

2m11.3057.6

Université de Montréal

Effets du cuivre (II) sur le transport à haute affinité du glutamate dans des astrocytes en culture: proposition d'un mécanisme physiopathologique de la maladie de Wilson.

Par

Marc Pannunzio

Département de physiologie, Faculté de médecine

Mémoire de maîtrise présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître en Science (M.Sc.)
en sciences neurologiques

Février, 2003

© Marc Pannunzio, 2003

W

4

158

2003

N. 094

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Effets du cuivre (II) sur le transport à haute affinité du glutamate dans des astrocytes en culture: proposition d'un mécanisme physiopathologique de la maladie de Wilson.

présenté par

Marc Pannunzio

a été évalué par un jury composé des membres suivants :

Dr Guy Doucet
Président-rapporteur

Dr Roger F. Butterworth
directeur de recherche / membre du jury

Dre Jane Montgomery
membre du jury



Déclaration des coauteurs d'un article

Marc Pannunzio
sciences neurologiques

Impaired high affinity glutamate uptake in rat primary cortical astrocytes exposed to copper (II) salts.

Marc Pannunzio, Helen Chan, Alan S. Hazell, and Roger F. Butterworth

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Marc Pannunzio inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre "Effets du cuivre (II) sur le transport à haute affinité de glutamate dans des astrocytes en culture: proposition d'un mécanisme physiopathologique de la maladie de Wilson."

Helen Chan
coauteur


signature

1/5/2003
date

Alan S. Hazell
coauteur


signature

1/5/2003
date

Roger F. Butterworth
coauteur


signature

1/5/2003
date

Autorisation pour microfilmage du mémoire de maîtrise de Marc Pannunzio,

contenant l'article :

Impaired high affinity glutamate uptake in rat primary cortical astrocytes exposed to copper (II) salts.

Dont les coauteurs sont:

Marc Pannunzio (auteur)

Helen Chan :

Alan S. Hazell

Roger F. Butterworth:

Montréal, le 6 janvier, 2003.

Sommaire

La maladie de Wilson (MW) est un défaut génétique affectant un transporteur hépatique de cuivre ATP-dépendant de type P (ATP7B) largement responsable de l'élimination du cuivre de l'organisme. Une dysfonction de ce transporteur résulte donc en une accumulation systémique de cuivre, particulièrement au foie et au cerveau, où les niveaux augmentent jusqu'à 25 et 15 fois, respectivement, les concentrations normales. Cette augmentation cérébrale de cuivre est directement associée à l'apparition des symptômes neurologiques de la MW et est proportionnelle à la sévérité de ceux-ci. Plusieurs études ont démontré des effets toxiques d'une exposition au cuivre sur des astrocytes en culture, notamment des altérations de nature morphologique et biochimique. Afin d'élucider d'avantage les effets du cuivre sur la fonction astrocytaire, nous avons déterminé si une accumulation de cuivre avait comme conséquence de réduire le transport à haute affinité du glutamate dans des astrocytes en culture.

Nous avons démontré qu'une exposition au cuivre réduisait de façon concentration- et temps-dépendante le transport astrocytaire à haute affinité du glutamate et causait une diminution des niveaux protéiniques du transporteur EAAT-1, sans toutefois affecter les niveaux de l'ARNm de celui-ci. Ces résultats nous ont non seulement permis de proposer un nouveau mécanisme physiopathologique responsable des symptômes neurologiques de la MW, ils nous ont également permis de proposer l'existence de mécanismes pathogéniques communs entre les déficiences hépato-cérébrales d'origine génétique (la maladie de Wilson) et acquise (l'encéphalopathie hépatique), en plus d'entrevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour de telles maladies associées à une déposition cérébrale de métaux divalents chez l'humain.

Mots Clés :

cuivre, transport du glutamate, astrocytes, maladie de Wilson, EAAT-1.

Summary

Wilson's disease (WD) is an autosomal recessive genetic disorder affecting the hepatic P-type ATPase copper transporter, whose main role is to lead copper to its biliary excretion pathway. Hence, a dysfunction of this transporter in WD results in copper accumulations throughout the body, and especially in the liver and in the brain, where concentrations have been shown to increase 25 and 15 fold, respectively, their baseline values. These cerebral copper accumulations are directly linked and proportional to the onset and the severity of the neuropsychiatric symptoms associated with the disease. Previous studies have shown a toxic effect of copper exposure on cultured astrocytes resulting in both morphologic and biochemical alterations. As a part of a series of studies to further elucidate the effects of copper on astrocytic function, exposure of primary rat cortical astrocytes to cupric chloride (CuCl_2) was studied. Copper exposure was capable of reducing the high-affinity glutamate uptake in a time- and concentration-dependant manner, as well as causing a decrease in the EAAT-1 astrocytic glutamate transporter protein levels without affecting mRNA levels. Such results allow us not only to propose a new pathological mechanism involved in Wilson's disease, but also to establish a link between hepato-cerebral disorders of genetic (Wilson's disease) and acquired (hepatic encephalopathy) origins, as well as foresee novel therapeutic strategies for such diseases associated with the cerebral accumulation of divalent metals in humans.

Key Words:

Copper, glutamate transport, astrocytes, Wilson's disease, EAAT-1, neuronal cell death.

Table des Matières

Sommaire.....	I
Summary.....	II
Table des matières.....	III
Liste des tableaux.....	V
Liste des figures.....	VI
Liste des abréviations.....	VII
Dédicaces.....	VIII

CHAPITRE 1

1- Biochimie nutritionnelle et métabolisme du cuivre chez les mammifères.....	1
1.1 La bio-disponibilité du cuivre.....	1
1.2 L'absorption du cuivre chez les mammifères.....	2
1.3 Le transport et la distribution du cuivre dans l'organisme.....	3
1.3.1 Une distribution systémique à deux temps.....	5
1.4 Les fonctions du cuivre dans l'organisme.....	6
1.5 L'élimination du cuivre.....	8

2-	Altérations dans le métabolisme et dans le transport du cuivre.....	10
2.1	Métabolisme du cuivre lors de l'inflammation et du cancer.....	10
2.2	Défauts génétiques affectant le transport du cuivre.....	11
2.3	La maladie de Menkes : une déficience en cuivre.....	12
2.4	La maladie de Wilson : une accumulation de cuivre.....	13
2.4.1	Symptômes.....	15
2.4.2	Diagnostic clinique	16
2.4.3	Traitements.....	17
2.4.4	Neuropathologie.....	19
2.4.5	Mécanismes physiopathologiques.....	21

CHAPITRE 2

Article : Impaired high affinity glutamate uptake in rat primary cortical astrocytes exposed to copper (II) salts.

Marc Pannunzio, Helen Chan, Alan S. Hazell,
and Roger F. Butterworth.....27

CHAPITRE 3

3.1	Discussion.....	51
3.2	Conclusions.....	66
	Bibliographie.....	67

Liste des tableaux

CHAPITRE 1

Tableau I.	Concentration relative de cuivre de certains aliments.....	2
Tableau II.	Enzymes et protéines dont la fonction dépend du cuivre chez les mammifères.....	6

CHAPITRE 2

Table III.	Effects of CuCl_2 on the kinetic parameters of high affinity [^3H]-D- aspartate uptake by primary cortical astrocytes.	49
------------	--	----

Liste des Figures

CHAPITRE 1

- Figure 1.1 Sommaire de la biochimie nutritionnelle et du métabolisme du cuivre chez l'humain adulte.....4
- Figure 1.2 Cellules Alzheimer de type I et de type II.....20

CHAPITRE 2

- Figure 2.1A Effects of varying concentrations of CuCl_2 on [^3H]-D-aspartate and [^3H]-citalopram uptake in primary cultured astrocytes (2 day exposure period).....48
- Figure 2.1B Effects of 50 μM CuCl_2 on [^3H]-D-aspartate and [^3H]-citalopram uptake in primary cultured astrocytes for 1 and 3 days.....48
- Figure 2.2 Effects of CuCl_2 on [^3H]-D-aspartate uptake in primary cultured astrocytes.....49
- Figure 2.3 Effects of 50 μM CuCl_2 exposure for 3 days on EAAT-1 protein expression in primary cultured astrocytes.....50
- Figure 2.4 Effects of antioxidants α -tocopherol and BHA on the high affinity [^3H]-D-aspartate uptake in primary cultured astrocytes exposed to varying concentrations of CuCl_2 (3 day exposure period).....50

CHAPITRE 3

- Figure 3.1 Le cycle glutamate-glutamine.....54

Liste des abréviations

ALZ I	cellules Alzheimer de type I
ALZ II	cellules Alzheimer de type II
AMPA	alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid
ATP	adénosine triphosphate
EH	encéphalopathie hépatique
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GS	glutamine synthétase
IRM	imagerie par résonance magnétique
LDH	lactate déshydrogénase
MW	maladie de Wilson
MM	maladie de Menkes
MRS	spectroscopie par résonance magnétique
NMDA	N-methyl-D-aspartate
OPL	cellules Opalski
PBS	phosphate-buffered saline
PPSE	potentiel post-synaptique excitateur
SOD	superoxyde dismutase
SSCP	single strand conformation polymorphism
Vit E	α -tocophérol (vitamine E)
ww	wet weight (poids humide)

À mes parents, Ida et Joseph

À ma bien-aimée, Catalina

À mon frère, Pierre et son épouse, Nathalie

et

un gros merci à Roger Butterworth, mon directeur de recherche
à Paul Desjardins et Alan Hazell
à Nicolas, Helen, Mireille et Darren
ainsi qu'aux autres membres de notre groupe de recherche

1. Biochimie nutritionnelle et métabolisme du cuivre chez les mammifères.

Afin de mieux saisir le rôle du cuivre dans la physiopathologie de la maladie de Wilson (MW), ce premier chapitre traitera de la bio-disponibilité, de l'absorption, des fonctions physiologiques et de l'élimination de ce micro-nutriment essentiel. Il traitera ensuite de quelques défauts reliés soit à son absorption, soit à son élimination, tout en portant une attention particulière à la MW.

1.1 La bio-disponibilité du cuivre.

L'apport quotidien moyen de cuivre chez l'adulte varie de 0.6 à 1.6 mg/j (1, 2). Le tableau I démontre la concentration relative de cuivre de certains aliments. Ce sont les aliments qui contribuent à l'essentiel du cuivre absorbé et il y a énormément de variation dans la concentration de cuivre dans ces aliments. Les crustacés et les abats sont la source alimentaire la plus riche en cuivre, tandis que les viandes rouges en contiennent beaucoup moins. Chez les végétaux, les graines et les noix sont les sources les plus riches en cuivre, tandis que les fruits et les légumes en contiennent généralement beaucoup moins. Un apport quotidien recommandé de cuivre de 1.5 à 3.0 mg/jour est considéré sécuritaire et adéquat pour l'adulte (3). Cet apport quotidien recommandé pourrait cependant être inférieur à 1.5 mg/j, car il a été démontré qu'une consommation de seulement 0.8 mg/j était suffisante pour maintenir à des niveaux adéquats le statut corporel de cuivre (4).

<u>Aliments</u>	<u>Concentration relative (µg/g)</u>
Viande rouge	0.9-1.0
Poissons	
de mer	2-3
d'eau douce	0.3-3
Crustacés	12-37
Volaille	0.5-3
Foie	4.6-6.2
Noix	6-37
Graines	3-8
Son	15
Légumineuses	3-7
Légumes	0.3-3
Fruits	0.4-1.5
Patates	2.1

Tableau I. Concentration relative de cuivre de certains aliments (modifié de (1)).

1.2 L'absorption du cuivre chez les mammifères.

Le seul moyen que possèdent les mammifères pour absorber le cuivre est via le tube digestif. L'absorption de cuivre se fait principalement (ou même exclusivement) dans l'intestin grêle, après la digestion des aliments par l'estomac et le duodénum. L'efficacité d'absorption de cet ion métallique est très élevée : les valeurs d'absorption chez l'humain adulte se situent entre 55% et 75% et ne semblent pas diminuer avec l'âge (1, 2, 4). Des études chez le rat ont même démontré une certaine adaptation de l'efficacité d'absorption proportionnelle à la quantité de cuivre ingéré : moins il y a de cuivre ingéré, plus les pourcentages d'absorption augmentent, et vice-versa (1, 4).

