induces a failure to properly incorporate Cu into ceruloplasmin (Cp),<sup>8</sup> resulting in a deficiency of Cp in the serum (less than 200 mg L<sup>-1</sup>) and an elevation of the non-Cp serum Cu concentration of more than 100 mg L<sup>-1</sup>.<sup>9</sup> The loss of ATP7B function disrupts the Cu cellular processing resulting in Cu accumulation in the liver first, and then by an overflow effect in the brain, kidneys, and cornea, for which the Kayser-Fleischer ring is a specific clinical sign.

There is no curative treatment for WD and medication must be taken for life. The aim of existing treatments is to stabilize, and hopefully reduce, the body's Cu load using chelators. The first treatment, which appeared in 1951, was the British anti-Lewisite (BAL or 2,3-dimercatopropanol).<sup>10</sup> Due to the many side effects of BAL, a new chelator, D-penicillamine, was introduced first by John Walshe in 1956.<sup>11</sup> While the use of BAL required painful injections, D-penicillamine is orally administered. D-Penicillamine is structurally similar to the cysteine amino-acid but with a free sulphhydryl group and has a high affinity for Cu. Some patients are however D-penicillamine-intolerant and develop a nephrotic syndrome, so Walshe introduced in 1969 triethylene tetramine dihydrochloride as a new orally active chelating agent.<sup>12</sup> Triethylene tetramine dihydrochloride has a polyamine structure and Cu is chelated within the four nitrogen groups. Noteworthy is the use of zinc in the treatment of WD.<sup>13</sup> Recently, Brewer proposed tetrathiomolybdate (TTM) to chelate Cu.<sup>14</sup> The Food and Drug Administration authorized TTM as WD treatment in USA but TTM is not authorized in Europe yet.

There is a general agreement that the diagnosis of WD should be based on a combination of several genetic, biological, clinical and radiological features.<sup>15,16</sup> However, the Relative exchangeable Cu (REC), *i.e.* the ratio between exchangeable serum Cu (CuEXC) and total serum Cu, has been found to have a perfect sensitivity and specificity in diagnosing WD for REC > 18.5%.<sup>15,17</sup> Recently, Aramendía *et al.*<sup>18</sup> suggested that the natural variations of the stable isotope <sup>65</sup>Cu/<sup>63</sup>Cu ratio in blood could be used for the

diagnosis of WD. It was found in this study that the <sup>65</sup>Cu/<sup>63</sup>Cu ratio of WD patients is significantly lower than that of healthy controls, with no overlap.<sup>18</sup> The two Cu stable isotopes, <sup>63</sup>Cu and <sup>65</sup>Cu, have different behaviors in biological processes due to mass difference. Mass difference between isotopes of an element induces variations in kinetic reactions and bond energies, called the isotope effect or isotope fractionation, which indicates small variations in the relative abundances of the isotopes. Isotope fractionation must however obey mass conservation, *i.e.* the total abundance of all the isotopes must be balanced in the course of a chemical reaction. For about ten years now, the use of Cu stable isotope fractionation has driven specific interest and developments in the field of biomedicine. The Cu stable isotopes largely fractionate in organs and body fluids, with a range of isotope compositions of a few permil (‰) units.<sup>19,20</sup> The blood Cu isotope composition is different between human males and females<sup>21</sup> due to menstrual losses.<sup>22,23</sup> Copper isotope compositions are highly sensitive to disease conditions and have been suggested as a new biomarker for cancer,<sup>24–26</sup> liver diseases<sup>20,27</sup> and neurodegenerative disorders.<sup>28–31</sup> In their pilot study Aramendía *et al.* show interest in measuring Cu isotopic composition in WD, but the study concerns five WD patients only, who were all treated.

In the present study, we focused on naïve (untreated) WD patients ( $n = 11$ ), whose blood was collected at diagnosis, and WD patients treated with different chelators, *i.e.* D-penicillamine or “Trolovol” ( $n = 19$ ) and triethylene tetramine dihydrochloride or “Trientine” ( $n = 6$ ). The results obtained on the population of WD patients were compared to those of an age-matched healthy population, with new <sup>65</sup>Cu/<sup>63</sup>Cu values of young (from 1 to 13 years old,  $n = 28$ ) completed by <sup>65</sup>Cu/<sup>63</sup>Cu values of adults (>18 years old,  $n = 47$ ) from the study of Albarède *et al.*<sup>21</sup> In addition, the <sup>65</sup>Cu/<sup>63</sup>Cu values in plasma, liver and feces in 11–12 week old and 45 week old *Atp7b*<sup>-/-</sup> mice have been measured.

## Materials and methods

### Reagents

Ultrapure water (resistivity 18.2 M $\Omega$  cm<sup>-1</sup>) was produced in a Millipore Synergy system (France). Concentrated technical grade HCl and HNO<sub>3</sub> provided by Carlo Erba (France) were distilled at low temperature in Savillex PFA equipment. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% Suprapur was purchased from Merck (Germany). Macroporous anion-exchange resin AG MP-1, 100–200 mesh, was purchased from Biorad Laboratories.

### Samples

All the young controls of this study as well as the adult controls from Albarède *et al.*<sup>21</sup> were prepared and analyzed in the same conditions in the Laboratoire de Géologie de Lyon, Ecole Normale Supérieure de Lyon, France. Total blood samples from supposedly healthy controls ( $n = 47$ ) between 18 and 35 years old are from the Etablissement du Sang.<sup>21</sup> Total blood samples from supposedly healthy controls between 1 and 13 years old

( $n = 28$ ) are from the Department of Biochemistry and Molecular Biology, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, France. The samples were collected originally for suspicion of lead exposition. Total blood samples from WD patients treated with chelators ( $n = 25$ ) and naïve patients ( $n = 11$ ) between 3 and 52 years old are from French National Reference Center for Wilson's Disease, Hôpital Femme Mère Enfant, Hospices Civils de Lyon, France. The samples were collected in Vacutainer tubes. Samples were stored at 4 °C until analysis.

**WD patients.** The diagnosis of WD was based on clinical, biochemical, histologic and genetics findings. All patients had two disease-causing *ATP7B* mutations. Phenotypic classification was based on the Leipzig score.<sup>16</sup> This scoring system includes a combination of clinical and biochemical tests such as the absence or presence of the Kayser-Fleischer ring, neurologic symptoms, Coombs-negative hemolytic anemia, serum ceruloplasmin concentration, hepatic Cu concentration, urinary Cu concentration and presence of mutations. Patients were considered to have severe fibrosis (F3–F4) when they have clinical or morphological features of cirrhosis (ascites, hepatic dysmorphism with signs of portal hypertension), presence of bridging fibrosis or cirrhosis on histology or fibroscan >10 kPa on two different measures in the absence of severe cytolysis (transaminases < 5 × ULN). The study was conducted in the French National Wilson disease Center of Lyon, in the Pediatric Hepatology Department of the Children's Hospital and the Hepatology Department of Edouard Herriot Hospital, qualified as evaluation of daily practice and was approved by our local ethic committee (hôpital Femme-Mère-Enfant, Hospices civils de Lyon). Informed consent was obtained from all participants.

***Atp7b*<sup>-/-</sup> mice.** The *Atp7b*<sup>-/-</sup> mouse model used in this study was developed by Buiakova *et al.*<sup>32</sup> and kindly provided by Prof. Svetlana Lutsenko and Dr Dominik Huster. *Atp7b*<sup>+/-</sup> heterozygous mice, maintained on a mixed 129S6/SvEv × C57BL/6J genetic background, were bred in our animal care facility and used to generate *Atp7b*<sup>-/-</sup> mice. Mouse breeding, housing and experiments were performed according to the protocols approved by the ethics committees (C2EA – 12 Comité d'éthique ComEth Grenoble and C2EA – 44 CETEA – CEA DSV IdF), the veterinary authorities, and the French Ministry for Research. The mice were kept on a 12 h/12 h light/dark cycle and fed with maintenance dry food #3469 (Kliba Nafag CH), containing 14 mg kg<sup>-1</sup> of Cu. Mice at 11–12 weeks ( $n = 12$ ) and at 45 weeks ( $n = 12$ ) were transferred to metabolism cages for 24 hours fasting and feces collection. Then, the mice were exposed to carbon dioxide, before blood collection in sodium heparin-treated tubes (Becton Dickinson) by cardiac puncture and liver dissection. Within one hour of collection, blood samples were centrifuged at 2000g and 4 °C for 15 min to collect plasma supernatants. Liver, plasma and feces specimens were stored at –20 °C until analysis.

### Blood sample preparation

An aliquot of about 500 µL of total blood was digested in Savillex PFA beakers using 2 mL of HNO<sub>3</sub> (14 M) and 0.2 mL

of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) at 100 °C overnight. Dissolved samples were then evaporated to dryness at 100 °C and redissolved in 1 mL of HNO<sub>3</sub> (0.5 M). A 100 µL aliquot was taken for the measurement of Cu concentration, and the remaining solution was evaporated and redissolved with 1 mL of HCl (7 M) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.001%) for chromatographic separation according to the technique of Maréchal *et al.*<sup>33</sup> Briefly, Cu was separated on quartz columns containing 1.6 mL of macroporous anion-exchange resin AG MP1. Samples were loaded onto the columns and rinsed with 10 mL of HCl (7 M) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.001%). Copper was eluted using 20 mL of HCl (7 M) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.001%). Copper was further purified using the same protocol.

### Mouse sample preparation

Liver and feces samples were digested in Savillex PFA beakers using 5 mL of HNO<sub>3</sub> (14 M) at 100 °C for 7 days and regularly degassed. After cooling, 0.5 mL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) was added and the beakers were replaced at 100 °C for 4 days. Dissolved samples were then evaporated to dryness and a second mineralization was performed using the same protocol to ensure complete dissolution. Plasma samples were digested in Savillex PFA beakers using 1 mL of HNO<sub>3</sub> (14 M) and 0.2 mL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) at 100 °C overnight. Dissolved samples were then evaporated to dryness. Liver and feces samples were redissolved with 3 mL of HNO<sub>3</sub> (0.5 M) and plasma samples with 1 mL of HNO<sub>3</sub> (0.5 M). A 30 µL aliquot was taken for the measurement of Cu concentration, and the remaining solution was evaporated. Liver and feces samples were redissolved with 2 mL of HCl (7 M) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.001%) and the quantity needed to get about 600 ng of Cu was taken for chromatographic separation as previously described. Plasma samples were redissolved with 1 mL of HCl (7 M) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.001%) for chromatographic separation.

### Instrumentation and measurement protocols

The Cu concentrations were determined by quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) on an Agilent 7500 CX. Samples were diluted in 0.5 M sub-boiled distilled HNO<sub>3</sub> and indium at 2 µg L<sup>-1</sup> was used as an internal standard. The Cu isotope compositions were measured by multiple-collector inductively coupled plasma mass spectrometry (MC-ICP-MS) on a Nu 500 HR instrument. Instrumental mass discrimination was corrected using Zn-doping (Zn JMC-Lyon) and standard sample bracketing following the recommendations provided by Albarède *et al.*<sup>34</sup> Generally, Cu and Zn concentrations were adjusted to 200 µg L<sup>-1</sup> in 2 mL of 0.05 M sub-boiled distilled HNO<sub>3</sub>. Copper fractions were otherwise dissolved in the minimal volume needed for an isotopic analysis (~700 µL) and Zn concentrations were adjusted to that of Cu. Wet plasma was used to avoid instrumental bias that occurs in the membrane of the desolvating systems. Copper isotope composition is reported with the standard delta notation relative to the Cu isotopic standard NIST SRM 976, according to the formula

$$\delta^{65}\text{Cu} = \left\{ \left[ \frac{({}^{65}\text{Cu}/{}^{63}\text{Cu})_{\text{sample}}}{({}^{65}\text{Cu}/{}^{63}\text{Cu})_{\text{standard}}} \right] - 1 \right\} \times 1000.$$



### Statistical analysis

To compare two groups, statistical significances were calculated using the non-parametric Mann–Whitney/Wilcoxon test with the R software. The level of significance established of the  $p$ -values was 0.05.

## Results

The results are summarized in Table 1 for humans. The blood Cu concentration in WD patients ( $384 \pm 134 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $n = 35$ ) is significantly lower ( $p$ -value  $< 10^{-4}$ ) than in healthy controls ( $997 \pm 302 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $n = 75$ , Fig. 1A). The blood Cu concentration in treated WD patients ( $388 \pm 116 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $n = 25$ ) and in untreated WD patients ( $373 \pm 178 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $n = 10$ ) is not significantly different ( $p$ -value = 0.6, Fig. 1A). The blood Cu concentration in WD patients treated with Trientine ( $374 \pm 44 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $n = 6$ ) is similar to that in WD patients treated with Trolovol ( $392 \pm 132 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $n = 19$ ,  $p$ -value = 0.88, Table 1). The blood  $\delta^{65}\text{Cu}$  value is similar in control and untreated patients ( $p$ -value = 0.32, Fig. 1B) but in treated WD patients ( $-0.97 \pm 0.70\%$ ,  $n = 25$ ) it is significantly lower compared to that in untreated WD patients ( $-0.04 \pm 0.85\%$ ,  $n = 11$ ) ( $p$ -value = 0.0025) and healthy controls ( $-0.03 \pm 0.27\%$ ,  $n = 75$ ,  $p$ -value  $< 10^{-4}$ , Fig. 1B). To ensure that any treatment effect is not at the origin of this difference, we compared the  $\delta^{65}\text{Cu}$  values at different times and for some patients on the day of the

diagnosis and after treatment. The blood Cu concentration ( $n = 7$ ) and the  $\delta^{65}\text{Cu}$  values ( $n = 8$ ) have been measured at two time points (Table 1). For two WD patients (PALA and DIMA), the blood Cu concentration decreases over time (Fig. 2A), while other patients are stable (Fig. 2A). The blood Cu isotope composition remains constant in all patients over time (Fig. 2B). For four of them (AZWA, MOKA, PAPH, and JEAN), the average value was considered for statistical analysis because the clinical situation was unchanged between the two time points. For three of them (CREM, DIMA and PEEV), the blood samples were taken at diagnosis and after more than three years of treatment, so that the two measurements were considered as independent. Finally, for PALA, the treatment was changed between the two time points, so the two measurements were also considered as independent.

We next examine the influence of sex and age on the blood  $\delta^{65}\text{Cu}$  values which are known to be influenced by menstruation.<sup>22,23,35</sup> Women patients aged more than 15 years old, who are supposed to be menstruated, have a lower  $\delta^{65}\text{Cu}$  value ( $-1.18 \pm 0.81\%$ ,  $n = 12$ ) than the rest of WD patients ( $-0.44 \pm 0.78\%$ ,  $n = 24$ ,  $p$ -value = 0.0137). In controls, the difference of the  $\delta^{65}\text{Cu}$  value between menstruated women ( $0.00 \pm 0.20\%$ ,  $n = 25$ ) and men ( $0.16 \pm 0.16\%$ ,  $n = 22$ ) aged more than 15 years old is also significant ( $p$ -value = 0.0072, Fig. 3).

Bearing in mind that anthropological factors affect the blood  $\delta^{65}\text{Cu}$  value, we now explore the pathological effects of

**Table 1** Anthropological (age and sex), chemical (Cu concentration, Cu isotope composition and REC) and clinical (MELD, fibrosis and phenotype) data of the WD patients and healthy controls

	WD patients				Controls
	Treated	Untreated	All WD		
Cu ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$388 \pm 116$ ( $n = 25$ )	$373 \pm 178$ ( $n = 10$ )	$384 \pm 134$ ( $n = 35$ )		$997 \pm 302$ ( $n = 75$ )
	Trientine $374 \pm 44$ ( $n = 6$ )	Trolovol $392 \pm 132$ ( $n = 19$ )			
$\delta^{65}\text{Cu}$ (‰)	$-0.97 \pm 0.70$ ( $n = 25$ )	$-0.04 \pm 0.85$ ( $n = 11$ )	$-0.69 \pm 0.86$ ( $n = 36$ )		$-0.03 \pm 0.27$ ( $n = 75$ )
REC (%)	$53.0 \pm 57.8$ ( $n = 25$ )	$40.7 \pm 22.4$ ( $n = 11$ )	$49.2 \pm 49.7$ ( $n = 36$ )		
MELD	$7.6 \pm 0.9$ ( $n = 21$ )	$7.5 \pm 3.1$ ( $n = 10$ )	$7.6 \pm 1.9$ ( $n = 31$ )		
Age	$20.4 \pm 11.9$ ( $n = 25$ )	$13.6 \pm 8.2$ ( $n = 11$ )	$18.3 \pm 11.3$ ( $n = 36$ )		$16.7 \pm 8.5$ ( $n = 75$ )
$\delta^{65}\text{Cu}$ (‰) F $\geq 15$ years			$-1.18 \pm 0.81$ ( $n = 12$ )		$0.00 \pm 0.20$ ( $n = 25$ )
$\delta^{65}\text{Cu}$ (‰) all M; F $< 15$ years			$-0.44 \pm 0.78$ ( $n = 24$ )		
$\delta^{65}\text{Cu}$ (‰) M $\geq 15$ years					$0.16 \pm 0.16$ ( $n = 22$ )
$\delta^{65}\text{Cu}$ (‰) M and F $< 15$ years			$-0.15 \pm 0.80$ ( $n = 14$ )		$-0.21 \pm 0.27$ ( $n = 28$ )
$\delta^{65}\text{Cu}$ (‰) M and F $\geq 15$ years			$-1.03 \pm 0.71$ ( $n = 22$ )		$0.08 \pm 0.20$ ( $n = 47$ )
Level of fibrosis					
$\delta^{65}\text{Cu}$ (‰) F0–F2			$-0.14 \pm 0.84$ ( $n = 15$ )		
$\delta^{65}\text{Cu}$ (‰) F3–F4			$-1.09 \pm 0.62$ ( $n = 21$ )		
Phenotypic form					
$\delta^{65}\text{Cu}$ (‰) pre-symptomatic			$0.32 \pm 0.40$ ( $n = 2$ )		
$\delta^{65}\text{Cu}$ (‰) hepatic			$-0.44 \pm 0.73$ ( $n = 24$ )		
$\delta^{65}\text{Cu}$ (‰) neurologic			$-1.48 \pm 0.62$ ( $n = 10$ )		
Level of fibrosis and phenotypic form					
$\delta^{65}\text{Cu}$ (‰) pre-symptomatic F0–F2			$0.32 \pm 0.40$ ( $n = 2$ )		
$\delta^{65}\text{Cu}$ (‰) hepatic F0–F2			$-0.09 \pm 0.81$ ( $n = 12$ )		
$\delta^{65}\text{Cu}$ (‰) hepatic F3–F4			$-0.80 \pm 0.43$ ( $n = 12$ )		
$\delta^{65}\text{Cu}$ (‰) neurologic F0–F2			$-1.60$ ( $n = 1$ )		
$\delta^{65}\text{Cu}$ (‰) neurologic F3–F4			$-1.47 \pm 0.65$ ( $n = 9$ )		

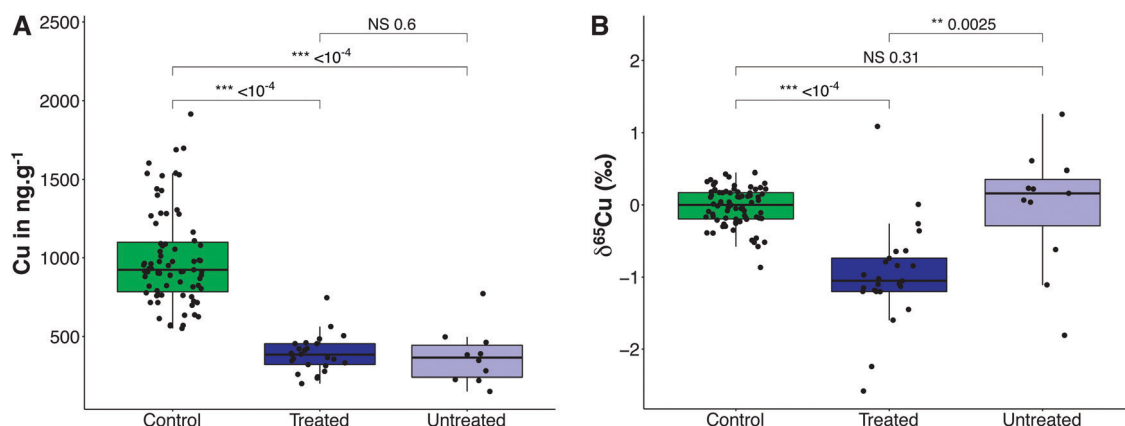


Fig. 1 (A) Distribution of the Cu concentration in the blood of healthy control, treated and untreated WD patients. (B) Distribution of the Cu isotope compositions in the blood of healthy control, treated and untreated WD patients.  $p$ -Values are non-significant (ns)  $p > 0.05$ ; (\*)  $p \leq 0.05$ ; (\*\*)  $p \leq 0.01$ ; (\*\*\*)  $p \leq 0.001$ .

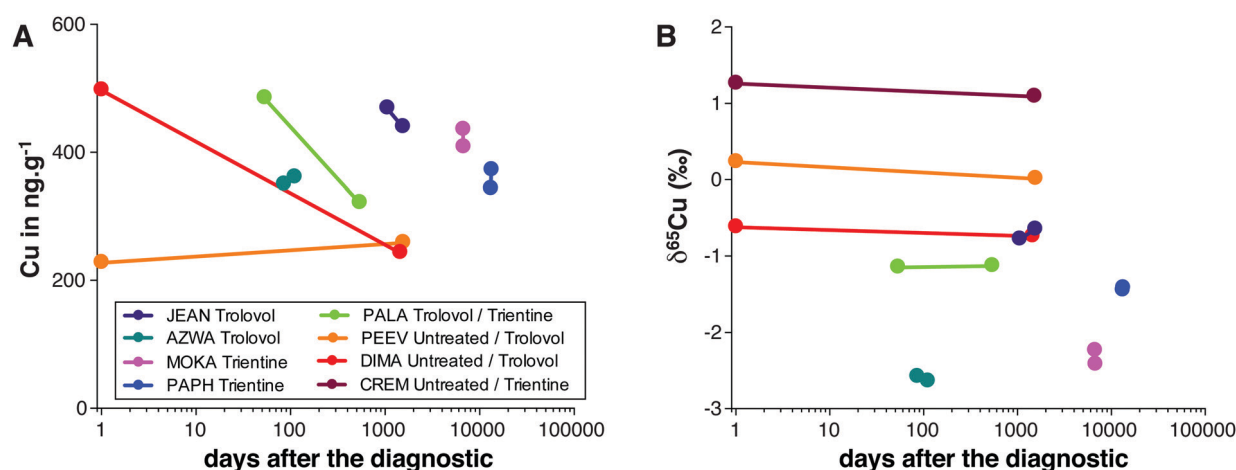


Fig. 2 (A) Evolution of the Cu concentration in blood for seven WD patients. (B) Evolution of the Cu isotope compositions in blood for eight WD patients.

the WD disease. The fibrosis stages for WD patients are summarized in Table 1. Whatever the pace of the disease, liver injury results in fibrosis, which is an excessive accumulation of extracellular matrix forming scar tissue. There are several stages of fibrosis with no fibrosis (F0), minimal fibrosis (F1), moderate fibrosis (F2), severe fibrosis (F3) and cirrhosis (F4). The comparison of the stage of fibrosis with the blood  $\delta^{65}\text{Cu}$  value reveals that WD patients with severe fibrosis or cirrhosis (F3–F4) exhibit significantly lower  $\delta^{65}\text{Cu}$  values ( $-1.09 \pm 0.62\%$ ,  $n = 21$ ) compared to WD patients with no, minimal or moderate fibrosis (F0–F2) ( $-0.14 \pm 0.84\%$ ,  $n = 15$ ,  $p$ -value = 0.0013, Fig. 4).

The WD usually progresses from hepatic failure to neurologic disability. Starting with the two pre-symptomatic patients at  $0.32 \pm 0.40\%$ , the  $\delta^{65}\text{Cu}$  value decreases to  $-0.44 \pm 0.73\%$  for the hepatic form ( $n = 24$ ) and decreases again to  $-1.48 \pm 0.62\%$  for the neurologic form ( $n = 10$ , Fig. 5). The blood  $\delta^{65}\text{Cu}$  value in the pre-symptomatic form is undistinguishable from that of controls ( $p$ -value = 0.18), while the blood  $\delta^{65}\text{Cu}$  value in the hepatic and neurologic forms is significantly lower than that

of controls ( $p$ -value = 0.0017 and  $p$ -value  $< 10^{-4}$ , respectively, Fig. 5).

Altogether, the above results show that the blood  $\delta^{65}\text{Cu}$  value in WD patients decreases with the degree of the liver injury, which is reflected by the level of fibrosis and the phenotypic form. Even if the WD progress is variable among patients, there is a clear inverse correlation between the blood  $\delta^{65}\text{Cu}$  value and the age of the patients (Fig. 6). The WD patients compose clusters within the relationship with little overlaps, with the hepatic F0–F2 group having the highest blood  $\delta^{65}\text{Cu}$  values and the youngest age ( $-0.09 \pm 0.81\%$ ,  $12 \pm 9$  years old,  $n = 12$ ), the hepatic F3–F4 group being intermediary ( $-0.80 \pm 0.43\%$ ,  $17 \pm 4$  years old,  $n = 12$ ) and the neurologic F3–F4 group having the lowest blood  $\delta^{65}\text{Cu}$  values and the oldest age ( $-1.47 \pm 0.65\%$ ,  $28 \pm 15$  years old,  $n = 9$ ).

To get insights into the pathological mechanisms at work in the WD, we measured the Cu concentration and isotope composition in plasma, liver and feces in 11–12 week and 45 week old *Atp7b*<sup>-/-</sup> mice, which are summarized in Table 2.

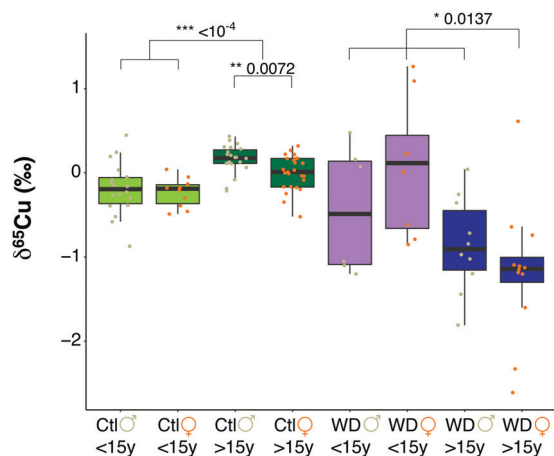


Fig. 3 Distribution of the Cu isotope compositions in the blood of healthy controls (ctl) and WD patients (WD). A threshold value of fifteen years (15y) is used to identify infants (with non-menstruated girls) from adults (with menstruated women).  $p$ -Values are non-significant (ns)  $p > 0.05$ ; (\*)  $p \leq 0.05$ ; (\*\*)  $p \leq 0.01$ ; (\*\*\*)  $p \leq 0.001$ .

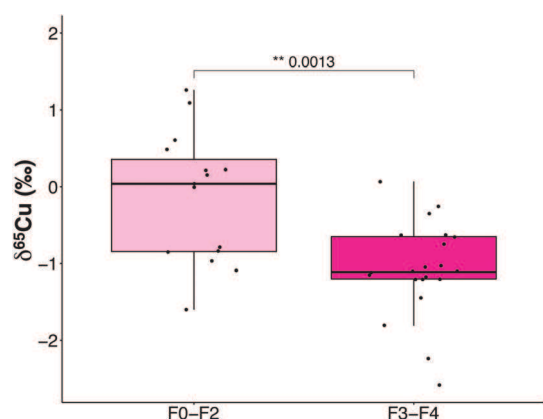


Fig. 4 Distribution of the Cu isotope compositions in the blood of WD patients with no, minimal or moderate fibrosis (F0–F2) and severe fibrosis or cirrhosis (F3–F4).  $p$ -Values are non-significant (ns)  $p > 0.05$ ; (\*)  $p \leq 0.05$ ; (\*\*)  $p \leq 0.01$ ; (\*\*\*)  $p \leq 0.001$ .

From 11–12 weeks to 45 weeks, the Cu concentration increases in the liver ( $p$ -value  $< 10^{-4}$ ) and plasma ( $p$ -value = 0.0243), but decreases in feces ( $p$ -value = 0.0111, Fig. 7A). The Cu isotope composition was significantly lower in 45 week old mice in comparison with 11–12 week old mice ( $p$ -values  $< 10^{-4}$  for plasma, liver and feces, Fig. 7B).

## Discussion

Aramendía *et al.*<sup>18</sup> previously showed that the Cu isotope composition in WD patients ( $-1.70 \pm 0.66\text{‰}$ ,  $n = 5$ ) is lower than in healthy controls ( $-0.72 \pm 0.25\text{‰}$ ,  $n = 18$ ). On comparing these results to the present ones two observations can be drawn. First, based on their results, Aramendía *et al.*<sup>18</sup> claimed that the  $\delta^{65}\text{Cu}$  value could be a potential diagnostic biomarker of WD, but we do not observe here any difference between

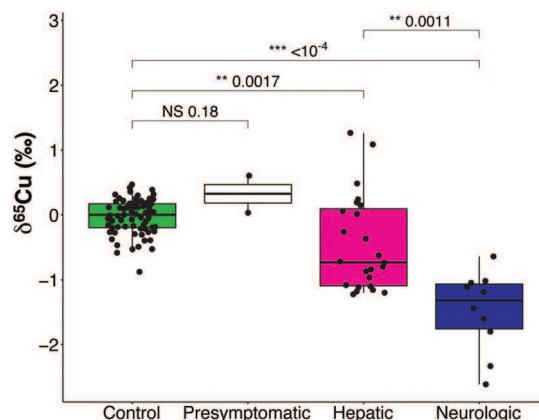


Fig. 5 Distribution of the Cu isotope compositions in the blood of healthy controls and WD patients according to the phenotypic presentation.  $p$ -Values are non-significant (ns)  $p > 0.05$ ; (\*)  $p \leq 0.05$ ; (\*\*)  $p \leq 0.01$ ; (\*\*\*)  $p \leq 0.001$ .

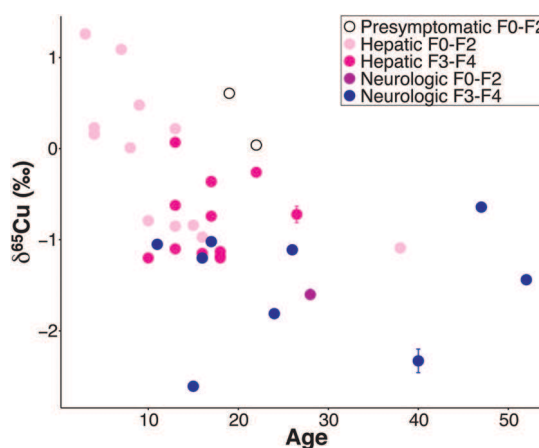


Fig. 6 Variation of the Cu isotope composition in the blood of WD patients according to the degree of fibrosis and the phenotypic presentation.  $p$ -Values are non-significant (ns)  $p > 0.05$ ; (\*)  $p \leq 0.05$ ; (\*\*)  $p \leq 0.01$ ; (\*\*\*)  $p \leq 0.001$ .

untreated WD patients ( $n = 11$ ) and controls ( $n = 75$ ) suggesting that the  $\delta^{65}\text{Cu}$  value cannot be reliably used for WD diagnosis. The inconsistency between the two studies lies in the fact that the five WD patients in the study of Aramendía *et al.*<sup>18</sup> were treated patients (VanHaecke, pers. comm.). Second, Aramendía *et al.*<sup>18</sup> measured the Cu isotope composition in serum while we measured the Cu isotope composition in total blood. Copper in the serum is mostly bound to ceruloplasmin ( $\sim 90\%$ ) and the remaining Cu is bound to albumin and alpha-2 macroglobulin. The extra compartment in whole blood is red blood cells in which Cu is bound to superoxide dismutase. Serum components and red blood cells have a different turnover, so comparing serum and whole blood  $\delta^{65}\text{Cu}$  values is not appropriate at first glance. However, a comparison of serum and whole blood  $\delta^{65}\text{Cu}$  values from the same sample collection tube reveals that both compartments are isotopically similar.<sup>21</sup> It is obvious that working with the same type of sample is more careful, but it can happen that different types of samples can be present in the

Table 2 Cu concentration and isotope composition in 11–12 and 45 week old *Atp7b*<sup>-/-</sup> mice

Age (w)	Plasma		Liver		Feces	
	Cu ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$\delta^{65}\text{Cu}$ (‰)	Cu ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$\delta^{65}\text{Cu}$ (‰)	Cu ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$\delta^{65}\text{Cu}$ (‰)
11–12	$0.39 \pm 0.09$ ( $n = 10$ )	$-0.31 \pm 0.13$ ( $n = 9$ )	$275 \pm 22$ ( $n = 12$ )	$-0.53 \pm 0.12$ ( $n = 12$ )	$49 \pm 7$ ( $n = 12$ )	$0.33 \pm 0.06$ ( $n = 12$ )
45	$0.53 \pm 0.16$ ( $n = 12$ )	$-1.63 \pm 0.53$ ( $n = 12$ )	$479 \pm 116$ ( $n = 12$ )	$-1.86 \pm 0.40$ ( $n = 12$ )	$42 \pm 6$ ( $n = 12$ )	$0.06 \pm 0.10$ ( $n = 12$ )

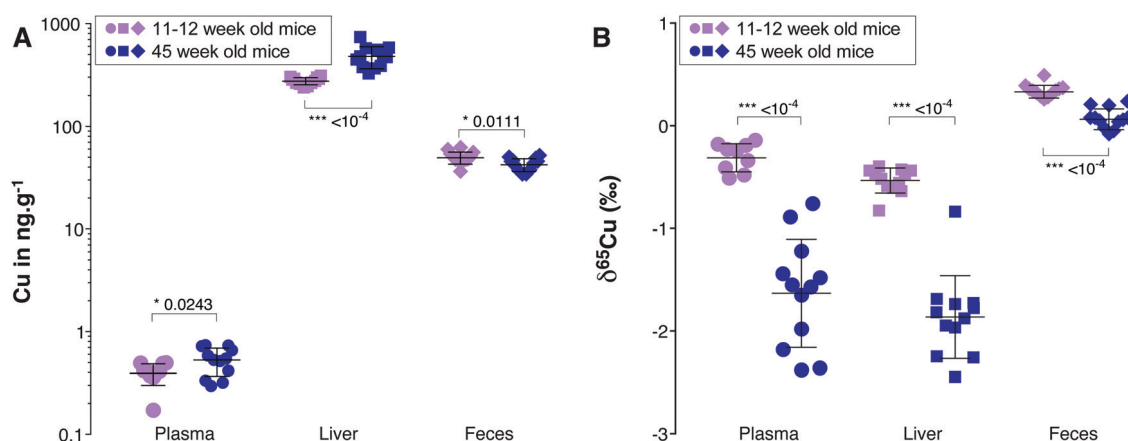


Fig. 7 (A) Distribution of the Cu concentration in the serum, liver and feces of *Atp7b*<sup>-/-</sup> mice. (B) Distribution of the Cu isotope compositions in the serum, liver and feces of *Atp7b*<sup>-/-</sup> mice.  $p$ -Values are non-significant (ns)  $p > 0.05$ ; (\*)  $p < 0.05$ ; (\*\*)  $p < 0.01$ ; (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

same biobank. Noteworthy is the fact that hemolysis will not affect the quality of the measurement as far as Cu isotope composition is concerned.

In the present study, we found that untreated WD patients and controls have comparable  $\delta^{65}\text{Cu}$  values, which are different from treated patients (Fig. 1B). In addition, WD patients, being treated or not, exhibit a  $\delta^{65}\text{Cu}$  value which seems to not vary through time (Fig. 2B). Each WD patient is likely to have a Cu isotopic signature. A distribution of the  $\delta^{65}\text{Cu}$  value as a function of gender and age indicates some patterns of anthropological origin (Fig. 3). While the difference between menstruated women and men has already been described and explained,<sup>21–23,35</sup> an isotopic pattern yet unknown is the difference ( $p$ -value  $< 10^{-4}$ ) of the  $\delta^{65}\text{Cu}$  value between young ( $< 15$  years old,  $-0.21 \pm 0.27\%$ ,  $n = 28$ ) and adult ( $> 15$  years old,  $0.08 \pm 0.20\%$ ,  $n = 47$ ) controls (Fig. 3). This difference is also observed in WD patients ( $p$ -value = 0.0033). The blood  $\delta^{65}\text{Cu}$  signature of WD patients thus integrates an anthropological (age and sex) and a pathological component.

The results described above show that the Cu isotope composition in total blood decreases with the severity of the liver disease and the state of liver functions, which is in accordance with a previous study<sup>27</sup> showing that the serum Cu isotope composition in female cirrhotic patients ( $-0.78 \pm 0.72\%$ ,  $n = 25$ ) is lower than in female healthy controls ( $-0.29 \pm 0.27\%$ ,  $n = 29$ ) ( $p$ -value  $< 10^{-4}$ ). In this study,<sup>27</sup> the authors also showed that the  $\delta^{65}\text{Cu}$  value decreases with the MELD score (Model of End stage Liver Disease), which confirms that the serum/blood Cu isotope composition is correlated with the severity of the liver injury. Here, the blood  $\delta^{65}\text{Cu}$  value is also

inversely correlated to the MELD score ( $R = -0.15$ ) but the correlation is not significant ( $p$ -value = 0.40).

In WD, which is a genetic disease, Cu hepatic accumulation probably begins at birth but it takes several years to observe the first hepatic symptoms. The familial genetic screening can however help to diagnose pre-symptomatic young WD patients. The hepatic injury generally happens at 2–3 years and further evolves at a variable pace, so that some WD infants can be cirrhotic at ten years and others will reach adulthood with moderate hepatic damage. The neurologic injury always follows the hepatic one, but is little symptomatic at the onset and can be ignored for a certain time. The age of the patient at diagnosis therefore generally gives first order information about the degree of the hepatic injury. In this context, the blood  $\delta^{65}\text{Cu}$  value appears to be a good biomarker of WD progress and potentially of WD prognosis. Interestingly, some patients exhibit blood  $\delta^{65}\text{Cu}$  values which are outside the expected range of age. This is the case for instance for AZWA who is already a F3–F4 neurologic phenotype at 15 years old only. In his/her case, the WD has been very aggressive because he/she has a very negative  $\delta^{65}\text{Cu}$  value at  $-2.61\%$ , the lowest of the dataset. Another interesting example is JEJI, for whom the WD is stable at 38 years old, with a blood  $\delta^{65}\text{Cu}$  value at  $-1.09\%$ .

To study the mechanism of the WD, we measured the Cu concentration and isotope composition in blood plasma, liver and feces in *Atp7b*<sup>-/-</sup> mice at two time points, 11–12 and 45 weeks. The Cu concentration increases in the liver by 87% and plasma by 67% but slightly decreases by 15% in feces from 11–12 weeks to 45 weeks (Fig. 7A). During that duration, the Cu

isotope composition decreases in all tissues. The liver  $\delta^{65}\text{Cu}$  value decreases from  $-0.53 \pm 0.12\%$  ( $n = 12$ ) to  $-1.86 \pm 0.40\%$  ( $n = 12$ ), that of plasma from  $-0.31 \pm 0.13\%$  ( $n = 9$ ) to  $-1.63 \pm 0.53\%$  ( $n = 12$ ) and that of feces from  $0.33 \pm 0.06\%$  ( $n = 12$ ) to  $0.06 \pm 0.10\%$  ( $n = 12$ ) (Fig. 7B). The difference of the  $\delta^{65}\text{Cu}$  values between 45 and 11–12 weeks, hereafter annotated  $\Delta^{65}\text{Cu}$ , is  $-1.3\%$ ,  $-1.3\%$  and  $-0.3\%$  for liver, plasma and feces, respectively. Unfortunately, these numbers cannot be evaluated relative to the control group because we did not have access to wild type mice. Twelve week old mice can however be considered as a control group because it is at this age that copper has significantly accumulated in the liver and causes liver damage.<sup>36</sup> The evolution of the  $\Delta^{65}\text{Cu}$  values of organs of *Atp7b*<sup>-/-</sup> mice can be compared to those of Costas-Rodriguez *et al.*,<sup>20</sup> who studied the effects of cholestatic liver disease using a common bile duct ligation (CBDL) murine model. The comparison is interesting because, although of distinct etiologies, cholestatic liver disease and WD both result in hepatic Cu accumulation. CBDL-operated mice exhibit a dramatic increase of Cu concentration of 336% in the liver and of 170% in serum and a decrease of 16% in feces compared to SHAM-operated mice.<sup>20</sup> The bile duct ligation results in a decrease of the  $\Delta^{65}\text{Cu}$  value of  $-1.0\%$ ,  $-0.6\%$  and  $0.0\%$  for liver, serum and feces, respectively. Therefore, while the Cu accumulation in CBDL-operated mice is much more important than in *Atp7b*<sup>-/-</sup> mice, the resulting decrease of the  $\Delta^{65}\text{Cu}$  value is less pronounced than in *Atp7b*<sup>-/-</sup> mice. This suggests that the knockdown of the *ATP7B* gene leads to a very efficient hepatic accumulation of  $^{63}\text{Cu}$ .

