

Le rôle des ions métalliques dans la maladie d'Alzheimer

Apport de la spectroscopie d'absorption X

Peter Fallor et Christelle Hureau

Résumé Capables de se lier au peptide amyloïde- β et d'en modifier les propriétés, les ions métalliques sont impliqués dans la maladie d'Alzheimer. On les retrouve en grande quantité dans les plaques séniles, une des lésions de la maladie. Alors que le peptide amyloïde- β est présent sous forme soluble dans les cerveaux de patients sains, les plaques séniles, détectées post-mortem chez les patients atteints, contiennent une grande quantité de peptides dans un état agrégé. Les résultats présentés dans cet article montrent l'apport des spectroscopies d'absorption X (XANES et EXAFS) dans la détermination de la sphère de coordination des ions métalliques liés au peptide (en particulier les ions cuivreux et cuprique) et dans le suivi de l'environnement du centre métallique au cours du processus toxique d'agrégation qui conduit à la formation des plaques séniles.

Mots-clés Ions métalliques, peptide, coordination, agrégation, spectroscopie d'absorption X, rayonnement synchrotron.

Abstract **Impact of metallic ions in Alzheimer's disease: insights from XAS spectroscopy**
Able to bind to the amyloid- β peptide and to modify some of his properties, metallic ions are involved in Alzheimer's disease. Metallic ions are found in high concentration in the senile plaques, one of the disease hallmarks. While the amyloid- β exists on a soluble form in healthy persons' brain, amyloid plaques are detected in Alzheimer's disease patients. High concentrations of the amyloid- β peptide in aggregated states are also detected in amyloid plaques. The results shown in this article illustrate how useful the X-ray absorption spectroscopy (XANES and EXAFS) is to disentangle the coordination sphere of metallic ions (mainly cuprous and cupric ions) bound to the peptide and how this method is well-suited to monitor modification of the environment of the metallic centers during the aggregation process that leads to formation of the senile plaques.

Keywords **Metallic ions, peptide, coordination, aggregation, X-ray absorption spectroscopy, synchrotron radiation.**

De nombreux ions métalliques jouent un rôle clé dans les systèmes biologiques. Ils occupent des fonctions structurales et catalytiques essentielles au sein d'enzymes et de protéines. C'est pourquoi il existe un système complexe permettant de contrôler de manière extrêmement fine leur métabolisme : détection, transport, stockage, sélectivité... Par ailleurs, il est établi que le cerveau représente un système biologique unique. C'est en particulier le cas pour l'homéostasie des ions de métaux de transition, comme par exemple la réserve de « zinc labile » impliquée dans la neurotransmission [1]. Une approche permettant de mieux comprendre un système aussi compliqué est d'en étudier les dysfonctionnements, c'est-à-dire les maladies neurologiques. Ainsi, l'étude du rôle des ions métalliques en neurologie, et plus particulièrement leur implication dans les maladies neurodégénératives, est actuellement un champ d'intenses investigations, et comme indiqué par S.J. Lippard *et coll.* ce domaine de recherche est l'apanage des chimistes bioinorganiciens [2].

La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) se caractérise par un déclin des capacités mentales, cognitives et physiques. Elle est la maladie neurodégénérative la plus fréquente et, à cause d'une incidence croissante due principalement au vieillissement des populations, elle est devenue un véritable enjeu de santé publique [3]. Deux types de lésions morphologiques sont détectées chez les malades : des dégénérescences neurofibrillaires intracellulaires constituées de protéine tau et des plaques séniles extracellulaires, constituées principalement des peptides amyloïdes- β ($A\beta$) dans un état agrégé [4-5]. Ces peptides, composés majoritairement de 40 à 42 acides aminés ($A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$) sont issus de la dégradation d'une protéine membranaire et sont présents sous forme soluble dans les cerveaux sains [6]. Ils sont constitués d'un domaine N-terminal fortement hydrophile et d'un domaine C-terminal hydrophobe. Dans la mesure où les plaques amyloïdes se retrouvent