L'absorption du cuivre par les cellules de la muqueuse intestinale et son transfert subséquent au liquide interstitiel et au sang à travers la membrane basale s'effectuent selon des mécanismes différents. Le transfert à travers la muqueuse intestinale se fait par un mécanisme de diffusion passive, tandis que le transfert subséquent à travers la membrane basale semble être effectué principalement par un transporteur ATP-dépendant de type P saturable, dont le taux de transfert est limité et énergie-dépendant (nous allons traiter de ce transporteur dans une section ultérieure). Il existe également

des mécanismes additionnels de diffusion à travers la membrane basolatérale dont la fonction première est d'absorber les métaux de transition autres que le cuivre. Le cuivre peut donc être absorbé via ces mécanismes lorsque son apport est suffisamment élevé pour entrer en compétition et déplacer ces autres métaux de leurs sites de diffusion. Selon ce principe de compétition, une concentration excessive de zinc ou de fer peut réduire le transfert du cuivre ingéré à la circulation sanguine : un traitement clinique que nous aborderons également plus tard.

Une fois dans le cytoplasme des cellules de la muqueuse intestinale, environ 80% du cuivre nouvellement absorbé est lié à des métallothionines ou à des protéines de taille similaire (6). Le cuivre a également tendance à déplacer des métallothionines les autres métaux se trouvant sous forme ionique dans ces cellules. Comme à la membrane basolatérale, une forte concentration de ces métaux (par exemple le zinc) peut donc entraver le passage du cuivre de la muqueuse intestinale au sang et ainsi agir comme traitement pour diminuer l'apport de cuivre dans l'organisme.

1.3 Le transport et la distribution du cuivre dans l'organisme

Dans tout système biologique, incluant l'eau, le cuivre a tendance à être sous forme cuprique (Cu^{2+}), quoiqu'il soit aussi présent sous forme (Cu^+). À un pH physiologique, il n'y a pas ou très peu de cuivre sous forme libre en solution : les meilleures estimations de cuivre libre dans le plasma sanguin humain sont d'environ 1×10^{-13} mol/L (1). Donc, après son absorption à travers la membrane basolatérale, le cuivre atteint le liquide interstitiel, où il est immédiatement lié soit à l'albumine, soit à la transcupréine (8). La grande majorité du cuivre lié par ces deux protéines est ensuite directement acheminée vers le foie (9) (figure 1.1).

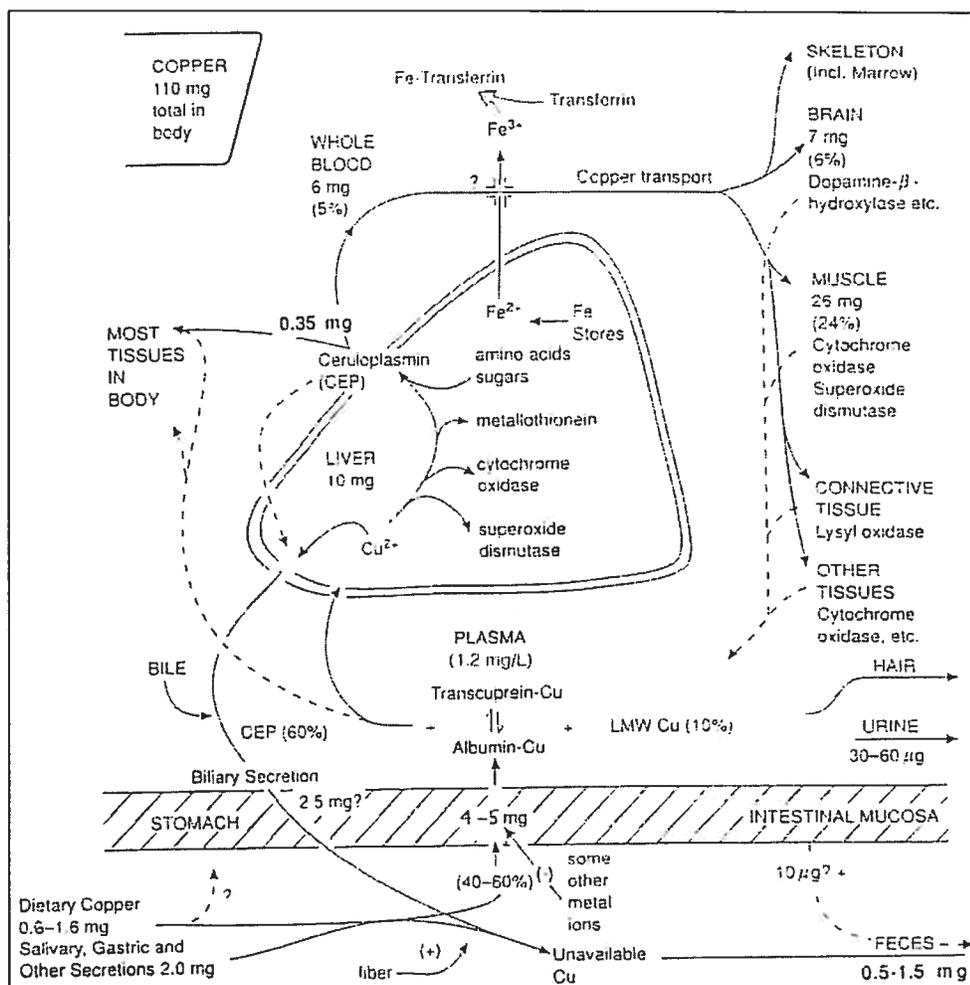


Figure 1.1. Sommaire de la biochimie nutritionnelle et du métabolisme du cuivre chez l'humain adulte. Les valeurs indiquent la quantité quotidienne moyenne de cuivre ingéré, absorbé, sécrété dans les fluides corporels et excrété par les différentes routes. Les concentrations représentent les concentrations de cuivre dans les différents fluides corporels et les pourcentages représentent la proportion de cuivre absorbé ou le pourcentage de cuivre corporel attribué à un tissu ou à un organe donné. (modifié de (6)).

Fait intéressant, la quantité abondante d'albumine se trouvant dans le plasma sanguin pourrait lier presque 40 mg/L de cuivre; cependant, seulement un maigre 180 µg/L y est associé (10, 11). La quantité de cuivre restant dans le plasma sanguin (≈1000 µg/L) est donc soit liée à la céruloplasmine (≈65%), la transcupréine (≈12%) ou à des acides aminés et peptides de petites masses moléculaires (1, 10, 11).

1.3.1 Une distribution systémique à deux temps

La plupart du cuivre absorbé est transporté directement dans les hépatocytes par la transcupréine (principalement) et par l'albumine, tandis qu'une plus petite fraction fait son chemin vers les reins. La transcupréine lie directement le cuivre dès qu'il entre dans le plasma sanguin; il y a échange direct de cuivre entre l'albumine et la transcupréine car l'affinité de cette dernière pour le Cu (II) est beaucoup plus élevée (12). De plus, quoique l'albumine constitue une importante composante de la concentration plasmatique de cuivre échangeable, elle n'est pas requise pour la distribution systémique de cet ion métallique aux différents tissus et organes. Ceci a été démontré chez le rat *Nagase analbuminémique*, qui ne présente aucune anomalie dans le transport et la distribution tissulaire et systémique du cuivre malgré une absence d'albumine dans le sang (13). Ce n'est que lorsque le cuivre nouvellement absorbé est intégré à la céruloplasmine à l'intérieur des hépatocytes qu'il peut ensuite faire son chemin aux autres tissus et organes. En effet, le cuivre lié à la céruloplasmine ne fait pas partie des concentrations plasmatiques de cuivre échangeable et la céruloplasmine n'incorpore pas ou ne lie pas directement le cuivre lorsqu'elle y est exposée; le cuivre ne peut être intégré à la céruloplasmine que lors de la synthèse de celle-ci. Le cuivre doit donc obligatoirement transiter par le foie, unique lieu de synthèse de la céruloplasmine, afin d'être intégré à celle-ci.

Il semble donc y avoir deux phases de distribution du cuivre après que celui-ci soit entré dans le plasma sanguin : son transport de la membrane basolatérale de la muqueuse intestinale vers le foie et les reins, véhiculé principalement par la transcupréine, suivi par son incorporation à la céruloplasmine et par sa distribution systémique et tissulaire. Ce modèle de distribution bi-phasique du cuivre a été établi et fortement appuyé par de

nombreuses études utilisant des isotopes radioactifs stables chez l'humain et chez le rat (14).

1.4 Les fonctions du cuivre dans l'organisme.

Le cuivre est un micro-nutriment essentiel à plusieurs fonctions physiologiques, telles que la croissance chez l'enfant, la maturation des érythrocytes, le transport du fer, la dureté des os, les contractions cardiaques et le développement cérébral (16). Chez la majorité des organismes vivants, dont l'humain, le cuivre agit principalement comme cofacteur de plusieurs enzymes impliqués dans le transport et le transfert d'électrons et donc dans la production d'énergie et dans le métabolisme oxydatif. L'aisance avec laquelle le cuivre acquiert ou se débarrasse d'un électron le rend essentiel aux réactions d'oxydoréduction et à la production de radicaux libres. Chez les mammifères, le cuivre est incorporé principalement à la céruloplasmine (un transporteur plasmatique), à la cytochrome oxydase (l'enzyme terminal de la chaîne respiratoire), à la superoxyde dismutase (impliquée dans la défense contre les radicaux libres oxygénés) et à la métallothionine (qui accumule l'excès de cuivre et qui a des propriétés d'élimination des radicaux libres). Le tableau II dresse une liste des principaux enzymes dont la fonction dépend du cuivre chez les mammifères.

<u>Protéines intracellulaires</u>	<u>Protéines extracellulaires</u>
Cytochrome <i>c</i> oxydase	Céruloplasmine
Superoxyde dismutase	Lysyl oxydase
Métallothionine	Albumine
Dopamine- β -mono-oxygénase	Transcupréine
Tyrosinase (cathécol oxydase)	Amine oxydase
Phénylalanine hydroxylase	Superoxyde dismutase
Diamine oxydase	Métallothionine
	Ferroxydase II

Tableau II. Enzymes et protéines dont la fonction dépend du cuivre chez les mammifères (modifié de (6)).

La cytochrome oxydase est l'enzyme terminal de la chaîne de transport d'électrons dans la mitochondrie (et dans la membrane cellulaire chez les bactéries) et le site d'utilisation de l'oxygène lors de la respiration cellulaire. L'enzyme catalyse la réduction de O_2 à deux molécules de H_2O . Les quatre électrons nécessaires pour cette réaction proviennent de la chaîne de transport d'électrons (et du cycle de Krebs) via le cytochrome *c* tandis que les protons proviennent de l'environnement aqueux situé entre les deux membranes mitochondriales. Le transfert d'électrons du cytochrome *c* à l'oxygène s'effectue par le groupement hème, composé de deux moitiés hème (*a* et *a3*) et de deux atomes de cuivre (CuA et CuB). Une sévère déficience en cuivre entraîne donc une diminution de l'activité de la cytochrome *c* oxydase et conséquemment une diminution de la capacité respiratoire de la mitochondrie (17).

La superoxyde dismutase (SOD) contient habituellement du manganèse et du fer ou du cuivre et du zinc. Chez l'humain, la SOD existant sous forme de manganèse se situe dans les mitochondries et est plus importante que les formes contenant du fer. La forme Cu/Zn-SOD de l'enzyme, quant à elle, se trouve principalement dans le cytosol des cellules eukaryotes, où elle transforme deux molécules de O_2^- (anion superoxyde) en O_2^- et H_2O_2 . L'enzyme est formé de deux sous-unités contenant chacune une molécule de cuivre et une de zinc; le cuivre agissant comme lieu de liaison du substrat (superoxyde). Plusieurs expériences avec des souris mutantes nulles pour la Cu/Zn-SOD ont clairement démontré que cet enzyme est essentiel pour contrer les attaques oxydatives provenant des radicaux libres oxygénés (18).