Two different processes are likely at work to explain the  $^{63}\text{Cu}$  hepatic accumulation in *Atp7b*<sup>-/-</sup> mice, and thus in WD. First, it is the preferential entry of  $^{63}\text{Cu}$  in cells, being healthy or pathologic. Copper crosses the cellular membrane with the high affinity transporter hCTR1, which only carries reduced  $\text{Cu}^+$ . The reduction of Cu is achieved by a Steap reductase prior to the transport by hCTR1. Because bonds involving low oxidation states ( $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ) prefer light to heavy isotopes,<sup>37,38</sup> the Steap activity will favor  $^{63}\text{Cu}$  to  $^{65}\text{Cu}$ , and thus  $^{63}\text{Cu}^+$  will preferentially enter the cells. Second, it is suppression of the preferential exit of Cp-bound  $^{63}\text{Cu}$ . Due to the effects on the isotopic distribution of Cu with different binding sites, Tennant *et al.*<sup>39</sup> predicted that the binding of Cu to apo-Cp favors  $^{63}\text{Cu}$ . The prediction is in accordance with the observation that serum has systematically a lower  $\delta^{65}\text{Cu}$  value than liver in normal conditions, *i.e.* the difference of the  $\delta^{65}\text{Cu}$  values between liver and serum ( $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{liver-ser}}$ ) is positive. In CBDL-operated mice, *ATP7B* is functional and can still deliver Cu to apo-Cp resulting in a  $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{liver-ser}}$  of  $+0.5\%$ .<sup>20</sup> However, in *Atp7b*<sup>-/-</sup> mice, Cu is no longer delivered to apo-Cp resulting in  $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{liver-ser}}$  of  $-0.2\%$  (Fig. 7B and Table 2), whatever the age of the mice.

Finally,  $^{63}\text{Cu}$  accumulates in *Atp7b*<sup>-/-</sup> mice and in WD patients because the biliary excretion is impaired by the mutation of the *ATP7B* gene,<sup>40</sup> but part of the accumulated Cu is still excreted out of hepatocytes by a yet unknown process. Exocytosis can be involved where Cu would be unbound,

leading to the observed increase in CuEXC in *Atp7b*<sup>-/-</sup> mice<sup>41</sup> and in WD patients.<sup>15,17</sup> Interestingly, Lauwens *et al.*<sup>42</sup> measured the  $\delta^{65}\text{Cu}$  value of CuEXC in alcoholic liver cirrhotic patients and found comparable or lower values than in the corresponding bulk serum.

## Conclusion

In this study, the Cu concentrations and isotope compositions have been measured in treated and untreated WD patients and compared to age-matched healthy controls. We show that WD patients exhibit a Cu isotopic signature that depends on anthropological parameters in addition to the degree of disease progression, which was quantified by the level of liver fibrosis and the gradient of the phenotypic presentation. To get insights into the effects of the progress of the WD, we measured the Cu concentrations and isotope compositions in the liver, feces and serum of 12 and 45 week old *Atp7b*<sup>-/-</sup> mice. The evolution of the  $\delta^{65}\text{Cu}$  values is marked by a decrease in all tissues. The results show that  $^{63}\text{Cu}$  dynamically accumulates in the liver due to the preferential cellular entry of reduced  $^{63}\text{Cu}^+$  and the impairment of the preferential  $^{63}\text{Cu}$  over  $^{65}\text{Cu}$  exit by Cp. The hepatic accumulation of monovalent  $^{63}\text{Cu}^+$  and the release of  $^{63}\text{Cu}$  in the peripheral system as CuEXC, with an unknown redox state, are likely to fuel the production of free radicals, likely supporting WD pathogenesis. The present results obtained on WD patients and *Atp7b*<sup>-/-</sup> mice already suggest that the blood  $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$  ratio recapitulates the progress of the WD and is potentially a prognostic biomarker for WD.

## Conflicts of interest

There are no conflicts of interest to declare.

## Acknowledgements

V. B. and A. L. are grateful to Fondation Bullukian, Fondation Mérieux, the CNRS Mission pour l'Interdisciplinarité.

## References

- 1 S. A. K. Wilson, Progressive lenticular degeneration, *Br. Med. J.*, 1912, 2(2710), 1645.
- 2 P. C. Bull, G. R. Thomas, J. M. Rommens, J. R. Forbes and D. W. Cox, The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene, *Nat. Genet.*, 1993, 5(4), 327–337.
- 3 M. C. Linder and M. Hazegh-Azam, Copper biochemistry and molecular biology, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1996, 63(5), 797S–811S.
- 4 B. Zhou and J. Gitschier, hCTR1: A human gene for copper uptake identified by complementation in yeast, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1997, 94(14), 7481–7486.



- 5 S. Lutsenko, N. L. Barnes, M. Y. Bartee and O. Y. Dmitriev, Function and Regulation of Human Copper-Transporting ATPases, *Physiol. Rev.*, 2007, **87**(3), 1011–1046.
- 6 P. Delangle and E. Mintz, Chelation therapy in Wilson's disease: from D-penicillamine to the design of selective bioinspired intracellular Cu(I) chelators, *Dalton Trans.*, 2012, **41**(21), 6359–6370.
- 7 A. Ala, A. P. Walker, K. Ashkan, J. S. Dooley and M. L. Schilsky, Wilson's disease, *Lancet*, 2007, **369**(9559), 397–408.
- 8 E. A. Roberts and M. L. Schilsky, Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update, *Hepatology*, 2008, **47**(6), 2089–2111.
- 9 I. Sternlieb, The outlook for the diagnosis of Wilson's disease, *J. Hepatol.*, 1993, **17**(3), 263–264.
- 10 J. N. Cumings, The effects of B.A.L. in hepatolenticular degeneration, *Brain*, 1951, **74**(1), 10–22.
- 11 J. M. Walshe, Penicillamine, a new oral therapy for Wilson's disease, *Am. J. Med.*, 1956, **21**(4), 487–495.
- 12 J. M. Walshe, Management of penicillamine nephropathy in Wilson's disease: a new chelating agent, *Lancet*, 1969, **294**(7635), 1401–1402.
- 13 T. U. Hoogenraad, R. Koevoet and R. Korver EGWM de, Oral Zinc Sulphate as Long-Term Treatment in Wilson's Disease (Hepatolenticular Degeneration), *Eur. Neurol.*, 1979, **18**(3), 205–211.
- 14 G. J. Brewer, Zinc and tetrathiomolybdate for the treatment of Wilson's disease and the potential efficacy of anticopper therapy in a wide variety of diseases, *Metallomics*, 2009, **1**(3), 199.
- 15 O. Guillaud, A.-S. Brunet, I. Mallet, J. Dumortier, M. Pelosse and S. Heissat, *et al.*, Relative exchangeable copper: a valuable tool for the diagnosis of Wilson disease, *Liver Int.*, 2018, **38**(2), 350–357.
- 16 P. Ferenci, K. Caca, G. Loudianos, G. Mieli-Vergani, S. Tanner and I. Sternlieb, *et al.*, Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease<sup>1</sup>, *Liver Int.*, 2003, **23**(3), 139–142.
- 17 S. El Balkhi, J.-M. Trocello, J. Poupon, P. Chappuis, F. Massicot and N. Girardot-Tinant, *et al.*, Relative exchangeable copper: A new highly sensitive and highly specific biomarker for Wilson's disease diagnosis, *Clin. Chim. Acta*, 2011, **412**(23–24), 2254–2260.
- 18 M. Aramendía, L. Rello, M. Resano and F. Vanhaecke, Isotopic analysis of Cu in serum samples for diagnosis of Wilson's disease: a pilot study, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2013, **28**(5), 675.
- 19 V. Balter, A. Lamboux, A. Zazzo, P. Télouk, Y. Leverrier and J. Marvel, *et al.*, Contrasting Cu, Fe, and Zn isotopic patterns in organs and body fluids of mice and sheep, with emphasis on cellular fractionation, *Metallomics*, 2013, **5**(11), 1470.
- 20 M. Costas-Rodríguez, S. V. Campenhout, A. A. M. B. Hastuti, L. Devisscher, H. V. Vlierberghe and F. Vanhaecke, Body distribution of stable copper isotopes during the progression of cholestatic liver disease induced by common bile duct ligation in mice, *Metallomics*, 2019, **11**(6), 1093–1103.
- 21 F. Albarède, P. Telouk, A. Lamboux, K. Jaouen and V. Balter, Isotopic evidence of unaccounted for Fe and Cu erythropoietic pathways, *Metallomics*, 2011, **3**(9), 926.
- 22 L. Van Heghe, O. Deltombe, J. Delanghe, H. Depypere and F. Vanhaecke, The influence of menstrual blood loss and age on the isotopic composition of Cu, Fe and Zn in human whole blood, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2014, **29**(3), 478–482.
- 23 K. Jaouen and V. Balter, Menopause effect on blood Fe and Cu isotope compositions, *Am. J. Phys. Anthropol.*, 2014, **153**(2), 280–285.
- 24 V. Balter, A. Nogueira da Costa, V. P. Bondanese, K. Jaouen, A. Lamboux and S. Sangrajrang, *et al.*, Natural variations of copper and sulfur stable isotopes in blood of hepatocellular carcinoma patients, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2015, **112**(4), 982–985.
- 25 V. P. Bondanese, A. Lamboux, M. Simon, J. Lafont, E. Albalat, S. Pichat, J. M. Vanacker, P. Télouk, V. Balter, P. Oger and F. Albarède, Hypoxia induces copper stable isotope fractionation in hepatocellular carcinoma, in a HIF-independent manner, *Metallomics*, 2016, **8**, 1177–1184.
- 26 L. Lobo, M. Costas-Rodríguez, J. C. de Vicente, R. Pereiro, F. Vanhaecke and A. Sanz-Medel, Elemental and isotopic analysis of oral squamous cell carcinoma tissues using sector-field and multi-collector ICP-mass spectrometry, *Talanta*, 2017, **165**, 92–97.
- 27 M. Costas-Rodríguez, Y. Anoshkina, S. Lauwens, H. V. Vlierberghe, J. Delanghe and F. Vanhaecke, Isotopic analysis of Cu in blood serum by multi-collector ICP-mass spectrometry: a new approach for the diagnosis and prognosis of liver cirrhosis?, *Metallomics*, 2015, **7**(3), 491–498.
- 28 K. A. Miller, C. M. Keenan, G. R. Martin, F. R. Jirik, K. A. Sharkey and M. E. Wieser, The expression levels of cellular prion protein affect copper isotopic shifts in the organs of mice, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2016, **31**(10), 2015–2022.
- 29 T. G. Enge, H. Ecroyd, D. F. Jolley, J. J. Yerbury and A. Dosseto, Longitudinal assessment of metal concentrations and copper isotope ratios in the G93A SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis, *Metallomics*, 2017, **9**(2), 161–174.
- 30 F. Moynier, J. Creech, J. Dallas and M. L. Borgne, Serum and brain natural copper stable isotopes in a mouse model of Alzheimer's disease, *Sci. Rep.*, 2019, **9**(1), 1–7.
- 31 L. Sauzéat, E. Bernard, A. Perret-Liaudet, I. Quadrio, A. Vighetto and P. Krolak-Salmon, *et al.*, Isotopic Evidence for Disrupted Copper Metabolism in Amyotrophic Lateral Sclerosis, *iScience*, 2018, **6**, 264–271.
- 32 O. I. Buiakova, J. Xu, S. Lutsenko, S. Zeitlin, K. Das and S. Das, *et al.*, Null Mutation of the Murine ATP7B (Wilson Disease) Gene Results in Intracellular Copper Accumulation and Late-Onset Hepatic Nodular Transformation, *Hum. Mol. Genet.*, 1999, **8**(9), 1665–1671.
- 33 C. N. Maréchal, P. Télouk and F. Albarède, Precise analysis of copper and zinc isotopic compositions by plasma-source mass spectrometry, *Chem. Geol.*, 1999, **156**(1–4), 251–273.
- 34 F. Albarède, P. Telouk, J. Blichert-Toft, M. Boyet, A. Agranier and B. Nelson, Precise and accurate isotopic measurements using multiple-collector ICPMS, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 2004, **68**(12), 2725–2744.
- 35 K. Jaouen, V. Balter, E. Herrscher, A. Lamboux, P. Telouk and F. Albarède, Fe and Cu stable isotopes in archeological

- human bones and their relationship to sex, *Am. J. Phys. Anthropol.*, 2012, **148**(3), 334–340.
- 36 D. Huster, Structural and metabolic changes in Atp7b<sup>-/-</sup> mouse liver and potential for new interventions in Wilson's disease, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2014, **1315**(1), 37–44.
- 37 F. Albarède, P. Télouk and V. Balter, Medical Applications of Isotope Metallomics, *Rev. Mineral. Geochem.*, 2017, **82**(1), 851–885.
- 38 F. Albarède, P. Télouk, V. Balter, V. P. Bondanese, E. Albalat, P. Oger, P. Bonaventura, P. Miossec and T. Fujii, Medical applications of the Cu, Zn and S isotope effects, *Metallomics*, 2016, **8**, 1056–1070.
- 39 A. Tennant, A. Rauk and M. E. Wieser, Computational modelling of the redistribution of copper isotopes by proteins in the liver, *Metallomics*, 2017, **9**(12), 1809–1819.
- 40 M. Lacombe, M. Jaquinod, L. Belmudes, Y. Couté, C. Ramus and F. Combes, *et al.*, Comprehensive and comparative exploration of the Atp7b<sup>-/-</sup> mouse plasma proteome, *Metallomics*, 2020, **12**(2), 249–258.
- 41 S. Heissat, A. Harel, K. Um, A.-S. Brunet, V. Hervieu and O. Guillaud, *et al.*, Evaluation of the accuracy of exchangeable copper and relative exchangeable copper (REC) in a mouse model of Wilson's disease, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2018, **50**, 652–657.
- 42 S. Lauwens, M. Costas-Rodríguez, J. Delanghe, H. Van Vlierberghe and F. Vanhaecke, Quantification and isotopic analysis of bulk and of exchangeable and ultrafiltrable serum copper in healthy and alcoholic cirrhosis subjects, *Talanta*, 2018, **189**, 332–338.

# **Chapitre 4**

---

---

**Mise en évidence de  
l'effet et du mécanisme  
de fonctionnement d'un  
chélateur innovant**

---

---





# Introduction

---

Les traitements actuellement administrés aux malades de Wilson sont essentiellement des chélateurs, la D-Pénicillamine (Trolovol) et la triéthylènetétramine (Trientine). Ils ont pour but de faire diminuer l'excès de Cu dans le corps en favorisant son excrétion par les urines. Cependant ils présentent des effets secondaires et ne ciblent pas particulièrement le Cu en excès dans le foie. La recherche se penche donc sur de nouveaux chélateurs plus spécifiques. Une équipe de recherche du CEA de Grenoble, avec laquelle j'ai collaboré, travaille activement sur ces nouveaux chélateurs, en s'intéressant notamment au design et à la synthèse de molécules chélatant le cuivre, en vue de constituer un traitement pour la maladie de Wilson.

Je montrerai dans une première partie, qu'en mesurant les concentrations en cuivre chez des souris du modèle murin de la maladie de Wilson (des souris *Atp7b*<sup>-/-</sup>), j'ai mis en évidence l'efficacité du chélateur en développement appelé « Chel2 ». Dans un second temps, je montrerai comment les mesures de la composition isotopique du cuivre ont contribué à étudier le mécanisme de fonctionnement de Chel2.

---



## 4.1 Mise en évidence de l'effet de Chel2 sur l'excrétion du cuivre

L'objectif de ce travail est de vérifier l'efficacité de Chel2 et montrer qu'il favorise bien l'excrétion du cuivre vers la bile. Pour cela, j'ai mesuré la concentration en cuivre dans la bile de différents groupes de souris.

### 4.1.1 Structure de Chel2

Les traitements actuellement administrés aux malades de Wilson sont principalement des chélateurs comme la D-penicillamine et la trientine. Malheureusement ses chélateurs agissent de manière systémique et présentent des effets indésirables. Pour palier à ceux-ci, depuis une dizaine d'année, la recherche se penche sur de nouveaux chélateurs plus spécifiques. Ils ont notamment pour but d'agir spécifiquement au niveau du foie pour traiter la surcharge en Cu (Gateau et al., 2014). En effet, la protéine ATP7B (en déficit fonctionnel chez les malades de Wilson) a pour rôle d'excréter l'excès de cuivre sous forme  $\text{Cu}^+$  vers la bile. Ces nouveaux chélateurs ont donc pour but de complexer les ions  $\text{Cu}^+$  à l'intérieur des hépatocytes afin d'être excrétés dans la bile, puis dans les fèces. Pour les rendre spécifiques aux hépatocytes, ces chélateurs sont greffés à des ligands spécifiques aux récepteurs des asialoglycoprotéines<sup>1</sup> (ASGP) (Monestier et al., 2016).

Afin de mettre en évidence les mécanismes de fonctionnement d'un de ces chélateurs, j'ai travaillé avec des souris *Atp7b*<sup>-/-</sup> traitées par Chel2 (Pujol et al., 2012) (figure 32).

---

<sup>1</sup> Définition du MeSH : Glycoprotéines endogènes dont l'acide sialique a été supprimé sous l'action de sialidases. Elles se lient avec une forte affinité aux récepteurs des asialoglycoprotéines qui sont situées sur la membrane plasmique des hépatocytes. Après pénétration par endocytose, elles sont dégradées par les lysosomes. On les retrouve à des taux élevés dans le sérum des patients souffrant de cirrhose hépatique ou d'hépatite.

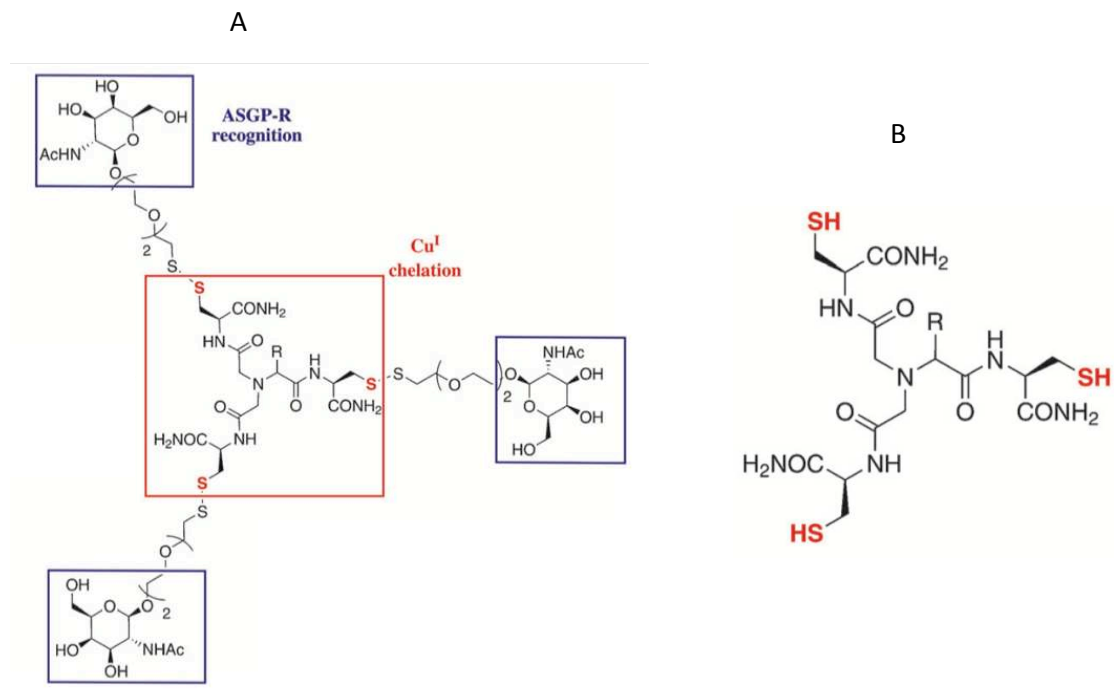


Figure 32 : Structure du pro-chélateur Chel2 possédant les 3 ligands ciblant les récepteurs ASGP (A) et du chélateur libéré (B)  
Modifié d'après (Pujol et al., 2012)

## 4.1.2 Matériels et méthodes

Afin de montrer l'efficacité de Chel 2, les deux expériences suivantes ont été réalisées :

- La première consiste à mesurer la concentration en Cu dans la bile de 3 groupes de souris âgées de 20 semaines :

Un groupe de 12 souris *Atp7b*<sup>-/-</sup> recevant une injection de Chel2 par intraveineuse à une dose de 50 mg/kg à partir d'une solution de Chel2 à 0,5 mg/mL.

Un groupe témoin de 6 souris *Atp7b*<sup>-/-</sup>.

Un groupe de 5 souris Wild Type C57BL/6.

- La deuxième expérience consiste à mesurer la concentration en Cu dans la bile de 2 groupes de souris *Atp7b*<sup>-/-</sup> âgées de 45 semaines :

Un groupe de 10 souris traitées par Chel2 à 5 mg/kg. Les souris ont reçu 8 injections intrapéritonéales sur 10 jours (week-end exclu).

Un groupe contrôle de 12 souris ayant reçu 7 injections intrapéritonéales de NaCl 0,9 % sur 9 jours (week-end exclu).

A la dernière injection, toutes les souris sont placées en cages à métabolisme à jeun pour ~24 h avant le sacrifice.

Les mesures de la concentration en Cu ont été réalisées par ICP-MS sur le Thermo IcapQ.

La quantité de bile chez les souris étant très faible, afin de s'assurer que les tubes utilisés pour la collecte des échantillons de biles n'apportaient pas trop de Cu et que les étapes de minéralisation des échantillons n'étaient pas source de pollution en Cu, des mesures de blancs ont été réalisées.

Les échantillons de bile ont été collectés et directement pesés dans des tubes de 15 mL au CEA de Grenoble. Afin de récolter la totalité de l'échantillon, le protocole appliqué est le suivant :

Dans le tube de 15 mL, verser 1 mL d'HNO<sub>3</sub> 0,5 N, agiter puis centrifuger et enfin verser dans un bécher Savillex®. Répéter cette opération 3 fois. Evaporer les 3 mL récupérés dans le bécher Savillex® puis procéder à la minéralisation avec 1 mL d'HNO<sub>3</sub> 0,5 N et 0,1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %.

La même procédure a été appliquée sans échantillon afin de déterminer le blanc de manipulation. J'ai ainsi pu déterminer, que les tubes, la procédure de récupération de l'échantillon ainsi que la minéralisation apportait moins de 2 ng de Cu.

### 4.1.3 Résultats

Les résultats des mesures de la concentration en Cu dans la bile des souris sont résumés dans le tableau 9 et le détail des résultats est en annexe 3.

La concentration en Cu dans la bile des souris *Atp7b*<sup>-/-</sup> contrôles (non traitées par Chel2) ( $0,80 \pm 0,32$  µg/g, n = 6) est plus faible que celle des souris WT ( $1,52 \pm 0,42$  µg/g, n = 5), *p*-value = 0,03 (figure 33). La concentration en Cu dans la bile des souris *Atp7b*<sup>-/-</sup> traitées par Chel2 en intraveineuse à 50 mg/kg ( $2,46 \pm 1,82$  µg/g, n = 12) est plus grande que celle des souris *Atp7b*<sup>-/-</sup> contrôles, *p*-value = 0,02, et est comparable à celle des souris WT, *p*-value = 0,47 (figure

33). Ceci montre bien que les souris *Atp7b*<sup>-/-</sup> traitées par Chel2 excrètent plus de Cu que les souris non traitées et que ces dernières excrètent moins de Cu que des souris WT.

Cu en µg/g dans la bile					
	souris	traitement	F	M	F+M
1ère exp	<i>Atp7b</i> <sup>-/-</sup>	1 IV Chel2 à 50 mg/kg	3.44 ± 1.74 (n=7)	1.09 ± 0.73 (n=5)	2.46 ± 1.82 (n=12)
	<i>Atp7b</i> <sup>-/-</sup>	pas de traitement	1.04 ± 0.18 (n=3)	0.55 ± 0.20 (n=3)	0.80 ± 0.32 (n=6)
	WT	pas de traitement	1.72 ± 0.25 (n=2)	1.39 ± 0.50 (n=3)	1.52 ± 0.42 (n=5)
2nde exp	<i>Atp7b</i> <sup>-/-</sup>	Chel2 à 5 mg/kg (7 IP)	5.48 ± 1.28 (n=4)	1.43 ± 1.03 (n=5)	3.23 ± 2.39 (n=9)
	<i>Atp7b</i> <sup>-/-</sup>	NaCl 0.9 % (8 IP)		0.31 ± 0.23 (n=11)	

Tableau 9 : Concentration en Cu dans la bile des souris. IV signifie injection par intraveineuse et IP injection intrapéritonéale

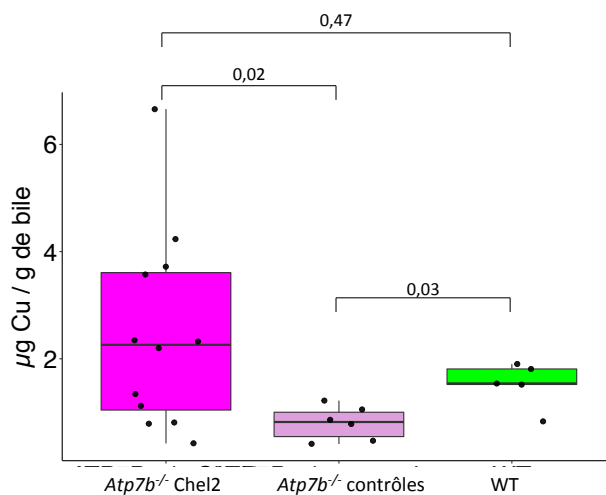


Figure 33 : Boxplot des concentrations en Cu dans la bile chez les souris *Atp7b*<sup>-/-</sup> traitées avec Chel2 par intraveineuse (en rose foncé), les souris *Atp7b*<sup>-/-</sup> contrôles non traitées (en rose clair) et les souris WT (en vert)

La concentration en Cu dans la bile des souris *Atp7b*<sup>-/-</sup> traitées par Chel2 en intrapéritonéale à 5 mg/kg (3,23 ± 2,39 µg/g, n = 9) est plus élevée que celle des souris *Atp7b*<sup>-/-</sup> contrôles (traitées par NaCl à 0,9 % en intrapéritonéale) (0,31 ± 0,23 µg/g, n = 11), *p*-value = 0,0012 (figure 34).

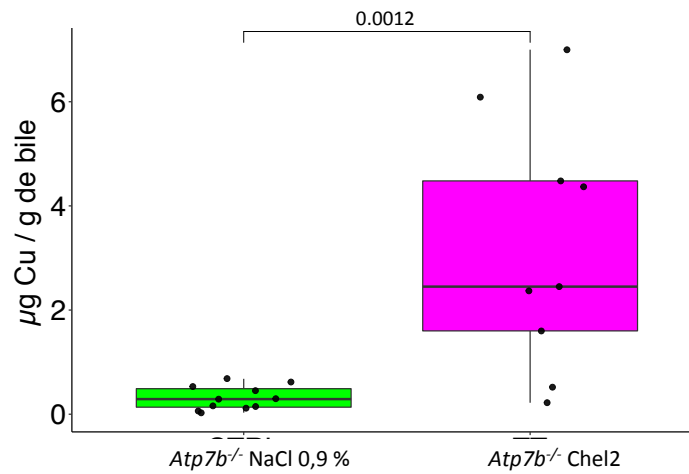


Figure 34 : Boxplot des concentrations en Cu dans la bile chez les souris *Atp7b*<sup>-/-</sup> traitées par Chel2 en intrapéritonéale (en rose) et les souris *Atp7b*<sup>-/-</sup> contrôles traitées avec NaCl 0,9 % en intrapéritonéale (en vert)

Les concentrations en cuivre plus élevées dans la bile des souris *Atp7b*<sup>-/-</sup> traitées par Chel2 en intrapéritonéale par rapport celles recevant du NaCl 0,9 % en IP indiquent que Chel2 favorise l'excrétion du cuivre vers la bile.

#### 4.1.4 Conclusion

Les résultats obtenus montrent que lorsque Chel2 est administré aux souris *Atp7b*<sup>-/-</sup> par voie intraveineuse ou intrapéritonéale leur bile contient plus de Cu que celle des souris contrôles. Ceci indique que Chel2 est efficace, qu'il favorise bien l'excrétion du cuivre. L'excrétion du cuivre grâce à Chel2 se faisant alors par la bile, le Cu sera donc éliminé dans les fèces. L'efficacité de Chel2 ayant été démontrée, la partie suivante sera consacrée à étudier plus en détails son mécanisme de fonctionnement.



## 4.2 Etude du mécanisme de fonctionnement de Chel2 grâce aux mesures isotopiques du cuivre

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence le mécanisme d'excrétion du Cu chez la souris *Atp7b*<sup>-/-</sup> traitée avec Chel2. Afin de suivre le flux de cuivre, une dose de <sup>65</sup>Cu est administrée à des souris *Atp7b*<sup>-/-</sup> avant le traitement par Chel2, puis leurs urines et fèces sont récoltées régulièrement. Enfin après euthanasie le sang et le foie sont prélevés. Les mesures des compositions isotopiques du Cu par MC-ICP-MS dans ces différents compartiments permettront ainsi de suivre les flux de Cu. Dans cette partie, je montrerai dans un premier temps qu'il a fallu vérifier qu'une injection de <sup>65</sup>Cu modifiait la composition isotopique du foie, en combien de temps et quelle était la dose optimale. Dans un deuxième temps, je présenterai comment a été mis en évidence le flux de cuivre chez la souris *Atp7b*<sup>-/-</sup> traitée avec Chel2. Les résultats obtenus couplés à ceux démontrant l'interaction entre Chel2 et la localisation de Cu dans ces cellules par microscopie confocale à l'aide d'un dérivé fluorescent et de nano fluorescence X ont donné lieu à un article publié dans *Metallomics* : « A liver-targeting Cu(I) chelator relocates Cu in hepatocytes and promotes Cu excretion in a murine model of Wilson's disease ».

### 4.2.1 Mise en évidence d'une modification de la composition isotopique du cuivre du foie de souris après injection de <sup>65</sup>Cu

Cette première partie de l'étude a pour but de vérifier qu'une injection de <sup>65</sup>Cu effectuée par intraveineuse modifie bien le rapport isotopique du foie et des fèces des souris *Atp7b*<sup>-/-</sup>. J'aborderai tout d'abord les précautions qui ont été prises pour effectuer les mesures de compositions isotopiques d'échantillons dopés en <sup>65</sup>Cu. Ensuite, le calcul de l'excès de <sup>65</sup>Cu sera détaillé. Enfin, je présenterai comment a été déterminée la dose de <sup>65</sup>Cu à administrer et je montrerai qu'elle engendre bien une modification de la composition isotopique du Cu dans le foie et dans les fèces.

#### 4.2.1.1 Précautions prises pour l'analyse d'échantillons dopés en

##### <sup>65</sup>Cu

La manipulation et la mesure d'échantillons dopés en <sup>65</sup>Cu n'ayant jamais été réalisée au laboratoire, des mesures de précautions spécifiques ont dû être prises. Il a tout d'abord fallu s'assurer de ne pas contaminer les échantillons naturels analysés de manière courante au laboratoire. La préparation de ces échantillons a donc été réalisée dans une partie de la salle blanche où personne d'autre ne travaillait avec des échantillons de Cu naturel. Des béciers en téflon ainsi que des colonnes quartz pour la séparation du Cu ont été réservés pour ces échantillons particuliers. Un grand soin a été apporté lors de la préparation de ces échantillons, afin particulièrement de ne pas engendrer de contamination croisée avec d'autres échantillons.

Les analyses d'échantillons dopés comme ceux-ci pouvant potentiellement entraîner une contamination ou un effet mémoire sur les appareils, elles ont été réalisées sur des appareils dédiés. Les mesures de concentrations ont été effectuées sur l'ICP-MS Agilent 7500 CX du fait que ce soit l'appareil le moins utilisé pour la mesure des concentrations au laboratoire. La plupart des mesures de concentrations notamment celle en Cu dans les échantillons biologiques étant réalisées sur le Thermo ICapQ. Les mesures isotopiques ont été réalisées sur le Nu Plasma 1700 de Nu Instrument puisque les analyses de Cu naturel sont faites habituellement sur le Nu Plasma HR. Le choix de ces appareils a permis de s'assurer de ne pas biaiser les mesures des autres utilisateurs tout en gardant les performances nécessaires pour ces mesures.

Afin de valider les mesures des échantillons dopés en <sup>65</sup>Cu effectuées sur le Nu plasma 1700 plusieurs paramètres décrits ci-après ont été contrôlés. Au cours des différentes séquences d'analyse, j'ai tout d'abord contrôlé que l'erreur interne était équivalente à celle mesurée lors de l'analyse d'échantillons naturels. Pour la mesure en « standard bracketing » des échantillons de Cu, le standard NIST SRM 976 est mesuré tous les 2 échantillons, j'ai donc pu évaluer la déviation de ce standard. Le tableau 10 présente les mesures de ce standard international, et l'erreur interne correspond à 2sd, celle-ci est toujours de l'ordre de 0,1 ‰ ce qui est du même ordre de grandeur que pour la mesure d'échantillons naturels. J'ai également vérifié la reproductibilité des mesures d'un standard maison (« in-house standard ») dont la valeur de référence est de 0,29 ‰. Ce standard maison est une solution de Cu commerciale que j'avais préalablement calibré en vue de pouvoir remplacer le NIST SRM 976 lorsque celui-ci sera épuisé. Ce standard maison a été mesuré plusieurs fois au cours de chaque session de mesure, ces

mesures sont récapitulées dans le tableau 10. Les moyennes des valeurs de  $\delta^{65}\text{Cu}$  de ce standard maison s'échelonnent de  $0,25 \pm 0,07 \text{ ‰}$  à  $0,30 \pm 0,08 \text{ ‰}$  ce qui montre que sur toutes les sessions d'analyse, la valeur mesurée correspond à la valeur de référence ( $0,29 \text{ ‰}$ ).

date	"in-house standard" ( $\delta^{65}\text{Cu} = 0,29 \text{ ‰}$ )			NIST SRM 976		
	moyenne	2sd	n	moyenne	2sd	n
févr-17	0,25	0,07	7	0,00	0,09	23
mars-17	0,28	0,11	2	0,01	0,06	14
juin-17	0,29	0,01	5	-0,01	0,10	35
juil-17	0,28	0,08	6	-0,01	0,09	38
nov-17	0,30	0,08	9	0,00	0,08	33
janv-18	0,28	0,07	5	0,01	0,11	25
févr-18	0,27	0,07	2	0,00	0,11	11

Tableau 10 : suivi des mesures de  $\delta^{65}\text{Cu}$  d'un standard maison (dont la valeur de référence est  $0,29 \text{ ‰}$ ) et du standard international de Cu NIST SRM 976 au cours des sessions de mesures d'échantillons dopés en  $^{65}\text{Cu}$  sur le MC-ICP-MS Nu Plasma 1700

Le fait que la déviation du NIST SRM 976 soit classique et que la valeur du  $\delta^{65}\text{Cu}$  du standard maison soit constante, montre que la mesure d'échantillons dopés en  $^{65}\text{Cu}$  n'entraîne pas un biais de mesure sur le MC-ICP-MS.

Après avoir pris les précautions nécessaires pour la manipulation et la préparation de tels échantillons dopés en  $^{65}\text{Cu}$ , j'ai donc pu vérifier que leur mesure était réalisable au laboratoire. Aussi, l'analyse de ces échantillons n'entraîne pas d'effet mémoire sur les spectromètres de masse.