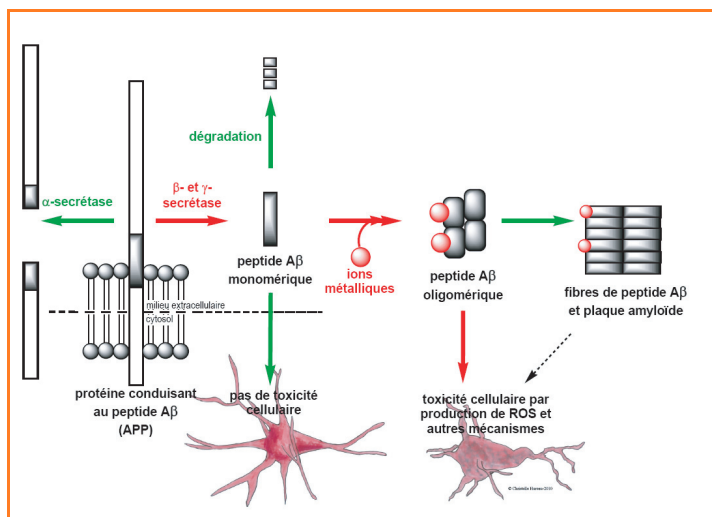


Figure 1 - Principe de la cascade amyloïde.

Le peptide amyloïde- β est obtenu par coupure de l'APP (« amyloid precursor protein ») sous forme soluble et est détecté chez les patients sains. L'interaction avec des ions métalliques (en particulier redox comme le $\text{Cu}^{+/2+}$) conduit à l'obtention de formes oligomères toxiques et *in fine* aux plaques amyloïdes détectées chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. En vert : voies non toxiques ; en rouge : voies toxiques.

principalement chez les patients atteints de la MA, le passage du peptide soluble au peptide agrégé est une étape clé dans le développement de la pathologie [7], comme le propose l'hypothèse de la cascade amyloïde (figure 1).

En accord avec cette hypothèse, une augmentation du rapport $\text{A}\beta_{42}/\text{A}\beta_{40}$ est observée dans des cas de MA sporadique et familiale (mutations héréditaires affectant la coupure de l'APP), l'agrégation de la forme $\text{A}\beta_{42}$ étant plus rapide que celle de l' $\text{A}\beta_{40}$, et cette forme étant également plus toxique vis-à-vis des neurones. Les conditions influant sur ce processus d'agrégation présentent donc un intérêt majeur [7]. En particulier, un rôle prépondérant des ions métalliques ($\text{Cu}^{+/2+}$, Zn^{2+} et $\text{Fe}^{2+/3+}$) est proposé dans la littérature. En effet, des études *in vitro*, *in cellulo* et *in vivo* dans des modèles murins de la MA indiquent toutes un impact majeur des ions métalliques et des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans cette maladie [8]. Ceci est corroboré par le fait que les ions Zn^{2+} et Cu^{2+} sont co-extraits avec les peptides $\text{A}\beta$ des plaques séniles de patients atteints de la MA [9-10]. Des études *in vitro* ont établi que ces ions se lient à l' $\text{A}\beta$ [9] et modulent son agrégation [7]. L'implication des ions métalliques dans le mécanisme de stress oxydant provoquant la toxicité de $\text{A}\beta$ est également établie [7-11] ; les ions Cu^{2+} l'augmentent alors que les ions Zn^{2+} la diminuent. Cette différence d'activité entre les deux ions métalliques est associée au caractère redox du couple $\text{Cu}^{+/2+}-\text{A}\beta$ [12]. L'implication du Zn^{2+} dans la maladie est donc davantage reliée à son effet sur la structuration et l'agrégation des $\text{A}\beta$. Il est connu que le Zn^{2+} se fixe sur les $\text{A}\beta$ et est capable d'en changer la conformation et ainsi d'en moduler l'agrégation.