Les métallothionines sont de petits polypeptides riches en cystéine. Elles sont exprimées dans les cellules de plusieurs organismes en réponse à une attaque par les métaux de transition divalents, tels le Zn(II), le Cd(II), et le Cu(II) et elles sont

présentement considérées comme des sites d'entreposage et comme des mécanismes de détoxification pour ces métaux, qui pourraient sinon modifier d'autres réactions métaboliques et en catalyser des changements non désirés. Une suppression des gènes codant pour les métallothionines rend les cellules hyper-sensibles à un empoisonnement au cuivre (1). Les métallothionines ont la capacité de diriger les molécules de cuivre et de zinc vers des enzymes qui en sont dépendants et elles possèdent également des capacités anti-oxydantes pouvant contrer les dommages oxydatifs provenant de radicaux libres oxygénés (19, 20).

1.5 L'élimination du cuivre

Chez l'humain adulte, entre 0.5-1 mg de cuivre est absorbé, puis excrété quotidiennement. L'excrétion biliaire représente la voie principale de l'élimination du cuivre, tandis que seulement une infime partie est éliminée via l'urine. Cette perte minimale via l'urine résulte, comme nous l'avons déjà mentionné, de la faible concentration de cuivre sous forme libre dans le plasma sanguin. La perte de cellules épithéliales ne semble pas non plus être une source majeure de l'élimination quotidienne, quoique les ongles et les cheveux soient extrêmement riches en cuivre (6). De tous les liquides corporels, c'est la bile qui possède clairement la plus forte concentration de cuivre. Il est estimé que l'excrétion biliaire représente environ 2.5 mg du cuivre déversé quotidiennement dans le tube gastrointestinal, tandis que tout les autres liquides qui y sont déversés représentent environ 2.0 mg. La quantité de cuivre entrant dans le tube digestif par excrétion étant quatre ou cinq fois supérieure à celle y entrant par l'alimentation, la majorité des ≈ 6.0 mg de cuivre présents dans le tube

digestif doit être réabsorbée afin de garder un équilibre dans l'organisme. Malgré cette réabsorption au niveau du tube digestif, la majorité du cuivre non réabsorbé (et donc éliminé) provient tout de même de l'excrétion biliaire.

Si l'excrétion biliaire est la voie principale de l'élimination du cuivre, le cuivre cellulaire (se trouvant partout dans l'organisme) doit donc retourner vers les hépatocytes afin d'être incorporé dans le système biliaire. La céruloplasmine n'est donc pas uniquement impliquée dans la deuxième phase de l'absorption et de la distribution systémique du cuivre; elle participe également à son retour au foie pour fins d'élimination. En fait, non seulement la céruloplasmine liée au cuivre a-t-elle été identifiée dans la sécrétion biliaire (21), elle a également été retrouvée complexée à la bile dans le tube digestif (22, 23). De plus, le fait que la céruloplasmine n'est que très peu digérée par les enzymes digestifs (et donc ne peut être facilement absorbée par le système digestif) explique la non-réabsorption du cuivre lié à la bile (21, 22) et fait de l'excrétion biliaire le chemin principal pour l'élimination du cuivre.

Il existe un mécanisme physiologique permettant de séparer le cuivre devant être réparti dans le reste de l'organisme de celui devant être éliminé. Contrairement à la majorité des cellules de l'organisme, les hépatocytes n'ont pas de récepteurs spécifiques pour la céruloplasmine. Par contre, la forme désialylée de la protéine peut quand même transiger dans les hépatocytes via des récepteurs non-spécifiques pour le galactose, qui captent la majorité des glycoprotéines désialylées par endocytose (24). Des récepteurs spécifiques pour la céruloplasmine, ainsi qu'une capacité à désialyler les chaînes carboniques de la protéine, ont été identifiés chez les cellules épithéliales hépatiques. La céruloplasmine liant le cuivre destiné à être éliminé est donc d'abord absorbée et désyalisée par les cellules épithéliales hépatiques, puis déversée dans l'espace de Disse,

où elle est finalement absorbée via les récepteurs non-spécifiques pour le galactose par les hépatocytes avant d'être incorporée à la bile puis éliminée. Cette étape de désyrialisation représente donc un moyen de régulation de l'élimination du cuivre.

2. Altérations dans le métabolisme et dans le transport du cuivre.

Lors de certaines conditions ou maladies, le transport, le métabolisme et l'excrétion du cuivre peuvent être modifiés; ces altérations agissent soit comme les causes directes de ces maladies ou en sont les conséquences. Pour différencier les deux, la prochaine section traitera d'altérations dans le métabolisme du cuivre survenant lors de deux conditions particulières, puis dans deux maladies génétiques responsables d'une absorption et d'une excrétion anormales du cuivre.

2.1 Métabolisme du cuivre lors de l'inflammation et du cancer.

La réponse inflammatoire est caractérisée par une augmentation des concentrations plasmatiques de cuivre et de céruloplasmine, ainsi que par une augmentation de l'ARNm, des taux de synthèse et de la sécrétion hépatique de celle-ci (6). L'augmentation de la céruloplasmine dans la circulation sanguine offre ainsi une protection supplémentaire contre les radicaux libres oxygénés produits par l'activation des leukocytes, des macrophages et des autres cellules immunitaires lors de la réponse inflammatoire.

Le cuivre joue également un rôle dans l'angiogenèse, nécessaire au développement de nouveaux tissus et à la croissance des tumeurs. Il a été démontré que les cellules

cancéreuses absorbent aisément le cuivre plasmatique provenant de la céruloplasmine (25) et qu'en général, les tumeurs contiennent de fortes concentrations de cuivre (26).

2.2 Défauts génétiques affectant le transport du cuivre.

Deux défauts génétiques impliquant le transport du cuivre ont été identifiés il y a déjà quelque temps. L'un d'eux, la maladie de Menkes (MM), résulte en une déficience en cuivre, tandis que l'autre, la maladie de Wilson (MW), résulte en une suraccumulation de cuivre. Les deux gènes responsables de ces maladies ont été identifiés et clonés et des modèles animaux pour chaque maladie ont été élaborés : il s'agit du "mottled mice" pour la maladie de Menkes (27) et du "Long-Evans Cinnamon rat" pour la maladie de Wilson (28).

Les deux maladies résultent de mutations des gènes codant pour des transporteurs spécifiques du cuivre situés sur les membranes cellulaires ou sur les organelles intracellulaires. Ces deux transporteurs, baptisés ATP7A et ATP7B, font partie de la famille des transporteurs ATP-dépendants de type P impliqués dans le transport de cations au travers des membranes et partagent des similitudes structurales avec les transporteurs de Mg(II), Na(I), K(I) et Ca(II) présents chez d'autres organismes. En effet, toutes les ATPases de type P ont conservé un résidu aspartate, qui est phosphorylé lors du transport des cations, et des séquences spécifiques servant à lier les métaux présents sous forme ionique. Ces séquences sont similaires à celles des ATPase de type P présentes chez les bactéries et sont caractérisées par un motif *Gly-Met-Thr-Cys-X-X-Cys* (29). Les gènes responsables des maladies de Menkes et de Wilson codent tous deux pour des protéines contenant dans leur domaine amino-terminal 6 de ses séquences spécifiques pour la liaison des métaux. Ces deux protéines possèdent effectivement une

similitude de 59% dans leur séquence d'acides aminés, en plus de posséder des similitudes de 43% (pour la protéine de Wilson) et 33% (pour la protéine de Menkes) avec le transporteur bactériologique CopA (30).

Étant donné que nous sommes plutôt intéressés par une accumulation de cuivre systémique (et donc par la maladie de Wilson), nous n'allons couvrir la maladie de Menkes que très brièvement afin d'en souligner les similitudes avec la maladie de Wilson.

2.3 La maladie de Menkes : une déficience en cuivre.

La maladie de Menkes (MM) est un défaut génétique récessif lié au chromosome X et caractérisé par une sévère déficience en cuivre au niveau systémique. Le gène responsable de cette maladie code pour un transporteur de cuivre de la famille des ATPases de type P. Ce transporteur nommé ATP7A (également connu sous protéine MNK) est largement exprimé partout dans l'organisme, sauf dans le foie. Le défaut principal de la MM est une réduction de la première phase du transport du cuivre lors de son absorption (tel que décrit à la section 2.2). La majorité du cuivre entrant dans les cellules de la muqueuse intestinale ne parvient pas à traverser la membrane basolatérale et entrer dans la circulation sanguine pour ensuite se rendre dans le foie et être distribué dans l'organisme. Les cellules de la muqueuse intestinale, alors riches en cuivre, sont éventuellement éliminées de façon naturelle via les selles, où une concentration anormalement élevée de cuivre sert de diagnostic pour la maladie. Une conséquence évidente de cette déficience en cuivre est que tout les enzymes dépendants du cuivre deviennent soit inactifs ou voient leur activité enzymatique diminuer radicalement. Ceci explique donc les divers symptômes cliniques associés à la maladie: dégénérescence

neurologique, mauvaise régulation de la température corporelle, dégénérescence des muqueuses, pâleur, cheveux minces et brisés ("steely and kinky hair"), et parfois même décès prématuré dans l'enfance (31).

La mauvaise absorption intestinale ne va pas totalement exclure tout le cuivre de l'organisme: une infime quantité est tout de même transférée à travers la membrane basolatérale de la muqueuse intestinale par d'autres transporteurs d'ions métalliques non-spécifiques pour le cuivre. Malgré cet apport minime, il en résulte néanmoins une déficience sévère en cuivre dans la majorité des tissus corporels, qui, à moins d'être remédiée par l'introduction de cuivre au niveau de la circulation sanguine, peut éventuellement causer la mort chez les individus affectés. Concernant cette introduction de cuivre dans la circulation sanguine, il a été démontré qu'un traitement continu au cuivre (sous forme de complexe dihistidine), débutant dès que possible après la naissance, pouvait prolonger la vie de certains individus atteints de la maladie et même prévenir les dommages au cerveau et à la fonction motrice. Cependant, ce traitement n'est pas suffisant pour entièrement prévenir la pathologie, qui commence tout de même à se développer dès la période de gestation (32).

2.4 La maladie de Wilson : une accumulation de cuivre.

La maladie de Wilson (ou dégénérescence hépato-lenticulaire acquise) (MW), identifiée par SA Kinnier Wilson en 1912, est également un défaut génétique de transmission autosomique récessive affectant un transporteur de cuivre ATP-dépendant de type P (33). Malgré une similitude au niveau génétique et dans la sorte de protéine affectée, le phénotype de la MW est complètement l'opposé de celui de la maladie de Menkes : il y a accumulation et non déficience de cuivre au niveau de l'organisme. Ceci

est dû au fait que la protéine codée par le gène de Wilson, nommée ATP7B, est responsable d'une autre phase de l'absorption du cuivre dans l'organisme. Normalement, une fois absorbé, le cuivre est dirigé vers les hépatocytes par la transcupréine, où il est ensuite incorporé soit dans la céruloplasmine, soit dans la bile, soit dans des enzymes intracellulaires (telle la Cu/Zn-SOD). Cependant, chez les patients atteints de la MW, les processus d'incorporation du cuivre dans la céruloplasmine et dans le système biliaire font tous deux défaut. Le cuivre doit traverser une portion de la membrane hépatocytaire menant aux canaliculi biliaires pour être incorporé dans la bile et il doit se retrouver dans les canaux du réticulum endoplasmique pour être incorporé dans la céruloplasmine: deux fonctions assumées par le même transporteur ATP7B. En effet, ce produit du gène de la MW est presque exclusivement exprimé dans le foie et constitue une étape indispensable au transfert du cuivre dans le système biliaire, ainsi que dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (pour son incorporation dans la céruloplasmine) (34, 35).