#### 4.2.1.2 Calcul de l'excès de $^{65}\text{Cu}$

L'excès de  $^{65}\text{Cu}$  ( $^{65}\text{Cu}_{\text{xs}}$ ) permet de quantifier l'effet du dopage en  $^{65}\text{Cu}$  sur la composition isotopique du Cu dans les échantillons, notamment de foies et de fèces. Il correspond à la différence entre la quantité totale de  $^{65}\text{Cu}$  de l'échantillon ( $^{65}\text{Cu}_{\text{ech}}$ ) et la quantité de  $^{65}\text{Cu}$  naturelle de l'échantillon ( $^{65}\text{Cu}_{\text{nat}}$ ).

$$^{65}\text{Cu}_{\text{xs}} = ^{65}\text{Cu}_{\text{ech}} - ^{65}\text{Cu}_{\text{nat}}$$

$^{65}\text{Cu}_{\text{nat}}$  est calculé grâce à la mesure de  $^{63}\text{Cu}$  de l'échantillon ( $^{63}\text{Cu}_{\text{ech}}$ ) selon la formule suivante :

$${}^{65}\text{Cu}_{\text{nat}} = {}^{63}\text{Cu}_{\text{ech}} * R_{\text{std}}$$

Avec  $R_{\text{std}}$  le rapport des isotopes  ${}^{65}\text{Cu}/{}^{63}\text{Cu}$  du standard NIST 976 mesuré selon la méthode du « standard bracketing » tous les 2 échantillons :  $R_{\text{std}} = ({}^{65}\text{Cu}/{}^{63}\text{Cu})_{\text{std}}$

$R_{\text{std}}$  est donc calculé selon la moyenne pondérée des standards mesurés qui encadrent la mesure de l'échantillon.

$$\text{Avec } {}^{65}\text{Cu}_{\text{ech}} = {}^{63}\text{Cu}_{\text{ech}} * R_{\text{ech}}$$

$$\text{et } R_{\text{ech}} = ({}^{65}\text{Cu}/{}^{63}\text{Cu})_{\text{ech}}$$

Nous obtenons donc :

$${}^{65}\text{Cu}_{\text{xs}} = {}^{63}\text{Cu}_{\text{ech}} * R_{\text{ech}} - {}^{63}\text{Cu}_{\text{ech}} * R_{\text{std}}$$

$${}^{65}\text{Cu}_{\text{xs}} = (R_{\text{ech}} - R_{\text{std}}) \times {}^{63}\text{Cu}_{\text{ech}}$$

$$\text{Avec } \text{Cu}_t = {}^{65}\text{Cu}_{\text{ech}} + {}^{63}\text{Cu}_{\text{ech}} \text{ et } {}^{65}\text{Cu}_{\text{ech}} = {}^{63}\text{Cu}_{\text{ech}} * R_{\text{ech}}$$

$$\text{Nous obtenons } {}^{63}\text{Cu}_{\text{ech}} = \text{Cu}_t / (R_{\text{ech}} + 1)$$

Et finalement

$${}^{65}\text{Cu}_{\text{xs}} = (R_{\text{ech}} - R_{\text{std}}) / (R_{\text{ech}} + 1) \times \text{Cu}_t$$

#### 4.2.1.3 Modification de la composition isotopique en Cu du foie et des fèces chez la souris *Atp7b*<sup>-/-</sup> après administration de <sup>65</sup>Cu

Afin de vérifier qu'une injection de <sup>65</sup>Cu, suivie du traitement par Chel2, entraîne bien une modification de la composition isotopique du foie et des fèces de souris *Atp7b*<sup>-/-</sup>, l'expérience suivante a été réalisée :

Un groupe de 7 souris *Atp7b*<sup>-/-</sup> a reçu une alimentation appauvrie en Cu pendant 5 semaines avant l'expérience et est divisé en 2 sous-groupes :

- Le premier sous-groupe comprenant 2 souris (1 mâle et 1 femelle) âgées de 12 semaines n'a pas reçu de <sup>65</sup>Cu et servira de contrôle.
- Le deuxième sous-groupe comprenant 5 souris (3 mâles et 2 femelles), dont 3 sont âgées de 12 semaines et 2 sont âgées de 8 semaines. Ces souris pesant entre 20 et 26 g ont reçu par intraveineuse une injection de 70 µL d'une solution pour perfusion avec <sup>65</sup>Cu à 10 µg.mL<sup>-1</sup> soit une quantité de <sup>65</sup>Cu de 700 ng. Après un traitement sur 2 jours par Chel2, les souris sont

placées en cage à métabolisme pour une durée de 24 h afin de récolter leurs fèces et urines. Enfin elles sont euthanasiées et leur foie est prélevé. Les mesures de concentrations et de compositions isotopiques du cuivre sont effectuées, les résultats sont présentés dans le tableau 11.

n°ech	traitement	masse fèces en g	Cu <sub>T</sub> en ng	R <sub>ech</sub>	<sup>65</sup> Cu en ng	<sup>63</sup> Cu en ng	R <sub>std</sub>	<sup>65</sup> Cu <sub>XS</sub>	<sup>65</sup> Cu <sub>XS</sub> / masse fèces
fèces 577	<sup>65</sup> Cu + Chel2	0.2482	3954	0.4488	1225	2729	0.4474	3.93	15.84
fèces 578	<sup>65</sup> Cu + Chel2	0.3045	5524	0.4492	1712	3812	0.4474	6.84	22.46
fèces 579	<sup>65</sup> Cu + Chel2	0.1933	3841	0.4488	1190	2651	0.4474	3.82	19.78
fèces 580	<sup>65</sup> Cu + Chel2	0.1261	1094	0.4493	339	755	0.4474	1.45	11.46
fèces 581	<sup>65</sup> Cu + Chel2	0.2503	4427	0.4490	1371	3055	0.4474	4.88	19.50
fèces 582	contrôle	0.3225	3648	0.4473	1127	2520	0.4474	-0.07	-0.23
fèces 583	contrôle	0.2513	3784	0.4473	1169	2615	0.4474	-0.19	-0.77

n°ech	traitement	masse foie en g	Cu <sub>T</sub> en ng	R <sub>ech</sub>	<sup>65</sup> Cu en ng	<sup>63</sup> Cu en ng	R <sub>std</sub>	<sup>65</sup> Cu <sub>XS</sub>	<sup>65</sup> Cu <sub>XS</sub> / masse foie
foie 577	<sup>65</sup> Cu + Chel2	1.5547	224102	0.4523	69792	154309	0.4474	757	487
foie 578	<sup>65</sup> Cu + Chel2	1.4452	272356	0.4519	84765	187590	0.4474	837	579
foie 579	<sup>65</sup> Cu + Chel2	1.3337	68807	0.4615	21727	47079	0.4475	659	494
foie 580	<sup>65</sup> Cu + Chel2	1.1113	81042	0.4606	25557	55485	0.4474	733	660
foie 581	<sup>65</sup> Cu + Chel2	1.3861	45478	0.4706	14553	30925	0.4474	717	517
foie 582	contrôle	1.0876	59544	0.4472	18399	41144	0.4474	-7.5	-6.9
foie 583	contrôle	1.5485	60050	0.4472	18555	41495	0.4474	-8.7	-5.6

Tableau 11 : mesure des concentrations et des rapports isotopiques du cuivre et calcul de l'excès de <sup>65</sup>Cu.

Les résultats montrent qu'après une injection d'environ 700 ng de <sup>65</sup>Cu puis un traitement par Chel2, les foies des souris présentent un excès de <sup>65</sup>Cu à hauteur de 550 ng.g<sup>-1</sup>. Les fèces présentent elles aussi un excès de <sup>65</sup>Cu de 11 à 22 ng.g<sup>-1</sup>. Concernant les contrôles, aucun excès de <sup>65</sup>Cu n'est identifié. Ici, le traitement par Chel2 a été suivi pendant 2 jours ; pour l'étude suivante une quantité plus importante de <sup>65</sup>Cu (de 1 à 1.5 µg selon le poids de la souris) et un traitement plus long (sur 2 semaines) ont été réalisés.

## 4.2.2 Mise en évidence du flux de Cu chez les souris

### *Atp7b*<sup>-/-</sup> traitées par Chel2

Chel2 est un chélateur ciblant le Cu (I) du foie et favorisant la chélation intracellulaire du Cu. Je montrerai ici que l'excrétion du Cu dans les fèces est augmentée chez les souris *Atp7b*<sup>-/-</sup> recevant une injection de Chel2 par voie intraveineuse ou sous-cutanée. Ceci a permis de confirmer le mécanisme d'excrétion du cuivre via la bile dans le modèle murin de la maladie de Wilson.

#### 4.2.2.1 Descriptif des expérimentations

Afin de mettre en évidence le flux de cuivre induit par Chel2 chez les souris *Atp7b*<sup>-/-</sup>, des souris males et femelles âgées de 9 à 18 semaines ont d'abord reçu une alimentation appauvrie en cuivre contenant seulement 0,367 mg/kg (C1041 Altromin). Cette alimentation a été administrée le temps nécessaire pour stabiliser le contenu en cuivre dans les fèces, c'est à dire pendant environ 5 semaines.

Les souris ont été divisées en 4 groupes :

- Le premier groupe de 8 souris *Atp7b*<sup>-/-</sup> a reçu une injection d'environ 1,5 µg de <sup>65</sup>Cu par voie intraveineuse à J-4 puis les souris ont été traitées par Chel2 en intraveineuse à partir de J0. Chel2 a été administré une fois par jour de J0 à J3 et de J7 à J10. Les souris seront placées en cage à métabolisme pendant 24 h afin de récolter leurs fèces suivant le schéma représenté dans le tableau 12. Puis les foies ont été récoltés au sacrifice à J11, les souris ont alors 16 semaines.
- Le deuxième groupe de 8 souris *Atp7b*<sup>-/-</sup> a reçu une injection d'environ 1,5 µg de <sup>65</sup>Cu par voie intraveineuse à J-4 puis les souris ont été traitées par Chel2 par voie sous-cutanée à partir de J0. Chel2 a été administré une fois par jour de J0 à J3. Les souris seront placées en cage à métabolisme pendant 24 h afin de récolter leurs fèces suivant le schéma représenté dans le tableau 13. Puis les foies ont été récoltés au sacrifice à J4, les souris ont alors 17 à 19 semaines.
- Le troisième groupe de 4 souris a reçu une injection de 1,5 µg de <sup>65</sup>Cu par voie intraveineuse à J-4 puis les souris n'ont pas été traitées par Chel2 mais ont reçu une injection de NaCl 0,9 % une fois par jour de J0 à J3.
- Le quatrième groupe de 4 souris n'a pas reçu d'injection de <sup>65</sup>Cu mais une injection du véhicule seul (solution NaHCO<sub>3</sub> à 1,4 %) à J-4, puis les souris ont été traitées par Chel2 par voie intraveineuse une fois par jour de J0 à J3. Ce groupe servira de contrôle.

Les souris de ces deux derniers groupes seront placées en cage à métabolisme pendant 24 h afin de récolter leurs fèces suivant le schéma représenté dans le tableau 14. Puis les foies ont été récoltés au sacrifice à J4, les souris ont alors 10 semaines.

*	collecte fèces
	injection de $^{65}\text{Cu}$ par intraveineuse
	injection de Chel2 par intraveineuse

Souris \ Jour	J-5	J-4	J-3	J-2	J-1	J0	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	
	F24	*		*				*		*					*		*	
F25	*		*				*		*					*		*		
M28	*		*				*		*					*		*		
M29	*		*				*		*					*		*		
F26	*		*						*		*				*		*	
F27	*		*						*		*				*		*	
M30	*		*		décès													
M31	*		*						*		*					*		*

Tableau 12 : Représentation schématique de l'expérimentation avec injection de Chel2 par voie intraveineuse

*	collecte fèces
	injection de $^{65}\text{Cu}$ par intraveineuse
	injection de Chel2 par voie sous-cutanée

Souris \ Jour	J-5	J-4	J-3	J-2	J-1	J0	J1	J2	J3	J4
	F32	*		*				*		*
F33	*		*				*		*	
F46	*		*				*		*	
F47	*		*				*		*	
F34	*		*						*	*
F35	*		*						*	*
F48	*		*						*	*
F49	*		*						*	*

Tableau 13 : Représentation schématique de l'expérimentation avec injection de Chel2 par voie sous-cutanée

*	collecte fèces
	injection de $^{65}\text{Cu}$ par intraveineuse
	injection de tampon pH par intraveineuse
	injection de Chel2 par intraveineuse
	injection de NaCl 0,9% par intraveineuse

Souris \ Jour	Jour									
	J-4	J-3	J-2	J-1	J0	J1	J2	J3	J4	
F215		*				*		*		
F217		*				*		*		
F218		*					*		*	
M222		*					*		*	
F219		*				*		*		
M223		*				*		*		
F220		*					*		*	
M224		*					*		*	

Tableau 14 : Représentation schématique de l'expérimentation avec et sans injection de  $^{65}\text{Cu}$  et avec et sans injection de Chel2.

#### 4.2.2.2 Article « A liver-targeting Cu(I) chelator relocates Cu in hepatocytes and promotes Cu excretion in a murine model of Wilson's disease »

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article ci-après et montrent que Chel2 injecté par voie intraveineuse ou sous-cutanée à des souris Wilson augmente l'excrétion du Cu dans les fèces. Confirmant ainsi sur un modèle animal le mécanisme d'action de Chel2 mis en évidence dans des cellules hépatiques (WIF-B9) reconstituant un épithélium polarisé avec canalicules biliaires fonctionnels. La distribution intracellulaire des ions a été étudiée par nano fluorescence X à l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) à Grenoble. Le chélateur lié au Cu(I) a été trouvé dans des vésicules potentiellement excrétées dans les canalicules biliaires permettant de proposer le mécanisme d'action de Chel2.

Les informations supplémentaires de cet article sont en annexe 4.






 Cite this: *Metallomics*, 2020, 12, 1000

## A liver-targeting Cu(I) chelator relocates Cu in hepatocytes and promotes Cu excretion in a murine model of Wilson's disease†

 Marie Monestier,<sup>ab</sup> Anaïs M. Pujol,<sup>ab</sup> Aline Lamboux,<sup>c</sup> Martine Cuillel,<sup>a</sup> Isabelle Pignot-Paintrand,<sup>d</sup> Doris Cassio,<sup>e</sup> Peggy Charbonnier,<sup>a</sup> Khémaly Um,<sup>a</sup> Amélie Harel,<sup>a</sup> Sylvain Bohic,<sup>id f</sup> Christelle Gateau,<sup>id D</sup> Vincent Balter,<sup>id C</sup> Virginie Brun,<sup>id G</sup> Pascale Delangle<sup>id \*b</sup> and Elisabeth Mintz<sup>\*a</sup>

Copper chelation is the most commonly used therapeutic strategy nowadays to treat Wilson's disease, a genetic disorder primarily inducing a pathological accumulation of Cu in the liver. The mechanism of action of Chel2, a liver-targeting Cu(I) chelator known to promote intracellular Cu chelation, was studied in hepatic cells that reconstitute polarized epithelia with functional bile canaliculi, reminiscent of the excretion pathway in the liver. The interplay between Chel2 and Cu localization in these cells was demonstrated through confocal microscopy using a fluorescent derivative and nano X-ray fluorescence. The Cu(I) bound chelator was found in vesicles potentially excreted in the canaliculi. Moreover, injection of Chel2 either intravenously or subcutaneously to a murine model of Wilson's disease increased excretion of Cu in the faeces, confirming *in vivo* biliary excretion. Therefore, Chel2 turns out to be a possible means to collect and excrete hepatic Cu in the faeces, hence restoring the physiological pathway.

 Received 18th March 2020,  
Accepted 5th May 2020

DOI: 10.1039/d0mt00069h

[rsc.li/metallomics](http://rsc.li/metallomics)

### Significance to metallomics

Ionic copper (Cu) is both essential and toxic for any living organism. Vertebrates get rid of excess copper in their liver by transferring it from hepatocytes to the bile. Wilson's disease (WD) is a genetic disorder impairing this mechanism, thus leading patients to lifelong Cu chelation treatments. Because Cu primarily accumulates in the liver, we designed an hepatocyte-targeting molecule embedding a high affinity Cu(I)-chelator that is released in hepatocytes. Here, we elucidate the mechanism of action of this molecule at the cellular level and confirm that the liver-targeting chelator restores Cu excretion into the bile in WD mice.

## Introduction

A possible involvement of metal ions has been brought to the forefront in many neurodegenerative diseases without knowing whether the abnormal presence of metal ions is the cause or a

consequence of the disease, for instance in Alzheimer's disease.<sup>1</sup> In some cases however, when the homeostasis of an essential metal ion is disrupted by a genetic defect, the excess of the given metal is known to be responsible for the disease; this is the case for iron in hemochromatosis and aceruloplasminemia, manganese in hypermanganesemia or copper in Wilson's disease.<sup>2</sup> Systemic metal chelation is the usual therapy for most of these diseases, in order to lower the dietary absorption of the metal ions and, hopefully, to deplete the excess stores by excreting the metal ions, often in urine. One striking observation is that these diseases promote a high increase in the liver content of the metal with disrupted homeostasis. Some metal ions also promote neurological symptoms with abnormal magnetic resonance images of the brain.<sup>3</sup>

Wilson's disease is an autosomal recessive disease resulting from mutations of the *ATP7B* gene, whose product is a Cu(I)-transporting ATPase, a membrane protein that pumps copper

<sup>a</sup> Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IRIG, LCBM, F-38000 Grenoble, France

<sup>b</sup> Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IRIG, SyMMES, F-38000 Grenoble, France.  
E-mail: pascale.delangle@cea.fr

<sup>c</sup> Univ. Lyon, CNRS, ENS de Lyon, LGLTPE, F-69007 Lyon, France

<sup>d</sup> Univ. Grenoble Alpes, CNRS, Grenoble INP, LMGP, F-38000 Grenoble, France

<sup>e</sup> INSERM, Univ. Paris Sud, UMR U 1174, F-91405 Orsay, France

<sup>f</sup> Inserm, UA7, Synchrotron Radiation for Biomedicine (STROBE), 38000, Grenoble, France

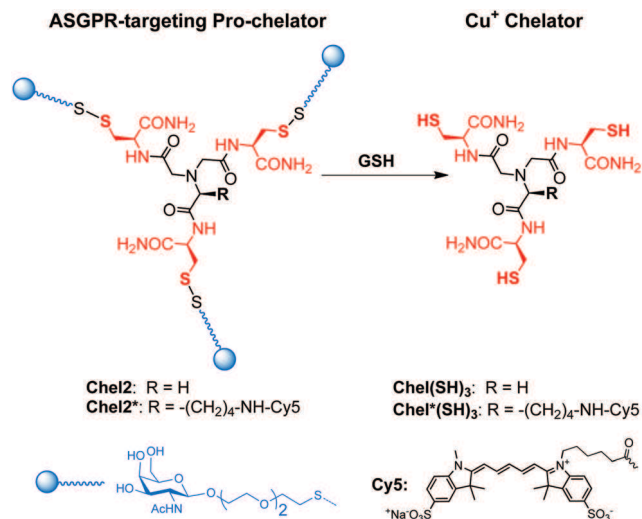
<sup>g</sup> Univ. Grenoble Alpes, CEA, INSERM, IRIG, BGE, F-38000 Grenoble, France

 † Electronic supplementary information (ESI) available: Detailed experimental section. Supplementary fluorescence images (Fig. S1–S3), nano XRF images (Fig. S4 and S5). Supplementary data for the <sup>65</sup>Cu experiments on mice (Fig. S6 and Table S1, S2)]. See DOI: 10.1039/d0mt00069h

out of the cytoplasm. Under normal conditions, the so-called Wilson protein is in the *trans*-Golgi network for dispensing copper to enzymes that use it as a co-factor. In case of excess copper in the cell, the Wilson protein changes its localization for pumping copper into intracellular vesicles that will eventually excrete it out of the cells.<sup>4</sup> The *ATP7B* gene is expressed mainly in the liver and the brain and to a lesser extent in kidney, lung, placenta, mammary gland and intestine.<sup>4,5</sup> Because vertebrates get rid of the excess copper by transferring it into the bile and then the faeces, the Wilson protein is responsible for the detoxification of the whole organism. Therefore, mutations in *ATP7B* gene primarily induce a pathological accumulation of copper in the liver.<sup>6,7</sup> Over the years, the liver undergoes fibrosis, cirrhosis and in some cases, acute hepatitis that requires a liver transplantation for the patient to survive. In addition, about 40% of the Wilson's disease patients develop neurological symptoms and 20%, psychiatric symptoms with no obvious signs of chronic liver disease. Among the patients with a neurological presentation, those who underwent a liver transplantation generally improved their condition. Their liver was loaded with copper, even though these patients did not necessarily exhibit typical signs of a liver condition.<sup>8–10</sup>

The heterogeneous clinical presentations and the late onset of the neurological signs make Wilson's disease difficult to diagnose from scratch, even though there is a clear MRI signature in the brain and many patients have a large copper overload at the time of diagnosis. The chelators prescribed all over the world are D-penicillamine and triethylenetetramine, two molecules that allow some copper removal of the body. Unfortunately, they also have adverse effects which preclude their use, in up to 30% of the patients in the case of D-penicillamine.<sup>11</sup> One major drawback of these molecules is that they are systemic and used at high dosage. They are only moderately specific for the excess copper stored in hepatocytes, especially when one has in mind the very high affinity and specificity found in proteins devoted to copper homeostasis.<sup>12</sup>

Given these observations, we have developed in the past decade bio-inspired chelators mimicking the Cu(I) binding sites from two cysteine-rich proteins involved in copper homeostasis.<sup>12,13</sup> One chelator mimics a metallochaperone binding site with a CuS<sub>2</sub> coordination<sup>14</sup> and the other one mimics a metallothionein binding site with a CuS<sub>3</sub> coordination.<sup>15,16</sup> To protect the Cu(I) binding sites until they reach their target, the chelator's thiol functions have been oxidized into disulphide bonds, so that Cu(I) chelation would be activated only once inside the cells. Indeed, intracellular glutathione is millimolar and ensures the reduction of the disulphide bonds.<sup>14,17</sup> Finally, because Wilson's disease starts in the hepatocytes, the so-designed pro-chelators were grafted with ligands that specifically recognize the asialoglycoprotein receptors (ASGPR) at the hepatocyte sinusoidal membrane.<sup>18</sup> The design and the efficiency of the final molecules, *i.e.* the hepatocyte targeting pro-chelators, have been described earlier.<sup>19</sup> These studies, performed on hepatocyte-derived cell lines, show that both ASGPR-targeting pro-chelators release an efficient Cu chelator inside the cells, suggesting these compounds were models for the development of new hepatocyte- and Cu(I)-specific



Scheme 1 Structures of the glycoconjugates Chel2 and Chel2\* and the released chelators Chel(SH)<sub>3</sub> and Chel\*(SH)<sub>3</sub>.

chelators. However, the intracellular mechanism of action of the chelators and the fate of the Cu(I) chelator complexes are still to be determined.

The work reported here aims at understanding the mechanism of action of Chel2 (Scheme 1), the hepatocyte-directed pro-chelator releasing a trithiolate chelator in the cells.<sup>17</sup>

We first studied Chel2 mechanism of action in WIF-B9 cells reconstituting a polarized epithelium. We report on the trafficking of Chel2\*, a sulphocyanin5 labelled version of Chel2 and on the effects of Chel2 on the intracellular distribution of metal ions, following their X-ray fluorescence at the sub-micron scale (nano XRF) thanks to the ESRF synchrotron beam in Grenoble. Based on these studies, we propose a mechanism of action for the pro-chelator which would result in the transfer of the Cu(I)-chelator complex into the bile. This mechanism was further tested on *ATP7b*<sup>-/-</sup> mice, an animal model of Wilson's disease which develops the hepatic form of the disease.<sup>20</sup> To this end, *ATP7b*<sup>-/-</sup> mice were administrated <sup>65</sup>Cu which accumulated in their liver. We found that a treatment with Chel2 increased the <sup>65</sup>Cu content of the mice faeces, in agreement with partial restoration of the physiological pathway for Cu excretion through the bile.

## Results

Chel2 has been shown to release in WIF-B9 cells the high affinity Cu(I) chelator, Chel(SH)<sub>3</sub> (Scheme 1).<sup>17</sup> The latter is a tripodal sulphur chelator based on a nitrilotriacetic core grafted with three cysteine moieties that chelate Cu(I) with properties reminiscent of metallothioneins. The complex, denoted ChelS<sub>3</sub>Cu, exhibits a CuS<sub>3</sub> coordination and an affinity constant as large as 10<sup>19</sup>.<sup>16,21</sup> In the hepatocyte-targeting pro-chelator Chel2, the three thiol functions are hidden in disulphide bridges carrying the targeting units, namely three polyethylene glycol chains grafted with *N*-acetyl galactosamine

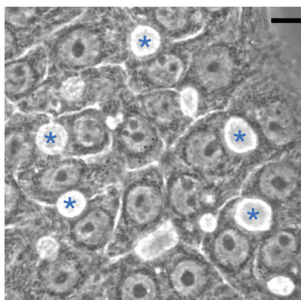


Fig. 1 Phase contrast image of living WIF-B9 cells forming bile canaliculi (phase lucent structures \*), scale bar 10  $\mu\text{m}$ .

moieties to get an architecture perfectly adapted for the interaction with the ASGPR.<sup>19</sup>

The hepatocyte-derived WIF-B9 cells are able to reconstitute remarkably stable and polarized epithelia with functional bile canaliculi, indicated by asterisks in Fig. 1.<sup>22</sup>

WIF-B9 cells provide a means to follow the detoxification function of the Wilson protein in case of excess copper. Indeed, the latter protein, localized at the *trans*-Golgi network membrane under normal conditions, migrates to the canalicular membrane in case of excess copper.<sup>23</sup> Hence, the localization of the Wilson protein, as detected by immunofluorescence, can be used to evaluate whether the intracellular Cu concentration is normal or in excess.<sup>23</sup> Under conditions where ATP7B co-localized with an apical membrane marker (*i.e.* the WIF-B9 canalicular membrane), addition of Chel2 into the culture medium actually suppressed the need for detoxification, as illustrated by the re-localization of ATP7B back to the *trans*-Golgi network.<sup>14,17</sup> These experiments demonstrate that the ASGPR-targeting pro-chelators are indeed doing what they were designed for, namely intracellular copper chelation. While performing these experiments, we found that 1  $\mu\text{M}$  copper added to the WIF-B9 culture medium for 2 h is enough to induce the change in the ATP7B localization. Therefore, we could avoid the high concentrations used in previous studies on the localization of the ATP7B protein in WIF-B9 cells and other cell lines such as HepG2, HuH-7, CHO or HEK, where 20 to 200  $\mu\text{M}$  Cu was used.<sup>23–27</sup> In the experiments reported hereafter, added Cu was either 1 or 15  $\mu\text{M}$ . They were designed to study the localization of the Cu(I) chelator in hepatic cells and its effect on intracellular Cu distribution.

#### Chel2\* localization in WIF-B9 cells

Endogenous asialoglycoproteins such as asialo-ceruloplasmin, -fetuin or -orosomucoid, are known to be cleared from the circulation after binding to ASGPR,<sup>28</sup> a receptor of the hepatocyte sinusoidal membrane. In the rat liver, half a million ligand-binding sites per cell allow asialoglycoprotein–ASGPR complexes to undergo endocytosis.<sup>29,30</sup> Internalization is rapid (4–5 min at 37 °C)<sup>31</sup> and followed by a separation of ASGPR-containing vesicles that are found at the Golgi complex and ligand-containing vesicles that prefigure lysosomes.<sup>32–34</sup> The receptor is recycled by returning to the sinusoidal membrane, whereas the majority of the asialoglycoproteins is degraded in

lysosomes. Yet, 1–4% of the asialoglycoproteins is kept intact and secreted into the bile across the canalicular membrane, a phenomenon called transcytosis that primarily depends on the protein.<sup>31,35,36</sup>

To get further insights into the fate of Chel2, we designed Chel2\*, an analogue compound bearing a red fluorescent tag.<sup>19</sup> In Chel2\* the sulphocyanin5 red fluorescent tag is tethered to the nitrilotriacetic acid scaffold through an amide bond.<sup>19</sup> When the disulphide bridges are cleaved by the reducing medium of the cell, namely glutathione, the red-fluorescent tag is still attached to the released chelator Chel\*(SH)<sub>3</sub> (see Scheme 1). Because we do not know exactly at which stage the chelator is released, the red fluorescence in confocal microscopy was assigned either to the whole molecule (Chel2\*), the free chelator Chel\*(SH)<sub>3</sub> or to the copper–chelator complex Chel\*S<sub>3</sub>Cu, depending on the redox state of the molecule and the presence of Cu.

After 2 h of incubation with 1  $\mu\text{M}$  Cu, 1  $\mu\text{M}$  Chel2\* was added to the culture medium for 30 min, 1 h or 2 h. Various compartments identified during endocytosis were marked by green fluorescence and co-localization was analysed on confocal laser scanning microscopy images, assigning a yellow colour to the co-localization pixels (Fig. 2). The images shown in Fig. 2 were chosen among about 40 images analysed for Chel2\* localization in various organelles. Additional images are shown in Fig. S1 in the ESI.† After 30 min (Fig. 2A), Chel2\* was found in early endosomes (EEA1), close to the nuclei and in late endosomes or lysosomes (Lamp1), close to the bile canaliculi, but not in the *trans*-Golgi network (P58K). The latter finding confirms that Chel2\* and ASGPR were segregated at that time.<sup>37</sup> There was still some co-localization with late endosomes after 1 h (Rab7, Fig. 2B), and with lysosomes/late endosomes after 2 h (LysoTracker™ and Lamp1, Fig. 2C).

A remarkable feature of Chel2\* is that we did not observe a uniform distribution of red fluorescence in the cytosol. The red fluorescence always appeared as spots of about 200 nm, suggesting it was trapped in vesicles on the endocytosis/transcytosis pathway.

#### Chel2\* reaches bile canaliculi

At this point, special attention was paid to the search for Chel2\* in the canaliculi after 30 min to 3 h. To this end, we looked for canaliculi surrounded by Chel2\* and analysed the fluorescence intensity profile across these canaliculi. Some images obtained at 1 and 3 h are shown in Fig. 3, where the canaliculus is defined thanks to the interferential profile in panels B and D. Details of the analysis leading to Fig. 3 are shown in Fig. S2 and images of other canaliculi are shown in Fig. S3, in the ESI.† After 1 h incubation, Chel2\* detected from the red fluorescence profile is found at the border of the canaliculus close to the cell apical membrane (Fig. 3A and B) and after 3 h incubation, Chel2\* is found in the middle of the canaliculus (Fig. 3C and D). This shows Chel2 can be transferred to the canaliculus.

#### Copper intracellular distribution by nano XRF

To get further insights into the fate of the chelator and the Cu(I)–chelator complexes, the WIF-B9 cells were analysed for



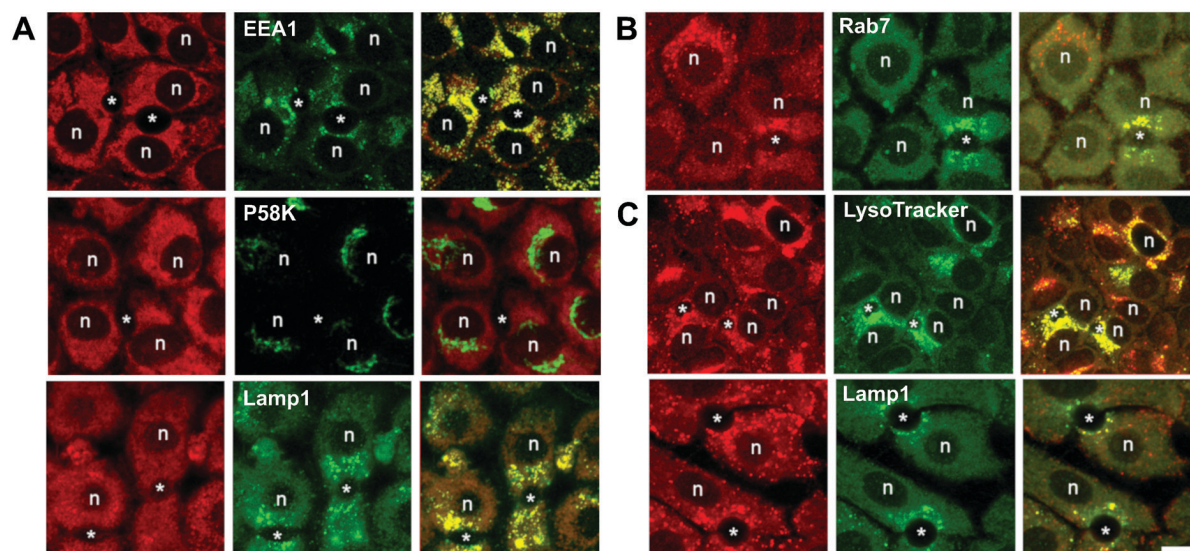


Fig. 2 Fluorescence images obtained by confocal microscopy of WIF-B9 epithelia forming canaliculi (\*) and incubated for 2 h with  $1 \mu\text{M}$  Cu and for (A) 30 min, (B) 1 h, (C) 2 h with  $1 \mu\text{M}$  Chel2\*. Left panels, red fluorescence of Chel2\*; middle panels, green immunofluorescence of various protein markers or fluorescence of LysoTracker™ added 2 h before Chel2\*; right panels, co-localization analysis, the yellow false colour is assigned to the co-localized pixels. EEA1: early endosomes, P58K: *trans*-Golgi network, LysoTracker™: lysosomes, Lamp1: late endosome/lysosome, Rab7: late endosomes. (n) nucleus, scale bar  $10 \mu\text{m}$ .

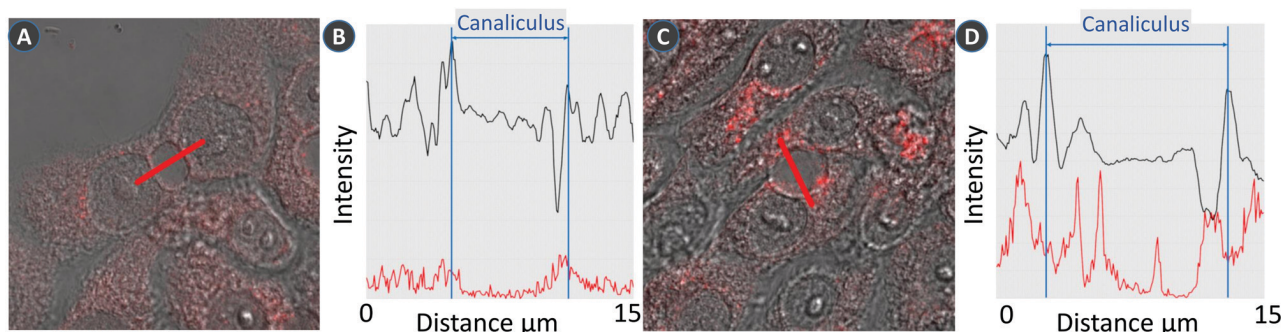


Fig. 3 Detailed analysis of Chel2\* position in the region of the canaliculus. Analysis from interferential contrast and fluorescence images obtained by confocal microscopy of WIF-B9 epithelia forming canaliculi and incubated with  $1 \mu\text{M}$  Chel2\* for (A and B) 1 h or (C and D) 3 h. (A and C) merged images of interferential contrast and red fluorescence. The canaliculi are crossed by a  $15 \mu\text{m}$  red line along which interferential contrast and fluorescence intensities are analysed. (B and D) interferential profiles in black and red fluorescence profiles along the line crossing the canaliculus.

their intracellular metal distribution, paying special attention to the bile canaliculi and the cytoplasmic region close to the canalicular membrane.

Nano XRF maps were performed on WIF-B9 cells forming a polarized epithelium and submitted to different conditions, starting with the basal culture medium, adding Cu for 2 h and then adding Chel2 for 3 h (Fig. 4). The nano XRF images shown in Fig. 4 are representative of the 2–5 canalicular regions scanned under each condition (Fig. S4 in the ESI<sup>†</sup>), bile canaliculi are indicated by asterisks. The P distribution covers the nuclei and the Zn distribution indicates the nuclei showing nucleoli as holes. Comparison with the phase image (Fig. 1) shows that the WIF-B9 organization and polarization were preserved by the sample preparation and the scans.

The image obtained under the basal conditions (Fig. 4A) shows two cells sharing a bile canaliculus and the Cu distribution is

homogeneous across the cytoplasm with only scarce hot spots. After 2 h in the presence of  $1 \mu\text{M}$  Cu, the Cu distribution shows a lot more hot spots in the three cells forming a canaliculus (Fig. 4B). Under the next condition, 5 h in  $1 \mu\text{M}$  Cu including  $50 \mu\text{M}$  Chel2 for the last 3 h, the Cu distribution appears concentrated along the apical membranes forming the canaliculus (Fig. 4C). All the scanned regions, whatever the condition, showed empty canaliculi, although their structure, and thus the cell organization, was preserved. The explanation for this observation was found by checking the distribution of abundant and loosely bound metal ions such as potassium or calcium. Actually, none of them was detectable, because the cryofixation step did permeabilize the cell membranes. Indeed, despite our efforts we did not succeed in finding a cryofixation method of WIF-B9 epithelia that would neither modify their membrane permeability nor break the canaliculi structure.

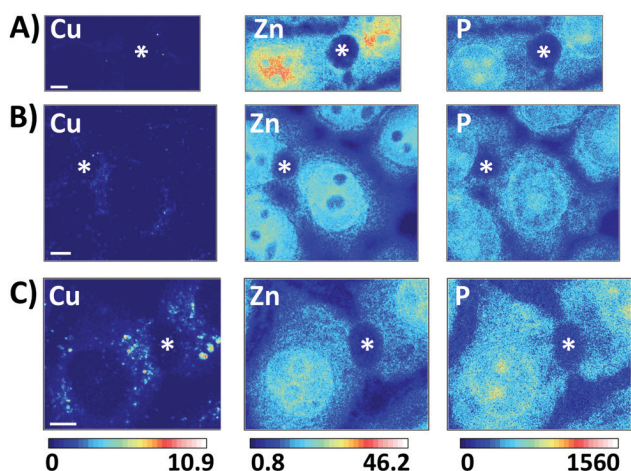


Fig. 4 Cell content analysed by nano XRF in WIF-B9 epithelia forming canaliculi under 3 different conditions: (A) basal conditions, (B) after 2 h with 1  $\mu\text{M}$  Cu and (C) after 2 h with 1  $\mu\text{M}$  Cu followed by addition of 50  $\mu\text{M}$  Chel2 for 3 h. Under each condition, the Cu, Zn and P maps are shown. Scale bar 5  $\mu\text{m}$ . The pixel size is 150  $\times$  150  $\text{nm}^2$ . Intensity scales are given in  $\text{ng cm}^{-2}$ .

The scans were next used to quantify the amount of Cu per surface unit. There was no significant change in whole scan Cu areal density (Fig. 5A) going from the basal conditions towards 1  $\mu\text{M}$  Cu for 2 h; however, a clear-cut increase was observed in the presence of 15  $\mu\text{M}$  Cu for 2 h ( $P = 0.002$ ). There was no further change in whole scan areal density when the cells were left for 3 more hours with 15  $\mu\text{M}$  Cu. Some nano XRF images acquired with 15  $\mu\text{M}$  Cu incubation are shown in Fig. S5 in the ESI.† These observations confirm that in the preparations, Cu homeostasis was active, the Wilson protein pumping Cu towards the bile canaliculus to protect the cell from extra Cu accumulation. A 50-fold excess of Chel2 in the presence of 1  $\mu\text{M}$  Cu induced a significant increase in whole scan areal density of Cu when compared to the basal conditions ( $P = 0.037$ ). Bearing in mind that under these conditions, the Wilson protein is back

at the *trans*-Golgi network as if the conditions were normal,<sup>17</sup> the extra Cu measured must be chelated or hidden from the intracellular medium. This shows that Chel2 has released the chelator in the cells ( $\text{Chel}(\text{SH})_3$ , Scheme 1) and that the latter efficiently binds the excess Cu, becoming  $\text{ChelS}_3\text{Cu}$  and thereby allowing more Cu to enter the cells from the culture medium.

The Cu areal density was also evaluated for regions of interest in the cells treated with 1  $\mu\text{M}$  Cu, the nucleus and the canaliculus vicinity, denoted 'at bc' for 'surrounding the bile canaliculus'. The latter was defined as a crown around the canalicular membrane that was counted separately from the rest of the cytoplasm. The 'at bc' area accounts for  $10.8 \pm 1.1\%$  of the cytoplasm area or  $5.8 \pm 0.4\%$  of the whole scan area (mean  $\pm$  SEM,  $n = 16$ ). Analysis of the Cu distribution in the cells (Fig. 5B) shows that only in the presence of Chel2, the 'at bc' area has an increased areal density, when compared to the basal condition ( $P = 0.037$ ). Interestingly, this demonstrates a Cu relocation around the canaliculi upon Chel2 treatment.

#### Faecal copper excretion in $\text{ATP7b}^{-/-}$ mice

Assuming that the relocation of Cu seen in the nano XRF experiments reflects Cu excretion in the bile canaliculi due to Chel2 transcytosis, we next designed an experiment on  $\text{ATP7b}^{-/-}$  mice to determine whether excess Cu could be found in their faeces after a treatment with Chel2. This section describes experiments performed on the  $\text{ATP7b}^{-/-}$  mice kindly provided by Professor Svetlana Lutsenko.<sup>20</sup>

Tracing Cu excretion is feasible using Cu stable isotopes measured by multi-collector inductively coupled plasma mass spectrometry (MC-ICPMS). The MC-ICPMS technique gives access to natural variations of the  $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$  ratio including biological samples such as cells, animal fluids and organs.<sup>38–40</sup>

Hence, we designed the following experiment. We reasoned that if the hepatic copper content could be enriched in  $^{65}\text{Cu}$  by injecting a  $^{65}\text{Cu}$  solution to the  $\text{Atp7b}^{-/-}$  mice, we could collect their faeces during the following days and find out whether any  $^{65}\text{Cu}$ -enrichment could be measured. Assuming that Chel2 can

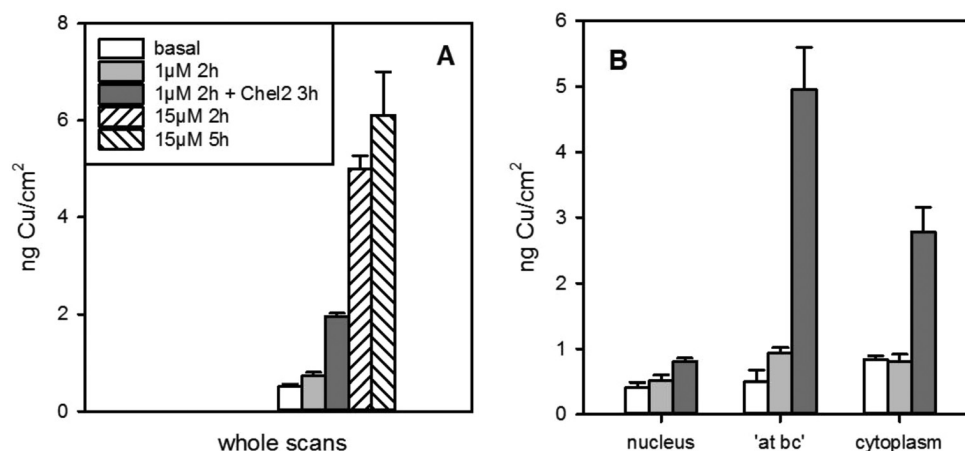


Fig. 5 Effects of Cu and Chel2 on the Cu areal density in WIF-B9 cells (mean and SE, standard error of the mean). In absence of Chel2, Cu was added to the culture medium at the concentration indicated in A. 50  $\mu\text{M}$  Chel2 was added 2 h after Cu and left for 3 h. (A) Cu areal density of the whole scans; (B) Cu areal densities in the 3 subcellular regions, as indicated.

restore Cu excretion through the bile, *i.e.* the physiological pathway, then treating the mice by injecting Chel2 after the  $^{65}\text{Cu}$  injection should induce an increase in the  $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$  ratio in the faeces. We first evaluated how much excess  $^{65}\text{Cu}$  could be found in the liver from  $Atp7b^{-/-}$  mice during the days following an intravenous (IV) injection of  $^{65}\text{Cu}$ . Preliminary experiments on 5  $Atp7b^{-/-}$  mice showed that after injecting  $\approx 700\text{ ng }^{65}\text{Cu}$ , their liver contained  $\approx 500\text{ ng}$  of excess  $^{65}\text{Cu}$  one or two days later. The 24 h-faeces collected in the meantime also contained excess  $^{65}\text{Cu}$  ( $11\text{--}22\text{ ng g}^{-1}$  faeces) accounting for less than 5% of that found in the liver ( $487\text{--}660\text{ ng g}^{-1}$  liver). Thanks to these results, we could envisaged to treat the mice with Chel2 for a week-long experiment.