L'apport de la spectroscopie XAS dans nos études

La spectroscopie d'absorption X (XAS) est une technique de choix i) pour déterminer la coordination des ions métalliques liés aux peptides $\text{A}\beta$, en particulier celle des ions « silencieux » par d'autres techniques (la configuration d'¹⁰

des ions Zn^{2+} et Cu^{+} rend la plupart des spectroscopies inappropriées), ii) pour suivre les processus d'agrégation, puisque cette spectroscopie s'applique aussi sur des échantillons en solution (fluide ou gelée) ou solides. De plus, le XAS est approprié à l'étude d'échantillons dilués comme ceux qui nous intéressent ici. Les premières études XAS que nous avons réalisées aux synchrotrons SOLEIL et ESRF autour de la thématique « rôle des ions métalliques dans la maladie d'Alzheimer » sont illustrées ci-après par deux exemples : l'étude de la coordination des ions $\text{Cu}^{+}/\text{Cu}^{2+}$ au peptide $\text{A}\beta$ et l'étude de l'agrégation induite par le Zn^{2+} de formes tronquées du peptide $\text{A}\beta$.

Coordination des ions Cu^{+} et Cu^{2+} par l' $\text{A}\beta$

L'étude de la coordination des ions $\text{Cu}^{+/2+}$ au peptide amyloïde a été réalisée sur un peptide plus court que les peptides natifs, ne comportant que les seize acides aminés N-terminaux ($\text{A}\beta_{16}$), qui reproduit la coordination des ions métalliques au peptide complet mais qui ne s'agrège pas [13]. Elle a été effectuée à température ambiante et a ainsi complété avantageusement d'autres données obtenues principalement à basse température (solution gelée). En ce qui concerne le Cu^{2+} et en conjonction avec d'autres méthodes (principalement spectroscopies de résonance paramagnétique électronique avancées et résonance magnétique nucléaire paramagnétique), il a ainsi pu être établi que la sphère de coordination du Cu^{2+} lié au $\text{A}\beta_{16}$ dépend fortement du pH et est constituée pour les deux formes présentes à pH physiologique de quatre ligands équatoriaux et d'un ligand apical (pour davantage de détails sur la nature des ligands, voir figure 2) [14-15]. En ce qui concerne le Cu^{+} , la signature XANES est très sensible à la géométrie du complexe $\text{Cu}^{+}-\text{A}\beta$ et il a donc été montré que l'ion Cu^{+} est lié linéairement par les fonctions imidazoles de deux histidines [16], et ce indépendamment de la valeur du pH [17]. Ce résultat confronté à celui obtenu par RMN, qui montre que les trois histidines sont impliquées dans la coordination du Cu^{+} , permet de mettre en évidence un échange dynamique entre ligands histidine dans l'environnement du Cu^{+} (figure 2) [17].



Figure 2 - Structures des complexes $\text{Cu}^{+}-\text{A}\beta$ (haut) et $\text{Cu}^{2+}-\text{A}\beta$ (bas) en fonction du pH proposées d'après plusieurs études spectroscopiques complémentaires, et en particulier XANES (absorption au seuil K du cuivre en unité arbitraire).

Deux sphères de coordination coexistent à pH physiologique pour l'ion cuivrique.

Influence de la coordination des ions Zn^{2+} sur l'agrégation de peptides modèles

L'étude de l'agrégation induite par l'ion Zn^{2+} sur des peptides modèles a été réalisée sur des peptides sous-séquence de l'A β et en particulier sur le peptide A β 11-28 plus pertinent d'un point de vue biologique, puisque la coupure entre les acides aminés en position 10 et 11 peut être réalisée par des peptidases. La cinétique d'agrégation est suivie classiquement par fluorescence de la thioflavine-T (ThT), l'état d'agrégation pouvant être visualisé par microscopie électronique à transmission. La spectroscopie XAS a montré que l'environnement du centre métallique ne varie pas au cours du processus d'agrégation, impliquant que la coordination du Zn^{2+} induit des modifications structurales du A β qui conduisent à des propriétés d'agrégation différentes (cinétique, type d'agrégats formés...) de celles de l'apo-peptide correspondant, mais que ces modifications structurales n'entraînent pas, dans un second temps, un changement de la coordination du Zn^{2+} (figure 3) [18].