Le cuivre ne pouvant être incorporé à la céruloplasmine ni être éliminé par le système biliaire, il y a accumulation hépatique jusqu'à 25 fois les concentrations normales (36). Cette accumulation prolongée de cuivre entraîne éventuellement une cirrhose, un déversement hépatique et une accumulation de cuivre dans des tissus extra-hépatiques (37), incluant le cerveau, où les niveaux atteignent entre 10 et 15 fois les concentrations normales (38, 39). Ceci explique le fait que les symptômes initiaux reliés à la MW se présentent sous forme hépatique, neurologique, psychiatrique et/ou de crise hémolytique.

Il y a des variations régionales dans l'accumulation cérébrale de cuivre (37, 40) : les ganglions de la base, les noyaux sous-thalamiques, la matière corticale blanche et la

matière corticale grise présentant les plus grandes accumulations (41). Ces accumulations cérébrales de cuivre peuvent résulter en dégénérescence cavitaire, en gliose, ou même en perte de cellules nerveuses (36, 42). Des études réalisées chez l'humain et chez les modèles animaux de la MW ont démontré une concentration de cuivre normale dans le liquide céphalorachidien d'individus ne souffrant pas de symptômes neurologiques. Par contre, chez les individus ayant des symptômes neurologiques, ces concentrations de cuivre deviennent anormalement élevées et s'avèrent proportionnelles à la concentration cérébrale (43). Il semblerait en effet que cette augmentation cérébrale des niveaux de cuivre soit directement associée aux symptômes neurologiques reliés à la MW (44).

2.4.1 Symptômes

Ce sont les manifestations hépatiques et neurologiques, apparaissant dans plus ou moins les mêmes proportions, qui sont les plus fréquentes dans la MW (31). Les symptômes hépatiques se manifestent souvent avant l'adolescence (quoiqu'ils soient beaucoup plus difficiles à déceler par la suite) et peuvent se manifester sous forme de déficience hépatique aiguë ou chronique avec ou sans symptômes neurologiques. Les symptômes neurologiques, pour leur part, ont tendance à se manifester plus tard (généralement entre 20 et 30 ans), quoiqu'ils puissent également être présents lors de l'adolescence et de l'enfance. Ces symptômes neurologiques incluent des déficits du mouvement, des tremblements, une mauvaise coordination, une rigidité, une perte du mouvement locomoteur fin et des difficultés à avaler (45). Dans presque 20% des cas, il y a présence de symptômes psychiatriques sans aucune autre manifestation clinique. De

plus, des troubles de comportement, de la dépression et même un cas de schizophrénie ont également été rapportés (31).

2.4.2 Diagnostic clinique

Le diagnostic clinique de la MW chez des patients présentant des symptômes neurologiques et/ou hépatiques accompagnés d'anneaux Kayser-Fleisher dans la cornée de l'œil (résultat d'un dépôt de cuivre dans la membrane de Desemet) est le plus simple à établir. En plus d'être basé sur l'apparition des anneaux de Kayser-Fleisher et une augmentation des concentrations urinaires de cuivre, le diagnostic de la maladie peut également être basé sur une diminution de la concentration de céruloplasmine plasmatique, sur une concentration élevée d'alanine aminotransférase plasmatique (une indication d'un dommage hépatique), ainsi que sur une détermination quantitative de la concentration de cuivre hépatique et du liquide céphalorachidien (44). Cependant, étant donné que les anneaux de Kayser-Fleisher sont absents chez presque 40% des patients présentant des manifestations hépatiques, que la distribution du cuivre dans le foie peut être inégale et donc faussement déterminée par une biopsie localisée et qu'il n'y a pas de signes cliniques ou biochimiques spécifiques à la MW, un diagnostic précis de la maladie devient extrêmement difficile à établir (46), surtout chez des patients ne présentant que des symptômes hépatiques et chez des enfants asymptomatiques (34).

Il existe évidemment des méthodes d'analyse de mutations génétiques, notamment celles du polymorphisme de conformation à simple brin et à l'analyse de linkage génétique qui utilisent des marqueurs microsatellites permettant un diagnostic précis de la maladie. Mais étant donné la diversité des mutations présentes sur le gène, ces méthodes d'analyse génétique s'avèrent extrêmement compliquées, plutôt longues et

malheureusement trop coûteuses. Jusqu'à présent, au-delà de 200 de ces mutations ont été identifiées sur le gène de Wilson : elles sont répertoriées et classifiées dans <http://www.medgen.med.ualberta.ca/database.html>, un outil indispensable à l'élaboration éventuelle de solutions aux problèmes d'analyse génétique de cette maladie. Récemment, un groupe allemand a développé un système de dépistage beaucoup plus rapide utilisant la technologie de "reverse hybridization DNA strip" pour identifier les deux mutations les plus fréquemment observées : la H1069Q (fréquence d'allèle 63%) et la 3400delC (fréquence d'allèle 9%) (47).

Le diagnostic idéal de la MW en est donc un qui, à défaut d'être confirmé par analyse génétique, ne tient pas uniquement compte d'un seul résultat de laboratoire, mais intègre plutôt le plus de paramètres cliniques et biochimiques disponibles. Il a même été proposé que tout patient âgé de 40 ans et moins présentant des signes cliniques et/ou histologiques d'hépatite chronique (et dont l'hépatite de cause auto-immunitaire ou virale a été exclue) soit soumis à un examen de dépistage pour la MW (46). De plus, il est primordial que la parenté immédiate d'une personne souffrant de la MW soit examinée, car la maladie peut être cliniquement "latente", malgré un dommage extensif aux organes.

2.4.3 Traitements

Malgré un diagnostic difficile à établir, il devient primordial de déceler la maladie de Wilson le plus tôt possible afin d'éviter des dommages permanents causés au foie et au cerveau. En effet, le pronostic pour les patients est excellent s'il y a traitement précoce et immédiat; il peut même y avoir rétablissement d'une fonction neurologique normale après l'apparition de symptômes cliniques. Étant donné l'omniprésence du cuivre dans

les aliments, une restriction alimentaire stricte et rigoureuse devient pratiquement impossible à établir, mais devrait tout de même se situer sous les 1 mg par jour. Présentement, deux approches thérapeutiques sont utilisées dans le traitement de la MW : un traitement aux agents de séquestration (tels la pénicillamine et la trientine) et une prévention de l'absorption du cuivre au niveau intestinal à l'aide de fortes doses de zinc (48, 49).

Introduite en 1956 par JM Walshe, la pénicillamine s'avère un agent de séquestration du cuivre fort efficace qui est à ce jour encore largement utilisée comme traitement principal pour la MW. De nombreuses études ont démontré que l'utilisation de la pénicillamine pour aussi peu que quatre semaines atténue fortement (et parfois même élimine complètement) les anomalies hépatiques, neurologiques et psychiatriques associées à la MW (48). Son mécanisme d'action demeure encore controversé et est basé sur sa capacité de séquestrer le cuivre intracellulaire et/ou à induire une production de métallothionines. La trientine (dihydrochlorure de triéthylène tétramine), utilisée pour la première fois en 1969, sert d'alternative chez les patients réagissant négativement à la pénicillamine (surtout des complications au niveau du système immunitaire et des réactions au niveau de la peau). La trientine forme un complexe tout aussi stable avec le cuivre, (permettant également son évacuation via l'urine) et cause beaucoup moins de complications secondaires que la pénicillamine chez ces patients. Par contre, son efficacité de séquestration et d'élimination du cuivre s'avère inférieure à celle de la pénicillamine, justifiant ainsi son utilisation conditionnelle (50, 51).

Afin de réduire l'absorption intestinale de cuivre, le zinc, administré de façon orale, est utilisé depuis 1979. Les fortes doses de zinc stimulent chez les cellules de la muqueuse intestinale une surproduction de métallothionines, qui ont une plus forte

affinité pour le cuivre que pour le zinc. Le cuivre est donc lié aux métallothionines à l'intérieur des cellules intestinales (retardant ainsi son passage au travers de la membrane basolatérale) jusqu'à ce que ces dernières soient éliminées de façon naturelle avec les selles (52). Étant donné que les agents de séquestration sont beaucoup plus rapides pour éliminer le cuivre de l'organisme, le traitement au zinc est souvent utilisé comme traitement à long terme et/ou comme complément aux traitements de séquestration (53), quoique son utilisation en monothérapie soit également assez efficace (54). Finalement, étant donné que le cuivre présent en trop grande quantité peut causer la formation de radicaux libres oxygénés (voir la section suivante), un traitement aux antioxydants commence à être utilisé en parallèle, quoiqu'il soit encore trop tôt pour déterminer si les résultats s'avèrent efficaces.

2.4.4 Neuropathologie

Étant donné que l'apparition et la sévérité des symptômes neurologiques de la MW sont directement proportionnelles à l'accumulation cérébrale de cuivre, plusieurs études ont été menées afin de déterminer les mécanismes d'action pathologiques de cet ion métallique (lorsque présent en concentrations anormalement élevées) dans le cerveau. De nombreux travaux neuropathologiques portant sur la MW ont démontré une pathologie au niveau des cellules gliales, plutôt qu'une perte extensive de cellules neuronales (55) : Mossakowski (56, 57) et plus récemment Bertrand (58, 59), ont démontré la présence de cellules de type Alzheimer I (Alz I), Alzheimer II (Alz II) et Opalski (Opl), toutes d'origine gliale, dans des cerveaux autopsiés de patients de la MW, ainsi que dans des cultures cellulaires exposées au sérum de patients atteints de la MW. Les caractéristiques intrinsèques des cellules Alz I et Alz II sont très différentes ; les

cellules Alz II étant les plus couramment observées et donc les mieux étudiées. Décrites initialement par von Hösslin et Alzheimer en 1912 (60), ces dernières sont mitotiques et ont une distribution plus étendue et une durée de vie supérieure à celles de type I (61). Elles possèdent un noyau pâle et enflé, généralement présent en paires (manifestation d'une prolifération astrocytaire), un gonflement et une vacuolisation du cytoplasme et une composition altérée des microfilaments intermédiaires (marquée principalement par une réduction de la protéine GFAP). À ce jour, les cellules de type Alz II ont été identifiées dans quelques 15 pathologies différentes. La figure 1.2, tirée d'un ouvrage de Mossakowski sur la pathologie cellulaire de la MW, présente un exemple typique d'une cellule Alzheimer de type II.



Figure 1.2. Cellules Alzheimer de type I et II. Tirée de l'ouvrage de Mossakowski, cette image microscopique démontre un exemple de cellule Alzheimer de type I (I) et de cellule Alzheimer de type II (II).

Les cellules de type I, quand à elles, sont situées uniquement là où le dommage tissulaire est plus sévère. Elles sont fortement GFAP-positives et ont une durée de vie beaucoup plus courte que les cellules de type II. Ces cellules sont caractérisées par un défaut dans la formation du fuseau de division, qui entraîne une répulsion entre paires de chromatides encore jointes par le centromère. Il y a également absence de séparation de

ces mêmes chromatides, ce qui entraîne la formation de "micro-noyaux", qui se fusionnent et deviennent ainsi facilement identifiables (figure 1.2) (62). Contrairement aux cellules Alz II, les cellules Alz I ne sont pas originaires d'astrocytes normaux : elles sont plutôt originaires de cellules Alz II, déjà dystrophiques et métaboliquement altérées (ce qui explique leur présence aux sites de dommage tissulaire intense). En effet, il a été démontré qu'une attaque supplémentaire, tel un infarctus cortical dans un cerveau hépato-encéphalique (63) ou un dommage parenchymal sévère dans les ganglions de la base lors de la MW (64), active ces cellules Alz II et les transforme en astrocytes fortement GFAP-positifs (c'est-à-dire, en cellules de type Alz I).