Eight adult  $Atp7b^{-/-}$  mice received an IV injection of  $1\text{--}1.5\text{ }\mu\text{g }^{65}\text{Cu}$  at day  $-4$  and from day 0 on, 8 IV injections of Chel2 ( $30\text{ mg kg}^{-1}$ , once a day for 4 days in a row, repeated the following week), as described in the upper panel of Fig. 6. The experiment was stopped on day 11. Another eight adult  $Atp7b^{-/-}$  mice received Chel2 by subcutaneous (SC) injection instead of the IV route. The latter series lasted only one week and was stopped at day 4. Two other groups of 4  $Atp7b^{-/-}$  mice were treated for control experiments that were stopped at day 4. They received either one dose of  $^{65}\text{Cu}$  at day  $-4$  and 4 injections of buffer instead of Chel2, or one injection of vehicle at day  $-4$  and 4 injections of Chel2. The faeces of all mice were collected every other day during treatment and at euthanasia, their liver was removed for analysis.

The excess of  $^{65}\text{Cu}$ , denoted  $^{65}\text{Cu}_{\text{xs}}$  from now on, reflects in all samples the effect of the  $^{65}\text{Cu}$  spike on the isotopic Cu

distribution. It is calculated by the difference between  $^{65}\text{Cu}_{\text{spl}}$ , the  $^{65}\text{Cu}$  amount measured in the sample and the natural  $^{65}\text{Cu}$  amount in the sample. The latter is calculated from  $^{63}\text{Cu}_{\text{spl}}$ , the  $^{63}\text{Cu}$  amount measured in the sample and  $r_{\text{ref}}$ , the natural  $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$  ratio measured in the isotopic standard NIST SRM 976 solution that always brackets the samples during the analysis.

Denoting  $r_{\text{ref}} = ^{65}\text{Cu}_{\text{ref}}/^{63}\text{Cu}_{\text{ref}}$  and  $r_{\text{spl}} = ^{65}\text{Cu}_{\text{spl}}/^{63}\text{Cu}_{\text{spl}}$ , the isotopic ratio measured in the reference solution and the sample, respectively and designating by  $\text{Cu}_t = ^{65}\text{Cu}_{\text{spl}} + ^{63}\text{Cu}_{\text{spl}}$ , the total Cu measured in the sample,  $^{65}\text{Cu}_{\text{xs}}$  is calculated as follows:

$$^{65}\text{Cu}_{\text{xs}} = (r_{\text{spl}} - r_{\text{ref}}) \times ^{63}\text{Cu}_{\text{spl}},$$

$$\text{with } ^{63}\text{Cu}_{\text{spl}} \times (r_{\text{spl}} + 1) = \text{Cu}_t,$$

$$\text{and finally } ^{65}\text{Cu}_{\text{xs}} = (r_{\text{spl}} - r_{\text{ref}})/(r_{\text{spl}} + 1) \times \text{Cu}_t$$

The results are then expressed per unit of wet weight, ranging from 5 to  $117\text{ ng g}^{-1}$  for the faeces and from 0.1 to  $1.4\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$  for the liver. In the control experiment where the mice did not receive  $^{65}\text{Cu}$ , the faeces collected after Chel2 treatment contained  $0.2 \pm 0.3\text{ ng g}^{-1}$  excess  $^{65}\text{Cu}$  (mean  $\pm$  SEM,  $n = 8$ ) and the 4 livers,  $-0.012 \pm 0.001\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$  excess  $^{65}\text{Cu}$  (mean  $\pm$  SEM,  $n = 4$ ), showing that  $r_{\text{spl}}$  was not changed by the Chel2 treatment. In the other experiments where  $^{65}\text{Cu}$  was injected to the mice on day  $-4$ , dividing  $^{65}\text{Cu}_{\text{xs}}$  obtained in the faeces by  $^{65}\text{Cu}_{\text{xs}}$  obtained in the liver allows to evaluate  $^{65}\text{Cu}_{\text{xsF}}$ , the fraction of hepatic  $^{65}\text{Cu}$  excreted in the faeces, independently of individual variability. All the data is shown in Fig. 6 in permil.

Before any treatment, *i.e.* during the 24 h-period following the  $^{65}\text{Cu}$  injection, excess of  $^{65}\text{Cu}$  was evidenced in the faeces (see  $^{65}\text{Cu}_{\text{xsF}}$  at day  $-3$  in Fig. 6). In the mock group, where only the vehicle was injected for 4 days in a row, there was almost no more excess of  $^{65}\text{Cu}$  in each 24 h-faeces sample and  $^{65}\text{Cu}_{\text{xsF}}$  value was around 15%. Bearing in mind that these mice cannot excrete Cu from their liver, the measured  $^{65}\text{Cu}_{\text{xsF}}$  value in the faeces at day  $-3$  suggests the existence of an excretion pathway for Cu from blood to faeces, crossing the intestinal epithelium. The existence of such a Cu-excretion pathway has not been documented up to now. As a secondary excretion pathway appearing in the  $Atp7b^{-/-}$  mice, it could also reflect the role of non-absorptive cells in the intestine.<sup>41</sup>

In the groups that received Chel2, either by IV- or by SC-injections, the fraction of hepatic  $^{65}\text{Cu}$  excreted in the faeces appeared higher than in the mock group. In a first attempt to interpret the effect of Chel2 on  $^{65}\text{Cu}_{\text{xsF}}$ , we pooled the data of each group on each day in Fig. S6 in the ESI,<sup>†</sup> which shows the mean and SEM ( $n = 2$  to 4). At first glance, the IV-treated mice excretion appeared stable for the two 4-day periods of treatment around 33%, twice as much as the mock group (15%). By contrast, the SC-treated animals excretion reached 45% at day 1 and tended to increase during the next days. Since we aimed at knowing whether Chel2 SC- or IV-treatment significantly increases the fraction of hepatic  $^{65}\text{Cu}$  excreted in the mice faeces, the data collected after treatment were pooled for each treatment and submitted to statistical analysis. The 3 groups were found statistically different by the nonparametric ANOVA

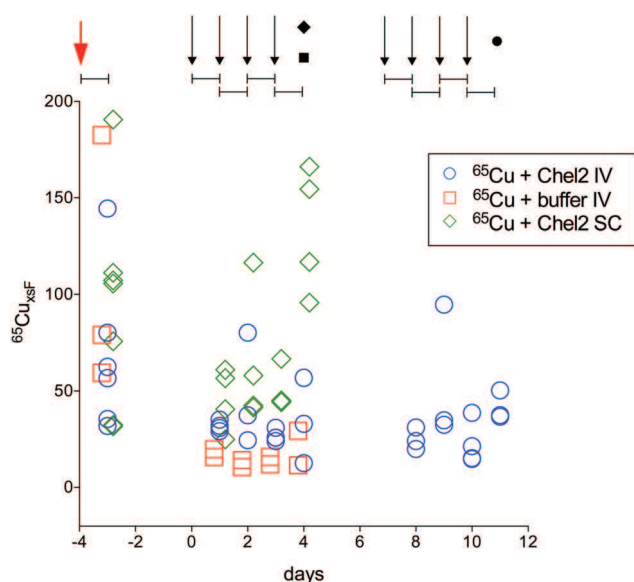


Fig. 6 Effect of Chel2 injections (starting at day 0, black arrows on top) on the fraction of hepatic  $^{65}\text{Cu}$  excreted in the faeces of mice ( $^{65}\text{Cu}_{\text{xsF}}$  in permil) following an IV injection of  $^{65}\text{Cu}$  at day  $-4$  (red arrow). (□) mock treatment: 4 mice received 4 IV injections of buffer from day 0 to day 4; (○) Chel2 IV-treatment: 7 mice received 8 IV injections of Chel2 ( $30\text{ mg kg}^{-1}$ ) from day 0 to day 10; (◇) Chel2 SC-treatment: 8 mice received 4 SC injections of Chel2 ( $50\text{ mg kg}^{-1}$ ) from day 0 to day 4. On top, segments figure the 24 h faeces collections and black symbols, euthanasia.



on ranks test. Pairwise comparisons show that both Chel2 treatments were statistically different from the mock treatment and that the SC-treatment was more efficient than the IV-treatment. All the data are listed in Table S1 and the statistical parameters are detailed in Table S2 in the ESI.† As a matter of fact, Chel2 is a highly hydrophilic compound, therefore expected to be rapidly cleared from the serum. Altogether, the IV injections were probably limiting the amount of Chel2 reaching the liver and crossing the hepatocytes. In contrast with the IV treatment, the SC injections were more effective in excreting excess  $^{65}\text{Cu}$  from the liver, suggesting a more progressive delivery of Chel2 to the liver.

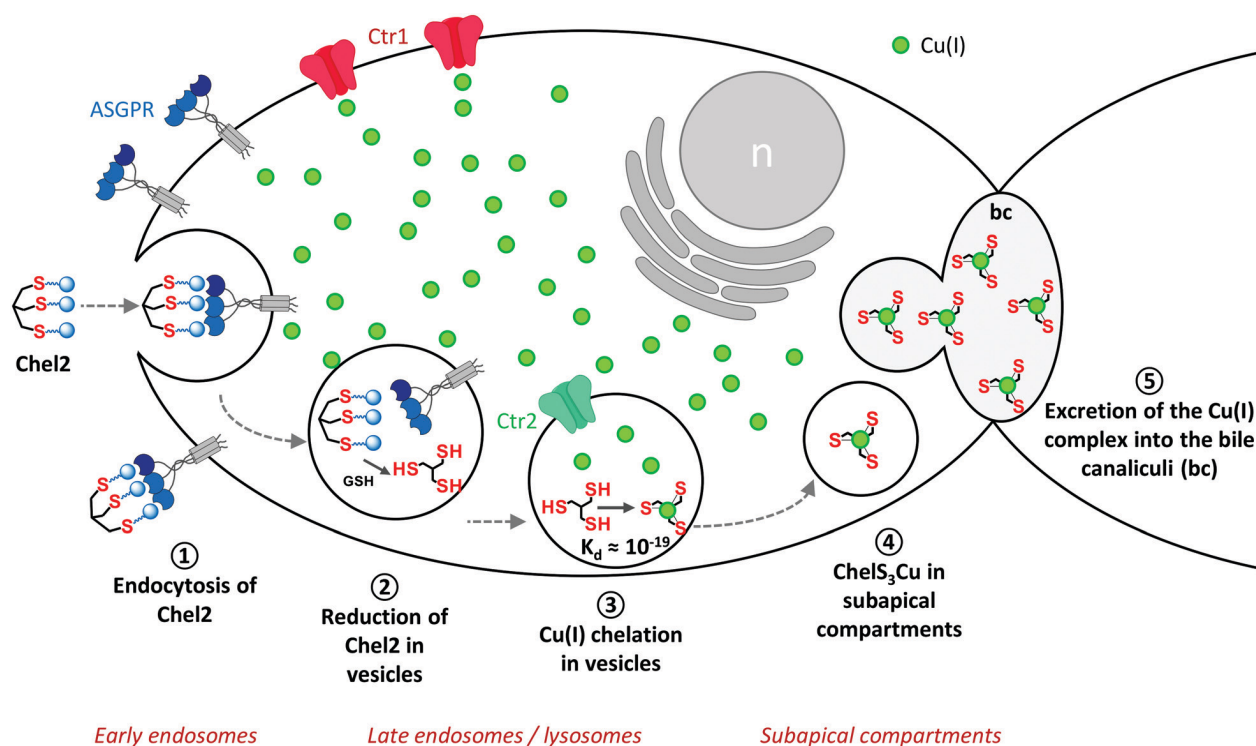
## Discussion

The mechanism of action of Chel2, the liver-targeting Cu(I) chelator, was studied in WIF-B9 cells that reconstitute polarized epithelia with functional bile canaliculi. The relationship between Chel2 and Cu localization and distribution in these cells could be inferred from fluorescence confocal microscopy using the fluorescent derivative Chel2\* and nano XRF, respectively.

For further discussion, we need to bear in mind that upon endocytosis in WIF-B9 cells, Chel2 releases Chel(SH)<sub>3</sub>, the high affinity Cu(I) chelator. This was shown before, following the effect of Chel2 addition to the culture medium in the presence of 1  $\mu\text{M}$  Cu on the Wilson protein localization and it provided the conditions used here for chelation (50  $\mu\text{M}$  Chel2 + 1  $\mu\text{M}$  Cu).<sup>17</sup> We can therefore expect the same for Chel2\* (1  $\mu\text{M}$  Chel2\* + 1  $\mu\text{M}$  Cu)

which will also release the high affinity chelator. Therefore, we assign to Chel\*(SH)<sub>3</sub> and Chel\*S<sub>3</sub>Cu(I) the red spots in Fig. 2 and 3.

Asialoglycoprotein endocytosis in polarized WIF-B9 cells has been previously studied and a remarkable feature is that the proteins pass through a subapical compartment that sorts them: some are sent to the lysosomes for degradation and others are sent to the apical membrane for transcytosis.<sup>42</sup> Using the same route with Chel2\* instead of a protein, however, shows that there is co-localization with lysosomes and that red vesicles also concentrate around the canaliculi (Fig. 2). This suggests that after reduction of Chel2\*, some Chel\*(SH)<sub>3</sub> and Chel\*S<sub>3</sub>Cu are trapped in non-lysosomal vesicles on their way to exocytosis. Indeed, red fluorescence is seen in the middle of the canaliculus after 3 h (Fig. 3). Interestingly enough, these subapical vesicles could also be the hot spots of Cu seen by XRF, which would be full of ChelS<sub>3</sub>Cu, under the chelation conditions (50  $\mu\text{M}$  Chel2, Fig. 4C). Going back to the effect of 1  $\mu\text{M}$  Cu for 2 h, we recall that under these conditions, ATP7B is found in the canalicular membrane, where it pumps Cu out of the cell, into the bile canaliculus.<sup>17</sup> According to Nyasae *et al.*<sup>43</sup> whose conclusions were derived from a similar polarized epithelium, we can assume ATP7B to have left the *trans*-Golgi network in vesicles and trafficked to the canalicular membrane *via* at first, basolateral endosomes and then, the subapical compartment. The same observation in Can-10 hepatic cells,<sup>44</sup> that are also able to reconstitute a polarized epithelium, suggests that in polarized hepatic cells, proteins undergoing transcytosis and proteins meant to reach the apical membrane



Scheme 2 Proposed mechanism for Chel2 fate in hepatic cells in the presence of Cu.



use the same route and there is no such a secretory pathway from the Golgi to the apical membrane. Therefore, we can assume that while being transported towards the canalicular membrane, ATP7B has pumped Cu inside the vesicles. Hence, the hot spots of Cu that are seen in the cytoplasm of the cells (Fig. 4B). In the presence of Chel2, endocytosis vesicles, that have a Cu transporter in their membrane,<sup>45</sup> are also able to accumulate Cu because Chel(SH)<sub>3</sub> binds Cu(I) inside the vesicles, hence creating a gradient for the Cu transporter. This will last until the normal “free” Cu concentration is reached, when ATP7B will return to the *trans*-Golgi network. At that time, the canalicular region will be full of subapical vesicles entrapping ChelS<sub>3</sub>Cu and ready for exocytosis. All these observations led us to propose the mechanism shown in Scheme 2 for Chel2 fate in hepatic cells and its relationship with intracellular copper chelation. It can be described as follows: ① Chel2 binds to ASGPR and enters the hepatocytes by basolateral or sinusoidal endocytosis, ② Chel(SH)<sub>3</sub>, the high affinity chelator, is released from Chel2 by reduction with GSH in these vesicles, ③ ChelS<sub>3</sub>Cu, the Cu(I) complex, is formed in sinusoidal endocytic vesicles, ④ some vesicles fuse with lysosomes, while others become the subapical compartment and ⑤ the latter spills its load into the canalicular lumen leading to Cu excretion into the bile canaliculi.

If this were the mechanism occurring in *ATP7b*<sup>-/-</sup> hepatocytes, then Chel2 would restore the pathway for Cu excretion out of the liver. Our study with *ATP7b*<sup>-/-</sup> mice following excess <sup>65</sup>Cu by MC-ICPMS supports this mechanism. Mice that received <sup>65</sup>Cu followed by Chel2 treatment showed a significant increase of the <sup>65</sup>Cu content in their faeces. This demonstrates increased Cu excretion after IV injections and even more efficiently after SC injections of Chel2 and most importantly excretion through the bile.

## Conclusions

In search of the mechanism of action of Chel2, the liver-targeting Cu(I) chelator, we observed in hepatocytes that among the Chel2 molecules that entered by endocytosis, some were localized in the lysosomes, whereas others were found in vesicles close to the canalicular membrane, most probably in subapical compartments, and finally in the canalicular lumen. Interestingly enough, hot spots of Cu were found surrounding the canaliculi in WIF-B9 cells, demonstrating that the chelator-containing vesicles were full of Cu. Because in polarized WIF-B9 cells, subapical compartments are known to fuse with the apical membrane, we assumed that the chelator released by Chel2 was expelled in the canalicular lumen together with Cu. Therefore, intracellular Cu chelation by the high affinity chelator released by Chel2 is expected to occur in vesicles along Chel2 transcytosis pathway, leading ultimately to Cu excretion into the bile canaliculi. Importantly, Chel2 injection either intravenously or subcutaneously to a murine model of Wilson's disease increased excretion of Cu in the faeces, confirming the biliary excretion mechanism at the animal level. As things

stand now, Chel2 turns to a possible means to collect and excrete hepatic Cu in the faeces, hence restoring the physiological pathway. It would be interesting to check this on bigger animals whose condition can be monitored daily, to envisage the use of Chel2 for patients who do not tolerate the current treatments of Wilson's disease.

## Author contributions

EM and PD designed and supervised the work. MM, AP and CG synthesized the molecules. MC, IPP, PC and DC optimized the cell experiments. SB, PD and EM performed the experiment at ESRF and SB performed the data quantitative analyses. KU, AH and VBr performed the animal studies. AL and VBa performed the <sup>65</sup>Cu MC-ICPMS analyses. The manuscript was written through contributions of all authors.

## Conflicts of interest

“There are no conflicts of interest to declare”.

## Acknowledgements

We thank Prof. Svetlana Lutsenko for providing the *ATP7b*<sup>-/-</sup> mice, Sandrine Miesch-Fremy for technical support with the experiments on mice, Dr Michel Ferrand for fruitful discussions on the project and Dr Michaud-Soret for critical reading of the manuscript. We acknowledge ESRF committees for providing synchrotron radiation beamtime (proposal MD-714) and all the ID22-NI beamline staff for help during the experiment. This research was supported by the French National Agency for Research in the framework of the “Investissements d'avenir” Program (ANR-15-IDEX-02), the Labex ARCANE (ANR-11-LABX-003), the CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003) and the grant “COPDETOX” (ANR-11-EMMA-025), the “Fondation pour la Recherche Médicale” (grant DCM20111223043), the “Programme transversal du CEA Technologies pour la santé” (WILCOP) and ADDMEDICA, the company that funded the experiments with <sup>65</sup>Cu on mice.

## Notes and references

- 1 D. Strausak, J. F. Mercer, H. H. Dieter, W. Stremmel and G. Multhaup, *Brain Res. Bull.*, 2001, **55**, 175.
- 2 A. Piperno, F. Bertola and A. Bentivegna, (2005, Feb 17) [Updated 2020 Jan 9]. Juvenile Hemochromatosis [Web page]. Barton, J.C.; Edwards, C.Q. (2000, Apr 3) [Updated 2018 Dec 6]. HFE Hemochromatosis [Web page]. De Gobbi, M.; Roetto, A. (2005, Aug 29) [Updated 2018 Feb 15]. TFR2-Related Hereditary Hemochromatosis [Web page]. Miyajima, H.; Hosoi, Y. (2003, Aug 12) [Updated 2018 Sep 27]. Aceruloplasminemia [Web page]. Tuschl, K.; Clayton, P.T.; Gospe, S.M. Jr *et al.* (2012, Aug 30) [Updated 2017 Feb 9]. Dystonia/Parkinsonism, Hypermanganesemia, Polycythemia and Chronic Liver Disease [Web page]. Weiss, K.H. (1999, Oct 22)

- [Updated 2016 Jul 29]. Wilson Disease [Web page]. All retrieved February 9, 2020 from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1116/>.
- 3 F. Woimant and J. M. Trocello, *Handb. Clin. Neurol.*, 2014, **120**, 851.
  - 4 S. Lutsenko, N. L. Barnes, M. Y. Bartee and O. Y. Dmitriev, *Physiol. Rev.*, 2007, **87**, 1011.
  - 5 K. H. Weiss, J. Wurz, D. Gotthardt, U. Merle, W. Stremmel and J. Fullekrug, *J. Anat.*, 2008, **213**, 232.
  - 6 J. M. Walshe, *Mov. Disord.*, 2006, **21**, 142.
  - 7 J. M. Walshe, *Mov. Disord.*, 2007, **22**, 2216.
  - 8 A. Stracciari, A. Tempestini, A. Borghi and M. Guarino, *Arch. Neurol.*, 2000, **57**, 384.
  - 9 O. Guillaud, J. Dumortier, R. Sobesky, D. Debray, P. Wolf, C. Vanlemmens, F. Durand, Y. Calmus, C. Duvoux, S. Dharancy, N. Kamar, K. Boudjema, P. H. Bernard, G. P. Pageaux, E. Salame, J. Gugenheim, A. Lachaux, D. Habes, S. Radenne, J. Hardwigsen, O. Chazouilleres, J. M. Trocello, F. Woimant, P. Ichai, S. Branchereau, O. Soubrane, D. Castaing, E. Jacquemin, D. Samuel and J. C. Duclos-Vallee, *J. Hepatol.*, 2014, **60**, 579.
  - 10 C. Laurencin, A. S. Brunet, J. Dumortier, L. Lion-Francois, S. Thobois, J. Y. Mabrut, R. Dubois, F. Woimant, A. Poujois, O. Guillaud, A. Lachaux and E. Broussolle, *Eur. Neurol.*, 2017, **77**, 5.
  - 11 K. H. Weiss, F. Thurik, D. N. Gotthardt, M. Schafer, U. Teufel, F. Wiegand, U. Merle, D. Ferenci-Foerster, A. Maieron, R. Stauber, H. Zoller, H. H. Schmidt, U. Reuner, H. Hefter, J. M. Trocello, R. H. Houwen, P. Ferenci, W. Stremmel and E. Consortium, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 2013, **11**, 1028.
  - 12 P. Delangle and E. Mintz, *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 6359.
  - 13 C. Gateau, E. Mintz and P. Delangle, in *Ligand Design in Medicinal Inorganic Chemistry* ed. T. Storr, Wiley-Blackwell, 2014, p. 287.
  - 14 A. M. Pujol, M. Cuillel, O. Renaudet, C. Lebrun, P. Charbonnier, D. Cassio, C. Gateau, P. Dumy, E. Mintz and P. Delangle, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 286.
  - 15 A. M. Pujol, C. Gateau, C. Lebrun and P. Delangle, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 6928.
  - 16 A. M. Pujol, C. Gateau, C. Lebrun and P. Delangle, *Chem. – Eur. J.*, 2011, **17**, 4418.
  - 17 A. M. Pujol, M. Cuillel, A.-S. Jullien, C. Lebrun, D. Cassio, E. Mintz, C. Gateau and P. Delangle, *Angew. Chem.*, 2012, **51**, 7445.
  - 18 G. Ashwell and J. Harford, *Annu. Rev. Biochem.*, 1982, **51**, 531.
  - 19 M. Monestier, P. Charbonnier, C. Gateau, M. Cuillel, F. Robert, C. Lebrun, E. Mintz, O. Renaudet and P. Delangle, *ChemBioChem*, 2016, **17**, 590.
  - 20 O. I. Buiakova, J. Xu, S. Lutsenko, S. Zeitlin, K. Das, S. Das, B. M. Ross, C. Mekios, I. H. Scheinberg and T. C. Gilliam, *Hum. Mol. Genet.*, 1999, **8**, 1665.
  - 21 A.-S. Jullien, C. Gateau, I. Kieffer, D. Testemale and P. Delangle, *Inorg. Chem.*, 2013, **52**, 9954.
  - 22 C. Decaens, P. Rodriguez, C. Bouchaud and D. Cassio, *J. Cell Sci.*, 1996, **109**(Pt 6), 1623.
  - 23 Y. Guo, L. Nyasae, L. T. Braiterman and A. L. Hubbard, *Am. J. Physiol.: Gastrointest. Liver Physiol.*, 2005, **289**, G904.
  - 24 H. Roelofsen, H. Wolters, M. J. Van Luyn, N. Miura, F. Kuipers and R. J. Vonk, *Gastroenterology*, 2000, **119**, 782.
  - 25 M. Harada, H. Kumemura, S. Sakisaka, S. Shishido, E. Taniguchi, T. Kawaguchi, S. Hanada, H. Koga, R. Kumashiro, T. Ueno, T. Sukanuma, K. Furuta, M. Namba, T. Sugiyama and M. Sata, *Int. J. Mol. Med.*, 2003, **11**, 293.
  - 26 D. Huster, M. Hoppert, S. Lutsenko, J. Zinke, C. Lehmann, J. Mossner, F. Berr and K. Caca, *Gastroenterology*, 2003, **124**, 335.
  - 27 M. A. Cater, J. Forbes, S. La Fontaine, D. Cox and J. F. Mercer, *Biochem. J.*, 2004, **380**, 805.
  - 28 H. J. Geuze, J. W. Slot, G. J. Strous, H. F. Lodish and A. L. Schwartz, *J. Cell Biol.*, 1982, **92**, 865.
  - 29 G. Gregoriadis, A. G. Morell, I. Sternlieb and I. H. Scheinberg, *J. Biol. Chem.*, 1970, **245**, 5833.
  - 30 P. A. Charlwood, E. Regoeczi and M. W. Hatton, *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, **585**, 61.
  - 31 H. Tolleshaug, *Int. J. Biochem.*, 1981, **13**, 45.
  - 32 T. Tanabe, W. E. Pricer, Jr. and G. Ashwell, *J. Biol. Chem.*, 1979, **254**, 1038.
  - 33 H. J. Geuze, J. W. Slot, G. J. Strous, H. F. Lodish and A. L. Schwartz, *Cell*, 1983, **32**, 277.
  - 34 S. C. Mueller and A. L. Hubbard, *J. Cell Biol.*, 1986, **102**, 932.
  - 35 P. Thomas and J. W. Summers, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1978, **80**, 335.
  - 36 T. M. Chang and C. H. Chang, *Biochim. Biophys. Acta*, 1989, **1014**, 229.
  - 37 P. P. Breitfeld, C. F. Simmons, Jr., G. J. Strous, H. J. Geuze and A. L. Schwartz, *Int. Rev. Cytol.*, 1985, **97**, 47.
  - 38 V. Balter, A. N. da Costa, V. P. Bondanese, K. Jaouen, A. Lamboux, S. Sangrajang, N. Vincent, F. Fourel, P. Telouk, M. Gigou, C. Lecuyer, P. Srivatanakul, C. Brechot, F. Albaredo and P. Hainaut, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2015, **112**, 982.
  - 39 V. P. Bondanese, A. Lamboux, M. Simon, J. E. Lafont, E. Albalat, S. Pichat, J. M. Vanacker, P. Telouk, V. Balter, P. Oger and F. Albaredo, *Metallomics*, 2016, **8**, 1177.
  - 40 L. Sauzeat, E. Bernard, A. Perret-Liaudet, I. Quadrio, A. Vighetto, P. Krolak-Salmon, E. Broussolle, P. Leblanc and V. Balter, *iScience*, 2018, **6**, 264.
  - 41 H. Pierson, H. J. Yang and S. Lutsenko, *Annu. Rev. Nutr.*, 2019, **39**, 75.
  - 42 G. Ihrke, G. V. Martin, M. R. Shanks, M. Schrader, T. A. Schroer and A. L. Hubbard, *J. Cell Biol.*, 1998, **141**, 115.
  - 43 L. K. Nyasae, M. J. Schell and A. L. Hubbard, *Traffic*, 2014, **15**, 1344.
  - 44 V. Lalioti, R. Peiro, M. Perez-Berlangua, Y. Tsuchiya, A. Munoz, T. Villalba, C. Sanchez and I. V. Sandoval, *J. Cell Sci.*, 2016, **129**, 2190.
  - 45 C. Y. Tsai, J. K. Liebig, I. F. Tsigelny and S. B. Howell, *Metallomics*, 2015, **7**, 1477.



# **Chapitre 5**

---

---

**Fractionnement  
isotopique du Cu, du Zn,  
du Fe et du Mg dans les  
compartiments  
cellulaires**

---

---



## Introduction

---

Comme nous venons de le voir dans les chapitres précédents, des pathologies liées à un dysfonctionnement du métabolisme du cuivre sont à l'origine de variations de la composition isotopique du cuivre. Afin de pouvoir mieux définir les mécanismes mis en jeu, j'ai envisagé de mesurer les compositions isotopiques du cuivre, du zinc, du fer et du magnésium dans les compartiments cellulaires. Cette partie du travail de thèse mêle pleinement le domaine de la biologie cellulaire aux outils géochimiques. Dans ces deux domaines, les contraintes sont très différentes. L'objectif ici, était d'établir un protocole de séparation des compartiments cellulaires en vue de déterminer des rapports isotopiques. Ce protocole a été détaillé dans le chapitre 2. J'exposerai dans une première partie, le travail préliminaire qui a permis, d'une part de déterminer les blancs de manipulation, puis d'autre part, les résultats obtenus qui ont permis de mettre au point la méthode, pour des cellules de cancer du sein et pour des foies de souris. Dans une seconde partie, je présenterai un article en préparation intitulé « Copper, zinc, iron and magnesium isotopic fractionation in cellular compartments ».

---



## 5.1 Etude préliminaire sur des cellules de cancer du sein

Afin de vérifier que le protocole d'isolation des mitochondries présenté dans le chapitre 2.2.1 pouvait être appliqué en vue d'effectuer des mesures de compositions isotopiques, j'ai commencé à travailler avec des cellules de cancer du sein (cellules MDA).

Pour cela, il a d'abord fallu déterminer les blancs apportés par les protocoles de culture cellulaire et de séparation des mitochondries. J'ai ensuite déterminé la quantité de cellules nécessaire pour pouvoir effectuer des mesures isotopiques de Cu et de Zn dans chaque compartiment cellulaire. Ces expériences ont été conduites à l'Institut Génomique Fonctionnelle de Lyon (IGFL) à l'ENS de Lyon.

### 5.1.1 Détermination des blancs

Les contraintes dans les domaines de la biologie et de la géochimie sont très différentes. En géochimie, nous nous attelons à traquer toute trace métallique par des lavages du matériel à l'acide pour éviter les contaminations des échantillons ; alors qu'en biologie cellulaire, le matériel est stérilisé afin d'éviter toute contamination bactérienne. Il a donc fallu s'assurer que les blancs apportés par le matériel et les réactifs (PBS et milieu de culture) employés pour la culture cellulaire soient suffisamment faibles pour assurer la justesse et la reproductibilité des mesures de compositions isotopiques. Pour cela, les concentrations en Cu et Zn dans le PBS et le milieu de culture ont été déterminées (tableau 15). Il en est de même pour le tampon d'homogénéisation nécessaire à la séparation des compartiments cellulaires, pour lequel les concentrations en Cu, et Zn de plusieurs lots de réactifs ont été mesurées, afin de ne retenir que ceux pour lesquels les concentrations étaient les plus faibles. Les concentrations en Cu et Zn dans le tampon mannitol, préparé avec le sucrose, le MOPS et le mannitol choisi, étaient d'environ 15 ng/L. Les blancs apportés par le matériel ont été déterminés en appliquant le protocole de culture sur 5 boîtes, sans cellule. Les quantités obtenues sont inférieures à 15 ng pour le Cu et le Zn.



	Cu	Zn
PBS en µg/L	6,7	9,8
Milieu en µg/L	12,9	175

Tableau 15 : Concentrations en Cu, Zn et Fe dans le PBS et le milieu de culture

### 5.1.2 Détermination de la quantité de cellules nécessaire

Environ 100 ng de Cu et de Zn sont nécessaires pour effectuer une mesure de rapport isotopique sur le Nu Plasma 500. Je me suis donc assuré d'avoir une quantité suffisante de chaque métal, dans chaque compartiment cellulaire, pour pouvoir effectuer les mesures de composition isotopique.

A partir de 5 boîtes de culture contenant chacune entre 8 et 10 millions de cellules MDA, j'ai procédé à la séparation des compartiments cellulaires. Les quantités de Cu et de Zn ont alors été déterminées dans chaque fraction, les résultats sont répertoriés dans le tableau 16.

	Cu en ng	Zn en ng
Mitochondries	24	241
Cytosol	207	1015
Noyaux	86	1053

Tableau 16 : Quantité en ng de Cu et Zn dans les fractions "mitochondries", "cytosol" et "noyaux" pour 5 boîtes de pétri de cellules MDA, soit entre 40 et 50 millions de cellules.

La quantité la plus limitante est celle de Cu dans la fraction de mitochondries. Pour s'assurer d'avoir plus de Cu que la quantité minimum nécessaire pour une mesure de la composition isotopique, j'ai choisi de travailler avec une trentaine de boîtes de culture.

### 5.1.3 Résultats

La séparation des compartiments cellulaires a été effectuée à l'IGFL, selon le protocole décrit dans le chapitre 2.2.1.2 avec 2 mL de tampon mannitol.

Les compositions isotopiques en Cu et en Zn des compartiments cellulaires de cellules MDA ont été déterminées sur 3 expériences identiques, chacune avec environ 300 millions de cellules. Les résultats sont représentés sur la figure 35.

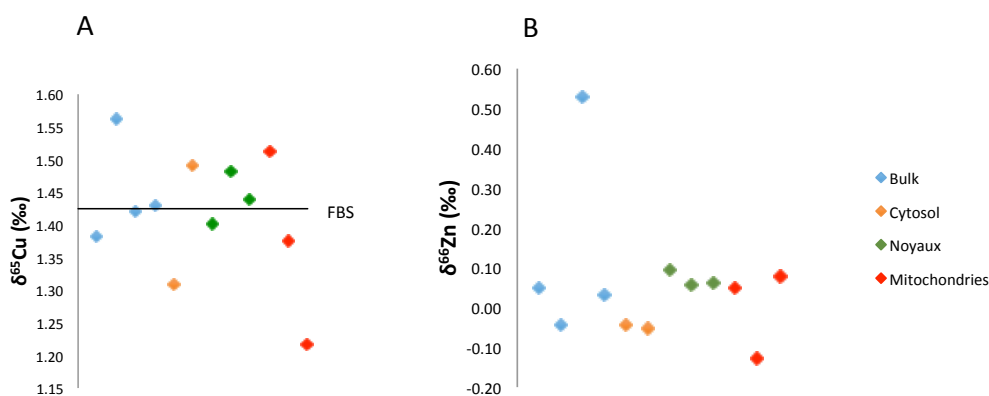


Figure 35 : Variation isotopique du Cu (A) et du Zn (A) dans les cellules MDA (Bulk) et dans les compartiments cellulaires.

Aucune différence significative dans la composition isotopique du Cu et du Zn dans les compartiments cellulaires n'a pu être mise en évidence. Des western blot n'ont pas pu être réalisés afin de s'assurer de l'efficacité du protocole de séparation des compartiments cellulaires. De plus, le protocole de séparation des compartiments cellulaires a été réalisé à l'IGFL et non en salle blanche sous hotte à flux laminaire. Les blancs induits par ce protocole n'ont pas pu être déterminés. L'environnement peut donc être une source de contamination en Cu et Zn. Cependant ces premiers résultats ont montré que le protocole d'isolation des mitochondries était applicable sur des lignées cellulaires en vue de déterminer les compositions isotopiques du Cu et du Zn dans différents compartiments cellulaires.

## 5.2 Etude préliminaire sur des foies de souris

A la suite des premiers résultats obtenus sur les cellules MDA, j'ai eu l'opportunité de pouvoir travailler sur des foies de souris WT. Les souris provenaient de l'animalerie de l'IGFL. Afin de séparer les compartiments cellulaires des foies de souris, il est indispensable d'appliquer le protocole sur des foies fraîchement prélevés. Or l'accès à l'animalerie est contrôlé, et ne possédant pas les habilitations nécessaires, c'est Anne-Laure Bulteau, qui après avoir euthanasié les souris et prélevé le foie, a procédé à la séparation des compartiments cellulaires.

### 5.2.1 Résultats

Les concentrations et les compositions isotopiques en Cu et en Zn des compartiments cellulaires des cellules du foie ont été déterminées sur 5 foies de souris WT.

Les concentrations en Cu et Zn dans le foie sont bien reproductibles, la moyenne est de  $4.63 \pm 0.26$  ppm (n=4) pour le Cu, et  $23.87 \pm 1.32$  ppm (n=4) pour le Zn (figure 36). Les concentrations en Cu et Zn dans le cytosol sont également bien reproductibles mais elles sont biaisées par le tampon mannitol (figure 36). En effet le cytosol est récupéré avec le surnageant qui constitue un volume important et donc la masse de cette fraction n'est pas seulement la masse du cytosol mais principalement celle du tampon mannitol. Les plages des valeurs de la concentration en Cu et en Zn dans les mitochondries sont beaucoup plus grandes (figure 36). Toutefois, les quantités de Cu dans chaque fraction étaient toujours supérieures à 100 ng, et celles de Zn toujours supérieures à 500 ng, ce qui a permis de pouvoir effectuer les séparations des éléments sur colonnes échangeuses d'ions et de déterminer les compositions isotopiques.

La valeur de  $\delta^{65}\text{Cu}$  dans le foie des souris WT est de  $-0.29 \pm 0,17$  ‰, n = 5 ; dans le cytosol, elle est de  $-0.24 \pm 0,48$  ‰, n = 5 ; dans les mitochondries, elle est de  $-0.43 \pm 0,10$  ‰, n = 5 ; et dans les noyaux elle est de  $-0.40$  ‰, n = 1 (figure 37). Les plages de valeurs des  $\delta^{65}\text{Cu}$  des foies et des mitochondries sont assez restreintes, alors que pour le cytosol les valeurs sont plus dispersées. Dans l'ensemble les mesures sont assez reproductibles. Les compositions isotopiques du foie et du cytosol sont similaires alors que celles des mitochondries sont plus faibles.