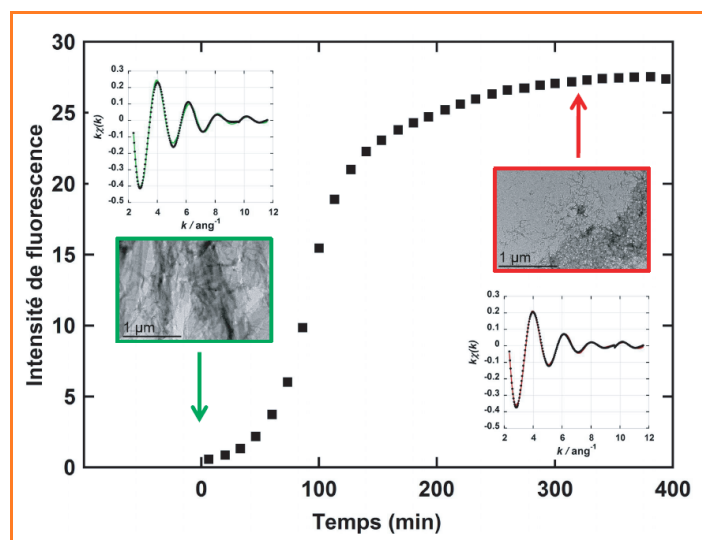


Figure 3 - Suivi cinétique du processus de fibrillogénèse par fluorescence de la ThT (molécule dont la fluorescence est spécifique de la présence de fibres amyloïdes) en unité arbitraire, pH = 7,6 ; $[Zn-A\beta_{11-28}] = 300 \mu M$. À $t=0$, aucune fibre n'est encore formée, comme le montre la microscopie électronique à transmission (TEM) et l'absence de fluorescence de la ThT ; à t très long, la formation de fibres est observée par fluorescence de la ThT et par TEM. Au cours du processus d'agrégation, l'environnement du centre métallique est peu modifié comme attesté par les données EXAFS (points : données expérimentales ; lignes fines : simulations).

Perspectives

D'autres études non présentées ici se sont axées sur une large série de mutants de l'A β 16 afin de déterminer quels sont les acides aminés impliqués dans la coordination du Zn^{2+} par les A β , coordination qui reste encore largement sujette à controverses. L'apport de la spectroscopie XAS dans plusieurs autres études en cours sera également essentielle : la caractérisation du site de coordination de l'ion Fe^{2+} , ion pour lequel la spectroscopie XAS et le Mössbauer sont les deux techniques les plus appropriées ; l'étude du transfert métallique entre des chélateurs et les A β (en particulier pour les ions d^{10} qui ne peuvent être facilement caractérisés par d'autres techniques). En effet, la thérapie par chélation est actuellement envisagée pour la maladie d'Alzheimer.

Les auteurs remercient leurs collaborateurs impliqués dans ce projet : Emmanuel Guillon et Stéphanie Sayen (Université de Reims-Champagne Ardenne) et Pier Lorenzo Solari (SOLEIL), ainsi que les responsables des lignes SAMBA, FAME et MARS : Valérie Briois, Jean-Louis Hazemann et Bruno Sitaud et leurs « contacts locaux » : Emiliano Fonda, Isabelle Alliot et Olivier Proux. Bruno Alies est remercié pour sa participation au projet sur l'agrégation des peptides modèles. Ces travaux ont bénéficié du soutien des synchrotrons SOLEIL (projets 20080324 et 20090686) et ESRF (projet CH-3015) et du support financier de l'Agence Nationale de la Recherche (Programme blanc NT09-488591, « NEUROMETALS »).