Les études de Mossakowski et de Bertrand ont également démontré que le type et la quantité de pathologie gliale étaient proportionnels à l'intensité du dommage tissulaire ainsi qu'à la forme clinique de la MW. En effet, les cellules Alz II sont plutôt caractéristiques d'une réponse gliale immédiate à une augmentation cérébrale de cuivre, et donc beaucoup plus présentes lors de la forme hépatique de la maladie, tandis que les cellules de type Alz I et Opl ne sont présentes que dans les stades avancés de la maladie, c'est-à-dire lors des stades neurologiques.

2.4.5 Mécanismes physiopathologiques

Malgré plusieurs études caractérisant le type et la quantité de neuropathologie observée lors de la MW, les mécanismes responsables de celle-ci demeurent encore largement inconnus et malheureusement très peu documentés. Nous allons dans un premier temps énumérer les quelques mécanismes mis de l'avant pour expliquer cette pathologie cellulaire caractéristique de la MW. Nous allons ensuite décrire une autre

instance d'accumulation de cuivre au cerveau et en expliquer brièvement les mécanismes pathologiques afin de les superposer à la MW.

Étant donné que les ions cupriques, selon leur valence, peuvent être de puissants agents réducteurs ou oxydants, plusieurs études ont proposé qu'une altération dans leur concentration intracellulaire ou une erreur dans leur séquestration étaient responsables des dommages cellulaires et/ou tissulaires observés lors de la MW (65, 66). En effet, la réaction entre la forme réduite du cuivre et la molécule d'oxygène peut produire des espèces oxygénées réactives potentiellement cytotoxiques, tels l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyl ($\cdot OH$). Un faible niveau d'enzymes antioxydants (superoxyde dismutase, catalase et peroxydases), une forte concentration de substrats facilement oxydables (tels les lipides membranaires) et une production intrinsèque élevée d'espèces oxygénées (par suite de réactions neurochimiques, telle l'oxydation de la dopamine) font en sorte que le système nerveux central (SNC) est particulièrement vulnérable aux effets néfastes de ces espèces oxygénées (67). De plus, le fait que le l'anion superoxyde puisse transférer un électron à l'ion cuprique (Cu^{2+}) pour le réduire en cupreux (Cu^+) (la forme réactive pour la production des radicaux libres), peut également causer une attaque oxydative pouvant dérégler certains mécanismes du SNC, les rendant potentiellement cytotoxiques. Par exemple, une telle attaque peut dérégler les concentrations intracellulaires de calcium et d'oxyde nitrique (NO), affectant ainsi la libération d'acides aminés excitateurs (66). Lorsque considérés, ces prédispositions font en sorte qu'un stress oxydatif engendré par une accumulation d'ions de cuivre pourrait en effet être responsable de la neuropathologie observée au SNC lors de la MW.

Plusieurs études ont donc proposé un dérèglement au niveau des espèces oxygénées comme étant le principal mécanisme physiopathologique responsable des symptômes neurologiques observés lors de la MW. Outre ce mécanisme, il a été démontré que les métaux de transition, incluant le cuivre, peuvent modifier de façon nuisible la structure moléculaire de certaines protéines et peptides (67) : le cuivre, par exemple, pouvant se complexer avidement avec les résidus histidine, cystéine et méthionine présents sur celles-ci. Il est donc permis de stipuler que l'excès de cuivre accumulé au cerveau lors de la MW se lie à et modifie la structure de certaines protéines essentielles au fonctionnement du système nerveux, en entrave le fonctionnement normal et conséquemment agit en tant que mécanisme physiopathologique responsable des symptômes neurologiques de la maladie.

Une autre instance d'accumulation de cuivre au cerveau est l'encéphalopathie hépatique (EH), une complication neuropsychiatrique causée par une déficience hépatique aiguë ou chronique, dont les symptômes cliniques ressemblent énormément à ceux de la MW (68). En effet, des accumulations de manganèse et de cuivre ont été découvertes dans les cerveaux autopsiés de patients souffrant de déficience hépatique chronique (69). Chez des patients souffrant d'EH, plusieurs études d'imagerie par résonance magnétique (IRM) ont démontré une hyper-intensité des signaux T-1 dans le pallidum attribuable à une accumulation de manganèse dans cette structure. Plusieurs anomalies ont également été découvertes par IRM chez des patients atteints de la MW : des lésions sous forme de signaux T-1 hypo-intenses et T-2 hyper-intenses ont été observées de façon symétrique dans plusieurs régions cérébrales, tels le *globus pallidus*, le putamen, le thalamus et la *substantia nigra* (70). Fait intéressant, lors d'un symposium international sur la MW en 1995, Hoogenraad a présenté des résultats

d'IRM démontrant cette fois une hyper-intensité pallidale des signaux T-1 chez des patients souffrant de la MW accompagnée d'une hypertension portale, proposant du même coup une accumulation de manganèse dans cette région (34). Malheureusement, il n'y a toujours pas d'information concernant les concentrations cérébrales de manganèse chez des patients souffrant de la MW, malgré qu'une toxicité chronique au manganèse présente une symptomatologie presque identique à celles de la MW et de l'EH. En 1997, Mochizuki a également démontré une hyper-intensité pallidale des signaux T-1 chez des patients souffrant de la MW ; il a cependant attribué cette hyper-intensité à un effet paramagnétique du cuivre et/ou à une accumulation de cellules gliales de type Alz II (71). Les accumulations cérébrales de cuivre et de manganèse, ainsi que les similitudes des lésions décelées par IRM suggèrent donc l'éventualité de certains mécanismes physiopathologiques communs entre les déficiences hépato-cérébrales d'origine génétique (maladie de Wilson) et acquise (encéphalopathie hépatique).

Quoique les mécanismes physiopathologiques de l'EH ne soient pas tout à fait résolus, il semblerait qu'un défaut de neurotransmission soit principalement impliqué. En effet, chez le rat souffrant d'une déficience hépatique aiguë, il y a diminution de l'expression du transporteur astrocytaire de glutamate GLT-1 (72). De plus, une exposition d'astrocytes en culture à des concentrations pathologiques de manganèse a comme conséquence de réduire le transport à haute affinité du glutamate (73). Ces diminutions du transport à haute affinité du glutamate se traduisent directement par une augmentation des concentrations extracellulaires de glutamate. Cette accumulation extracellulaire de glutamate peut ainsi engendrer un mécanisme de mort neuronale excitotoxique associée aux récepteurs NMDA, résultant du même coup en un mécanisme pathogénique responsable des symptômes neuropsychiatriques de l'EH.

Étant donné que les effets d'une exposition de manganèse sur le transport à haute affinité ont déjà été étudiés dans des astrocytes en culture et que nous considérons probable le fait qu'une accumulation de cuivre (également un métal de transition divalent s'accumulant dans le cerveau lors de la MW et de l'EH) puisse agir de la même façon, nous avons entrepris d'étudier les effets d'une accumulation de cuivre sur le transport à haute affinité du glutamate chez ces mêmes astrocytes en culture. Ceci nous permettra non seulement de proposer un nouveau mécanisme physiopathologique responsable de la maladie de Wilson, mais également d'établir certaines similitudes entre les mécanismes pathogéniques responsables des déficiences hépato-cérébrales d'origine génétique (MW) et acquise (EH), en plus d'entrevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour de telles maladies associées à une déposition cérébrale de métaux divalents chez l'humain.

CHAPITRE 2

Article

**Impaired high affinity glutamate uptake in rat primary cortical astrocytes
exposed to copper (II) salts.**

[Neurochemistry International (2003). Sous presse]

**IMPAIRED HIGH AFFINITY GLUTAMATE UPTAKE IN RAT PRIMARY
CORTICAL ASTROCYTES EXPOSED TO COPPER (II) SALTS.**

Marc Pannunzio, Helen Chan, Alan S. Hazell, and Roger F. Butterworth

Neuroscience Research Unit, Hôpital St-Luc (Université de Montréal),

Montréal, Québec, Canada H2X 3J4

Running title: Reduced glutamate uptake in copper-treated astrocytes.

Address for reprints and correspondence:

Roger F. Butterworth, Ph.D., D.Sc.
Director, Neuroscience Research Unit
Hôpital St-Luc,
1058 St-Denis Street,
Montréal, Québec
H2X 3J4 Canada

Tel.: (514) 890-8000 ext. 35740

Fax.: (514) 412-7314

Email.: 

Abstract

Wilson's disease (WD) is an autosomal recessive disorder characterized by neuronal degeneration resulting from copper accumulation in brain. Neuropathological studies of WD patients emphasize glial pathology rather than neural cell loss. A large body of evidence exists to support the role of copper-mediated oxidative injury as a major factor in the pathology of several neurodegenerative disorders, including WD. Since redox-active transition metal exposure of cultured astrocytes has been shown to reduce high-affinity glutamate uptake, the effects of cupric chloride (CuCl_2) exposure on the high affinity glutamate uptake system in primary cortical astrocytes was investigated. Exposure to CuCl_2 resulted in time and dose-dependent reductions of high affinity D-aspartate uptake. Kinetic analyses showed a significant dose-dependent decrease in the velocity of uptake (V_{\max}) and concomitant decreases in the affinity (K_m) of the transporter for its substrate. Exposure to CuCl_2 had no effect on astrocytic uptake of the monoamine transporter ligand citalopram. Immunoblotting using a monoclonal antibody to EAAT-1 revealed significant decreases in expression of the transporter following a 3 day, 50 μM CuCl_2 exposure, whereas RT-PCR failed to reveal any changes in *EAAT-1* gene expression, suggesting a post-translational modification. Treatment of CuCl_2 -exposed cells with the antioxidants α -tocopherol and butylated hydroxyanisole (BHA) resulted in a partial attenuation of the glutamate uptake deficit, suggesting a role of reactive oxygen species. The present results suggest a novel mechanism for the pathogenesis of neuronal cell death observed in copper toxicity disorders such as Wilson's disease, namely failure of the astrocytic glutamate uptake system in brain contributing to excitotoxic cell death.

Introduction

Wilson's disease (WD) is an autosomal recessive disorder characterized by liver cirrhosis and neuronal degeneration due to a marked impairment of biliary copper excretion (Monaco and Chelly, 1995) which leads to copper accumulation in the liver and extrahepatic tissues including the brain. Regional variations in brain copper accumulation are found in WD (Nalbandyan, 1983; Mzhe'Iskaia et al., 1989) with copper accumulating predominantly in the basal ganglia, subthalamic nuclei, and cortical grey and white matter (Alt et al., 1990). In WD, cerebral copper concentrations increase to as much as 59 $\mu\text{g/g}$ (wet weight) (Faa et al., 2001) with a cut-off point for the development of neurological symptoms being estimated at 40 $\mu\text{g/g}$ (wet weight) (Walshe and Gibbs, 1987). These cerebral copper accumulations result in cavitory degeneration, gliosis, and ultimately, neuronal loss (Waggoner et al., 1999; Di Donato and Sarkar, 1997).

Neuropathological studies of WD emphasize glial pathology rather than neural cell loss (Horoupian et al., 1988). In a series of studies, Mossakowski et al. (1970, 1984) and more recently, Bertrand et al. (1997, 2001) demonstrated the presence of Alzheimer type I (Alz I), Alzheimer type II (Alz II), and Opalski cells (Opl) (all of astroglial origin) in autopsied brain tissue from WD patients as well as in cell cultures exposed to serum from WD patients. It was noted that the type and the amount of astroglial pathology correlated both with the clinical form of the disease and with the intensity of tissue damage. Alz II cells, in particular, were a characteristic feature of the early astroglial response to copper overload.

Aside from WD, there is substantial interest in the role of trace redox-active transition metals in the neuropathology of several other neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease (PD), Alzheimer's disease (AD), and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (as reviewed by Campbell et al., 2001). Excessive tissue accumulation of redox-active transition metals can be cytotoxic, mostly because perturbations in metal homeostasis can lead to increased free radical production and to superoxide-yielding redox-cycling (Sayre et al., 1999). In agreement with this hypothesis, copper-mediated oxidative injury has often been proposed as a key mechanism in the pathogenesis of the neuronal cell loss observed in WD (Perry et al., 2002; Rotilio et al., 2000).