La valeur de  $\delta^{66}\text{Zn}$  dans le foie des souris WT est de  $-0.48 \pm 0,24$  ‰, n = 5 ; dans le cytosol, elle est de  $-0.44 \pm 0,35$  ‰, n = 5 ; dans les mitochondries, elle est de  $-0.47 \pm 0,33$  ‰, n = 4 ; et dans les noyaux elle est de  $-0.26$  ‰, n = 1 (figure 37). Les valeurs de  $\delta^{66}\text{Zn}$ , des foies et des

compartiments cellulaires sont similaires. Les compartiments cellulaires ne semblent pas avoir de signature isotopique du Zn particulière.

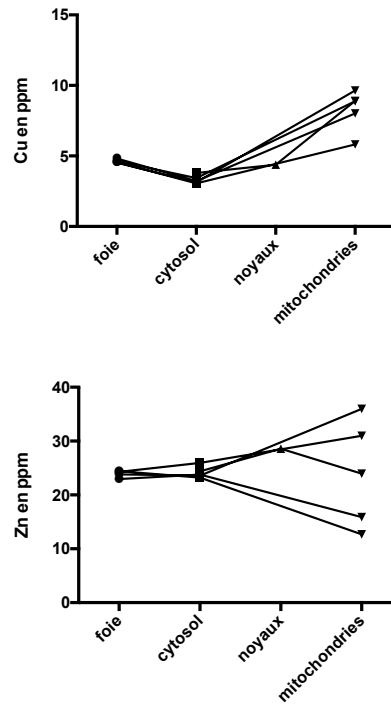


Figure 36 : Concentration en Cu (en haut) et en Zn (en bas) dans les cellules hépatiques de foies de souris WT. Chaque ligne noire représente une souris.

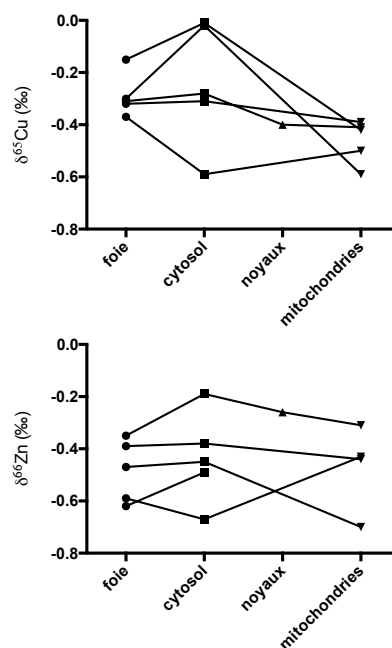


Figure 37 : Variation isotopique du Cu (en haut) et du Zn (en bas) dans les cellules hépatiques de foies de souris WT. Chaque ligne noire représente une souris.

Bien que ces premières expériences n'aient pas pu être conduites dans des conditions optimales (ni en salle blanche, ni sous hotte à flux laminaire), elles ont permis d'adapter le protocole d'isolation des mitochondries dans l'objectif d'effectuer des mesures de composition isotopique du Cu et du Zn dans les différents compartiments cellulaires. Les résultats obtenus montrent que les quantités de Cu et de Zn dans un foie de souris sont suffisantes pour effectuer aisément les mesures de compositions isotopiques dans le foie (bulk) ainsi que dans les fractions mitochondries, noyaux et cytosol.

Par la suite, j'ai eu l'opportunité de travailler en collaboration avec Yann Leverrier, sur des foies de souris C57BL/6 CD45.1 provenant du Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris (PBES) à l'ENS Lyon. Après euthanasie, le foie des souris est lavé avec du PBS puis avec le tampon mannitol, il est ensuite transféré au LGL-TPE. Ainsi, j'ai procédé à la séparation des compartiments cellulaires en salle blanche et sous hotte à flux laminaire, puis j'ai mesuré les compositions isotopiques du Cu, du Zn, du Fe et du Mg. Cette étude fait l'objet d'un article en préparation, détaillé dans le chapitre suivant.

## **5.3 Article en préparation « Copper, zinc, iron and magnesium isotopic fractionation in cellular compartments »**



# Copper, zinc, iron and magnesium isotopic fractionation in cellular compartments

(In preparation)

Aline Lamboux<sup>a</sup>, Yann Leverrier<sup>b</sup>, Anne-Laure Bulteau<sup>c</sup>, Olivia Guillin<sup>b</sup>, Laurent Chavatte<sup>b</sup>, Vincent Balter<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Univ Lyon, ENSL, Univ Lyon 1, CNRS UMR 5276, LGL-TPE, F-69007 Lyon, France

<sup>b</sup>Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, École Normale Supérieure de Lyon. Université de Lyon, F-69007, Lyon, France

<sup>c</sup>LVMH Recherche, Life Science Department, 185 Avenue de Verdun, 45800 Saint Jean de Braye, France

## Abstract

Cellular compartments have distinct proteomic profiles, and a generally accepted picture is that one-third of proteins require metals to function. For metals with several isotopes, proteins may have binding preferences with light or heavy isotopes depending on the nature of the ligand. Since isotope binding preferences for particular ligand can be predicted with *ab-initio* calculations, it is therefore possible to predict which proteins and by extension which cellular compartment, will be enriched in heavy or in light isotopes. In this study, we propose to experimentally determine the isotopic compositions in cellular compartments, to allow a better understanding of the metals cellular trafficking. A protocol for cellular separation was performed on 8 mouse liver samples to separate mitochondria, nuclei and cytoplasm fractions. The concentration and isotopic composition of Cu, Zn, Fe and Mg in the different cellular compartments and the bulk cell were measured. The results show that each cellular compartment has a specific isotopic composition and that the bulk liver isotopic composition reflects the mixture of the isotopic compositions of the cellular compartments. This study offers many perspectives by applying this approach to other organs or cell lines to highlight metal cellular trafficking in health and disease.



## Introduction

Metals play crucial roles in biological functions. About one third of all proteins are called metalloproteins and have one or more metal cofactors such as Fe, Cu, Zn or Mg to ensure their function (1). The metal ions can have a structural or catalytic role (2). Homeostasis of these elements is essential for reliable cellular function and dysregulation of these subtle balance generally lead to dysfunction of the physicochemical processes in which metalloproteins are involved (3-5). It is therefore essential to understand how the metals are recruited by proteins to appreciate how metals traffic into the cell in normal and pathological conditions.

The metallic elements have a nucleus with as many protons as electrons, to ensure the neutrality of the atom. The number of neutrons can vary for the same element, this is called isotope. Mass difference between isotopes of a metallic element induces slightly different binding energies and kinetic properties. During physico-chemical reactions a slight variation in the natural abundances of elements is observed, which is called the isotopic effect or isotopic fractionation, and provides information about small variations in the relative abundances of the isotopes. Two processes can be at the origin of an isotopic fractionation:

The thermodynamic process: the masses of isotopes affect the vibration frequencies of the bonds, thus modifying the binding energies and the thermodynamic equilibrium constants. Indeed, the energy of a chemical bond increases with the frequency of vibration, which is itself decreases with the atomic mass of the isotope. Thus, the heavier isotope shows a preference for the most rigid and strong chemical bonds (3,4). Oxidized elements exhibit a stronger electrostatic field than reduced elements. Thus, the oxidized elements are enriched in heavy isotope compared to the reduced elements.

The kinetic process: during irreversible reactions, the reaction and diffusion rates depend on the mass of the isotope. Reaction rates are related to the activation energy of isotopes. Generally, the lighter isotope reacts the fastest.

Isotopic variations can be predicted by *ab-initio* calculations (5,6). Metal-oxygen (hydroxide, sulfate, phosphate, lactate) or metal-nitrogen (histidine) bonds favor heavy isotopes and metal-sulfur bonds (cysteine, methionine, glutathione) favor light isotopes (6,7). The oxidation state of metals also plays a role in isotope fractionation. Bonds involving oxidized forms ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) are enriched in heavy isotopes and bonds involving reduced forms ( $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ) are enriched in light isotopes (6,7). In cells, metals are mostly bound to different proteins that are distributed in several cellular compartments. The *ab-initio* calculations thus allow to predict the isotopic enrichments of proteins (8).

Over the past twenty years, isotopic compositions of transition metals such as Cu, Fe and Zn have been increasingly measured in different biological contexts. Balter *et al.* reported the isotopic compositions of the above mentioned metals in the organs and biological fluids of mice and sheep (7). Variations in isotopic composition according to some parameters such as sex (9,10), diet (11,12) and age (13,14) in biological fluids and tissues have been reported. Studies also showed that isotopic compositions are highly sensitive to pathological conditions. Indeed, recent works have focused on the interest of studying isotopic variations of stable isotopes and particularly of Cu for the diagnosis or prognosis of some diseases (15–18). The copper isotope variations are also widely studied in patients with liver disease (19,20), cancer (21,22) and neurodegenerative diseases (23–25). Concerning the Zn isotope variations, they have been studied in the mouse model with Alzheimer's disease (26). The Zn isotopic composition has also shown a recent interest as a potential biomarker in breast cancer (27) and pancreatic cancer (28). Regarding Fe isotopic variations, they have been particularly studied in the context of hereditary hemochromatosis (29,30) and anemia (29). Although less studied, differences in the Mg isotopic composition have recently been shown to be different in the serum of type 1 diabetic patients compared to healthy controls (31). To date these studies of isotopic compositions have been conducted on human and animal bulk organ or biological fluid (i.e. blood, serum and urine). There are a few *in vitro* studies using cell culture (32–36).

The aim of this study is to present a method for the measurement of the isotopic compositions in cellular compartments to highlight the isotopic fractionation of Fe, Cu, Zn and Mg at the sub-cellular level. Here, the cellular compartments (mitochondria, nuclei and cytosol) of eight mouse liver samples are separated according to a mitochondria purification protocol. For each fraction ("Mito", "Nuclei", "Cytosol" and "Bulk"), the elements Cu, Fe, Zn, and Mg were isolated by chromatography on ion exchange columns, and the concentration measurements were carried out by ICP-MS and ICP-AES and the isotopic compositions measurements by MC-ICP-MS.

## **Materials and methods**

### **Samples**

The eight mouse livers named F3 to F10 used for this study come from the C57BL/6 CD45.1 mouse strain. Mice reared at the PBES (Plateau de Biologie Expérimental de la Souris) at the ENS de Lyon were between 12 and 14 weeks. Euthanasia was carried out by dislocation. Intracardiac injection with 10 ml of PBS was then performed, followed by washing of the liver with 10 ml of

PBS and with 5 ml of mannitol buffer. Liver samples were then placed in a tube with 2 mL of mannitol buffer, placed in ice for the transfert in the Labotoire de Géologie de Lyon at the ENS de Lyon.

Liver samples were cut into small pieces with ceramic scissors, and about 0.1 g of liver was discarded in a beaker constituting the "Bulk" fraction. The rest of the liver sample was used for the separation of cellular compartments.

## **Separation of the cellular compartments**

### Reagents

The reagents were purchased from Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA):

D-Mannitol  $\geq 99.9999$  %

MOPS Bio performance certified, cell cultured tested  $\geq 99.5$  %

Sucrose BioXtra  $\geq 99.5$  %

One liter of homogenization buffer ("mannitol buffer") was prepared by weighing 38.26 g of mannitol (210 mM), 1.05 g of MOPS (5 mM) and 24 g of sucrose (70 mM). The pH was adjusted to 7.4 with sodium hydroxide (NaOH from Acros Organics, Geel, Belgium) then the solution was stored at 4 °C.

### Protocol

The Falcon centrifuge tubes as well as the Kimble Konte (Vineland, NJ, USA) Dounce homogenizer and pestles A and B were washed in 20 % HCl for at least 48 hours.

The cellular compartments separation was performed on the freshly collected liver samples to keep the cells intact. To limit contamination, the whole protocol was carried out under laminar flow in a clean room (class 10,000).

About 0.3 g of liver was placed in Dounce homogenizer into ice with 7 mL of mannitol buffer, then pestles A and B were activated 10 times each. The homogenate was then placed into a 50 mL centrifuge tube. This operation was repeated 2 to 3 times depending on the size of the liver samples. The final homogenate was centrifuged at 1000 g for 5 minutes at 4 °C. The supernatant was keep apart in another 50 mL tube, and the pellet was dissolved in 7 mL of mannitol buffer then the crushing of the cells was repeated with pestles A and B. The homogenate was centrifuged again at 1000 g for 5 minutes at 4 °C. The pellet thus obtained was named "Nuclei" fraction. The supernatant was combined with the previous one and centrifuged at 10,000 g for 15 minutes at 4 °C. The pellet obtain was named "Mito" fraction and the supernatant was named "Cytosol" fraction.

To determine the quantities of metals provided by the manipulation corresponding to the blank, the same protocol was performed 3 times without sample.

### Western Blot

For the F7 to F10 liver samples, a small aliquot of the bulk as well as of the pellets ("Nuclei" and "Mito" fractions) was taken and placed in a lysis buffer and then frozen at -18 °C to perform a western blot at the Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI) at the ENS de Lyon. The cytosol being recovered with the mannitol buffer, it could not be taken to perform the western blot.

To load the correct amount of protein on the gel, protein concentration was measured using the DC Protein Assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Here, 20 µg of proteins was deposited in each hole. NuPAGE Sample Reducing Agent (Invitrogen, Carlsbad, CA), LDS Thermo Scientific Sample Loading Buffer and distilled water were added to the sample before heating at 95 °C for 5 min. The samples were then placed in the holes of the NuPAGE 4-12 % precast polyacrylamide gel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) itself placed in a tank filled with the MOPS NuPAGE migration buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in which a current of 100 V was applied for 1 h 30 at 2 h to separate the proteins by electrophoresis.

The proteins were then transferred from the gel to a nitrocellulose membrane in 7 min using a iBlot rapid transfer system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Membranes were blocked with 5 % weight per volume milk in TBST (Tris Buffered Saline with Tween 20) for 1 h at room temperature. Each membrane was then exposed to contact with the specific antibody on a shaker overnight at 4 °C. The primary antibodies used are: histone 3 (Anti-Histone H3 antibody - ab1791, Abcam, Cambridge, UK) for nuclei detection, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH D16H11, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) for cytosol detection and voltage dependent anion channel (VDAC D73D12, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) for mitochondria detection. Membranes were washed three times for 10 min with TBST buffer solution and then placed for 1 h in a solution of TBST containing the secondary antibody (Anti-Rabbit IgG-Peroxydase antibody produced in goat A6154, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). The membrane rinsing steps were repeated before proceeding to the detection. To this end, a substrate (Clarity Western ECL, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was deposited on parafilm before laying the membrane. After 4 min, the proteins were revealed by chemiluminescence using the ChemiDoc imaging system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Then the images were processed using Bio-rad Image Lab software.

## Sample preparation

### Reagents

Ultrapure water ( $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^2$ ) obtained from a Milli-Q IQ Element water purification (Merck Millipore, Bedford, MA, USA) was used. Nitric ( $\text{HNO}_3$ ) and hydrochloric ( $\text{HCl}$ ) acids were distilled in the laboratory. The 30 % Optima  $\text{H}_2\text{O}_2$  for analysis was from Fisher Chemical (Hampton, NH, USA), AG MP-1 100-200 mesh macroporous anionic resin, AG 1-X8 100-200 mesh anionic resin and AG 50W-X12 200-400 mesh cationic resin were from Bio-Rad (Temse, Belgium).

### Sample digestion

The “Bulk”, “Mito”, and “Nuclei” fractions were lyophilized for at least 48 h, the “Cytosol” fractions were lyophilized for at least 96 h. Lyophilized samples were digested in PFA Savillex beakers using 2 mL  $\text{HNO}_3$  (14 M) at room temperature for 24 h. Then 200  $\mu\text{L}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 %) were added and the beakers were heated at 100 °C for 24 h. After evaporation, a second digestion was performed using 1 mL  $\text{HNO}_3$  (14 M) and 200  $\mu\text{L}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 %) at 100 °C for at least 24 h.

The same process was repeated for the blank samples.

After evaporation, the samples and the “Cytosol” blanks were redissolved with 1 mL of  $\text{HNO}_3$  (0.5 N). Then a 100  $\mu\text{L}$  aliquot was taken for the measurement of the elemental concentrations. The remaining solution was evaporated and redissolved with 1 mL of  $\text{HCl}$  (7 N) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.001 %) for chromatographic separation. The “Mito” and “Nuclei” blanks were redissolved with 5 mL of  $\text{HNO}_3$  (0.5 N) for the measurement of elemental concentrations.

### Chemical separation of the elements on ion exchange columns

Iron, copper and zinc were separated according to a technique adapted from Maréchal *et al.* (37). Samples in 1 mL of  $\text{HCl}$  (7 N) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.001 %) were loaded on quartz columns containing 1.6 mL of the AG-MP1 resin. The matrix was eluted using 10 mL of  $\text{HCl}$  (7 N) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.001 %), evaporated and kept for Mg separation. Copper was eluted using 20 mL of  $\text{HCl}$  (7 N) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.001 %), Fe was then eluted using 12 mL of  $\text{HCl}$  (2 N) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.001 %) and finally Zn was eluted using 10 mL of  $\text{HNO}_3$  (0.5 N). Zinc was further purified according to the same protocol, recovering the Fe fraction to add it to the previous one. Copper was purified according to the same protocol. Iron was redissolved using 1 mL of  $\text{HCl}$  (6 N) and purified on Biorad columns containing 2 mL of AG1-X8 resin. Here the matrix was eluted using 10 mL of  $\text{HCl}$  (6 N) and Fe was eluted using 10 mL of  $\text{HNO}_3$  (0.5 N).

Magnesium was separated according to the technique from Le Goff *et al.* (38). The matrix fraction previously obtained was redissolved with 0.5 mL of  $\text{HCl}$  (1N) and loaded on a quartz

column containing 2 mL of AG50W-X12 resin. The matrix was removed using 17.5 mL of HCl (1 N), Mg was eluted with 29 mL of HCl (1 N). Magnesium was purified on a quartz column containing 210  $\mu\text{L}$  of AG50W-X12 resin. The Mg fraction previously obtained was redissolved using 0.3 mL of HCl (0.4 N), the matrix was eluted using 12.7 mL of HCl (0.4 N), and Mg was eluted using 3.5 mL of HCl (1 N). Magnesium was purified a second time using the same protocol to ensure the purity of Mg.

### **Instrumentation and measurement protocols**

The Cu, Fe, Zn and Mg concentrations were determined by quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) on an iCAPQ (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Samples were diluted in 0.5 N  $\text{HNO}_3$ , and In at  $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  was used as internal standard. Phosphorus concentration was determined by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) on an iCAP PRO (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Samples were diluted in 0.5 N  $\text{HNO}_3$ , and Sc at  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  was used as internal standard.

The Cu and Zn isotope compositions were determined by multiple-collector inductively coupled plasma mass spectrometry (MC-ICP-MS) on a Nu plasma HR (Nu Instruments Ltd, Wrexham, UK). The Cu and Zn concentration was adjusted to  $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  in 2 mL of 0.05 M  $\text{HNO}_3$ . Instrumental mass discrimination was corrected using Zn-doping (Zn JMC-Lyon, Johnson Matthey, Royston, UK) for the determination of Cu isotope compositions and Cu-doping (Cu NIST SRM 976, Gaithersburg, MD, USA) for the determination of Zn isotope compositions. The Cu and Zn isotope compositions were measured using the « standard sample bracketing » technique following the recommendations provided by Albarède *et al.* (39).

The Fe and Mg isotope compositions were determined by MC-ICP-MS on a Thermo Scientific Neptune Plus (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). The Fe and Mg concentrations were adjusted to  $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  in 2 mL of 0.05 M  $\text{HNO}_3$ . For the Fe isotope compositions, instrumental mass discrimination was corrected using Ni-doping (Ni Alfa-Aesar).

The isotopic compositions are reported with the standard delta notation using the 65/63, 66/64, 56/54 and 26/24 ratios relative to the international standards, NIST SRM 976, JMC Lyon, NIST IRMM 014 and DSM3 for Cu, Zn, Fe and Mg respectively.

## Results

### Blank levels

For this interdisciplinary study combining cellular fractionation and high purity ion exchange chromatography, it was necessary to consider the constraints linked to these two fields. This includes ensuring that the blank levels provided by the cellular compartments separation protocol were low enough to ensure measurement of accurate and reproducible isotopic compositions.

To determine the blank levels, the cellular compartments separation protocol was performed without sample 3 times for 2 different days. The total volume of mannitol buffer was 21 mL, which corresponds to the maximum volume of buffer used when the protocol was applied on liver samples. The “Mito”, “Nuclei” and “Cytosol” fractions obtained were lyophilized and mineralized in the same way as the samples. The Cu, Fe, Zn, and Mg amounts are respectively,  $0.47 \pm 0.20$  ng,  $11.0 \pm 13.8$  ng,  $4.9 \pm 1.9$  ng and  $8.4 \pm 9.2$  ng for the « Mito » fraction;  $0.59 \pm 0.51$  ng,  $10.7 \pm 9.9$  ng,  $4.6 \pm 2.5$  ng and  $5.8 \pm 2.9$  ng for the “Nuclei” fraction;  $13.1 \pm 5.4$  ng,  $61.1 \pm 46.8$  ng,  $31.2 \pm 11.9$  ng and  $94.6 \pm 1.3$  ng for the “Cytosol” fraction.

Although they may seem high, especially in the “Cytosol” fraction, these amounts remain low compared to the samples. By calculating the average amount of metals in the 8 samples, we can determine that the blank contribution in the “Mito” fraction, is 0.05 %, 0.13 %, 0.20 % and 0.02 % for Cu, Fe, Zn, and Mg, respectively. For the “Nuclei” fraction, the blank level represents only 0.21 %, 0.14 %, 0.22 % and 0.03 % for Cu, Fe, Zn, and Mg, respectively. For the “Cytosol” fraction, the blank level represents 1.01 %, 0.50 %, 0.36 % and 0.17 %, for Cu, Fe, Zn, and Mg, respectively. The cellular compartments separation protocol was performed under laminar flow in a clean room to limit contamination as much as possible. These amounts of metals are mainly from the reagents used to prepare the mannitol buffer, and are considered low enough to ensure accurate measurement of metal concentration and isotopic composition.

### Western Blot

The western blot performed for the “Mito” and “Nuclei” fractions of samples F7, F8, F9 and F10 and “Bulk” fractions of samples F9 and F10 is shown in Fig 1. It shows that the cytosol detected by GAPDH is not present in the “Mito” and “Nuclei” fractions, and it is well detected in the « Bulk » fractions. The “Mito” and “Nuclei” fractions are therefore not contaminated by the cytosol. The nuclei are detected by H3 in the “Nuclei” and “Bulk” fractions and are absent from the “Mito” fractions. Mitochondria are well detected by VDAC in the “Mito” fractions but except

for the F8 sample, they are also present in the “Nuclei” fractions. The protocol used does not allow to obtain either a 100% yield nor really pure fractions.

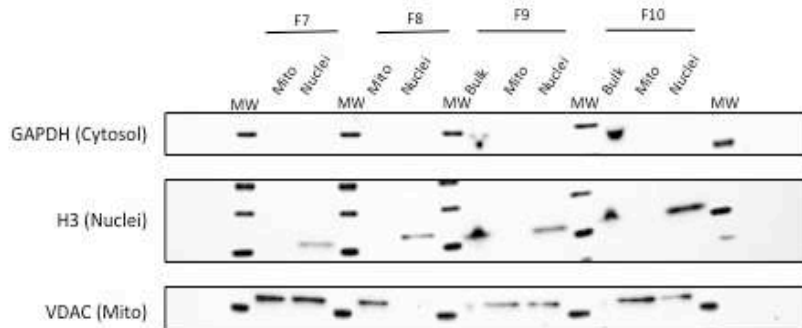


Fig 1: Western blot for the “Mito” and “Nuclei” fractions for the samples F7, F8, F9 and F10 and for the “Bulk” fractions for the samples F9 and F10. The primary antibodies GAPDH, H3 and VDAC are used for the detection of cytosol, nuclei, and mitochondria, respectively.

### Isotope compositions

The  $\delta^{65}\text{Cu}$  and  $\delta^{66}\text{Zn}$  values present the same characteristics. The “Mito” and “Nuclei” fractions have similar  $\delta^{65}\text{Cu}$  and  $\delta^{66}\text{Zn}$  values, being respectively  $-0.24 \pm 0.26 \text{ ‰}$  ( $n = 8$ ) and  $-0.15 \pm 0.24 \text{ ‰}$  ( $n = 8$ ) for  $\delta^{65}\text{Cu}$  in “Mito” and “Nuclei” fractions (Fig 2A) and  $-0.51 \pm 0.08 \text{ ‰}$ ,  $n = 8$  and  $-0.48 \pm 0.12 \text{ ‰}$ ,  $n = 8$  for  $\delta^{66}\text{Zn}$  in “Mito” and “Nuclei” fractions (Fig 2B). The  $\delta^{65}\text{Cu}$  and  $\delta^{66}\text{Zn}$  values of the “Cytosol” fraction are higher, being  $0.16 \pm 0.20 \text{ ‰}$  ( $n = 8$ ) for  $\delta^{65}\text{Cu}$  (Fig 2A) and  $-0.35 \pm 0.06 \text{ ‰}$  ( $n = 8$ ) for  $\delta^{66}\text{Zn}$  (Fig 2B). The  $\delta^{65}\text{Cu}$  and  $\delta^{66}\text{Zn}$  values of the “Bulk” fractions are significantly higher than those of the “Mito” and “Nuclei” fractions ( $p$ -value = 0.0013 and  $p$ -value = 0.0098 respectively for  $\delta^{65}\text{Cu}$ , Fig 2A;  $p$ -value = 0.00091 and  $p$ -value = 0.0013 respectively for  $\delta^{66}\text{Zn}$ , Fig 2B).

The  $\delta^{56}\text{Fe}$  values, of the “Mito” fractions ( $\delta^{56}\text{Fe} = -0.82 \pm 0.30 \text{ ‰}$ ,  $n = 8$ ) are significantly higher than those of the “Nuclei” fractions ( $\delta^{56}\text{Fe} = -1.49 \pm 0.46 \text{ ‰}$ ,  $n = 8$ ,  $p$ -value = 0.00016), and lower than those of the “Cytosol” fractions ( $\delta^{56}\text{Fe} = -0.31 \pm 0.22 \text{ ‰}$ ,  $n = 7$ ,  $p$ -value = 0.0014, Fig 2C).

The  $\delta^{26}\text{Mg}$  values of the “Bulk” fractions ( $\delta^{26}\text{Mg} = 0.85 \pm 0.32 \text{ ‰}$ ,  $n = 8$ ), “Mito” fractions ( $\delta^{26}\text{Mg} = 0.89 \pm 0.24 \text{ ‰}$ ,  $n = 8$ ) and “Nuclei” fractions ( $\delta^{26}\text{Mg} = 0.93 \pm 0.38 \text{ ‰}$ ,  $n = 8$ ) are not significantly different,  $p$ -value = 0.71 and  $p$ -value = 0.33, respectively (Fig 2D). The  $\delta^{26}\text{Mg}$  value of the “Cytosol” fractions ( $\delta^{26}\text{Mg} = 0.69 \pm 0.26 \text{ ‰}$ ,  $n = 8$ ) is significantly different from those of



the other fractions ( $p$ -value = 0.05,  $p$ -value = 0.013 and  $p$ -value = 0.024 respectively for the fractions “Bulk”, “Mito” and “Nuclei”, Fig 2D).

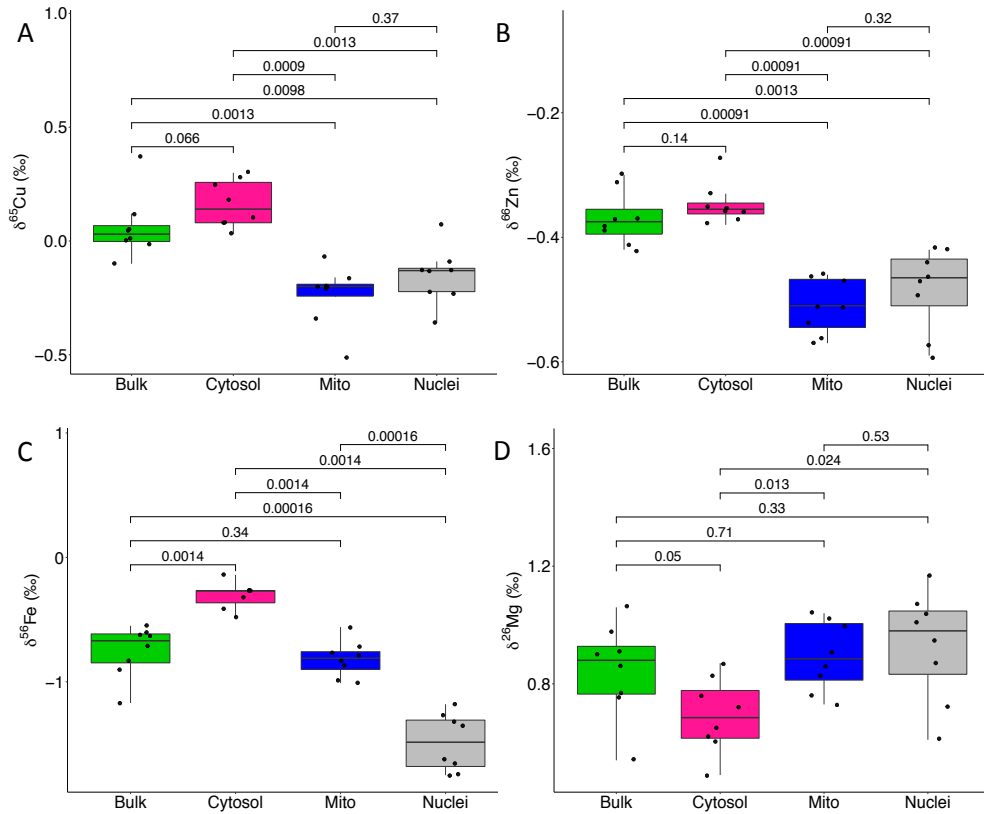


Fig 2: Distribution of the isotope compositions of Cu (A), Zn (B), Fe (C) and Mg (D) in the « Bulk » (in green), « Cytosol » (in pink), « Mito » (in blue) and « Nuclei » (in grey) fractions

## Discussion

### Cellular isotope mass balance

Using mass balance equations, one can calculate the  $\delta^{65}\text{Cu}$ ,  $\delta^{66}\text{Zn}$ ,  $\delta^{56}\text{Fe}$  and  $\delta^{26}\text{Mg}$  values of the « Bulk » fractions from the measured concentrations and the isotopic compositions of the « Mito », « Nuclei » and « Cytosol » fractions. We thereby compare the results obtained by calculations ( $\delta M_{\text{Bulk (calculated)}}$ ) with those obtained by measurements ( $\delta M_{\text{Bulk (measured)}}$ ).

We use the following mass balance equation:

$$\delta M_{\text{Bulk (calculated)}} = \varphi_{\text{Mito}} * \delta M_{\text{Mito}} + \varphi_{\text{Nuclei}} * \delta M_{\text{Nuclei}} + \varphi_{\text{Cytosol}} * \delta M_{\text{Cytosol}}$$

With for the “Mito” fraction:  $\varphi_{\text{Mito}} = fM_{\text{Mito}} * CM_{\text{Mito}} / (fM_{\text{Mito}} * CM_{\text{Mito}} + fM_{\text{Nuclei}} * CM_{\text{Nuclei}} + fM_{\text{Cytosol}} * CM_{\text{Cytosol}})$

$$\text{and } fM_{\text{Mito}} = mM_{\text{Mito}} / (mM_{\text{Mito}} + mM_{\text{Nuclei}} + mM_{\text{Cytosol}})$$

With  $M = \text{Cu, Fe, Zn or Mg}$ ,  $m$  the burden of metals and  $C$  the element concentrations. Here, the metal amounts and concentrations have been normalized with P to normalize the concentration and avoid any bias during sample weighting.

The slope of the regression line  $\delta M_{\text{Bulk (calculated)}} = f(\delta M_{\text{Bulk (measured)}})$  is 1.0596 ( $R^2=0.96$ ) (Fig 3) showing that the  $\delta M_{\text{Bulk (measured)}}$  values are in accordance with the  $\delta M_{\text{Bulk (calculated)}}$  values and that the  $\delta M_{\text{Bulk (calculated)}}$  values well correspond to the sum of the cellular compartments relative to their abundances. For Cu, Fe and Mg, the proportion is approximately the same in the three fractions (the average is between 30% and 40%). Vulpe & Packman reported that between 25 % and 50 % of Cu in the cytosol, slightly less in the nucleus and a smaller but nonetheless significant amount in the mitochondria and endoplasmic reticulum (40). For Zn, 54 % is in the “Cytosol” fraction, 27 % in the “Nuclei” fraction and 19 % in the “Mito” fraction. Baltaci & Yuce reported 50 % of cellular Zn in the cytosol and 40 % in the nucleus (41). Our results are in accordance with the literature. No information regarding the proportion of Fe and Mg in cell compartments was found in the literature.

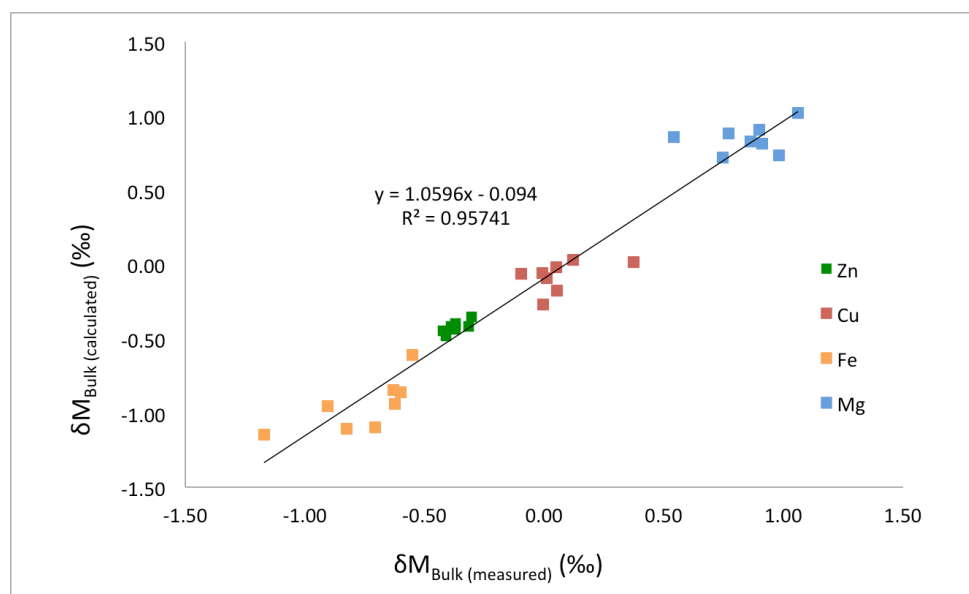


Fig 3: Mass balance  $\delta M_{\text{Bulk (calculated)}} = f(\delta M_{\text{Bulk (measured)}})$  with  $M = \text{Cu}$  (in red), Zn (in green) Fe (in yellow) or Mg (in blue)

### Cellular isotopic distribution

In the different cellular compartments, metals are almost always bound to proteins and isotopic fractionations can occur depending on the nature of the bond. It is known that bonds involving oxidized forms ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) promote a heavy isotope enrichment, and bonds involving reduced forms ( $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ) promote a light isotope enrichment (6,7).

The results are synthesized in Fig 4 and discussed hereafter for each metal.

### **Copper**

As the difference is not significant, the Cu isotopic composition in the “Cytosol” fraction is in average higher than that in the “Bulk” fraction (Fig 2A). Only for F3 and F10 samples, the Cu isotopic composition is slightly lower in the “Cytosol” fraction in comparison with that in the “Bulk” fraction (Fig 4A), and the relative Cu isotopic fractionation between the “Bulk” and the “Cytosol” fractions ( $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Bulk-Cytosol}}$ ) is respectively 0.07 and 0.02 ‰.

In the cytosol, Cu is bound to the metallochaperone Atox1 which delivers  $\text{Cu}^+$  (42) to an ATPase located in the Golgi apparatus (ATP7B in hepatocytes) (43). Copper in the  $\text{Cu}^+$  form, also binds the superoxide dismutase 1 copper chaperone, with which Cu is bound in the  $\text{Cu}^+$  form, implied in the metallation and activation of the Cu/Zn superoxide dismutase 1 (SOD1) (44), where Cu is in the  $\text{Cu}^{2+}$  form (45). The metallochaperone COX17 (46) and metallothionein (MT) are bound to Cu in the  $\text{Cu}^+$  form (47), and are also in the cytosol. Finally, in the cytosol Cu is mainly in the  $\text{Cu}^+$  form (except for SOD1), that allow to predict a light isotope enrichment in the cytosol, which is not in accordance with our results. The protocol that was used here does not allow to obtain neither a 100 % yield nor pure cellular compartments. The Golgi apparatus and the membrane are probably in the “Cytosol” fraction. Cell acquiring Cu from the high affinity transporters Ctr1 (48) and Ctr3 (49), and while the extracellular Cu is mainly in oxidized form ( $\text{Cu}^{2+}$ ), cellular Cu is in reduced form ( $\text{Cu}^+$ ); that implies the presence of the two Cu forms in the membrane, and explain why the “Cytosol” fraction is not enriched in light isotope as expected.

The average of the relative Cu isotopic fractionation between the “Mito” and the “Cytosol” fractions ( $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Mito-Cytosol}}$ ) is 0.40 ‰, and for each liver sample, the “Mito” fraction are enriched in light isotope relative to the “Cytosol” fraction (Fig 4A). The average of the relative Cu isotopic fractionation between the “Mito” fraction and the “Bulk” fraction ( $\Delta^{65}\text{Cu}_{\text{Mito-Bulk}}$ ) is 0.30 ‰, and for each liver sample, the “Mito” fraction are enriched in light isotope relative to the “Bulk” fraction (Fig 4A). Costas-Rodríguez *et al.* also reported an enrichment of mitochondria in  $^{63}\text{Cu}$  compared to the bulk of the human neuroblastoma SH-SY5Y cells (50).

Because in the mitochondria, Cu binds to the cytochrome-c oxidase (CCO) in the  $\text{Cu}^{2+}$  form, one predict an enrichment in heavy isotope in the mitochondria. But, in the “Mito” fraction, the measured Cu isotopic composition is not only due to the CCO. Indeed, Cu in the  $\text{Cu}^+$  form, is delivered by the cytosolic metallochaperone COX17 in the mitochondrial intermembrane space (46). Furthermore, the presence of a Cu pool, not bound to proteins, has also been demonstrated in the mitochondrial matrix (51). In addition, the protocol that was used here, not allowing to obtain pure cellular compartments, the endoplasmic reticulum is probably in the “Mito” fraction. Therefore, a separation of the other cellular compartments and particularly the endoplasmic reticulum, where Cu is also present (40), would provide a more detailed view of the isotopic variations. CCO is not the only protein in the “Mito” fraction, the presence of both Cu forms ( $\text{Cu}^+$  and  $\text{Cu}^{2+}$ ) in mitochondria could explain why our results are not in accordance with what was expected.

The “Nuclei” fractions are slightly enriched in heavy isotope ( $^{65}\text{Cu}$ ) in comparison with the “Mito” fractions, and in the light isotope ( $^{63}\text{Cu}$ ) in comparison with the “Cytosol” fractions (Fig 2A). In the nucleus, Cu is in the  $\text{Cu}^+$  form, is bound to MT (52), and Cu in the  $\text{Cu}^{2+}$  form is bound to SOD1 (53). The presence of both Cu forms ( $\text{Cu}^+$  and  $\text{Cu}^{2+}$ ) in the nucleus predict no specific isotopic variation, as show our results.

## **Iron**

The average of the relative Fe isotopic fractionation between the “Mito” fraction and the “Cytosol” fraction ( $\Delta^{56}\text{Fe}_{\text{Mito-Cytosol}}$ ) is 0.51 ‰ and for each sample, the “Cytosol” fraction is enriched in the heavy isotope relative to the “Mito” fraction (Fig 4D).