Références

- [1] Cuajungco M.P., Faget K.Y., Zinc takes the center stage: its paradoxical role in Alzheimer's disease, *Brain Res. Rev.*, **2003**, *41*, p. 44.
- [2] Burdette S.C., Lippard S.J., Meeting of the minds: metalloneurochemistry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, *100*, p. 3605.
- [3] www.alz.org
- [4] Selkoe D.J., Alzheimer's disease is a synaptic failure, *Science*, **2002**, *298*, p. 789.
- [5] Glenner G.G., Wong C.W., Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1984**, *120*, p. 885.
- [6] Haass C., Schlossmacher M.G., Hung A.Y., Vigo-Pelfrey C., Mellon A., Ostaszewski B.L., Lieberburg I., Koo E.H., Schenk D., Teplow D.B., Selkoe D.J., Amyloid- β peptide is produced by cultured cells during normal metabolism, *Nature*, **1992**, *359*, p. 322.
- [7] Roychaudhuri R., Yang M., Hoshi M.M., Teplow D.B., Amyloid beta-protein assembly and Alzheimer disease, *J. Biol. Chem.*, **2009**, *284*, p. 4749.
- [8] Bush A.I., The metallobiology of Alzheimer's disease, *Trends Neurosci.*, **2003**, *26*, p. 207.
- [9] 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., Bush A.I., Metalloenzyme-like activity of Alzheimer's disease β -amyloid, *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, p. 40302.
- [10] Miller L.M., Wang Q., Telivala T.P., Smith R.J., Lanzitotti A., Miklosy J., Synchrotron-based infrared and X-ray imaging shows focalized accumulation of Cu and Zn co-localized with β -amyloid deposits in Alzheimer's disease, *J. Struct. Biol.*, **2006**, *155*, p. 30.
- [11] Hureau C., Faller P., A β -mediated ROS production by the Cu ions: structural insights, mechanisms and relevance to Alzheimer's disease, *Biochimie*, **2009**, *91*, p. 1212.
- [12] Balland V., Hureau C., Savéant J.-M., Electrochemical and homogeneous electron transfers to the Alzheimer amyloid- β copper complex follow a preorganization mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2010**, *107*, p. 17113.
- [13] Minicozzi V., Stellato F., Comai M., Dalla Serra M., Potrich C., Meyer-Klaucke W., Morante S., Identifying the minimal Cu and Zn binding site sequence in amyloid- β peptides, *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*, p. 10784.
- [14] Hureau C., Coppel Y., Dorlet P., Solari P.L., Sayen S., Guillon E., Sabater L., Faller P., Deprotonation of the Asp1-Ala2 peptide bond induces modification of the dynamic copper(II) environment in the amyloid- β peptide near physiological pH, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, p. 9522.
- [15] Dorlet P., Gambarelli S., Faller P., Hureau C., Pulse EPR spectroscopy reveals the coordination sphere of copper(II) ions in the 1-16 amyloid- β peptide: a key role of the first two N-terminus residues, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, p. 9273.
- [16] Shearer J., Szalai V.A., The amyloid- β peptide of Alzheimer's disease binds Cu(I) in a linear bis-his coordination environment: insight into a possible neuroprotective mechanism for the amyloid- β peptide, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, p. 17826.
- [17] Hureau C., Balland V., Coppel Y., Solari P.L., Fonda E., Faller P., Importance of dynamical processes in the coordination chemistry and redox conversion of copper amyloid- β complexes, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2009**, p. 995.
- [18] Alies B., Pradines V., Alliot I., Sayen S., Guillon E., Hureau C., Faller P., Zn(II) modulates specifically amyloid formation and structure in model peptides, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2011**, *16*, p. 333.



P. Faller

Peter Faller est professeur et Christelle Hureau (auteur correspondant) chargée de recherche CNRS au Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC) de Toulouse*.



C. Hureau

* Université de Toulouse, UPS, INPT, Laboratoire de Chimie de Coordination, 205 route de Narbonne, F-31077 Toulouse Cedex. Courriels : peter.faller@lcc-toulouse.fr, christelle.hureau@lcc-toulouse.fr