However, oxidative injury may not be the sole pathogenetic mechanism involved in metal accumulation in brain. Since astroglia have the ability to avidly sequester metal accumulations in brain and known to act as metal depots (reviewed by Tiffany-Castiglioni and Quian, 2001), and since redox-active transition metal exposure of cultured astrocytes has been shown to reduce high-affinity glutamate uptake (Dave et al., 1994; Hazell and Norenberg, 1997), the effects of copper (II) exposure on the high affinity glutamate uptake system in primary cortical astrocytes were investigated in order to further elucidate the effects of copper on astrocytic function.

Materials and methods

Cell culture preparation

Primary astrocyte cultures were prepared from 1-day old Sprague-Dawley rat pups (Charles River, Quebec) and grown as described by Booher and Sensenbrenner (1972). The cerebral cortex was removed and the tissue mechanically dissociated and plated in either 35 mm or 50 mm culture dishes (Falcon). Cultures were maintained in 10% calf serum-containing Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Gibco) in 5% CO₂/ 95% air at 37°C for approximately 2 weeks until cells reached confluency. Thereafter, cells were maintained in 10% horse serum-containing DMEM (Gibco). Cells were grown for 3-5 weeks, during which time the culture medium was changed twice weekly.

Exposure of cell cultures to cupric chloride (CuCl₂), cupric sulphate (CuSO₄), sodium chloride (NaCl), α -tocopherol, and butylated hydroxyanisole (BHA).

Primary rat cortical astrocytes cultures (as described above) were exposed to varying concentrations (1 μ M to 100 μ M) of CuCl₂ (Sigma), CuSO₄ (Sigma), NaCl (Sigma). ZnCl₂ (Sigma) in 10% horse serum-containing DMEM for a range of time periods up to 5 days. In some studies, 50 μ M α -tocopherol, 100 μ M α -tocopherol or 100 μ M BHA was added in combination with copper for the duration of the treatment. Media was changed daily during treatment.

Determination of cytotoxicity by lactate dehydrogenase (LDH) release.

LDH release was measured at room temperature using a method previously described by Wroblewski and LaDue (1975) with minor modifications. Essentially, media was collected from 35 mm culture dishes and cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS), scraped and then collected in 0.5 mL 0.5% Triton X-100. The samples were then centrifuged at 10,000 g for 5 min and the resulting supernatants were assayed for LDH activity. The supernatants and NADH (4 mM) were added to a potassium phosphate buffer (0.1 M, pH= 7.4) and the reaction was initiated by the addition of sodium pyruvate (20 mM). The reaction was monitored spectrophotometrically for a 2 min period at 340 nm.

[³H]-D-Aspartate uptake studies

Uptake studies were carried out as described by Drejer et al. (1982) and Bender and Norenberg (1996). Cultures were gently washed and pre-incubated for 25 min in 5% CO₂/95% air at 37°C with HHBS (Hank's HEPES-buffered saline) buffer containing varying concentrations of cupric chloride (between 1 μM and 100 μM). The cultures were then incubated for 2 minutes with the same buffer containing both D-aspartate (50 μM) and [³H]-D-aspartate (0.2 μCi/mL). The glutamate analogue D-aspartate was chosen as it has the advantage of being non-metabolizable and is transported via the L-glutamate system (Drejer et al., 1983). Uptake was halted by aspiration of the HHBS buffer and rapid washing of the cells twice with ice-cold HHBS buffer. Cells were air-dried for a minimum of 15 min, then solubilized in 0.5 mL of 1 M NaOH. Sample aliquots were then measured for incorporated radioactivity (via liquid scintillation counting) and protein content (Lowry et al., 1951) for calculation of uptake rates.

Kinetic studies utilized a range of D-aspartate concentrations between 0.1 μM and 1000 μM .

[³H]-citalopram uptake studies

[³H]-citalopram uptake studies were performed essentially according to the same protocol as for the [³H]-D-aspartate uptake experiments as described above; 2 mM [³H]-citalopram replaced [D-aspartate + [³H]-D-aspartate] during the incubation period.

EAAT-1 protein expression (immunoblotting)

For the study of EAAT-1 protein expression, cultures were washed twice with 1X PBS, then scraped and collected in 1.0 mL of the same buffer on ice. Samples were centrifuged (5,000 rpm, 5 min, 4°C), the supernatant discarded, and the pellet frozen at –80°C overnight to allow for cell lysis. Subsequently, pellets were thawed and homogenized in 0.1 mL 1:50 Tris/EDTA buffer containing 1/500 Protease Inhibitor Cocktail (PIC, Sigma) and 1/100 PMSF (Sigma). Homogenates were centrifuged (12,000 rpm, 45 min, 4°C) and membrane (pellet) and cytosolic (supernatant) fractions separated. Membrane pellets used in this study were further washed with buffer and rehomogenized. Samples were kept at –80°C. A portion of these samples (30 μg) were later separated by a denaturing SDS-PAGE (8%) as previously described (Rothstein et al., 1994) and transferred to PVDF-nitrocellulose membranes (Pall) (pre-soaked in transfer buffer (48 mM Tris (pH= 8.3), 39 mM glycine, 0.037% SDS, 20% methanol) for 5 min) in a tank transfer cell overnight. Once transfer was completed, the membrane was air-dried. For immunological protein detection, the membrane was briefly incubated in

methanol (5 min) then in a blocking buffer (5% dried milk, PBS, 0.05% Tween-20) for 1 h, followed by incubations with antisera against EAAT-1 (1/10 000), a kind gift from Dr David Pow of the University of Queensland (Brisbane, Australia) (Pow and Barnett, 1999) and with the secondary antibody (1/30 000) (Santa Cruz); each in blocking buffer for 1 h. Subsequent to each incubation with the primary and secondary antibodies, blots were washed 3 x 5 min with PBS/0.05% Tween-20. Finally, blots were visualized using ECL chemiluminescence (Amersham) and apposed to Kodak X-OMAR film. Signal intensities were measured with a densitometer.

EAAT-1 mRNA expression (RT-PCR)

EAAT-1 transporter mRNA expression was measured by semi-quantitative RT-PCR using purified total mRNA from primary cortical astrocyte cultures. Total mRNA was extracted using Trizol reagent (Life Technologies Inc., USA) according to the manufacturer's protocol. *β-actin* was used as an internal standard to correct for loading variations. Optimal conditions were obtained after 20 amplification cycles for *EAAT-1* and 17 for *β-actin* using 0.5 μg of RNA per reaction for *EAAT-1* and 1.0 μg for *β-actin*. Oligonucleotide primers were designed using the PRIME program (Genetic Computer Group, Wisconsin) and synthesized by the Sheldon Biotechnology centre (McGill University, Quebec) based on the following accession numbers: V01217 (*β-actin*, Nudel et al., 1983) and X63744 (*EAAT-1 (GLAST)*, Stork et al., 1992). Composition of the PCR primers is as follows (5'→3') *EAAT-1*, TGGTTTTCTGGACCGCCTCCGA (forward) and TAAACCAATACGTTTTGGCT (reverse); and *β-actin*, CATCCCCAAAGTTCTAC (forward) and CCAAAGCCTTCATACACT (reverse). The monospecificity of the

oligonucleotide primers was verified by computer analyses using the PRIMER program. Reverse transcription of the mRNA and PCR amplification of the resulting cDNAs were performed in a one-step reaction. The reaction mixture (final volume of 50 μ L) contained 0.35 μ g of total RNA, which was incubated in 10 mM Tris-HCl (pH=8.3), 50 mM KCl, 0.1% (w/v) BSA, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 100 μ Ci/mL α [³²P]-dCTP (3000 μ Ci/mmol), 320 U/mL of RNase inhibitor, 100 U/mL AMV reverse transcriptase, 20 U/mL *Taq* polymerase and the primers either for *EAAT-1* or for *β -actin* (1 μ M of both forward and reverse oligos each). The mRNA was reverse transcribed at 50°C for 15 min followed by PCR including a denaturing step at 95°C for 1 min, primer annealing at 60°C for 45 s, and a DNA elongation step at 72°C for 1 min. Using these primer sets, the amplification of *EAAT-1* mRNA resulted in a 388 bp fragment, whereas the *β -actin* product was 347 bp in length. The PCR products were separated on an 8% polyacrylamide gel, which was then apposed to film for visualization. The amplified *EAAT-1* and *β -actin* cDNA fragments were then subsequently excised from the gel and Cerenkov radiation was quantified using a β -counter.

Results

Effects of CuCl₂ on [³H]-D-aspartate uptake.

Primary cortical astrocytes exposed to non-cytotoxic concentrations of CuCl₂ for up to 5-day time periods displayed both dose- and time-dependent decreases in high affinity [³H]-D-aspartate uptake when compared to cells exposed to CuCl₂-free media (controls) (figures 1A and 1B). As determined by LDH release assays, no cell toxicity was observed at CuCl₂ concentrations below 100 μM for exposure periods of 2 days, and at fixed concentrations of 50 μM CuCl₂ for up to 3 days (data not shown). Figure 1A demonstrates that astrocytes exposed to 10 μM CuCl₂ for two days results in a 28% reduction of the high affinity [³H]-D-aspartate uptake ($p < 0.05$), whereas exposures to 25 μM and 50 μM CuCl₂ results in 40% and 64% decreases ($p < 0.001$), respectively. Furthermore, subsequent studies in which cells were exposed to 50 μM CuCl₂ for 24 h and 72 h revealed a time-dependent effect on [³H]-D-aspartate uptake (62% and 75% decreases at 24h and 72h, respectively, $p < 0.001$) (Figure 1B).

In order to verify that the effect of CuCl₂ on uptake was due to the presence of Cu²⁺ ions and not the extra chloride ions released by CuCl₂ dissociation in the medium, parallel studies were performed using CuSO₄. Comparable decreases of [³H]-D-aspartate uptake in the presence of CuSO₄ showed both dose- and time-dependency (data not shown). Also, the effect exerted by copper showed specificity to high affinity glutamate uptake, as similar copper exposures failed to modify the high affinity uptake of the monoamine transporter ligand [³H]-citalopram, a non-metabolizable analogue of serotonin (Figures 1A and 1B).

To determine kinetic parameters, concentration dependence studies were performed following a 3 day exposure to 10, 25, and 50 μM CuCl_2 (Fig. 2). Exposure to 10 μM CuCl_2 resulted in a 17% decrease in the V_{max} (non-significant), which was further decreased to 55% and 62% ($p < 0.01$) following exposures to 25 μM and to 50 μM CuCl_2 , respectively (Table 1) suggesting a concentration-dependent reduction in the number of glutamate transporter sites. The decreases in V_{max} were accompanied by 18% (non-significant), 63% ($p < 0.05$), and 112% ($p < 0.01$) increases in the K_m values after exposures to 10, 25, and 50 μM CuCl_2 , respectively (Table 1) suggesting a concentration-dependent decrease in the affinity of the transporter for its substrate.

Effect of CuCl_2 exposure on EAAT-1 glutamate transporter protein expression

To examine the effect of CuCl_2 on the expression of EAAT-1, cell cultures were exposed to either varying concentrations (10, 25, and 50 μM) of CuCl_2 for a 3 day period or to a fixed concentration of 50 μM CuCl_2 for 1 and 3 day time periods. EAAT-1 protein expression was significantly reduced when cells were exposed to 50 μM CuCl_2 for a 3 day time period (12.5 % decrease, $p < 0.05$) (Fig. 3). Other exposure times and concentrations did not result in any alterations in EAAT-1 protein levels. Furthermore, total RNA extractions and subsequent RT-PCR of cells treated with varying concentrations (10, 25, and 50 μM) of CuCl_2 for a 3 day time period did not reveal any changes in EAAT-1 mRNA expression compared to cells treated with CuCl_2 -free media (controls) (data not shown).

Effect of α -tocopherol and BHA exposure on [3 H]-D-aspartate uptake in CuCl₂-treated cells.