In the cytosol, Fe that is not required for metabolic functions is mainly stored in ferritin (54), in the  $\text{Fe}^{3+}$  form. Iron is then reduced to  $\text{Fe}^{2+}$  by the metallo-reductase Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate 3 that allows the transporter Divalent Metal Transporter 1 to be exported into the cytosol. In the cytosol, Fe is in the two oxidation states ( $\text{Fe}^{3+}$  and  $\text{Fe}^{2+}$ ). In the mitochondria, Fe is introduce in the  $\text{Fe}^{2+}$  form by the chaperone frataxin (55). Iron is also present in the nucleus (56). The *ab-initio* calculations allow to predict that cytosol is enriched in heavy isotope relative to the mitochondria and nucleus, because of the presence of ferritin ( $\text{Fe}^{3+}$ ) in the cytosol, that promote heavy isotope ( $^{65}\text{Cu}$ ). The Fe isotopic compositions measured here are in accordance with the *ab-initio* calculations. One hundred proteins involved in enzyme catalysis, electron transport or oxygen transport and delivery, require Fe in cell (57). Cell acquires Fe from the plasma protein transferrin mainly thanks to its transferrin receptor 1 (58).

## Zinc

For each sample, the "Mito" fractions present lower  $\delta^{66}\text{Zn}$  values ( $\delta^{66}\text{Zn} = -0.51 \pm 0.08 \text{ ‰}$ ,  $n = 8$ ) compared to the "Cytosol" fractions ( $\delta^{66}\text{Zn} = -0.35 \pm 0.06 \text{ ‰}$ ,  $n = 8$ ). Except for the 2 samples F3 and F5, the "Mito" fractions present also lower  $\delta^{66}\text{Zn}$  values compared to the "Nuclei" fractions ( $\delta^{66}\text{Zn} = -0.48 \pm 0.12 \text{ ‰}$ ,  $n = 8$ ) (Fig 4.B). However, although the difference is significant with the "Cytosol" fractions ( $p\text{-value} = 0.00091$ ), it is not significant with the "Nuclei" fractions ( $p\text{-value} = 0.32$ ), and the average of the relative Zn isotopic fractionation in these fractions is very low ( $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{Mito-Cytosol}} = 0.16 \text{ ‰}$  and  $\Delta^{66}\text{Zn}_{\text{Mito-Nuclei}} = 0.03 \text{ ‰}$ ).

In cell, Zn is introduced into the cytosol by ZIP transporters (59). In cytosol, Zn is a cofactor of SOD1 with a disulfide bond (60) and MT with a cysteine bond, and both favor a light isotope enrichment. Carbonic anhydrases are also in cytosol, membranes and mitochondria (61,62) with histidine and OH bounds (63) favoring heavy isotope enrichment. In nucleus, Zn finger proteins with cysteine and histidine ligands (64) which promote light and heavy isotope enrichments respectively. In view of the Zn bonds with the proteins, *ab-initio* calculations allow to predict a heavy isotope enrichment of the mitochondria compared to nucleus and cytosol, but no specific enrichment between cytosol and nucleus because of the presence of proteins that promote light and heavy isotope enrichment. Our results are not in accordance with that was expected. But, contrary to Cu and Fe, Zn is not sensitive to redox reactions, and is always in the  $\text{Zn}^{2+}$  form. The variation of the Zn isotopic composition is of smaller amplitude and is attributable to the variation in the binding energy of Zn with the molecules. In addition, free chelated zinc has also been detected in mitochondria, endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus (65).

## Magnesium

The "Cytosol" fraction present lower  $\delta^{26}\text{Mg}$  values compared to the "Mito" and "Nuclei" fractions. But, the range of the  $\delta^{26}\text{Mg}$  values is very important for all the fractions. The results show a lack of systematic of Mg isotopic compositions in cellular compartments.

To our knowledge, unlike Cu, Zn and Fe, no *ab-initio* calculation has been carried out for the estimation of Mg isotope fractionation. After K, Mg is the most abundant intracellular cation in mammals (66). Magnesium is only in the  $\text{Mg}^{2+}$  form, and is a cofactor of more than 300 enzymatic reactions involved in energy metabolism and the synthesis of proteins and nucleic acids (67). A considerable part of intracellular Mg is also in its free form (not chelated to proteins) (68,69). The major part of  $\text{Mg}^{2+}$  is in microsomes and mitochondria, and in smaller extent, in the cytosol (70), in the nucleus and in the endoplasmic reticulum (68). In hepatic mitochondria, about 50 % of  $\text{Mg}^{2+}$  is found in the intermembrane space and 40 % in the matrix. The outer and inner membranes each contain only about 5 % (70,71).

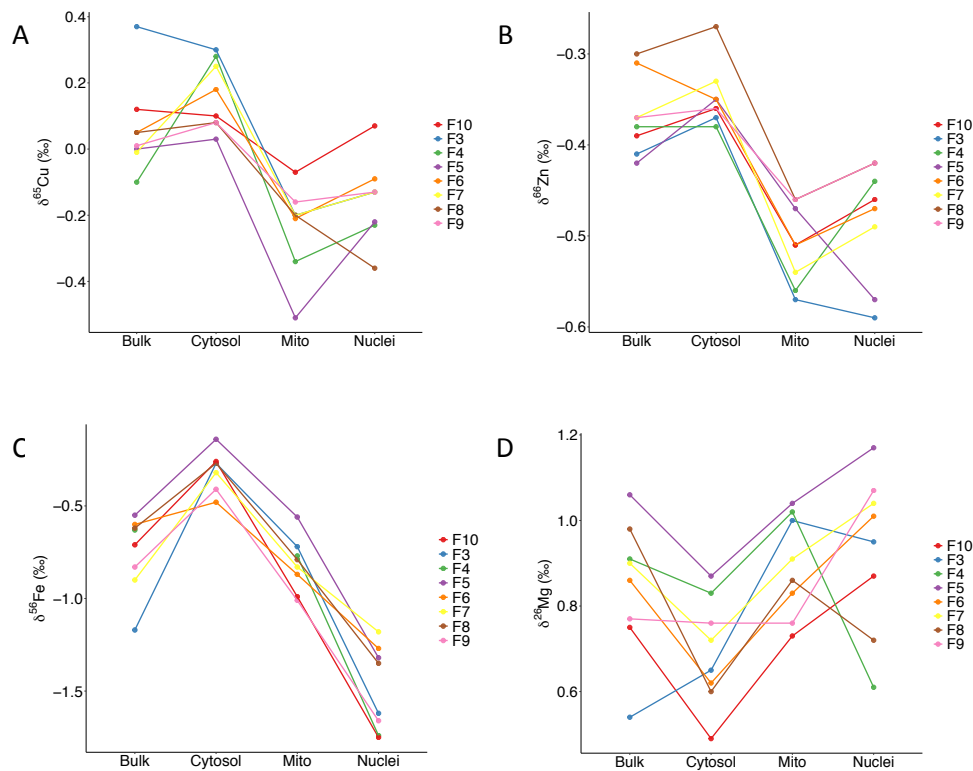


Fig 4 : Distribution of Cu (A), Zn (B), Fe (C) and Mg (D) isotope compositions for each liver sample (F3 to F10) in the “Bulk”, “Cytosol”, “Mito” and “Nuclei” fractions

Applying the method to a cellular model will be an *in vitro* proof of concept, and will facilitate the set-up for a mechanistic study. The hepatocellular carcinoma (HCC) cells strains HuH7 and HuH7 GCK<sup>+</sup>/HK2<sup>-</sup> would be good candidates for comparison between pathologic and healthy cells. By simplification, the generated cell strain HuH7 GCK<sup>+</sup>/HK2<sup>-</sup> mimics healthy hepatic cells (72). The limiting factor is the quantity of metals obtained in each fraction after the cellular compartments separation. The first results indicate that more than 50 million of cells are required for the measurements of the Cu, Fe and Zn isotopic compositions in each cellular compartment.

Studies on cells strains would also allow testing some parameters like oxidative stress which is known to be caused by an excess of Cu, and induces the intracellular heavy Cu isotope enrichment (33).

## Conclusion

This innovative study indicates that the isotopic compositions of Cu, Zn, Fe and Mg can be measured in cellular compartments. The results obtained show that each cell compartment has its own isotopic signature, and that the isotopic composition of the bulk cells liver correspond to the mixture of the latter. A separation of the other cellular compartments could provide additional and more detailed information. Overall, the isotopic signature of the cellular compartments observed here indicates that this method could be used to study the mechanisms of biological systems and also in the case of pathologies linked to disturbances in the homeostasis of these metals.

## References

1. Bertini I, Gray HB, Lippard SJ, Valentine JS. *Bioinorganic Chemistry*. Mill Valley, CA: University Science Books; 1994.
2. Holm RH, Kennepohl P, Solomon EI. Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. *Chem Rev*. 1996;96(7):2239-314.
3. Bigeleisen J, Mayer MG. Calculation of Equilibrium Constants for Isotopic Exchange Reactions. *J Chem Phys*. 1947;15(5):261-7.
4. Urey HC. The thermodynamic properties of isotopic substances. *J Chem Soc Resumed*. 1947;(0):562-81.
5. Moynier F, Fujii T, Shaw AS, Le Borgne M. Heterogeneous distribution of natural zinc isotopes in mice. *Metallomics*. 2013;5(6):693.
6. Fujii T, Moynier F, Blichert-Toft J, Albarède F. Density functional theory estimation of isotope fractionation of Fe, Ni, Cu, and Zn among species relevant to geochemical and biological environments. *Geochim Cosmochim Acta*. 2014;140:553-76.
7. Balter V, Lamboux A, Zazzo A, Télouk P, Leverrier Y, Marvel J, et al. Contrasting Cu, Fe, and Zn isotopic patterns in organs and body fluids of mice and sheep, with emphasis on cellular fractionation. *Metallomics*. 2013;5(11):1470.
8. Tennant A, Rauk A, Wieser ME. Computational modelling of the redistribution of copper isotopes by proteins in the liver. *Metallomics*. 2017;9(12):1809-19.
9. Walczyk T, Blanckenburg F von. Natural Iron Isotope Variations in Human Blood. *Science*. 2002;295(5562):2065-6.
10. Jaouen K, Balter V, Herrscher E, Lamboux A, Telouk P, Albarède F. Fe and Cu stable isotopes in archeological human bones and their relationship to sex. *Am J Phys Anthropol*. 2012;148(3):334-40.
11. Van Heghe L, Engström E, Rodushkin I, Cloquet C, Vanhaecke F. Isotopic analysis of the metabolically relevant transition metals Cu, Fe and Zn in human blood from vegetarians and

- omnivores using multi-collector ICP-mass spectrometry. *J Anal At Spectrom.* 2012;27(8):1327.
12. Jaouen K, Pons M-L, Balter V. Iron, copper and zinc isotopic fractionation up mammal trophic chains. *Earth Planet Sci Lett.* 2013;374:164-72.
  13. Jaouen K, Gibert M, Lamboux A, Telouk P, Fourel F, Albarède F, et al. Is aging recorded in blood Cu and Zn isotope compositions? *Metallomics.* 2013;5(8):1016-24.
  14. Sauzéat L, Laurençon A, Balter V. Metallome evolution in ageing *C. elegans* and a copper stable isotope perspective. *Metallomics.* 2018;10(3):496-503.
  15. Aramendía M, Rello L, Resano M, Vanhaecke F. Isotopic analysis of Cu in serum samples for diagnosis of Wilson's disease: a pilot study. *J Anal At Spectrom.* 2013;28(5):675.
  16. Costas-Rodríguez M, Delanghe J, Vanhaecke F. High-precision isotopic analysis of essential mineral elements in biomedicine: natural isotope ratio variations as potential diagnostic and/or prognostic markers. *TrAC Trends Anal Chem.* 2016;76:182-93.
  17. Télouk P, Puisieux A, Fujii T, Balter V, Bondanese VP, Morel A-P, et al. Copper isotope effect in serum of cancer patients. A pilot study. *Metallomics.* 2015;7(2):299-308.
  18. Lamboux A, Couchonnal-Bedoya E, Guillaud O, Laurencin C, Lion-François L, Belmalih A, et al. The blood copper isotopic composition is a prognostic indicator of the hepatic injury in Wilson disease. *Metallomics.* 2020;12(11):1781-90.
  19. Costas-Rodríguez M, Anoshkina Y, Lauwens S, Vlierberghe HV, Delanghe J, Vanhaecke F. Isotopic analysis of Cu in blood serum by multi-collector ICP-mass spectrometry: a new approach for the diagnosis and prognosis of liver cirrhosis? *Metallomics.* 2015;7(3):491-8.
  20. Costas-Rodríguez M, Campenhout SV, Hastuti AAMB, Devisscher L, Vlierberghe HV, Vanhaecke F. Body distribution of stable copper isotopes during the progression of cholestatic liver disease induced by common bile duct ligation in mice. *Metallomics.* 2019;11(6):1093-103.
  21. Balter V, Nogueira da Costa A, Bondanese VP, Jaouen K, Lamboux A, Sangrajrang S, et al. Natural variations of copper and sulfur stable isotopes in blood of hepatocellular carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci.* 2015;112(4):982-5.
  22. Lobo L, Costas-Rodríguez M, de Vicente JC, Pereiro R, Vanhaecke F, Sanz-Medel A. Elemental and isotopic analysis of oral squamous cell carcinoma tissues using sector-field and multi-collector ICP-mass spectrometry. *Talanta.* 2017;165:92-7.
  23. Miller KA, Keenan CM, Martin GR, Jirik FR, Sharkey KA, Wieser ME. The expression levels of cellular prion protein affect copper isotopic shifts in the organs of mice. *J Anal At Spectrom.* 2016;31(10):2015-22.
  24. Sauzéat L, Bernard E, Perret-Liaudet A, Quadrio I, Vighetto A, Krolak-Salmon P, et al. Isotopic Evidence for Disrupted Copper Metabolism in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *iScience.* 2018;6:264-71.
  25. Moynier, Creech J, Dallas J, Borgne ML. Serum and brain natural copper stable isotopes in a mouse model of Alzheimer's disease. *Sci Rep.* 2019;9(1):1-7.
  26. Moynier F, Foriel J, Shaw AS, Le Borgne M. Distribution of Zn isotopes during Alzheimer's disease. *Geochem Perspect Lett.* 2017;142-50.
  27. Larner F, Woodley LN, Shousha S, Moyes A, Humphreys-Williams E, Strekopytov S, et al. Zinc isotopic compositions of breast cancer tissue. *Metallomics.* 2015;7(1):112-7.
  28. Schilling K, Larner F, Saad A, Roberts R, Kocher HM, Blyuss O, et al. Urine metallomics signature as an indicator of pancreatic cancer†. *Metallomics.* 2020;12(5):752-7.
  29. Stenberg A, Malinovsky D, Ohlander B, Andrén H, Forsling W, Engström L-M, et al.



Measurement of iron and zinc isotopes in human whole blood: preliminary application to the study of HFE genotypes. *J Trace Elem Med Biol Organ Soc Miner Trace Elem GMS*. 2005;19(1):55-60.

30. Krayenbuehl P-A. Hereditary hemochromatosis is reflected in the iron isotope composition of blood. *Blood*. 2005;105(10):3812-6.

31. Grigoryan R, Costas-Rodríguez M, Laecke SV, Speeckaert M, Lapauw B, Vanhaecke F. Multi-collector ICP-mass spectrometry reveals changes in the serum Mg isotopic composition in diabetes type I patients. *J Anal At Spectrom*. 2019;34(7):1514-21.

32. Flórez MR, Anoshkina Y, Costas-Rodríguez M, Grootaert C, Camp JV, Delanghe J, et al. Natural Fe isotope fractionation in an intestinal Caco-2 cell line model. *J Anal At Spectrom*. 2017;32(9):1713-20.

33. Flórez MR, Costas-Rodríguez M, Grootaert C, Camp JV, Vanhaecke F. Cu isotope fractionation response to oxidative stress in a hepatic cell line studied using multi-collector ICP-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2018;410(9):2385-94.

34. Cadiou J-L, Pichat S, Bondanese VP, Soulard A, Fujii T, Albarède F, et al. Copper transporters are responsible for copper isotopic fractionation in eukaryotic cells. *Sci Rep*. 2017;7.

35. Bondanese VP, Lamboux A, Simon M, Lafont JE, Albalat E, Pichat S, et al. Hypoxia induces copper stable isotope fractionation in hepatocellular carcinoma, in a HIF-independent manner. *Metallomics*. 2016;8(11):1177-84.

36. Costas-Rodríguez M, Colina-Vegas L, Solovyev N, De Wever O, Vanhaecke F. Cellular and sub-cellular Cu isotope fractionation in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line: proliferating versus neuron-like cells. *Anal Bioanal Chem*. 2019;411(19):4963-71.

37. Maréchal CN, Télouk P, Albarède F. Precise analysis of copper and zinc isotopic compositions by plasma-source mass spectrometry. *Chem Geol*. 1999;156(1-4):251-73.

38. Le Goff S, Albalat E, Dosseto A, Godin J-P, Balter V. Determination of magnesium isotopic ratios of biological reference materials via multi-collector inductively coupled plasma mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2021;35(10):e9074.

39. Albarède F, Telouk P, Blichert-Toft J, Boyet M, Agranier A, Nelson B. Precise and accurate isotopic measurements using multiple-collector ICPMS. *Geochim Cosmochim Acta*. 2004;68(12):2725-44.

40. Vulpe CD, Packman S. Cellular Copper Transport. *Annu Rev Nutr*. 1995;15(1):293-322.

41. Baltaci AK, Yuce K. Zinc Transporter Proteins. *Neurochem Res*. 2018;43(3):517-30.

42. Klomp LWJ, Lin S-J, S.Yuan D, Klausner RD, Culotta VC, Gitlin JD. Identification and Functional Expression of HAH1, a Novel Human Gene Involved in Copper Homeostasis. *J Biol Chem*. 1997;272(14):9221-6.

43. Pufahl RA, Singer CP, Peariso KL, Lin S-J, Schmidt PJ, Fahrni CJ, et al. Metal Ion Chaperone Function of the Soluble Cu(I) Receptor Atx1. *Science*. 1997;278(5339):853-6.

44. Culotta VC, Klomp LWJ, Strain J, Casareno RLB, Krems B, Gitlin JD. The Copper Chaperone for Superoxide Dismutase. *J Biol Chem*. 1997;272(38):23469-72.

45. Fridovich I. Superoxide Dismutases. *Annu Rev Biochem*. 1975;44(1):147-59.

46. Glerum DM, Shtanko A, Tzagoloff A. Characterization of , a Yeast Gene Involved in Copper Metabolism and Assembly of Cytochrome Oxidase. *J Biol Chem*. 1996;271(24):14504-9.

47. Calvo J, Jung H, Meloni G. Copper metallothioneins. *IUBMB Life*. 2017;69(4):236-45.

48. Zhou B, Gitschier J. hCTR1: A human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94(14):7481-6.
49. Pena MM, Puig S, Thiele DJ. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* high affinity copper transporter Ctr3. *J Biol Chem.* 2000;275(43):33244-51.
50. Costas-Rodríguez M, Colina-Vegas L, Solovyev N, De Wever O, Vanhaecke F. Cellular and sub-cellular Cu isotope fractionation in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line: proliferating versus neuron-like cells. *Anal Bioanal Chem.* 2019;411(19):4963-71.
51. Cobine PA, Ojeda LD, Rigby KM, Winge DR. Yeast Contain a Non-proteinaceous Pool of Copper in the Mitochondrial Matrix \*. *J Biol Chem.* 2004;279(14):14447-55.
52. Banerjee D, Onosaka S, George Cherian M. Immunohistochemical localization of metallothionein in cell nucleus and cytoplasm of rat liver and kidney. *Toxicology.* 1982;24(2):95-105.
53. Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang LY. Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1992;89(21):10405-9.
54. Theil EC. Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. *Annu Rev Biochem.* 1987;56:289-315.
55. Shi H, Bencze KZ, Stemmler TL, Philpott CC. A Cytosolic Iron Chaperone That Delivers Iron to Ferritin. *Science.* 2008;320(5880):1207-10.
56. Meneghini R. Iron Homeostasis, Oxidative Stress, and DNA Damage. *Free Radic Biol Med.* 1997;23(5):783-92.
57. Anderson GJ, Vulpe CD. Mammalian iron transport. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(20):3241-61.
58. Aisen P. Transferrin receptor 1. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(11):2137-43.
59. Lichten LA, Cousins RJ. Mammalian Zinc Transporters: Nutritional and Physiologic Regulation. *Annu Rev Nutr.* 2009;29(1):153-76.
60. Ding F, Dokholyan NV. Dynamical roles of metal ions and the disulfide bond in Cu, Zn superoxide dismutase folding and aggregation. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105(50):19696-701.
61. Kuo W-H, Chiang W-L, Yang S-F, Yeh K-T, Yeh C-M, Hsieh Y-S, et al. The differential expression of cytosolic carbonic anhydrase in human hepatocellular carcinoma. *Life Sci.* 2003;73(17):2211-23.
62. Bayram E, Senturk M, Irfan Kufrevioglu O, Supuran CT. In vitro inhibition of salicylic acid derivatives on human cytosolic carbonic anhydrase isozymes I and II. *Bioorg Med Chem.* 2008;16(20):9101-5.
63. Supuran CT. How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist? *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2016;31(3):345-60.
64. Michalek JL, Besold AN, Michel SLJ. Cysteine and histidine shuffling: mixing and matching cysteine and histidine residues in zinc finger proteins to afford different folds and function. *Dalton Trans.* 2011;40(47):12619.
65. Lu Q, Haragopal H, Slepchenko KG, Stork C, Li YV. Intracellular zinc distribution in mitochondria, ER and the Golgi apparatus. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2016;8(1):35-43.
66. Romani A. Regulation of magnesium homeostasis and transport in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys.* 2007;458(1):90-102.

67. Elin RJ. Magnesium metabolism in health and disease. *Dis Mon.* 1988;34(4):166-218.
68. Romani A, Scarpa A. Regulation of cell magnesium. *Arch Biochem Biophys.* 1992;298(1):1-12.
69. Corkey BE, Duszyński J, Rich TL, Matschinsky B, Williamson JR. Regulation of free and bound magnesium in rat hepatocytes and isolated mitochondria. *J Biol Chem.* 1986;261(6):2567-74.
70. Günther T. *Biochemistry and Pathobiochemistry of Magnesium.* 1981;11.
71. Bogucka K, Wojtczak L. Intramitochondrial distribution of magnesium. *Biochem Biophys Res Commun.* 1971;44(6):1330-7.
72. Perrin-Cocon L, Vidalain P-O, Jacquemin C, Aublin-Gex A, Olmstead K, Panthou B, et al. A hexokinase isoenzyme switch in human liver cancer cells promotes lipogenesis and enhances innate immunity. *Commun Biol.* 2021;4(1):1-15.

# **Conclusion et perspectives**



Les avancées technologiques relativement récentes en MC-ICP-MS permettent aujourd'hui de mesurer des variations d'abondance d'isotopes non traditionnels avec une très grande précision. Plus particulièrement dans le domaine biomédical, les études portant sur des mesures de compositions isotopiques d'éléments tels que le Cu, le Zn, le Fe, le Mg ou encore le Ca ont fourni des informations sur la distribution des isotopes chez l'Homme et l'animal. Ces travaux menés sur des fluides biologiques, des organes et plus récemment sur des lignées cellulaires, ont permis de mettre en évidence des variations d'abondances isotopiques lors de dérégulations métaboliques. La mesure des compositions isotopiques est donc maintenant proposée comme nouveau marqueur de diagnostic ou pronostic de maladies.

Dans la première partie de cette thèse, j'aborde un volet clinique, en apportant la contrainte isotopique sur la dérégulation du métabolisme du Cu dans la maladie de Wilson. Puis dans la deuxième partie, j'aborde un volet plus fondamental, en mesurant des compositions isotopiques de compartiments cellulaires.

La maladie de Wilson est une maladie génétique rare, due à un dysfonctionnement de la protéine ATP7B, qui se caractérise par une accumulation de Cu, principalement dans le foie et le système nerveux central. Une première étude, réalisée en collaboration avec le Centre de Référence Maladies Rares (CRMR) : maladie de Wilson et autres maladies rares liées au cuivre de l'Hôpital Femme Mère Enfant de Lyon, a permis de montrer que la composition isotopique du Cu dans le sang est un indicateur de la progression de la maladie de Wilson, et peut donc constituer un outil de pronostic. Dans une seconde étude réalisée en collaboration avec le CEA de Grenoble, j'ai montré l'efficacité d'un chélateur innovant. Ce chélateur a été développé en vue de constituer un traitement de la maladie de Wilson. Il est plus spécifique que les traitements actuellement utilisés, et favorise l'excrétion du Cu vers la bile et non par les urines comme c'est le cas pour les chélateurs actuellement utilisés pour traiter la maladie de Wilson. Puis, grâce à la mesure des compositions isotopiques du Cu, j'ai participé à étudier le mécanisme de fonctionnement de ce chélateur. Les travaux réalisés dans cette première partie de thèse ont contribué à la publication de 2 articles.

Lors de précédents travaux, la signature isotopique spécifique de chaque organe de souris a été mise en évidence. Cette caractéristique a également été vérifiée au cours des travaux de la première partie de cette thèse et a ouvert la question de l'hétérogénéité des compositions isotopiques des compartiments cellulaires.

Ainsi, la seconde partie de cette thèse, constituée du chapitre 5, porte sur les compositions isotopiques du Cu, du Fe, du Zn et du Mg des compartiments cellulaires. Pour cette étude, j'ai

adapté un protocole d'isolation des mitochondries afin de séparer les compartiments cellulaires en vue de réaliser les premières mesures de compositions isotopiques. Les résultats montrent que chaque compartiment cellulaire de foie de souris possède sa propre signature isotopique en Cu, Fe et Zn. Cette partie plus fondamentale, a pleinement mêlé les techniques séparatives de biologie cellulaire, aux méthodes d'analyse classiquement utilisées dans le domaine de la géochimie.

Pour faire suite à l'étude portant sur la maladie de Wilson, nous pourrions envisager d'étudier la composition isotopique du Cu chez des patients atteints de stéatose hépatique non alcoolique, aussi appelée NASH pour Non Alcoholic Steato Hepatitis, ou encore maladie « du foie gras ». Cette pathologie liée à une alimentation trop grasse et trop sucrée est de plus en plus répandue en France et peut entraîner une fibrose ou une cirrhose. La composition isotopique du Cu dans le sérum étant liée à l'atteinte hépatique, elle devrait être plus basse chez les patients atteints de NASH comparée à celle d'un groupe contrôle.

Jusqu'à maintenant, les études portant sur les compositions isotopiques qui ont été réalisées dans les domaines de la biologie et de la médecine, portaient essentiellement sur des échantillons de fluides (sang, sérum, urines) et d'organes. Ces études ont fourni des informations sur la distribution des isotopes dans des conditions saines et pathologiques. Mais les systèmes biologiques corporels sont complexes, travailler sur des lignées cellulaires qui constituent des systèmes plus simples, permettrait de s'affranchir de certains paramètres. De plus les manipulations génétiques sur les lignées cellulaires sont routinières et ouvrent un grand panel d'exploration possible, comme par exemple en supprimant ou surexprimant une protéine pour évaluer son effet sur la composition isotopique, ou en appliquant des conditions particulières comme un stress oxydant. Les modèles cellulaires sont aussi moins coûteux et plus facilement disponibles que des modèles animaux. Ils présentent donc de nombreux avantages et devraient certainement être plus exploités pour des études mécanistiques.

Considérant cet aspect, j'envisage de poursuivre l'étude présentée dans le chapitre 5 en appliquant le protocole d'isolation des mitochondries d'une part aux cellules Huh7 qui proviennent d'une lignée de cellules humaines d'hépatocytes dérivées d'hépatocarcinome, et d'autre part aux cellules Huh7-GCK<sup>+</sup>/HK2<sup>-</sup> qui sont des cellules générées à partir de cellules Huh7 et qui imitent des cellules saines d'hépatocytes. Des résultats similaires à ceux obtenus avec les foies de souris permettront de constituer une « preuve de concept », et cette étude pourrait permettre de voir s'il y a des différences en conditions saine et pathologique.

Pour aller plus loin dans les mesures des compositions isotopiques des compartiments cellulaires, l'isolation d'autres compartiments cellulaires, et plus particulièrement l'appareil de golgi, permettrait d'avoir une vue encore plus détaillée des fractionnements isotopiques.

Une autre approche serait de mesurer les compositions isotopiques des métaux liés à chaque protéine. Pour ce faire, une étape de préparation par FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) permettant de séparer les protéines devrait être réalisée avant de séparer les éléments sur colonne échangeuse d'ions puis d'effectuer les mesures par MC-ICP-MS. Ceci nécessiterait une collaboration avec une équipe spécialisée dans les techniques de préparation par chromatographie liquide. Cette méthode permettrait d'attribuer un rapport isotopique à une protéine présente dans un organe, fournissant ainsi des informations sur les interactions entre protéines, et en conditions pathologiques sur les causes du dysfonctionnement des protéines.

Aussi la quantité de métal nécessaire pour réaliser une mesure de composition isotopique devrait être réduite. Ceci permettrait de pouvoir diminuer la quantité d'échantillon de départ, ce qui serait très intéressant pour les échantillons précieux. Dans les travaux réalisés au cours de cette thèse, c'est la quantité de Cu qui est la plus limitante. Sur le MC-ICP-MS Neptune Plus de Thermo Fisher Scientific, une configuration de cônes Jet + X devrait permettre d'obtenir une meilleure sensibilité tout en gardant les spécificités requises pour les mesures de la composition isotopique du Cu. Travailler sur des petits échantillons avec des concentrations basses requiert une attention particulière, notamment en ce qui concerne les blancs qui doivent être réduits d'autant.





# **Bibliographie**



- Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., and Lomri, A. (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. *Joint Bone Spine* 74, 324–329.
- Albarède, F., Telouk, P., Lamboux, A., Jaouen, K., and Balter, V. (2011). Isotopic evidence of unaccounted for Fe and Cu erythropoietic pathways. *Metallomics* 3, 926.
- Albarède, F., Télouk, P., Balter, V., Bondanese, V.P., Albalat, E., Oger, P., Bonaventura, P., Miossec, P., and Fujii, T. (2016). Medical applications of Cu, Zn, and S isotope effects. *Metallomics* 8, 1056–1070.
- Albarède, F., Télouk, P., and Balter, V. (2017a). Medical Applications of Isotope Metallomics. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 82, 851–885.
- Albarède, F., Télouk, P., and Balter, V. (2017b). Medical Applications of Isotope Metallomics. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 82, 851–885.
- Andreyev, A.Yu., Kushnareva, Yu.E., and Starkov, A.A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)* 70, 200–214.
- Angelova, M., Asenova, S., Nedkova, V., and Koleva-Kolarova, R. (2011). Copper in the human organism. *Trakia Journal of Sciences* 9, 11.
- Aramendía, M., Rello, L., Resano, M., and Vanhaecke, F. (2013). Isotopic analysis of Cu in serum samples for diagnosis of Wilson's disease: a pilot study. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 28, 675.
- Arredondo, M., Muñoz, P., Mura, C.V., and Núñez, M.T. (2003). DMT1, a physiologically relevant apical Cu<sup>1+</sup> transporter of intestinal cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 284, C1525–C1530.
- Balaban, R.S., Nemoto, S., and Finkel, T. (2005). Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell* 120, 483–495.
- Balter, V., Lamboux, A., Zazzo, A., Télouk, P., Leverrier, Y., Marvel, J., Moloney, A.P., Monahan, F.J., Schmidt, O., and Albarède, F. (2013). Contrasting Cu, Fe, and Zn isotopic patterns in organs and body fluids of mice and sheep, with emphasis on cellular fractionation. *Metallomics* 5, 1470.
- Balter, V., Nogueira da Costa, A., Bondanese, V.P., Jaouen, K., Lamboux, A., Sangrajrang, S., Vincent, N., Fourel, F., Télouk, P., Gigou, M., et al. (2015). Natural variations of copper and sulfur stable isotopes in blood of hepatocellular carcinoma patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 982–985.
- Beckman, J.S., Estévez, A.G., Crow, J.P., and Barbeito, L. (2001). Superoxide dismutase and the death of motoneurons in ALS. *Trends in Neurosciences* 24, S15–S20.
- Bergomi, M., Vinceti, M., Nacci, G., Pietrini, V., Brätter, P., Alber, D., Ferrari, A., Vescovi, L., Guidetti, D., Sola, P., et al. (2002). Environmental Exposure to Trace Elements and Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Population-Based Case–Control Study. *Environmental Research* 89, 116–123.
- Bielli, P., and Calabrese, L. (2002). Structure to function relationships in ceruloplasmin: a “moonlighting” protein. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59, 1413–1427.
- Bigeleisen, J., and Mayer, M.G. (1947). Calculation of Equilibrium Constants for Isotopic Exchange Reactions. *The Journal of Chemical Physics* 15, 261–267.
- Bolou-Bi, E.B., Poszwa, A., Leyval, C., and Vigier, N. (2010). Experimental determination of magnesium isotope fractionation during higher plant growth. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74, 2523–2537.
- Bondanese, V.P., Lamboux, A., Simon, M., Lafont, J.E., Albalat, E., Pichat, S., Vanacker, J.-M., Telouk, P., Balter, V., Oger, P., et al. (2016). Hypoxia induces copper stable isotope fractionation in

- hepatocellular carcinoma, in a HIF-independent manner. *Metallomics* 8, 1177–1184.
- Brem, S.S., Zagzag, D., Tsanaclis, A.M., Gately, S., Elkouby, M.P., and Brien, S.E. (1990). Inhibition of angiogenesis and tumor growth in the brain. Suppression of endothelial cell turnover by penicillamine and the depletion of copper, an angiogenic cofactor. *The American Journal of Pathology* 137, 1121–1142.
- Brewer, G.J. (2009). Zinc and tetrathiomolybdate for the treatment of Wilson's disease and the potential efficacy of anticopper therapy in a wide variety of diseases. *Metallomics* 1, 199.
- Büchl, A., Hawkesworth, C.J., Ragnarsdottir, K.V., and Brown, D.R. (2008). Re-partitioning of Cu and Zn isotopes by modified protein expression. *Geochemical Transactions* 9, 11.
- Buiakova, O.I., Xu, J., Lutsenko, S., Zeitlin, S., Das, K., Das, S., Ross, B.M., Mekios, C., Scheinberg, I.H., and Gilliam, T.C. (1999). Null Mutation of the Murine ATP7B (Wilson Disease) Gene Results in Intracellular Copper Accumulation and Late-Onset Hepatic Nodular Transformation. *Human Molecular Genetics* 8, 1665–1671.
- Cadenas, E., and Davies, K.J.A. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine* 29, 222–230.
- Cadiou, J.-L., Pichat, S., Bondanese, V.P., Soulard, A., Fujii, T., Albarède, F., and Oger, P. (2017). Copper transporters are responsible for copper isotopic fractionation in eukaryotic cells. *Scientific Reports* 7.
- Caicedo-Herrera, G., Candeló, E., Pinilla, J., Vidal, A., Cruz, S., and Pachajoa, H.M. (2018). Novel ATP7A gene mutation in a patient with Menkes disease. *The Application of Clinical Genetics* 11, 151–155.
- Capaldi, R.A. (1990). Structure and Function of Cytochrome *c* Oxidase. *Annual Review of Biochemistry* 59, 569–596.
- Collins, J.F., Prohaska, J.R., and Knutson, M.D. (2010). Metabolic crossroads of iron and copper. *Nutrition Reviews* 68, 133–147.
- Conti, A., Iannaccone, S., Sferrazza, B., Monte, L.D., Cappa, S., Franciotta, D., Olivieri, S., and Alessio, M. (2008). Differential expression of ceruloplasmin isoforms in the cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Proteomics Clinical Applications* 2, 1628–1637.
- Costas-Rodríguez, M., Anoshkina, Y., Lauwens, S., Vlierberghe, H.V., Delanghe, J., and Vanhaecke, F. (2015). Isotopic analysis of Cu in blood serum by multi-collector ICP-mass spectrometry: a new approach for the diagnosis and prognosis of liver cirrhosis? *Metallomics* 7, 491–498.
- Costas-Rodríguez, M., Delanghe, J., and Vanhaecke, F. (2016). High-precision isotopic analysis of essential mineral elements in biomedicine: natural isotope ratio variations as potential diagnostic and/or prognostic markers. *Trends in Analytical Chemistry* 76, 182–193.
- Costas-Rodríguez, M., Campenhout, S.V., Hastuti, A.A.M.B., Devisscher, L., Vlierberghe, H.V., and Vanhaecke, F. (2019). Body distribution of stable copper isotopes during the progression of cholestatic liver disease induced by common bile duct ligation in mice. *Metallomics* 11, 1093–1103.
- Coyle, P., Philcox, J.C., Carey, L.C., and Rofe, A.M. (2002). Metallothionein: the multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59, 627–647.
- Crisponi, G., Nurchi, V.M., Fanni, D., Gerosa, C., Nemolato, S., and Faa, G. (2010). Copper-related diseases: From chemistry to molecular pathology. *Coordination Chemistry Reviews* 254, 876–889.
- Cummings, J.N. (1951). The effects of B.A.L. in hepatocellular degeneration. *Brain* 74, 10–22.
- Daniel, K., G. (2004). Copper storage diseases: Menkes, Wilson's, and Cancer. *Frontiers in*

Bioscience 9, 2652.

Deng, H.X., Hentati, A., Tainer, J.A., Iqbal, Z., Cayabyab, A., Hung, W.Y., Getzoff, E.D., Hu, P., Herzfeldt, B., and Roos, R.P. (1993). Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science* 261, 1047–1051.

Denoyer, D., Masaldan, S., La Fontaine, S., and Cater, M.A. (2015). Targeting copper in cancer therapy: 'Copper That Cancer.' *Metallomics* 7, 1459–1476.

Dhalla, N.S., Temsah, R.M., and Netticadan, T. (2000). Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Journal of Hypertension* 18, 655–673.

Dolgin, E. (2017). Genetics: The hexanucleotide hex. *Nature* 550, S106–S108.

El Balkhi, S., Trocello, J.-M., Poupon, J., Chappuis, P., Massicot, F., Girardot-Tinant, N., and Woimant, F. (2011). Relative exchangeable copper: A new highly sensitive and highly specific biomarker for Wilson's disease diagnosis. *Clinica Chimica Acta* 412, 2254–2260.

Ferenci, P., Caca, K., Loudianos, G., Mieli-Vergani, G., Tanner, S., Sternlieb, I., Schilsky, M., Cox, D., and Berr, F. (2003). Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease<sup>1</sup>. *Liver International* 23, 139–142.

Finkel, T., and Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239–247.

Flórez, M.R., Costas-Rodríguez, M., Grootaert, C., Camp, J.V., and Vanhaecke, F. (2018). Cu isotope fractionation response to oxidative stress in a hepatic cell line studied using multi-collector ICP-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410, 2385–2394.

Fridovich, I. (1975). Superoxide Dismutases. *Annual Review of Biochemistry* 44, 147–159.

Frost, B., and Diamond, M.I. (2010). Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience* 11, 155–159.

Fujii, T., Moynier, F., Blichert-Toft, J., and Albarède, F. (2014). Density functional theory estimation of isotope fractionation of Fe, Ni, Cu, and Zn among species relevant to geochemical and biological environments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 140, 553–576.

Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Borthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., Gillespie, F., et al. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F  $\beta$ -amyloid precursor protein. *Nature* 373, 523.

Gateau, C., Mintz, E., and Delangle, P. (2014). Rational Design of Copper and Iron Chelators to Treat Wilson's Disease and Hemochromatosis. In *Ligand Design in Medicinal Inorganic Chemistry*, T. Storr, ed. (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), pp. 287–319.

Goodman, V.L., Brewer, G.J., and Merajver, S.D. (2004). Copper deficiency as an anti-cancer strategy. *Endocrine-Related Cancer* 11, 255–263.