To examine the hypothesis that copper may act as a mediator of oxidative stress and impair high affinity glutamate uptake through generation of reactive oxygen species (ROS), cell cultures treated with 25 and 50 μ M CuCl₂ for 3 days were co-incubated either with varying concentrations (50 and 100 μ M) of the antioxidants α -tocopherol (Vit. E) or 100 μ M BHA. Figure 4 demonstrates that addition of α -tocopherol partially attenuates the decrease in high affinity glutamate uptake due to CuCl₂. Addition of 50 μ M α -tocopherol caused 5% (non-significant) and 38% ($p < 0.05$) ameliorations in [3 H]-D-aspartate uptake in cells treated with 25 and 50 μ M CuCl₂ whereas addition of 100 μ M α -tocopherol led to even further increases compared to non- α -tocopherol treated cells (24% for 25 μ M CuCl₂ ($p < 0.05$) and 55% for 50 μ M CuCl₂ ($p < 0.001$)). The antioxidant BHA, on the other hand, proved to be less effective in re-establishing the high-affinity [3 H]-D-aspartate uptake in CuCl₂-treated cells. Addition of 100 μ M BHA increased high affinity uptake 10% (non-significant) in 25 μ M CuCl₂-treated cells and 45% ($p < 0.05$) in 50 μ M CuCl₂-treated cells (Fig. 4).

Discussion

In order to study the effects of a cerebral copper accumulation on astrocytic function, primary cortical astrocytes were exposed to pathophysiologically-relevant copper concentrations. To characterize copper exposure in cultured astrocytes, cytotoxicity experiments were performed using copper concentrations that were typically 5-fold lower than the *in vivo* cerebral copper concentrations found in WD patients (Walshe and Gibbs, 1987). Compared to more acute exposure protocols consisting of higher copper concentrations and shorter exposure times (Watt et al., 2001), ours more accurately depicted the progressive accumulation of copper in brain seen in WD patients and in experimental animal models of the disease (Yamaguchi et al., 1994).

The mechanism by which high affinity glutamate uptake is reduced following exposure to Cu^{2+} remains unclear. Because high-affinity glutamate uptake is reduced prior to any change in expression of EAAT-1 (the major glutamate transporter found in primary cultured astrocytes) (Danbolt, 2001; Rothstein et al., 1994), reduced uptake could only in part be attributed to a decreased expression of the EAAT-1 transporter. Rather, a possible link between copper accumulation in astrocytes and a reduction in high-affinity glutamate uptake might reside in the property of copper to function as a mediator of oxidative stress (Sayre et al., 1999). Indeed, a large body of evidence exists to support the role of copper-mediated oxidative injury as a major factor in the pathology of several neurodegenerative disorders (Rotilio et al., 2000). Consistent with this possibility, reduced hepatic concentrations of antioxidants (GSH and vitamin E), a rise in the concentrations of circulating lipid peroxides, and a decrease in plasma vitamin E levels have all been observed in WD patients (von Herbay et al., 1994). Also,

increased levels of 8-hydroxy-deoxy-guanosine levels in DNA are found in brain, kidney, and liver of the *Long-Evans Cinnamon* rat model of WD suggesting that excess copper levels may result in DNA damage by oxygen radicals (Yamamoto et al., 1993).

Emerging advances in molecular genetics and in neurochemistry suggest the association of excitotoxicity and oxidative damage in the selective degeneration of neuronal populations characteristic of neurodegenerative disorders such as PD, AD, ALS, and ischemia (as reviewed by Trotti et al., 1998, Gonzalez-Fraguela et al., 1999, and Follezou et al., 1999). Also, increasing evidence indicates that glutamate transporters are vulnerable to the action of biological oxidants, resulting in reduced uptake function (Miralles et al., 2001). Specific 'redox-sensing' elements, consisting of cysteine residues, have been identified in the structures of EAAT-1 and EAAT-2 and have been shown to regulate transport rate via thiol-disulphate redox interconversion (Trotti et al., 1998). In accordance with this finding, many studies have not only demonstrated that free radicals and ROS can modify glutamate transporters and consequently reduce high-affinity glutamate uptake (Volterra et al., 1994; Muller et al., 1998), but that addition of cupric ions potentiate this effect (Sorg et al., 1997). The present study supports this hypothesis by demonstrating that the addition of the antioxidants α -tocopherol and BHA partly re-establish high-affinity glutamate uptake in a way that is proportional to the copper concentration being used (suggesting that a higher copper concentration yields a greater oxidative insult affecting the high-affinity glutamate uptake). The partial amelioration of high-affinity glutamate uptake by these antioxidants suggests that copper may only be a contributing factor to the observed reduction in high-affinity glutamate uptake. Indeed, many other factors, such as the

capacity of transition metals to bind and modify deleteriously the molecular structure of peptides and proteins (Halliwell, 1992) and the capacity of an oxidative insult to alter the thermodynamics of glutamate transport by modifying Na^+K^+ -ATPase (Streck et al., 2001), may also reduce high-affinity glutamate uptake. Further work will thus have to be performed to clarify these possibilities.

Taken together, the present results demonstrate that copper exposure in cultured astrocytes leads to reduced glutamate uptake capacity of this cell type. This could lead to increased extracellular concentrations of glutamate and thus favor excitotoxic cell death. Furthermore, reduction of high-affinity glutamate uptake in these cells appears to be in part modulated by oxidative stress. Further studies will have to be conducted to define the precise relationship between glutamate uptake and oxidative stress in pathologies involving metal accumulation in brain. Also, other mechanisms such as cellular swelling and altered energy states might affect transport activity. Although our preliminary results demonstrate astrocytic swelling in response to copper exposure, these results, along with those regarding ATP level determination, L-glutamate metabolism and Na^+ concentrations, will be the object of a forthcoming study. Nonetheless, the clarification of copper-affected mechanisms in the brain is an important step towards further understanding of WD and may reveal more effective clinical treatments.

Acknowledgements

This work was funded by CIHR Canada. Helen Chan is a recipient of a CIHR Doctoral Award. The antisera against EAAT-1 was a kind gift from Dr David Pow from the University of Queensland, Australia.

References

- Alt, E.R., Sternlieb, I., Goldfisher, S. (1990). The cytopathology of metal overload. *Int Rev Exp Pathol.* **31**: 165-88.
- Bender, A.S., Norenberg, M.D. (1996). Effects of ammonia on L-glutamate uptake in cultured astrocytes. *Neurochem Res.* **21(5)**: 567-73.
- Bertrand, E., Lechowics, W., Szpak, G.M., Lewandowska, E., Czlonkowska, A., Dymecki, J. (1997). Quantitative study of pathological forms of astroglia in Wilson's disease. *Folia Neuropathol.* **35(4)**: 227-32.
- Bertrand, E., Lewandowska, E., Szpak, G.M., Hoogenraad, T., Blaauwgers, H.G., Czlonkowska, A., Dymecki, J. (2001). Neuropathological analysis of pathological forms of astroglia in Wilson's disease. *Folia Neuropathol.* **39(2)**:73-9.
- Booher, J., Sensenbrenner, M. (1972). Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat, and human brain in flask cultures. *Neurobiol.* **2**: 97-105.
- Campbell, A., Smith, M.A., Sayre, L.M., Bondy, S.C., Perry, G. (2001) Mechanisms by which metals promote events connected to neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull.* **55(2)**: 125-32.
- Dave, V., Mullanay, K.J., Goderie, S., Kimelberg, H.K., Aschner, M. (1994). Astrocytes as mediators of methylmercury neurotoxicity: effects on D-aspartate and serotonin uptake. *Dev Neurosci.* **16(3-4)**: 222-31.
- Danbolt, N.C. (2001). Glutamate Uptake. *Progress Neurobiol.* **65**: 1-105.
- Di Donato, M., Sarkar, B. (1997). Copper uptake and its alterations in Menkes' and Wilson's diseases. *Biochem Biophys Acta.* **1360**: 3-16.
- Drejer, J., Larsson, O.M., Schousboe, A. (1982). Characterisation of L-glutamate uptake into and release from astrocytes and neurons cultured from different brain regions. *Exp Brain Res.* **47**: 259-69.
- Drejer, J., Larsson, O.M., Schousboe, A. (1983). Characterization of uptake and release processes for D- and L-aspartate in primary cultures of astrocytes and cerebral granule cells. *Neurochem Res.* **8**: 231-43.
- Faa, G., Lisci, M., Caria, M.P., Ambu, R., Sciot, R., Nurchi, V.M., Silvagni, R., Diaz, A., Crisponi, G. (2001). Brain copper, iron, magnesium, zinc, calcium, sulfur, and phosphorus storage in Wilson's disease. *J Trace Elem Med Biol.* **15(2-3)**: 155-60.
- Follezou, J.Y., Emerit, J., Bricaire, F. (1999). [Neuro-degenerative diseases: role of reactive oxygen species and of apoptosis]. *Presse Med.* Oct 9; **28(30)**: 1661-6.

- Gonzalez-Fraguela, M.E., Castellano-Benitez, O., Gonzalez-Hoyuela, M. (1999). [Oxidative stress in neurodegeneration]. *Rev Neurol*. Oct 1-15: **28(5)**: 504-11.
- Halliwell, B., (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*. **59**: 1609-23.
- Hazell, A.S., Norenberg, M.D. (1997). Manganese decreases glutamate uptake in cultured astrocytes. *Neurochem Res*. **22(12)**: 1443-7.
- Horoupian, D.S., Sternlieb, I., Scheinberg, I.C.H. (1988). Neuropathological findings in penicillamine-treated patients with Wilson's disease. *Clin Neuropathol*. **7**: 62-7.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin reagent. *J Biol Chem*. **193**:263-75.
- Miralles, V.J., Martinez-Lopez, I., Zaragoza, R., Borrás, E., Garcia, C., Pallardo, F.V., Vina, J.R. (2001). Na⁺ dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) in primary astrocyte cultures: effect of oxidative stress. *Brain Res*. **922(1)**: 21-9.
- Monaco, A.P., Chelly, J. (1995). Menkes and Wilson diseases. *Adv Genet*. **33**: 233-53.
- Mossakowski, M.J., Renkawek, K., Krasnicka, Z., Smialek, M., Pronaszko, A. (1970). Morphology and histochemistry of Wilsonian and hepatic gliopathy in tissue culture. *Acta Neuropathol (Berl)*. **16(1)**: 1-16.
- Mossakowski, M.J., Weinrauder, H. (1984). Immunomorphology of Wilsonian and hepatic gliopathy in vitro. *Neuropatol Pol*. **22(2)**: 161-78.
- Mzhe'Iskaia, T.I., Larskii, E.G., Oashchenko, L.A., Gladkikh, S.P., Ivanova-Smolenskaia, I.A., Markova, E.D. (1989). [Analysis of trace elements of the brain and liver tissues in Wilson's disease] *Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova*. **89(7)**: 69-73.
- Muller, A., Maurin, L, Bonne, C., (1998). Free radical and glutamate uptake in the retina. *Gen Pharmacol*. **30(3)**: 315-8.
- Nalbandyan, R.M. (1983). Copper in Brain. *Neurochem Res*. **8(10)**: 1211-1231.
- Nudel, U., Zakut, R., Shani, M., Neuman, S., Levy, Z., Yaffe, D. (1983). The nucleotide sequence of the rat beta-actin gene. *Nuclei Acids Res*. **11**: 1759-71.
- Pow D.V., Barnett, N.L. (1999). Changing patterns of spatial buffering of glutamate in developing rat retinae are mediated by the Muller cell glutamate transporter *GLAST*. *Cell Tissue Res*. **297**: 57-66.