Guillaud, O., Brunet, A.-S., Mallet, I., Dumortier, J., Pelosse, M., Heissat, S., Rivet, C., Lachaux, A., and Bost, M. (2018). Relative exchangeable copper: A valuable tool for the diagnosis of Wilson disease. *Liver International* 38, 350–357.

Gupte, A., and Mumper, R.J. (2009). Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treat. Rev.* 35, 32–46.

Hamilton, E.I., Minski, M.J., and Cleary, J.J. (1973). The concentration and distribution of some stable elements in healthy human tissues from the United Kingdom An environmental study. *Science of The Total Environment* 1, 341–374.

Hamza, I., Prohaska, J., and Gitlin, J.D. (2003). Essential role for Atox1 in the copper-mediated intracellular trafficking of the Menkes ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*

100, 1215–1220.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.

Hardy, J., and Allsop, D. (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences* 12, 383–388.

Healy, J., and Tipton, K. (2007). Ceruloplasmin and what it might do. *Journal of Neural Transmission* 114, 777–781.

Holmberg, C.G., Laurell, C.-B., and Gjertsen, P. (1948). Investigations in Serum Copper. II. Isolation of the Copper Containing Protein, and a Description of some of its Properties. *Acta Chemica Scandinavica* 2, 550–556.

Hoogenraad, T.U., Koevoet, R., and Korver, E.G.W.M. de R. (1979). Oral Zinc Sulphate as Long-Term Treatment in Wilson's Disease (Hepatolenticular Degeneration). *European Neurology* 18, 205–211.

Horn, D., and Barrientos, A. (2008). Mitochondrial copper metabolism and delivery to cytochrome c oxidase. *IUBMB Life* 60, 421–429.

Hozumi, I., Hasegawa, T., Honda, A., Ozawa, K., Hayashi, Y., Hashimoto, K., Yamada, M., Koumura, A., Sakurai, T., Kimura, A., et al. (2011). Patterns of levels of biological metals in CSF differ among neurodegenerative diseases. *Journal of the Neurological Sciences* 303, 95–99.

Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., and Michel, H. (1995). Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* 376, 660–669.

James, S.A., Volitakis, I., Adlard, P.A., Duce, J.A., Masters, C.L., Cherny, R.A., and Bush, A.I. (2012). Elevated labile Cu is associated with oxidative pathology in Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine* 52, 298–302.

Jaouen, K., Balter, V., Herrscher, E., Lamboux, A., Telouk, P., and Albarède, F. (2012). Fe and Cu stable isotopes in archeological human bones and their relationship to sex. *American Journal of Physical Anthropology* 148, 334–340.

Jaouen, K., Gibert, M., Lamboux, A., Telouk, P., Fourel, F., Albarède, F., Alekseev, A.N., Crubézy, E., and Balter, V. (2013a). Is aging recorded in blood Cu and Zn isotope compositions? *Metallomics* 5, 1016–1024.

Jaouen, K., Pons, M.-L., and Balter, V. (2013b). Iron, copper and zinc isotopic fractionation up mammal trophic chains. *Earth and Planetary Science Letters* 374, 164–172.

Kägi, J.H.R., and Kojima, Y. (1987). Chemistry and Biochemistry of Metallothionein. In *Metallothionein II*, J.H.R. Kägi, and Y. Kojima, eds. (Basel: Birkhäuser Basel), pp. 25–61.

Kägi, J.H.R., and Schäffer, A. (1988). Biochemistry of metallothionein. *American Chemical Society* 27, 7.

Kim, B.-E., Nevitt, T., and Thiele, D.J. (2008). Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nature Chemical Biology* 4, 176–185.

Lamboux, A., Couchonnal-Bedoya, E., Guillaud, O., Laurencin, C., Lion-François, L., Belmalih, A., Mintz, E., Brun, V., Bost, M., Lachaux, A., et al. (2020). The blood copper isotopic composition is a prognostic indicator of the hepatic injury in Wilson disease. *Metallomics* 12, 1781–1790.

Larner, F., McLean, C.A., Halliday, A.N., and Roberts, B.R. (2019). Copper Isotope Compositions of Superoxide Dismutase and Metallothionein from Post-Mortem Human Frontal Cortex. *Inorganics* 7, 86.

Lauwens, S., Costas-Rodríguez, M., Van Vlierberghe, H., and Vanhaecke, F. (2016). Cu isotopic

- signature in blood serum of liver transplant patients: a follow-up study. *Scientific Reports* 6.
- Le Goff, S., Albalat, E., Dosseto, A., Godin, J.-P., and Balter, V. (2021). Determination of magnesium isotopic ratios of biological reference materials via multi-collector inductively coupled plasma mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 35, e9074.
- Lech, T., and Sadlik, J.K. (2007). Copper Concentration in Body Tissues and Fluids in Normal Subjects of Southern Poland. *Biological Trace Element Research* 118, 10–15.
- Linder, M.C. (1991). Biochemistry of Copper. In *Biochemistry of Copper*, U. Springer, ed. (Boston, MA: Springer US), p.
- Linder, M.C. (2016). Ceruloplasmin and other copper binding components of blood plasma and their functions: an update. *Metallomics* 8, 887–905.
- Linder, M.C., and Hazegh-Azam, M. (1996). Copper biochemistry and molecular biology. *The American Journal of Clinical Nutrition* 63, 797S-811S.
- Linder, M.C., Zerounian, N.R., Moriya, M., and Malpe, R. (2003). Iron and copper homeostasis and intestinal absorption using the Caco2 cell model. *Biometals* 16, 145–160.
- Linz, R., Barnes, N.L., Zimnicka, A.M., Kaplan, J.H., Eipper, B., and Lutsenko, S. (2008). Intracellular targeting of copper-transporting ATPase ATP7A in a normal and *Atp7b*<sup>-/-</sup> kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 294, F53–F61.
- Lobo, L., Costas-Rodríguez, M., de Vicente, J.C., Pereiro, R., Vanhaecke, F., and Sanz-Medel, A. (2017). Elemental and isotopic analysis of oral squamous cell carcinoma tissues using sector-field and multi-collector ICP-mass spectrometry. *Talanta* 165, 92–97.
- Loschen, G., Azzi, A., Richter, C., and Flohé, L. (1974). Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Letters* 42, 68–72.
- Lovell, M.A., Robertson, J.D., Teesdale, W.J., Campbell, J.L., and Markesbery, W.R. (1998). Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *Journal of the Neurological Sciences* 158, 47–52.
- Lowndes, S.A., and Harris, A.L. (2005). The Role of Copper in Tumour Angiogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 10, 299–310.
- Lutsenko, S. (2008). *Atp7b*<sup>-/-</sup> mice as a model for studies of Wilson's disease. *Biochemical Society Transactions* 36, 1233–1238.
- Lutsenko, S., Barnes, N.L., Bartee, M.Y., and Dmitriev, O.Y. (2007). Function and Regulation of Human Copper-Transporting ATPases. *Physiological Reviews* 87, 1011–1046.
- Luza, S.C., and Speisky, H.C. (1996). Liver copper storage and transport during development: implications for cytotoxicity. *The American Journal of Clinical Nutrition* 63, 812S-820S.
- Madsen, E., and Gitlin, J.D. (2007). Copper and Iron Disorders of the Brain. *Annual Review of Neuroscience* 30, 317–337.
- Malavolta, M., Piacenza, F., Basso, A., Giacconi, R., Costarelli, L., and Mocchegiani, E. (2015). Serum copper to zinc ratio: Relationship with aging and health status. *Mechanisms of Ageing and Development* 151, 93–100.
- Maréchal, C.N., Télouk, P., and Albarède, F. (1999). Precise analysis of copper and zinc isotopic compositions by plasma-source mass spectrometry. *Chemical Geology* 156, 251–273.
- Margoshes, M., and Vallee, B.L. (1957). A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of the American Chemical Society* 79, 4813–4814.
- Martin, J.E., Tacail, T., Adnet, S., Girard, C., and Balter, V. (2015). Calcium isotopes reveal the trophic position of extant and fossil elasmobranchs. *Chemical Geology* 415, 118–125.



- Martin, J.E., Tacail, T., Cerling, T.E., and Balter, V. (2018). Calcium isotopes in enamel of modern and Plio-Pleistocene East African mammals. *Earth and Planetary Science Letters* 503, 227–235.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., and Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 16, 577–586.
- Meister, A., and Anderson, M.E. (1983). Glutathione. *Annual Review of Biochemistry* 52, 711–760.
- Meyer, L.A., Durley, A.P., Prohaska, J.R., and Harris, Z.L. (2001). Copper Transport and Metabolism Are Normal in Aceruloplasminemic Mice. *Journal of Biological Chemistry* 276, 36857–36861.
- Mezzetti, A., Pierdomenico, S.D., Costantini, F., Romano, F., De Cesare, D., Cuccurullo, F., Imbastaro, T., Riario-Sforza, G., Di Giacomo, F., Zuliani, G., et al. (1998). Copper/zinc ratio and systemic oxidant load: effect of aging and aging-related degenerative diseases. *Free Radical Biology and Medicine* 25, 676–681.
- Micronutrients, I. of M. (US) P. on (2001). Copper (National Academies Press (US)).
- Milanino, R., Marrella, M., Gasperini, R., Pasqualicchio, M., and Velo, G. (1993). Copper and zinc body levels in inflammation: An overview of the data obtained from animal and human studies. *Agents and Actions* 39, 195–209.
- Miles, A.T., Hawksworth, G.M., Beattie, J.H., and Rodilla, V. (2000). Induction, Regulation, Degradation, and Biological Significance of Mammalian Metallothioneins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 35, 35–70.
- Miller, K.A., Keenan, C.M., Martin, G.R., Jirik, F.R., Sharkey, K.A., and Wieser, M.E. (2016). The expression levels of cellular prion protein affect copper isotopic shifts in the organs of mice. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 31, 2015–2022.
- Millhauser, G.L. (2007). Copper and the Prion Protein: Methods, Structures, Function, and Disease. *Annu Rev Phys Chem* 58, 299–320.
- Monestier, M., Charbonnier, P., Gateau, C., Cuillel, M., Robert, F., Lebrun, C., Mintz, E., Renaudet, O., and Delangle, P. (2016). ASGPR-Mediated Uptake of Multivalent Glycoconjugates for Drug Delivery in Hepatocytes. *ChemBioChem* 17, 590–594.
- Monty, J.-F., Llanos, R.M., Mercer, J.F.B., and Kramer, D.R. (2005). Copper Exposure Induces Trafficking of the Menkes Protein in Intestinal Epithelium of ATP7A Transgenic Mice. *The Journal of Nutrition* 135, 2762–2766.
- Moore, S.D.P., and Cox, D.W. (2002). Expression in Mouse Kidney of Membrane Copper Transporters Atp7a and Atp7b. *NEF* 92, 629–634.
- Moynier, F., Pichat, S., Pons, M.-L., Fike, D., Balter, V., and Albarède, F. (2009). Isotopic fractionation and transport mechanisms of Zn in plants. *Chemical Geology* 267, 125–130.
- Moynier, F., Creech, J., Dallas, J., and Borgne, M.L. (2019). Serum and brain natural copper stable isotopes in a mouse model of Alzheimer's disease. *Scientific Reports* 9, 1–7.
- Nose, Y., Kim, B.-E., and Thiele, D.J. (2006). Ctr1 drives intestinal copper absorption and is essential for growth, iron metabolism, and neonatal cardiac function. *Cell Metabolism* 4, 235–244.
- Okado-Matsumoto, A., and Fridovich, I. (2001). Subcellular Distribution of Superoxide Dismutases (SOD) in Rat Liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 276, 38388–38393.
- Opazo, C., Huang, X., Cherny, R.A., Moir, R.D., Roher, A.E., White, A.R., Cappai, R., Masters, C.L.,

- Tanzi, R.E., Inestrosa, N.C., et al. (2002). Metalloenzyme-like Activity of Alzheimer's Disease  $\beta$ -Amyloid. *Journal of Biological Chemistry* 277, 40302–40308.
- Opazo, C.M., Greenough, M.A., and Bush, A.I. (2014). Copper: from neurotransmission to neuroproteostasis. *Frontiers in Aging Neuroscience* 6, 143.
- Pall, H.S., Blake, D.R., Gutteridge, J.M., Williams, A.C., Lunec, J., Hall, M., and Taylor, A. (1987). Raised cerebrospinal fluid copper concentration in Parkinson's disease. *The Lancet* 330, 238–241.
- Peters, T.L., Beard, J.D., Umbach, D.M., Allen, K., Keller, J., Mariosa, D., Sandler, D.P., Schmidt, S., Fang, F., Ye, W., et al. (2016). Blood levels of trace metals and amyotrophic lateral sclerosis. *NeuroToxicology* 54, 119–126.
- Prohaska, J.R., and Gybina, A.A. (2004). Intracellular Copper Transport in Mammals. *The Journal of Nutrition* 134, 1003–1006.
- Prousek, J. (2007). Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure and Applied Chemistry* 79, 2325–2338.
- Pujol, A.M., Cuillel, M., Jullien, A.-S., Lebrun, C., Cassio, D., Mintz, E., Gateau, C., and Delangle, P. (2012). A Sulfur Tripod Glycoconjugate that Releases a High-Affinity Copper Chelator in Hepatocytes. *Angewandte Chemie International Edition* 51, 7445–7448.
- Richter, F.M., Dauphas, N., and Teng, F.-Z. (2009). Non-traditional fractionation of non-traditional isotopes: Evaporation, chemical diffusion and Soret diffusion. *Chemical Geology* 258, 92–103.
- Roberts, E.A., and Schilsky, M.L. (2008). Diagnosis and treatment of Wilson disease: An update. *Hepatology* 47, 2089–2111.
- Roos, P.M., Vesterberg, O., Syversen, T., Flaten, T.P., and Nordberg, M. (2013). Metal Concentrations in Cerebrospinal Fluid and Blood Plasma from Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Biological Trace Element Research* 151, 159–170.
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., and Deng, H.X. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59–62.
- Sarkar, B. (1997). Early copper histidine therapy in classic menkes disease. *Annals of Neurology* 41, 134–134.
- Sarkar, B., Lingertat-Walsh, K., and Clarke, J.T.R. (1993). Copper-histidine therapy for Menkes disease. *The Journal of Pediatrics* 123, 828–830.
- Sauer, H., Wartenberg, M., and Hescheler, J. (2001). Reactive Oxygen Species as Intracellular Messengers During Cell Growth and Differentiation. *Cellular Physiology and Biochemistry* 11, 173–186.
- Sauzéat, L. (2018). Vieillesse et maladies neurodégénératives : nouvelles contraintes apportées par la métallomique. phdthesis. Université de Lyon.
- Sauzéat, L., Laurençon, A., and Balter, V. (2018a). Metallome evolution in ageing *C. elegans* and a copper stable isotope perspective. *Metallomics* 10, 496–503.
- Sauzéat, L., Bernard, E., Perret-Liaudet, A., Quadrio, I., Vighetto, A., Krolak-Salmon, P., Broussolle, E., Leblanc, P., and Balter, V. (2018b). Isotopic Evidence for Disrupted Copper Metabolism in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *IScience* 6, 264–271.
- Sauzéat, L., Costas-Rodríguez, M., Albalat, E., Mattielli, N., Vanhaecke, F., and Balter, V. (2020). Inter-comparison of stable iron, copper and zinc isotopic compositions in six reference materials of biological origin. *Talanta* 121576.

- Sayre, L.M., Smith, M.A., and Perry, G. (2001). Chemistry and Biochemistry of Oxidative Stress in Neurodegenerative Disease. *Current Medicinal Chemistry* 8, 721–738.
- Schaefer, M., Hopkins, R.G., Failla, M.L., and Gitlin, J.D. (1999). Hepatocyte-specific localization and copper-dependent trafficking of the Wilson's disease protein in the liver. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 276, G639–G646.
- Schauble, E.A. (2004). Applying Stable Isotope Fractionation Theory to New Systems. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 55, 65–111.
- Scheiber, I.F., Mercer, J.F.B., and Dringen, R. (2014). Metabolism and functions of copper in brain. *Progress in Neurobiology* 116, 33–57.
- Scheinberg, I.H., Sternlieb, I., Schilsky, M., and Stockert, R.J. (1987). Penicillamine may detoxify copper in Wilson's disease. *The Lancet* 330, 95.
- Schroeder, H.A., Nason, A.P., Tipton, I.H., and Balassa, J.J. (1966). Essential trace metals in man: Copper. *Journal of Chronic Diseases* 19, 1007–1034.
- Shaw, P.J., and Ince, P.G. (1997). Glutamate, excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology* 244, S3–S14.
- Siggs, O.M., Cruite, J.T., Du, X., Rutschmann, S., Masliah, E., Beutler, B., and Oldstone, M.B.A. (2012). Disruption of copper homeostasis due to a mutation of Atp7a delays the onset of prion disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 13733–13738.
- Solovyev, N., El-Khatib, A.H., Costas-Rodríguez, M., Schwab, K., Griffin, E., Raab, A., Platt, B., Theuring, F., Vogl, J., and Vanhaecke, F. (2021). Cu, Fe, and Zn isotope ratios in murine Alzheimer's disease models suggest specific signatures of amyloidogenesis and tauopathy. *Journal of Biological Chemistry* 296, 100292.
- Squitti, R., Pasqualetti, P., Forno, G.D., Moffa, F., Cassetta, E., Lupoi, D., Vernieri, F., Rossi, L., Baldassini, M., and Rossini, P.M. (2005). Excess of serum copper not related to ceruloplasmin in Alzheimer disease. *Neurology* 64, 1040–1046.
- Stoj, C., and Kosman, D.J. (2003). Cuprous oxidase activity of yeast Fet3p and human ceruloplasmin: implication for function. *FEBS Letters* 554, 422–426.
- Takahashi, N., Ortel, T.L., and Putnam, F.W. (1984). Single-chain structure of human ceruloplasmin: the complete amino acid sequence of the whole molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81, 390–394.
- Taylor, J.P., Brown, R.H., and Cleveland, D.W. (2016). Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature* 539, 197–206.
- Télouk, P., Puisieux, A., Fujii, T., Balter, V., Bondanese, V.P., Morel, A.-P., Clapisson, G., Lamboux, A., and Albarede, F. (2015). Copper isotope effect in serum of cancer patients. A pilot study. *Metallomics* 7, 299–308.
- Tennant, A., Rauk, A., and Wieser, M.E. (2017). Computational modelling of the redistribution of copper isotopes by proteins in the liver. *Metallomics* 9, 1809–1819.
- Toni, M., Massimino, M.L., Griffoni, C., Salvato, B., Tomasi, V., and Spisni, E. (2005). Extracellular copper ions regulate cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) expression and metabolism in neuronal cells. *FEBS Letters* 579, 741–744.
- Tønnesen, T., Kleijer, W.J., and Horn, N. (1991). Incidence of Menkes disease. *Human Genetics* 86.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1996). The Whole Structure of the 13-Subunit Oxidized Cytochrome c Oxidase at 2.8 Å. *Science* 272, 1136–1144.

- Urey, H.C. (1947). The thermodynamic properties of isotopic substances. *Journal of the Chemical Society* 562–581.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., and Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry* 266, 37–56.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160, 1–40.
- Van Heghe, L., Engström, E., Rodushkin, I., Cloquet, C., and Vanhaecke, F. (2012). Isotopic analysis of the metabolically relevant transition metals Cu, Fe and Zn in human blood from vegetarians and omnivores using multi-collector ICP-mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27, 1327.
- Van Heghe, L., Deltombe, O., Delanghe, J., Depypere, H., and Vanhaecke, F. (2014). The influence of menstrual blood loss and age on the isotopic composition of Cu, Fe and Zn in human whole blood. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29, 478–482.
- Vinceti, M., Bergomi, M., Nacci, G., Pietrini, V., Ferrari, A., Fortini, K., Guidetti, D., Sola, P., Rocchi, E., Mancina, D., et al. (2002). Erythrocyte zinc, copper, and copper/zinc superoxide dismutase and risk of sporadic amyotrophic lateral sclerosis: a population-based case-control study. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders* 3, 208–214.
- Walshe, J.M. (1956). Penicillamine, a new oral therapy for Wilson's disease. *The American Journal of Medicine* 21, 487–495.
- Walshe, J.M. (1969). Management of penicillamine nephropathy in Wilson's disease: a new chelating agent. *The Lancet* 294, 1401–1402.
- Warburg O. and Krebs H.A. (1927). Über locker gebundenes Kupfer und Eisen im Blutserum. *Biochem. Z* 143–149.
- Wilson, S.A.K. (1912). Progressive lenticular degeneration. *British Medical Journal* 2, 1645.
- Xu, X., Pin, S., Gathinji, M., Fuchs, R., and Harris, Z.L. (2004). Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1012, 299–305.
- Yan, S.D., Chen, X., Schmidt, A.M., Brett, J., Godman, G., Zou, Y.S., Scott, C.W., Caputo, C., Frappier, T., and Smith, M.A. (1994). Glycated tau protein in Alzheimer disease: a mechanism for induction of oxidant stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 7787–7791.
- Yoshii, J., Yoshiji, H., Kuriyama, S., Ikenaka, Y., Noguchi, R., Okuda, H., Tsujinoue, H., Nakatani, T., Kishida, H., Nakae, D., et al. (2001). The copper-chelating agent, trientine, suppresses tumor development and angiogenesis in the murine hepatocellular carcinoma cells. *International Journal of Cancer* 94, 768–773.
- Zaitseva, I., Zaitsev, V., Card, G., Moshkov, K., Bax, B., Ralph, A., and Lindley, P. (1996). The X-ray structure of human serum ceruloplasmin at 3.1 Å: nature of the copper centres. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 1, 15–23.
- Zheng, W., and Monnot, A.D. (2012). Regulation of brain iron and copper homeostasis by brain barrier systems: Implication in neurodegenerative diseases. *Pharmacology & Therapeutics* 133, 177–188.
- Zhou, B., and Gitschier, J. (1997). hCTR1: A human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 7481–7486.
- Zhu, X.K., Guo, Y., Williams, R.J.P., O'Nions, R.K., Matthews, A., Belshaw, N.S., Canters, G.W., de Waal, E.C., Weser, U., Burgess, B.K., et al. (2002). Mass fractionation processes of transition metal isotopes. *Earth and Planetary Science Letters* 200, 47–62.

Zimnicka, A.M., Maryon, E.B., and Kaplan, J.H. (2007). Human Copper Transporter hCTR1 Mediates Basolateral Uptake of Copper into Enterocytes: Implications for copper homeostasis. *Journal of Biological Chemistry* 282, 26471–26480.

# **Annexes**



## Annexe 1- Concentration en Cu chez les personnes atteintes de cancer

Concentration en cuivre sérique chez les personnes saines et les patients atteints de cancer  
D'après Gupta et Mumper (2009).

Auteurs	Cancer	Concentration sérique en Cu chez les sujets sains ( $\mu\text{g/dL} \pm \text{SD}$ )	Concentration sérique en Cu chez les patients atteints de cancer ( $\mu\text{g/dL} \pm \text{SD}$ )	Nombre de sujets (niveau de signification par rapport aux contrôles ( $p$ value))
Carpentieri et al.	Leucémie lymphoïde aiguë	114 $\pm$ 29	328 $\pm$ 74	21 ( $p < 0.01$ )
Huang et al.	Cancer du sein	115 $\pm$ 20	131 $\pm$ 20	35 ( $p < 0.01$ )
Chan et al.	Cancer cervical	92.9	129.3	19 ( $p < 0.001$ )
Chan et al.	Cancer ovarien	92.9	139.5	4 ( $p < 0.001$ )
Cohen et al.	Lymphome non hodgkinien	120.4 $\pm$ 23.3	134.9 $\pm$ 42.4 (Stade I)	
			176.1 $\pm$ 66.3 (Stade II)	
			176.9 $\pm$ 37.5 (Stade III)	
			157.7 $\pm$ 49.6 (Stade IV)	
Yucel et al.	Cancer du sein	122.4 $\pm$ 15.8	222.7 $\pm$ 44.4 (Stade I)	35
			203.9 $\pm$ 31.3 (Stade II)	
			238.1 $\pm$ 36.8 (Stade III)	
			228.4 $\pm$ 38.0 (Total)	
Diez et al.	Cancer du poumon	100 $\pm$ 18.2	125 $\pm$ 20.2 (Stade I et II)	65 ( $p < 0.001$ )
			150 $\pm$ 33.8 (Stade III)	
Habib et al.	Cancer de la prostate	84.1 $\pm$ 6.27	124 $\pm$ 8.3	44 ( $p < 0.01$ )
Rajput et al.	Tumeur du système réticulo endothélial	115.8 $\pm$ 13.9 (hommes)	228.0 $\pm$ 52.4 (hommes)	70 ( $p < 0.001$ )
		118.9 $\pm$ 17.1 (femmes)	225.4 $\pm$ 61.8 (femmes)	
Scanni et al.	(1) Cancer du poumon	143.0 $\pm$ 3.2	188.2 $\pm$ 14.8 (Poumons)	20 ( $p < 0.01$ )
	(2) Cancer de l'estomac		171.9 $\pm$ 7.3 (Estomac)	33 ( $p < 0.01$ )
	(3) Cancer colorectal		164.7 $\pm$ 13.4 (Colorectal)	22 ( $p < 0.05$ )
Gupta et al.	Cancer colorectal	98.8 $\pm$ 24.3	165 $\pm$ 33.9	30 ( $p < 0.001$ )
Zuo et al.	Leucémies	86.7 $\pm$ 25.3	132.8 $\pm$ 50.6 (leucémie aiguë)	41 ( $p < 0.01$ )
			129.1 $\pm$ 49.8 (Leucémie lymphoïde aiguë)	7 ( $p < 0.01$ )
			139.9 $\pm$ 51.2 (Leucémie non-lymphoïde aiguë)	34 ( $p < 0.001$ )
			109.2 $\pm$ 45.4 (Leucémie myéloïde chronique)	8 ( $p < 0.05$ )
Jayadeep et al.	(1) Leucoplasie orale	66.9 $\pm$ 22.0 (hommes)	89.6 $\pm$ 19.0 (hommes)	21
			95.2 $\pm$ 17.0 (femmes)	25 ( $p < 0.001$ )
	(2) Carcinome cellulaire squameux	66.8 $\pm$ 14.0 (femmes)	108.9 $\pm$ 17.0 (hommes)	22 ( $p < 0.001$ )
			107.8 $\pm$ 12.0 (femmes)	20 ( $p < 0.001$ )
Lightman et al.	Cancer ovarien	133 $\pm$ 17.0 (Benin, $n = 42$ )	160 $\pm$ 17.0 (Stade I)	2
			190 $\pm$ 6.0 (Stade II)	4
			179 $\pm$ 18.0 (Stade III)	19 ( $p < 0.001$ )
			210 $\pm$ 23.0 (Stade IV)	11
Kuo et al.	Cancer du sein	96.5 $\pm$ 7.3 (Contrôle) $n = 26$	125.2 $\pm$ 15.0	25 ( $p < 0.01$ )
		103.8 $\pm$ 8.3 (Benin) $n = 43$		
Sharma et al.	Cancer du sein	100.7 $\pm$ 40.5	172.8 $\pm$ 12.2	50 ( $p < 0.01$ )



Concentration en cuivre dans les tissus de sujets sains et de patients atteints de cancer. D'après Gupta et Mumper (2009).

Auteurs	Cancer	Concentration en Cu dans les tissus chez les sujets sains ( $\mu\text{g/g} \pm \text{SD}$ )	Concentration en Cu dans les tissus des patients atteints de cancer ( $\mu\text{g/g} \pm \text{SD}$ )	Nombre de sujets (niveau de signification par rapport aux contrôles ( <i>p</i> value))
Kuo et al.	Cancer du sein	6.13 $\pm$ 4.32 (Normal)	11.08 $\pm$ 4.98 (Stade I)	25
			10.10 $\pm$ 5.61 (Stade II)	
		6.51 $\pm$ 5.33 (Bénin)	17.18 $\pm$ 11.83 (Stade III)	
Rizk et al.	Cancer du sein	9.3 $\pm$ 2.3	21.0 $\pm$ 10.7	22 ( <i>p</i> < 0.0001)
Yaman et al.	Cancer ovarien	0.2–0.9	0.4–2.8	10
Gupta et al.	Cancer colorectal	1.79 $\pm$ 0.57	2.78 $\pm$ 0.84	30 ( <i>p</i> < 0.001)
Santoliquido et al.	Cancer du sein	2.38	3.25	20
Geraki et al.	Cancer du sein	0.29 $\pm$ 0.29 ppm	0.89 $\pm$ 0.56 ppm	40
Margalioth et al.	Cancer colorectal	1.53 $\pm$ 0.35	1.90 $\pm$ 0.6	24 ( <i>p</i> < 0.05)
	Cancer de l'estomac	1.44 $\pm$ 0.38	2.09 $\pm$ 0.52	7 ( <i>p</i> < 0.02)
	Cancer ovarien	1.26 $\pm$ 0.45	2.16 $\pm$ 0.63	5 ( <i>p</i> < 0.01)
	Cancer du sein	1.58 $\pm$ 0.62	1.91 $\pm$ 0.56	8
	Cancer du rein	1.80 $\pm$ 0.42	1.61 $\pm$ 0.25	3
	Cancer de la vessie	1.54	2.80 $\pm$ 0.3	2
	Cancer des testicules	1.48 $\pm$ 0.7	1.43	1
	lymphome hodgkinien	1.42 $\pm$ 0.44	3.18	1
	Total	1.42 $\pm$ 0.44	2.08 $\pm$ 0.76	53 ( <i>p</i> < 0.001)
Mulay et al.	Cancer du sein	1.47 ppm	5.12 ppm	15 ( <i>p</i> < 0.01)
Yaman et al.	Cancer de l'estomac	1.1 $\pm$ 0.4	1.7 $\pm$ 0.1	18 ( <i>p</i> < 0.01)
Lightman et al.	Cancer ovarien	1.95 $\pm$ 0.64	2.17 $\pm$ 0.64	40
Carpentieri et al.	Leucémies	15 $\pm$ 4 $\mu\text{g}/10^6$ cellules	52 $\pm$ 16 $\mu\text{g}/10^6$ cellules	12 ( <i>p</i> < 0.01)

## Annexe 2 - Données du chapitre 3

Concentrations et mesures de compositions isotopiques du Cu, REC (rapport du Cuivre échangeable / cuivre total), niveau de fibrose et forme phénotypique chez les malades de Wilson et les contrôles.

ID	disease	treatment	sexe	age	sampling.date	Cu ( $\mu\text{g/L}^{-1}$ )	$\delta^{65}\text{Cu}$	REC	MELD	Fibrosis class	Form
CREM	WD	Trientine	F	7	14/09/18	332.22	1.09	26.9	7	F0-F2	Hepatic
PALA	WD	Trientine	F	18	21/03/14	321.18	-1.13	14.2	9	F3-F4	Hepatic
MOKA	WD	Trientine	F	40	05/04/13	421.82	-2.33	55.4		F3-F4	Neurologic
DECH	WD	Trientine	M	16	16/11/12	424.09	-0.97	39.8	7	F0-F2	Hepatic
DEAU	WD	Trientine	M	18	16/11/12	387.21	-1.2	104		F3-F4	Hepatic
PAPH	WD	Trientine	M	52	20/11/12	357.53	-1.44	33.5	7	F3-F4	Neurologic
MALE	WD	Trolovol	M	10	01/04/14	236.85	-1.2	15.7	8	F3-F4	Hepatic
DEKE	WD	Trolovol	M	11	31/05/13	277.74	-1.05	34.1	8	F3-F4	Neurologic
FEJU	WD	Trolovol	M	13	12/06/13	313.25	-1.1	61.1		F3-F4	Hepatic
ANEF	WD	Trolovol	M	15	17/05/13	410.83	-0.84	243	7	F0-F2	Hepatic
DUSEN	WD	Trolovol	M	17	07/06/13	454.07	-1.02	47.6	10	F3-F4	Neurologic
DEKR	WD	Trolovol	M	17	31/05/13	563.29	-0.36	35.6	7	F3-F4	Hepatic
DUEM	WD	Trolovol	M	22	07/06/13	201.4	-0.26	40.2	9	F3-F4	Hepatic
JEAN	WD	Trolovol	M	27	21/03/14	454.33	-0.72	17.5	7	F3-F4	Hepatic
PEEV	WD	Trolovol	F	8	15/06/18	258.56	0.01	20.8	7	F0-F2	Hepatic
OUCH	WD	Trolovol	F	10	15/06/18	505.04	-0.79	8.9	7	F0-F2	Hepatic
PECA	WD	Trolovol	F	13	27/03/13	392.99	-0.85	84.4	7	F0-F2	Hepatic
AZWA	WD	Trolovol	F	15	25/07/14	355.28	-2.61	45.1	8	F3-F4	Neurologic
PALA	WD	Trolovol	F	16	23/11/12	484.84	-1.15	217	8	F3-F4	Hepatic
POLI	WD	Trolovol	F	16	05/04/13	345.29	-1.2	55.4	8	F3-F4	Neurologic
DIMA	WD	Trolovol	F	17	04/06/18	243.09	-0.74	32	8	F3-F4	Hepatic
DUSER	WD	Trolovol	F	18	07/06/13	460	-1.18	16.5	8	F3-F4	Hepatic
BOAU	WD	Trolovol	F	28	28/02/13	747.44	-1.6	20.4	7	F0-F2	Neurologic
JEJI	WD	Trolovol	F	38	12/04/13	384.25	-1.09	19.8	6	F0-F2	Hepatic
MOVA	WD	Trolovol	F	47	19/08/14	364.7	-0.64	35.7		F3-F4	Neurologic
LERLO	WD	Untreated	M	4	05/09/14	281.16	0.16	30.4		F0-F2	Hepatic
DEKEL	WD	Untreated	M	9	16/03/18	383.53	0.48	27	6	F0-F2	Hepatic
DIHU	WD	Untreated	M	13	21/07/14	347.25	0.07	95	8	F3-F4	Hepatic
BEYA	WD	Untreated	M	22	24/10/14	221.26	0.04	35.7	6	F0-F2	Presymp
BOJP	WD	Untreated	M	24	28/02/13	773.23	-1.81	10.9	8	F3-F4	Neurologic
CREM	WD	Untreated	F	3	01/08/14		1.26	60	6	F0-F2	Hepatic
PEEV	WD	Untreated	F	4	21/03/14	227.33	0.23	28.8	6	F0-F2	Hepatic
DIMA	WD	Untreated	F	13	23/06/14	497.38	-0.62	40	16	F3-F4	Hepatic
TASH	WD	Untreated	F	13	12/09/14	389.77	0.22	37	6	F0-F2	Hepatic
BEWA	WD	Untreated	F	19	24/10/14	151.45	0.61	28.7	6	F0-F2	Presymp
NALU	WD	Untreated	F	26	09/02/18	462.51	-1.11	54.7	7	F3-F4	Neurologic
STRO	Control		M	1		766.04	-0.08				
SAAD	Control		M	2		1539.26	-0.58				
BOAD	Control		M	3		1219.06	0.19				
BEAR	Control		M	3		961.51	-0.15				
DUAL	Control		M	4		981.85	0.03				
SIMA	Control		M	4		902.47	-0.23				
BODA	Control		M	4		1090.32	-0.11				
MIAG	Control		M	6		964.39	-0.16				
RECL	Control		M	7		1278.72	-0.87				
REMA	Control		M	7		976.2	-0.27				
BUDI	Control		M	8		911.33	-0.52				
MIAM	Control		M	8		821.24	-0.3				
BIPI	Control		M	10		716.92	0.45				
BEYA	Control		M	11		1054.86	-0.39				

---

ZOSU	Control	M	11	724.94	-0.05
BEYA	Control	M	11	1076.2	-0.26
MULO	Control	M	13	904.48	0.24
DEAU	Control	M	13	923.35	-0.39
175062	Control	M	18	762.46	0.39
175089	Control	M	18	816.82	0.12
1015837	Control	M	19	825.48	0.43
1019934	Control	M	19	716.28	0.06
1015714	Control	M	20	635.76	0.13
1003406	Control	M	20	805.69	0.22
1020230	Control	M	20	913.5	0.28
1020257	Control	M	21	614.41	0.3
1015861	Control	M	21	551.68	-0.21
101595-	Control	M	21	699.3	0.17
1015992	Control	M	21	572.98	0.35
1015925	Control	M	22	568.24	0.18
1015941	Control	M	22	626.03	0.13
1003430	Control	M	22	882.05	0.25
1015669	Control	M	22	824.41	0.31
101990-	Control	M	22	570.93	0.11
1020513	Control	M	24	716.51	-0.19
1003502	Control	M	25	891.77	0.11
1935	Control	M	25	975.98	-0.08
1019694	Control	M	25	638.02	0.18
1943	Control	M	35	778.81	0.11
195936	Control	M	35	932.39	0.21
SACR	Control	F	2	984.97	-0.18
ETGE	Control	F	4	1108.47	-0.46
BOAL	Control	F	5	950.6	-0.13
BOIO	Control	F	5	976.99	-0.2
VADI	Control	F	5	1163.55	-0.39
VADE	Control	F	8	1087.73	-0.49
BEMA	Control	F	9	911.4	-0.18
SAMA	Control	F	12	753.5	0.04
NIAN	Control	F	13	764.29	-0.05
MIVA	Control	F	13	915.92	-0.3
16891 1	Control	F	19	954.05	0.22
16892 -	Control	F	19	1696.86	-0.18
16848 7	Control	F	19	1305.55	-0.52
22936 6	Control	F	19	1529.59	-0.01
22940 3	Control	F	19	931.47	-0.09
23056 -	Control	F	19	1537.9	-0.2
16849 5	Control	F	20	870.13	0.22
16888 2	Control	F	20	1914.74	-0.17
20165 4	Control	F	20	792.27	0.17
20166 2	Control	F	20	1428.85	0.11
20266 5	Control	F	20	847.84	0.03
22946 2	Control	F	20	1399.48	-0.25
23058 6	Control	F	20	1079.39	0.17
23060 7	Control	F	20	1687.23	-0.04
23062 3	Control	F	21	1284.45	0.04
20164 6	Control	F	21	1523.36	0.01
22943 8	Control	F	21	1040.48	0.15
22935 8	Control	F	21	1267.67	-0.35
22458 1	Control	F	22	889.41	-0.17
22461 0	Control	F	22	913.5	0.17
22939 0	Control	F	22	1439.84	0
20268 1	Control	F	31	760.2	0.32
16843 6	Control	F	32	1602.09	0.12
22480 5	Control	F	32	1282.12	-0.04
22495 2	Control	F	34	1011.34	0.27

Concentrations et mesures des compositions isotopiques du Cu chez les souris *Atp7b*<sup>-/-</sup> (modèle murin de la maladie de Wilson) dans les fèces, le plasma et le foie.

ID	âge (semaines)	Fèces		Plasma		Foie	
		Cu en µg/g	δ <sup>65</sup> Cu (‰)	Cu en µg/g	δ <sup>65</sup> Cu (‰)	Cu en µg/g	δ <sup>65</sup> Cu (‰)
M2	45	47.94	0.23	0.53	-0.9	551.93	-0.84
M3	45	44.57	0.19	0.58	-1.58	479.30	-1.78
M4	45	51.06	-0.03	0.32	-1.23	362.68	-1.73
M5	45	45.46	0.03	0.51	-1.56	443.83	-1.88
M7	45	44.73	0.20	0.73	-0.77	571.05	-1.97
M8	45	36.86	0.07	0.65	-2.39	735.38	-2.45
M9	45	40.84	0.07	0.73	-1.99	475.23	-1.82
M10	45	36.52	-0.09	0.29	-1.49	373.51	-2.26
M11	45	42.74	0.05	0.54	-2.19	324.25	-1.95
M39	45	49.30	-0.06	0.33	-1.45	384.20	-1.69
M40	45	33.55	0.04	0.41	-1.66	467.09	-1.74
M41	45	33.35	0.07	0.72	-2.37	578.08	-2.25
F52	11-12	46.99	0.48	0.48	-0.20	263.56	-0.43
F53	11-12	35.65	0.27	0.41	-0.35	238.33	-0.64
F56	11-12	54.77	0.33	0.40	-0.24	282.07	-0.61
M54	11-12	46.32	0.30	0.48	-0.49	300.62	-0.59
M55	11-12	45.31	0.31	0.41	-0.19	264.87	-0.40
M59	11-12	50.58	0.28	0.35	-0.25	296.39	-0.52
F63	11-12	45.96	0.38			287.97	-0.47
F64	11-12	49.86	0.33	0.36	-0.15	273.75	-0.44
F71	11-12	60.85	0.35			257.86	-0.44
M66	11-12	46.43	0.35	0.17		244.51	-0.56
M36	11-12	58.32	0.36	0.39	-0.42	286.62	-0.47
M67	11-12	52.58	0.25	0.49	-0.52	307.74	-0.83

## Annexe 3 - Données du chapitre 4.1.3

Concentrations en Mg, Cu et Zn en  $\mu\text{g/g}$  dans la bile de souris *Atp7b*<sup>-/-</sup> et WT (**chapitre 4.1.3**) :

	ID	Bile			
		Masse (g)	Mg en $\mu\text{g/g}$	Cu en $\mu\text{g/g}$	Zn en $\mu\text{g/g}$
Souris <i>Atp7b</i> <sup>-/-</sup> traitées par Chel2 en IV à 50mg/kg	F104	0.0037	42.18	6.66	6.46
	F300	0.0076	24.13	2.20	2.52
	F301	0.0075	31.72	4.23	2.77
	M303	0.0075	22.80	0.79	1.36
	M304	0.0065	25.06	0.81	1.23
	M305	0.0046	30.05	1.12	9.83
	M307	0.0082	18.26	0.42	1.74
	F308	0.0041	43.70	2.34	5.34
	F313	0.0050	32.64	3.72	5.57
	F314	0.0066	23.56	1.34	1.66
	M320	0.0031	45.16	2.32	3.71
	F321	0.0055	38.83	3.57	2.90
Souris <i>Atp7b</i> <sup>-/-</sup> non traitées	F315	0.0107	26.73	1.05	2.38
	F316	0.0177	18.55	0.86	0.63
	M322	0.0120	42.87	0.47	1.99
	M324	0.0099	41.39	0.78	0.93
	M325	0.0090	25.58	0.41	1.81
	F333	0.0119	13.96	1.22	5.50
Souris WT C57BL/6	1 M	0.0251	48.98	1.81	1.26
	2 M	0.0153	26.13	0.83	3.09
	3 M	0.0190	48.30	1.52	0.65
	4 F	0.0333	59.97	1.54	2.41
	5 F	0.0280	52.54	1.90	0.49

Concentrations en Mg, Cu et Zn en  $\mu\text{g/g}$  et composition isotopique en Cu ( $\delta^{65}\text{Cu}$  en ‰) dans la bile :

	ID	Bile			
		Masse (g)	Mg en $\mu\text{g/g}$	Cu en $\mu\text{g/g}$	Zn en $\mu\text{g/g}$
Souris <i>Atp7b</i> <sup>-/-</sup> contrôles (traitées par NaCl 0,9% en IP)	M2	0.1102	5.20	0.16	0.09
	M3	0.0418	5.65	0.15	1.87
	M4	0.0131	15.83	0.62	0.35
	M5	0.0976	6.04	0.12	0.57
	M7	0.0007			
	M8	0.0338	31.04	0.29	4.45
	M9	0.0119	27.84	0.30	3.15
	M10	0.0214	22.45	0.68	0.52
	M11	0.1047	5.02	0.06	0.05
	M39	0.0784	4.34	0.53	0.40
	M40	0.0211	28.49	0.45	1.86
	M41	0.004	1.43	0.03	3.08
Souris <i>Atp7b</i> <sup>-/-</sup> traitées par Chel2 en IP à 5mg/kg	M42	0.0044	66.13	2.45	8.00
	M43	0.0077	50.94	2.37	11.31
	M44	0.0086	42.71	1.60	6.08
	M46	0.0164	20.18	0.52	1.21
	M50	0.0198	7.51	0.22	1.43
	F60				
	F66				
	F72	0.013	53.44	7.00	7.53
	F73	0.0123	36.56	4.48	5.04
	F82	0.0085	30.12	6.09	4.22
	F91	0.0746	45.70	4.37	1.08

## **Annexe 4 - Supplementary Information chapitre 4.2.2.2**

Supplementary Information de l'article « A liver-targeting Cu(I) chelator relocates Cu in hepatocytes and promotes Cu excretion in a murine model of Wilson's disease ».

---

## **A liver-targeting Cu(I) chelator relocates Cu in hepatocytes and promotes Cu excretion in a murine model of Wilson's disease.**

Marie Monestier,<sup>a,b</sup> Anaïs M. Pujol,<sup>a,b</sup> Aline Lamboux,<sup>c</sup> Martine Cuillel,<sup>a</sup> Isabelle Pignot-Paintrand,<sup>d</sup> Doris Cassio,<sup>e</sup> Peggy Charbonnier,<sup>a</sup> Khémary Um,<sup>a</sup> Amélie Harel,<sup>a</sup> Sylvain Bohic,<sup>f</sup> Christelle Gateau,<sup>b</sup> Vincent Balter,<sup>c</sup> Virginie Brun,<sup>g</sup> Pascale Delangle,<sup>\*b</sup> Elisabeth Mintz<sup>\*a</sup>

<sup>a</sup> Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IRIG, LCBM, F-38000 Grenoble, France

<sup>b</sup> Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IRIG, SyMMES, F-38000 Grenoble, France

<sup>c</sup> Univ. Lyon, CNRS, ENS de Lyon, 46 Allée d'Italie. F-69342 Lyon, France

<sup>d</sup> Univ. Grenoble Alpes, CNRS, Grenoble INP, LMGP, F-38000 Grenoble, France

<sup>e</sup> INSERM, Univ. Paris Sud, UMR U 1174, F-91405 Orsay, France.

<sup>f</sup> Inserm, UA7, Synchrotron Radiation for Biomedicine (STROBE), 38000, Grenoble, France

<sup>g</sup> Univ. Grenoble Alpes, CEA, INSERM, IRIG, BGE, F-38000 Grenoble, France

## **Electronic Supplementary Information**



---

## Experimental Section.

### ***Chel2 and Chel2\*.***

Chel2 and Chel2\* were synthesized as previously described,<sup>1,2</sup> and stock solutions prepared in ultrapure laboratory grade MilliQ water (resistivity 18 MΩcm).

### ***Cell culture.***

WIF-B9 cells were grown in Coon's modified F12 medium (Sigma) supplemented with HAT ( $10^{-5}$  M hypoxanthine,  $4 \times 10^{-8}$  M aminopterin,  $1.6 \times 10^{-4}$  M thymidine), 5% FBS (Invitrogen), 2 mM glutamine and an anti-biotic and -fungal solution containing 100 µg/mL streptomycin, 100 U/mL penicillin and 0.25 µg/mL amphotericin B. Cells were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere with 7 % CO<sub>2</sub>. They were plated at  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> on plastic tissue culture dishes (Falcon), or on round (12 mm) autoclaved glass cover slips (Esco) in 6, or 12-well plates for fluorescence studies or else at  $1.6 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> on square (3 mm) silicon nitride membranes (Silson, UK) in 4-well plates for XRF studies. The culture medium was renewed every 2-3 days. Experiments were performed 5-7 days later, once bile canaliculi were clearly seen under the microscope (Fig. 1).

### ***Trafficking and immunofluorescence.***

WIF-B9 cells on glass cover slips were incubated at 37 °C for 2 h in the presence of 1 µM Cu, added as CuCl<sub>2</sub>. Then Chel2\* was added to the medium for various times, from 15 min to 3 h, to observe its trafficking. At the chosen times, the cells were rinsed 3 times, permeabilized with methanol for 4 min at -20 °C, rehydrated in PBS and incubated at 37 °C for 45 min with mouse primary antibody EEA1 for early endosomes (1/200 BD Biosciences), or rabbit primary antibody RAB7 for late endosomes (1/200 Santa Cruz), or rabbit primary polyclonal antibody LAMP1 for late endosomes/lysosomes (1/200, ab19294 Abcam) or P58K for the trans-Golgi network (1/200 ab5820 Abcam). After 3 rinses with PBS, cells were incubated for 20 min at 37 °C with a second antibody, a goat antirabbit or antimouse conjugated with Alexa 488 (1/1000 Molecular Probes). For lysosomes, we also used a direct marker LysoTracker™ Green DND-26 (L7526 Molecular Probes) that was added prior to Chel2\* for 30 min to 2 h. Cells were then rinsed 3 times with PBS and the coverslips were mounted on glass slides with a mounting medium (Sigma, M-1289). Each slide was first observed with a Zeiss Axioskop microscope using a Plan-Neofluar 40 x objective lens (NA 1.30 oil immersion) plus optovar 1.25 and the following filters: red  $\lambda_{\text{ex}}$  545/25 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  607.5/65 nm and green  $\lambda_{\text{ex}}$  470/40 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  540/50 nm.

Then confocal images were obtained with a Zeiss LSM-700 laser scanning confocal microscope equipped with an Axiovert 200 microscope and a 40 x 1.3 NA plan-Neofluar oil differential interference

contrast objective lens. Fluorescent markers and Cyanine 5 were excited with laser diodes at a 488 and 639 nm, respectively. The wavelength for the emission were 518 nm and 660 nm. The pixel sizes were  $0.10 \times 0.10 \mu\text{m}^2$  and pinholes were set to one Airy unit (*i.e.* 32 and 40  $\mu\text{m}$ ). The co-localization analysis was performed on a pixel by pixel basis with the co-localization module of the Zen software (Zeiss). The crosshairs were centred in the scatterplot at the same position for all markers. For easier visualization of the pixels exhibiting co-localization we assigned a yellow colour to pixels from quadrant 3 (false colour).

***Nano-XRF : WIF-B9 cell preparation, acquisition, data treatment and quantification***

Trace select water (95305) and methanol (42105) from Sigma were used for the XRF experiments. WIF-B9 cells on silicon nitride membranes were incubated at 37 °C for 2-5 h in the presence of 0, 1 or 15  $\mu\text{M}$  added Cu to observe the metal distribution in the cells. In some cases, after for 2 h in 1  $\mu\text{M}$  added Cu, the cells were further incubated with 50  $\mu\text{M}$  Chel2. Then, the cells were washed thoroughly with PBS, immersed into methanol for 4 min at -20 °C for chemical cryofixation, air-dried overnight and reported to yield very clean samples.<sup>3,4</sup>

X-ray fluorescence analysis was performed at the nano-imaging station ID22NI,<sup>5</sup> using the intrinsic monochromaticity of the undulators of about  $\delta\lambda/\lambda \approx 0.01$ . The experimental station is located at a distance of 63 m from the undulator source and at 37 m from the high power slits used as secondary source in the horizontal direction (25  $\mu\text{m}$  slit opening). The synchrotron radiation is focused by an X-ray optical device consisting of two elliptically shaped mirrors acting in two orthogonal planes using the so-called Kirkpatrick-Baez geometry.<sup>6</sup> The mirrors are coated with a graded multi-layer. No other monochromator is used in the setup, resulting in a very high and unique X-ray flux (up to  $10^{12}$  photons/s) at energies between 15 and 29 keV. In this work, the energy of the pink photon beam was set to 17.5 keV for all experiments. The focused beam was characterized by translation of a gold stripe of a nano-fabricated test pattern (Xradia, USA) recording both the transmitted intensity by a diode and the fluorescence emission line by a silicon drift detector (vortex-EX, SII NanoTechnology Inc., USA). The X-ray spot size was measured to be 86 nm horizontally by 94 nm vertically (FWHM). The samples were positioned in the focal plane of the KB system and translated by piezo-stages in the directions perpendicular to the beam. The X-ray fluorescence spectra of several samples were collected by the silicon drift energy dispersive detector positioned in the horizontal plane at 75° of the incoming X-ray beam. Based on the X-ray fluorescence energy spectrum, the areal mass ( $A_{mass}$ ) of the element can be calculated through a fitting procedure. The samples being scanned were deposited on  $3 \times 3 \text{ mm}^2$  membranes made of 500 nm thick silicon nitride ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) (Silson, Blisworth, UK). A step-size of 150 nm was used and the dwell time of 200 ms. The collected spectra were fitted using PyMCA software<sup>7</sup> and calibrated using the NIST SRM 1577c bovine liver standard (NIST, Gaithersburg, USA) to

---

obtain different elemental distributions and concentrations (areal mass density,  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) as previously published.<sup>8-10</sup>

**Atomic Force Microscopy** allows imaging the surface morphology at nanoscale resolution and measuring the force at nanoNewton scale. AFM can investigate thin and thick film coatings, synthetic and biological membranes, metals, polymers, semiconductors and study locally the electric, magnetic or mechanical properties of the sample.<sup>11</sup> Thanks to its versatility, AFM became a tool of choice in biophysics.<sup>12</sup> The WIF-B9 thickness was measured using Atomic force microscopy in Tapping mode under ambient conditions on an Asylum MFP-3D AFM instrument equipped with acoustic box. In this MFP-3D AFM the planar scan relies on an (X, Y) scanner in closed loop while an independent piezoelectric element drives the Z displacement of the probe according to the open feedback loop control. A standard Tapping probe was used with a measured resonant frequency of 325 kHz and a cantilever stiffness of about 45 N/m (average value provided by the manufacturer data sheet). The AFM topographic images were recorded with a numerical resolution of  $256 \times 256$  pixels. The Tapping mode is implemented in ambient air by exciting the cantilever assembly near the cantilevers resonant frequency using a dedicated piezoelectric crystal. Thanks to this mechanical excitation, the cantilever oscillates with amplitude of typically few tens of nanometers; this amplitude is modulated when the tip comes into contact with the surface. The AFM measurement was performed on the fixed cells that were further measured by X-ray fluorescence. An average thickness of  $0.9 \pm 0.1 \mu\text{m}$  (N=18) was obtained at the Surface Science Laboratory of the ESRF.

***<sup>65</sup>Cu solution for injection.***

A 1 mg/mL <sup>65</sup>Cu solution was prepared by adding <sup>65</sup>CuO (CULM-4577-PK, Eurisotop) to a 0.1N HCl solution and stirred overnight. It was further used to prepare a 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  <sup>65</sup>Cu solution in a sterile 1.4% NaHCO<sub>3</sub> solution. The mice were injected 50  $\mu\text{L}$  of the 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  <sup>65</sup>Cu solution in their caudal vein. For control experiments, *i.e.* without <sup>65</sup>Cu, the same volume of 1.4% NaHCO<sub>3</sub> solution was injected.

***Chel2 solution for injection.***

A 10 mg/mL Chel2 solution was prepared in a sterile NaCl 0.9% solution. For IV treatment, a 30 mg/kg dose was intravenously injected in the caudal vein after weighing each animal. For control experiments, *i.e.* without Chel2, a volume of NaCl 0.9% was injected that was equivalent to 3 times the weight of the animal. For SC treatment, a 50 mg/kg dose was subcutaneously injected in the back of the mice at the neck level.

---

***Mice, animal care, and experimental procedure.***

The *Atp7b*<sup>-/-</sup> mice have been described earlier;<sup>13</sup> they were kindly given to us by Prof. Svetlana Lutsenko. All mice were housed under the same conditions at the animal facilities of the Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA, Grenoble, France) that has accreditation from the French authorities under the reference D3818510001. Animal breeding, housing and experiments were performed in strict accordance with the French animal testing regulation. The mice were kept on a 12 h/12 h light/dark cycle and fed with maintenance dry food #3469 (Kliba Nafag CH), containing 14 mg/kg copper. For <sup>65</sup>Cu experiments, 29 adult *Atp7b*<sup>-/-</sup> mice (9 to 18 weeks of age) were fed with food containing only 0.367 mg/kg copper (C1041 Altromin dry food) for 3-5 weeks, a long enough period of time to lower and stabilize the copper content in their faeces. Food and water were provided ad libitum. Altogether, 29 *Atp7b*<sup>-/-</sup> mice were included in the study and separated into 4 groups. In 2 Chel2 groups, the mice received one <sup>65</sup>Cu dose by IV injection followed by 4 or 8 Chel2 doses. The treatment was either intravenously or subcutaneously injected, once a day for 4 days in a row, during 1 or 2 weeks. In the control groups, 4 mice received either one 1.4% NaHCO<sub>3</sub> solution injection followed by 4 Chel2 doses (once a day for 4 days in a row) or one <sup>65</sup>Cu dose followed by 4 NaCl 0.9% solution injections (once a day for 4 days in a row). Every other day, half of the mice were transferred to metabolism cages to allow the collection of their 24h-hour faeces. This protocol was approved by the French Research Ministry under the reference APAFIS #926-20 1506251 0212698 v4. One mouse died during the experiment.

Animals were euthanized by CO<sub>2</sub> inhalation the day after the last injection. Blood was immediately collected by cardiac exsanguination puncture in trace element dedicated tubes (Becton Dickinson Vacutainer, #369032, Le Pont-de-Claix, France) for copper measurements. The serum was collected after a 10-min centrifugation at 3000 rpm; it was kept at -20 °C for further analysis. Livers were removed rapidly after exsanguination, immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C. Faeces and livers were weighted (wet weight) and sent to the Laboratoire de Géologie for further analysis.

***Sample preparation for <sup>65</sup>Cu measurement.***

Livers and faeces samples were predigested at room temperature in Savillex® PFA beakers using approximately 5 mL 14 N HNO<sub>3</sub> during 24 hours. Then vials were heated at 110 °C for minimum 3 days; 0.5 mL Suprapur 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was then added on cooled samples. After 2 h at room temperature vials were heated slowly and gradually until 100 °C on hotplate for at least 2 days and evaporated to dryness. Samples were then dissolved in 3 mL 7 N HCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.001 %. A 30 µL aliquot was taken for elemental concentration measurements and a 1 mL solution processed for copper isotope analysis according to the technique of Maréchal et al.<sup>14</sup>

---

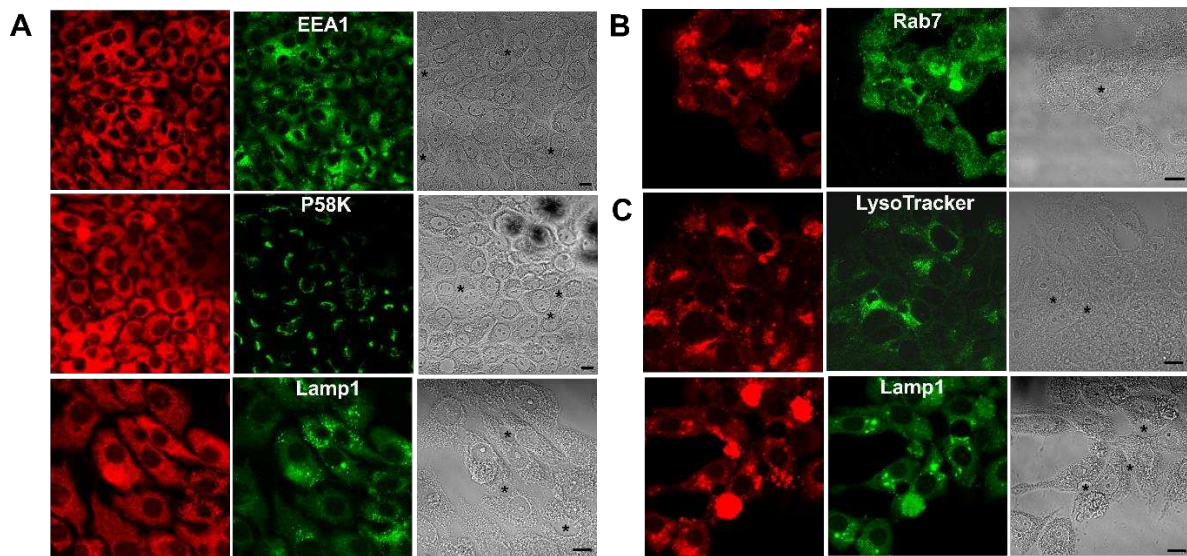
***Instrumentation and measurement protocols.***

Copper isotopic compositions were measured by MC-ICP-MS (Nu 1700 HR). The copper concentrations were adjusted to 300  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  in 0.05 N sub-boiled distilled  $\text{HNO}_3$ . Instrumental mass discrimination was corrected using Zn-doping (Zn JMC-Lyon) and standard sample bracketing.<sup>14</sup> Wet plasma was used to avoid differential isotopic fractionations that occur in the membrane of the desolvating systems. During the whole analysis, the Cu isotopic standard NIST SRM 976 was used to measure  $r_{\text{ref}}$ , the  $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$  standard ratio.

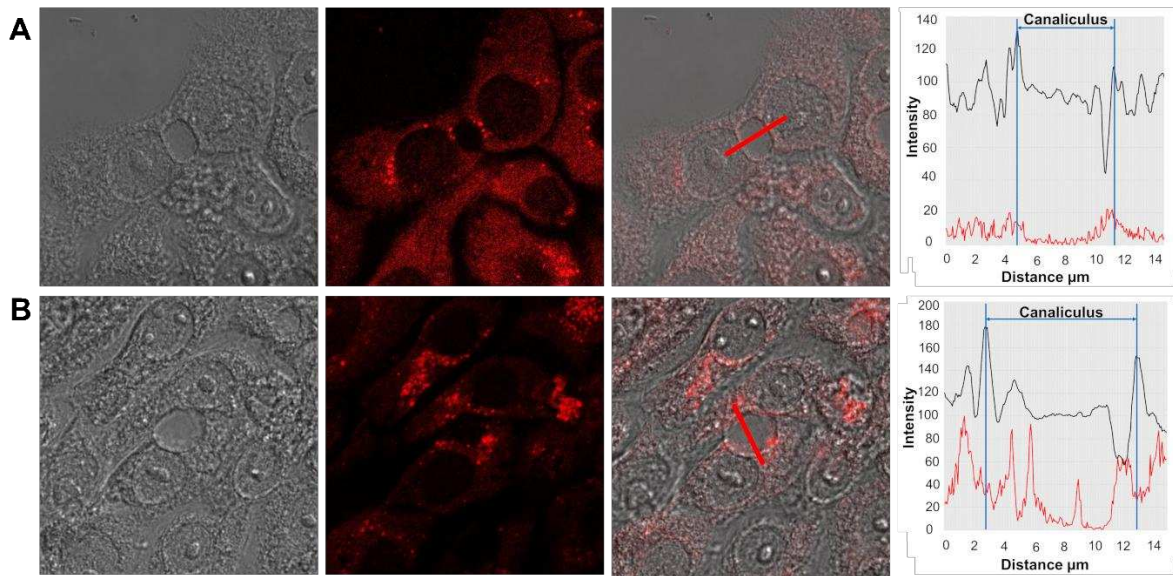
***Statistical analyses***

To analyse the effect of Chel2 on the intracellular copper content and spatial distribution, we gathered 3 datasets from the nano-XRF experiments, basal condition, 1  $\mu\text{M}$  Cu and 1  $\mu\text{M}$  Cu + 50  $\mu\text{M}$  Chel2 (Fig. 5). To analyse the effect of Chel2 on Cu excretion by mice, the  $^{65}\text{Cu}$  experiments also produced 3 datasets, one for each treatment, mock, IV and SC (Fig. 6). The Kruskal-Wallis analysis of variance on ranks is a nonparametric test that is adapted to small size sampling and does not require assuming all the samples were drawn from normally distributed populations of equal variances. ANOVA on ranks was therefore performed, using the SigmaStat option of SigmaPlot Version 13 (Systat Software, San Jose, CA, USA). The result is given as an H statistic value and a P value, the latter being the probability of wrongly rejecting the null hypothesis based on the H value. We choose  $P < 0.05$  to conclude that the distributions are different. When this was the case, multiple comparisons were performed pairwise to identify the different populations (Student-Newman-Keuls Method or Dunn's Method when there is a control group).

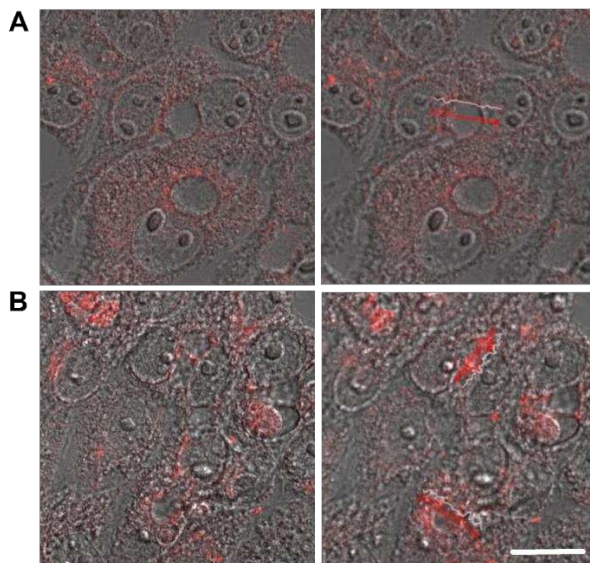
## Supplementary fluorescence images with Chel2\*.



**Fig. S1.** Fluorescence images obtained by confocal microscopy of WIF-B9 epithelia forming canaliculi (\*) and incubated for 2 h with 1  $\mu$ M Cu and for (A) 30 min, (B) 1 h, (C) 2 h with 1  $\mu$ M Chel2\*. Left panels, red fluorescence of Chel2\*; middle panels, green immunofluorescence of various protein markers or fluorescence of LysoTracker<sup>TM</sup> added 2 h before Chel2\*; right panels, phase contrast image. EEA1: early endosomes, P58K: trans-Golgi network, LysoTracker<sup>TM</sup>: lysosomes, Lamp1: late endosome/ lysosome, Rab7: late endosomes. (n) nucleus, scale bar 10  $\mu$ m.



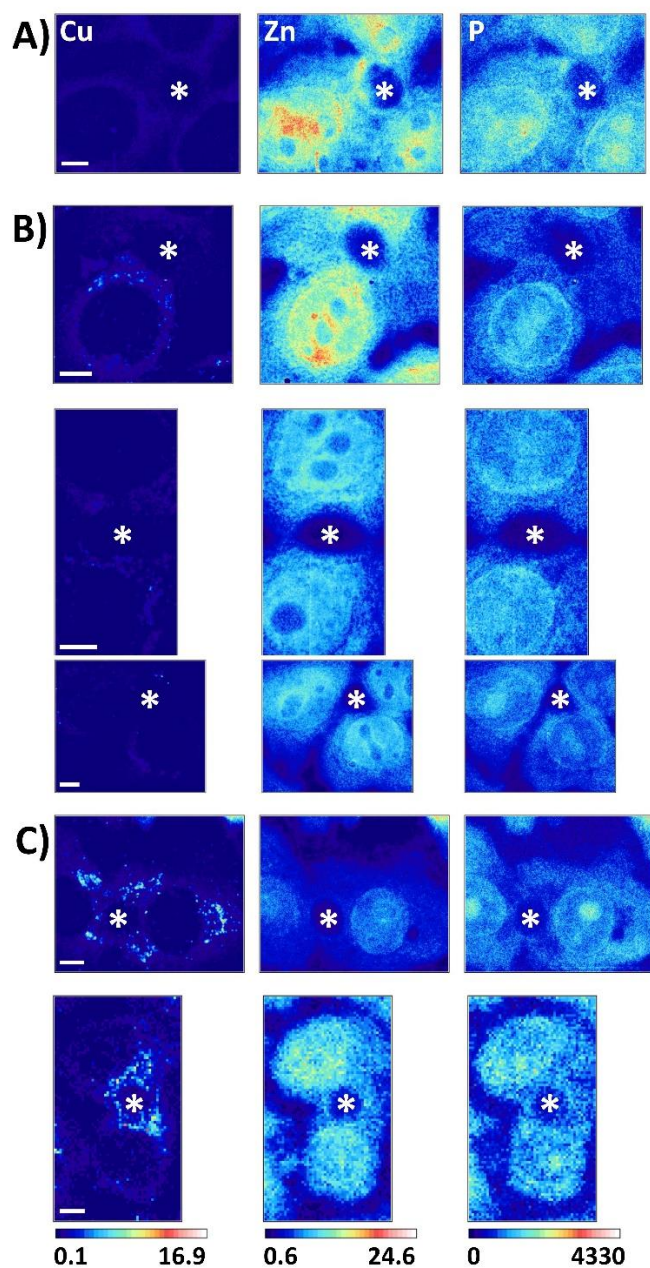
**Fig. S2.** Details of the analysis of Chel2\* position in the region of the canaliculi shown in Fig. 3 in the main text. The analysis was performed on one 2D-section from Z-stack images. From left to right: phase contrast, Chel2\* fluorescence, merge images of phase contrast and red fluorescence, intensity profiles along the 15  $\mu\text{m}$  line crossing the canaliculi.



**Fig. S3.** Other images of canaliculi obtained as in Fig. 3 and Fig. S2. The right panels show the intensity profiles on the canaliculi.

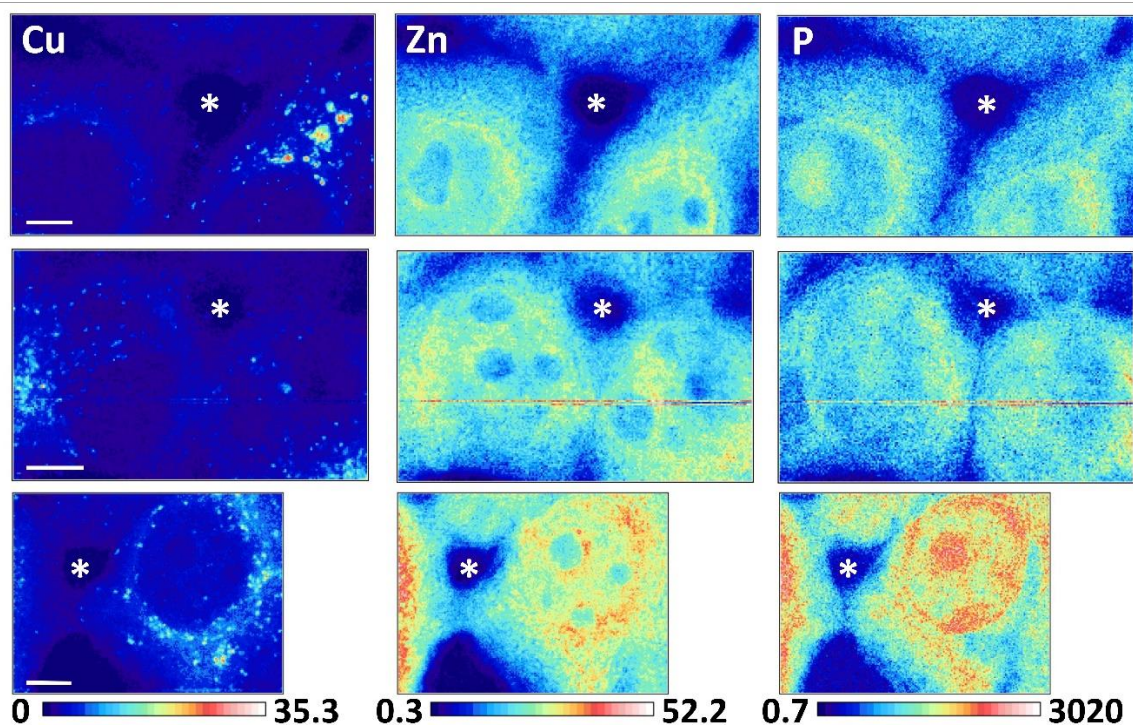


## Supplementary nano XRF images.

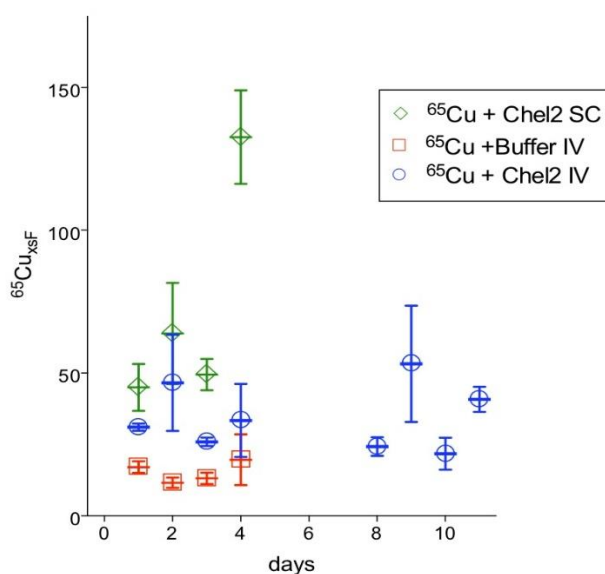


**Fig. S4.** Cell content analysed by nano XRF in WIF-B9 epithelia forming canaliculi under 3 different conditions: (A) basal Cu, (B) after 2 h with 1  $\mu\text{M}$  Cu and (C) after 2 h with 1  $\mu\text{M}$  Cu followed by addition of 50  $\mu\text{M}$  Chel2 for 3 h. Under each condition, the Cu, Zn and P maps are shown. Scale bar 5  $\mu\text{m}$ . The pixel size is 150x150  $\text{nm}^2$ , except the last series at the bottom, which was acquired with a pixel size of 500x500  $\text{nm}^2$ . Intensity scales are given in  $\text{ng}/\text{cm}^2$ .





**Fig. S5.** Cell content analysed by nano XRF in WIF-B9 epithelia forming canaliculi after 2 h with 15  $\mu\text{M}$  Cu. Under each condition, the Cu, Zn and P maps are shown. Scale bar 5  $\mu\text{m}$ . The pixel size is 150x150  $\text{nm}^2$ . Intensity scales are given in  $\text{ng}/\text{cm}^2$ .

Supplementary data for the  $^{65}\text{Cu}$  experiments on mice.

**Fig. S6.** Effect of Chel2 injections (starting at day 0) on the fraction of hepatic  $^{65}\text{Cu}$  excreted in the faeces of mice ( $^{65}\text{Cu}_{\text{xSF}}$  in permil) following an IV injection of  $^{65}\text{Cu}$  at day -4. (□) mock treatment: 4 mice received 4 IV injections of buffer from day 0 to day 4; (○) Chel2 IV-treatment: 7 mice received 8 IV injections of Chel2 (30 mg/kg) from day 0 to day 10; (◇) Chel2 SC-treatment: 8 mice received 4 SC injections of Chel2 (50 mg/kg) from day 0 to day 4. For each day and each treatment, the data is represented by its mean and standard error of the mean (SEM).

**Table S1.**  $^{65}\text{Cu}_{\text{xSF}}$ , the fraction of hepatic  $^{65}\text{Cu}$  excreted in the faeces in permil, measured by MC-ICPMS during the experiments on mice.

day	$^{65}\text{Cu}_{\text{xSF}}$ (‰)		
	Chel2 IV-treatment	Chel2 SC-treatment	Buffer Mock
J-3	61.75	104.95	181.80
J-3	143.71	106.56	58.60
J-3	34.80	189.87	
J-3		30.96	78.29
J-3	55.90	31.63	
J-3	31.18		
J-3		110.48	
J-3	79.39	74.89	
mean	67.79	92.76	106.23
SEM	16.84	20.68	38.21
N	6	7	3
J+1	28.49	55.83	15.05
J+1	31.26	24.19	19.12
J+1	34.38	60.15	
J+1	30.15	39.82	
mean	31.07	45.00	17.08

SEM	1.24	8.20	2.04
N	4	4	2
J+2	36.66	115.77	9.80
J+2	23.72	41.74	13.40
J+2		57.29	
J+2	79.41	40.67	
mean	46.60	63.87	11.60
SEM	16.83	17.71	1.80
N	3	4	2
J+3	25.07	65.82	15.10
J+3	23.28	44.11	11.16
J+3	25.15	44.45	
J+3	30.23	43.44	
mean	25.93	49.45	13.13
SEM	1.50	5.46	1.97
N	4	4	2
J+4	11.88	153.80	10.75
J+4	32.25	94.97	28.54
J+4		116.13	
J+4	56.09	165.43	
mean	33.41	132.58	19.64
SEM	12.78	16.37	8.89
N	3	4	2
J+8	19.15		
J+8	30.38		
J+8	23.33		
J+8			
mean	24.29		
SEM	3.28		
N	3		
J+9	31.7546		
J+9	34.0677		
J+9			
J+9	93.9369		
mean	53.2531		
SEM	20.3529		
N	3		
J+10	20.6505		
J+10	37.9594		
J+10	14.4674		
J+10	14.0151		
mean	21.7731		
SEM	5.6037		
N	4		

J+11	35.9911
J+11	36.7724
J+11	
J+11	49.6083
mean	40.7906
SEM	4.4146
N	3

**Table S2.** Statistical analysis of the 3 datasets of Table S1 and Fig. 6,  $^{65}\text{Cu}_{\text{xsF}}$ , the fraction of hepatic  $^{65}\text{Cu}$  excreted in the faeces.

Group	N	Median	25%	75%
Mock	8	14	11	18
IV-treatment	27	30	23	37
SC-treatment	16	57	42	111

H = 28 with 2 degrees of freedom      P < 0.001

*According to Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, the differences in the median values are greater than would be expected by chance. Therefore there is a statistically significant difference, which leads to pairwise comparisons hereafter.*

Comparison	Difference of Ranks	P
SC vs Mock	33	<0.001
SC vs IV	17	<0.001
IV vs Mock	16	0.024

---

**References.**

1. A. M. Pujol, M. Cuillel, A.-S. Jullien, C. Lebrun, D. Cassio, E. Mintz, C. Gateau and P. Delangle, *Angew. Chem.*, 2012, **51**, 7445.
2. M. Monestier, P. Charbonnier, C. Gateau, M. Cuillel, F. Robert, C. Lebrun, E. Mintz, O. Renaudet and P. Delangle, *ChemBioChem*, 2016, **17**, 590.
3. C. T. Dillon, in *Metallointercalators*, ed. Springer, Vienna, 2011, pp. 273.
4. J. B. Aitken, S. Antony, C. M. Weekley, B. Lai, L. Spiccia and H. H. Harris, *Metallomics*, 2012, **4**, 1051.
5. G. Martinez-Criado, R. Tucoulou, P. Cloetens, P. Bleuet, S. Bohic, J. Cauzid, I. Kieffer, E. Kosior, S. Laboure, S. Petitgirard, A. Rack, J. A. Sans, J. Segura-Ruiz, H. Suhonen, J. Susini and J. Villanova, *J. Synchrotron Radiat.*, 2012, **19**, 10.
6. O. Hignette, P. Cloetens, G. Rostaing, P. Bernard and C. Morawe, *Rev. Sci. Instrum.*, 2005, **76**, 063709.
7. V. A. Sole, E. Papillon, M. Cotte, P. Walter and J. Susini, *Spectrochim. Acta B*, 2007, **62**, 63.
8. L. Lemelle, A. Simionovici, T. Schoonjans, R. Tucoulou, E. Enrico, M. Salome, A. Hofmann and B. Cavalazzi, *Trac-Trend Anal. Chem.*, 2017, **91**, 104.
9. S. Bohic, K. Murphy, W. Paulus, P. Cloetens, M. Salome, J. Susini and K. Double, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 9557.
10. B. De Samber, M. J. Niemiec, B. Laforce, J. Garrevoet, E. Vergucht, R. De Rycke, P. Cloetens, C. F. Urban and L. Vincze, *Plos One*, 2016, **11**, e0165604.
11. F. Marchi, R. Dianoux, H. J. H. Smilde, P. Mur, F. Comin and J. Chevrier, *J. Electrostat.*, 2008, **66**, 538.
12. A. Alessandrini and P. Facci, *Meas. Sci. Technol.*, 2005, **16**, R65.
13. O. I. Buiakova, J. Xu, S. Lutsenko, S. Zeitlin, K. Das, S. Das, B. M. Ross, C. Mekios, I. H. Scheinberg and T. C. Gilliam, *Hum. Mol. Genet.*, 1999, **8**, 1665.
14. C. N. Marechal, P. Telouk and F. Albarede, *Chem. Geol.*, 1999, **156**, 251.