- Perry, G., Sayre, L.M., Atwood, G.S., Castellani, R.J., Cash, A.D., Rottkamp, C.A., Smith, M.A. (2002). The role of iron and copper in the aetiology of neurodegenerative disorders. *CNS Drugs*. **15(5)**: 339-52.
- Rothstein, J.D., Martin, L., Levey, A.I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., et al. (1994). Localisation of neuronal and glutamate transporters. *Neuron*. **13**: 713-25.
- Rotilio, G., Carri, M.T., Rossi, L., Ciriolo, M.R. (2000). Copper-dependent oxidative stress and neurodegeneration. *IUBMB Life*. **50**: 309-14.
- Sayre, L.M., Perry, G., Smith, M.A. (1999). Redox metals and neurodegenerative diseases. *Curr Opin Chem Biol*. **3**: 220-5.
- Sorg, O., Horn, T.F., Yu, N., Gruol, D.L., Bloom, F.E. (1997). Inhibition of astrocyte glutamate uptake by reactive oxygen species: role of antioxidant enzymes. *Mol Med*. Jul; **3(7)**: 431-40.
- Streck, E.L., Zugno, A.I., Tagliari, B., Franzon, R., Wannmacher, C.M., Wajner, M., Wyse, A.T. (2001). Inhibition of rat brain Na⁺, K⁺-ATPase activity induced by homocysteine is probably mediated by oxidative stress. *Neurochem Res*. Nov; **26(11)**: 1195-200.
- Tiffany-Castiglioni, E., Qian, Y. (2001). Astroglia as metal depots: molecular mechanisms for metal accumulation, storage and release. *Neurotoxicology Oct*; **22(5)**: 577-92.
- Trotti, D., Danbolt, N.C., Volterra, A. (1998). Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol Sci*. **19(8)**: 328-34. Review.
- Volterra, A., Trotti, D., Floridi, S., Racagni, G. (1994). Reactive oxygen species inhibit high-affinity glutamate uptake: molecular mechanism and neuropathological implications. *Ann N Y Acad Sci*. Nov 17; **738**: 153-62. Review.
- von Herbay, A., de Groot, H., Hegi, U., Stremmel, W., Strohmeyer, G., Sies, H. (1994). Low vit. E content in plasma of patients with alcoholic liver disease, hemochromatosis and Wilson's disease. *Hepatology*. **20**: 41-6.
- Waggoner, D.J., Bartnikas, T.B., Gitlin, J.D. (1999). The role of copper in neurodegenerative disease. *Neurobiol Dis*. Aug; **6(4)**: 221-230.
- Walshe, J.M., Gibbs, K.R. (1987). Brain copper in Wilson disease. *Lancet*. Oct 31; **2(8566)**: 1030.
- Watt, N.T., Hooper, N.M. (2001). The response of neurons and glial cells to elevated copper. *Brain Res Bull*. **55(2)**: 56-63.

- Woblewski, F., LaDue, J.S. (1975). Lactic dehydrogenase activity in the blood. *Proc Soc Exp Biol Med.* **90**: 210-13.
- Yamamoto, F., Kasai, H., Togashi, Y., Takeichi, N., Hori, T., Nishimura, S. (1993). Elevated level of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA of liver, kidneys, and brain of Long-Evans Cinnamon rats. *Japn J Cancer Res.* **84**: 508-11.
- Yamaguchi, Y., Heiny, M.E., Shimizu, N., Aoki, T., Gitlin, J.D. (1994). Expression of the Wilson disease gene is deficient in the Long-Evans Cinnamon rat. *Biochem J.* **301**: 1-4.

Legends to Figures and Tables

Figure 1A. Effects of varying concentrations of CuCl_2 on [^3H]-D-aspartate and [^3H]-citalopram uptake in primary cultured astrocytes (2 day exposure period). Error bars represent \pm SEM of 3 separate determinations. Experiments were performed in triplicate. † $p < 0.05$, * $p < 0.001$ compared with control cells (media alone).

Figure 1B. Effects of 50 μM CuCl_2 on [^3H]-D-aspartate and [^3H]-citalopram uptake in primary cultured astrocytes for 1 and 3 days. Error bars represent \pm SEM of 4 separate determinations. * $p < 0.001$ compared with control cells (no CuCl_2), † $p < 0.05$ compared with 1 day / 50 μM CuCl_2 treatment.

Figure 2. Effects of CuCl_2 on [^3H]-D-aspartate uptake in primary cultured astrocytes. Cells were exposed to varying concentrations of D-aspartate (1-1000 μM) following a 3 day exposure to CuCl_2 (10-50 μM). Results show the means \pm SEM of 8 separate determinations. Experiments were performed in duplicate.

Figure 3. Effect of 50 μM CuCl_2 exposure for 3 days on EAAT-1 protein expression in primary cultured astrocytes. Top panel shows typical Western blots. Histogram shows mean densitometric values. Data represents the mean \pm SEM, $n=5$. Experiments were performed in triplicate. * $p < 0.05$ compared to control cells.

Figure 4. Effect of antioxidants α -tocopherol (Vit. E) and BHA on the high-affinity [^3H]-D-aspartate uptake in primary cultured astrocytes exposed to varying concentrations of CuCl_2 (3 day exposure period). Error bars represent SEM of 4 determinations. Experiments were performed in duplicate. * $p < 0.05$ and † $p < 0.001$ compared to CuCl_2 alone (no α -tocopherol or BHA added).

Table 1. Effects of CuCl_2 on the kinetic parameters of high affinity [^3H]-D-aspartate uptake by primary cortical astrocytes. Data are mean \pm SEM from 8 separate determinations. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with controls (media alone). Experiment was performed in duplicate.

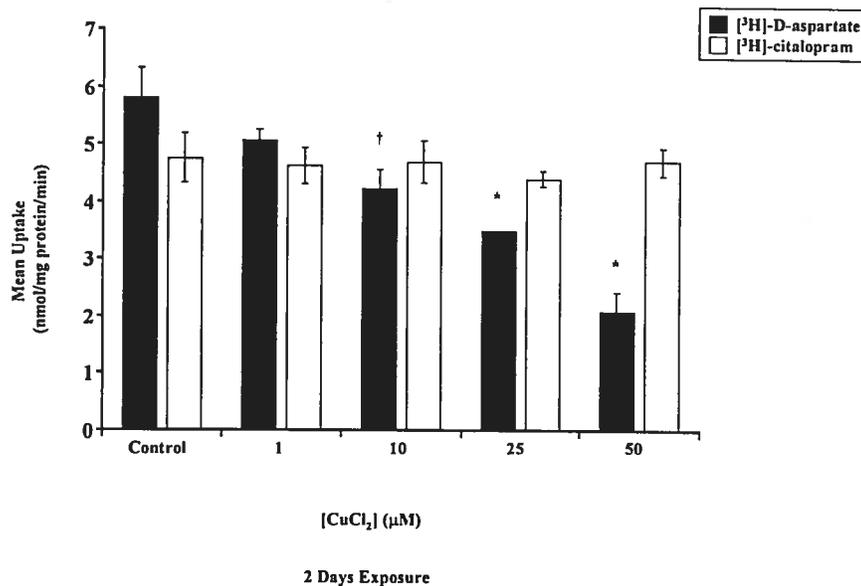


Figure 2.1A. Effects of varying concentrations of CuCl_2 on $[^3\text{H}]\text{-D-aspartate}$ and $[^3\text{H}]\text{-citalopram}$ uptake in primary cultured astrocytes (2 day exposure period). Error bars represent \pm SEM of 3 separate determinations. Experiments were performed in triplicate. \dagger $p < 0.01$, $*$ $p < 0.001$ compared with control cells (media alone).

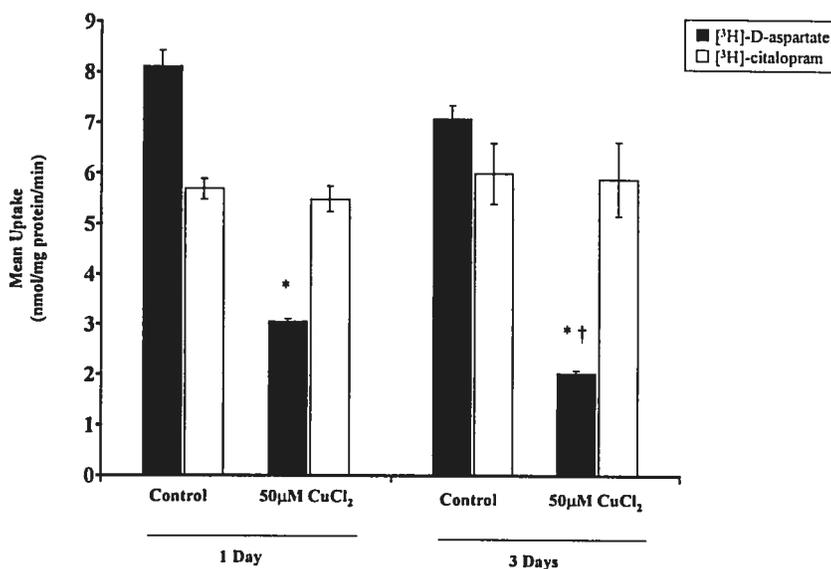


Figure 2.1B. Effects of 50 μM CuCl_2 on $[^3\text{H}]\text{-D-aspartate}$ and $[^3\text{H}]\text{-citalopram}$ uptake in primary cultured astrocytes for 1 and 3 days. Error bars represent \pm SEM of 4 separate determinations. $*$ $p < 0.001$ compared with control cells (no CuCl_2), \dagger $p < 0.05$ compared with 1 day / 50 μM CuCl_2 treatment.

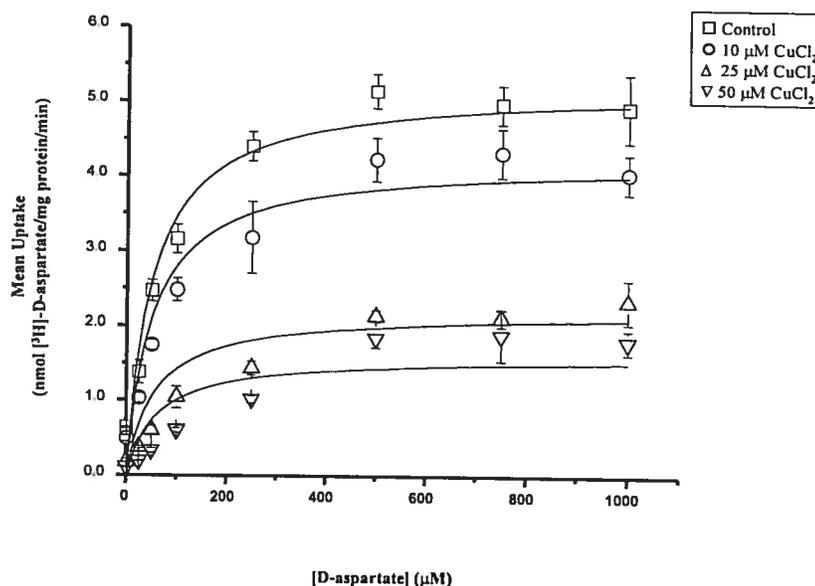


Figure 2.2. Effects of CuCl_2 on $[^3\text{H}]$ -D-aspartate uptake in primary cultured astrocytes. Cells were exposed to varying concentrations of D-aspartate (1-1000 μM) following a 3 day exposure to CuCl_2 (10-50 μM). Results show the means \pm SEM of 8 separate determinations. Experiments were performed in duplicate.

3 day exposure	V_{\max} (nmol/min/mg protein)	K_m (μM)
Control (no CuCl_2)	4.944 ± 0.234	46.22 ± 9.43
10 μM CuCl_2	4.012 ± 0.226	54.76 ± 10.96
25 μM CuCl_2	$2.214 \pm 0.146^{**}$	$75.20 \pm 9.28^*$
50 μM CuCl_2	$1.847 \pm 0.291^{**}$	$98.14 \pm 12.47^{**}$

Table III. Effects of CuCl_2 on the kinetic parameters of high affinity $[^3\text{H}]$ -D-aspartate uptake by primary cortical astrocytes. Data are mean \pm SEM from 8 separate determinations. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with controls (media alone). Experiment was performed in duplicate.

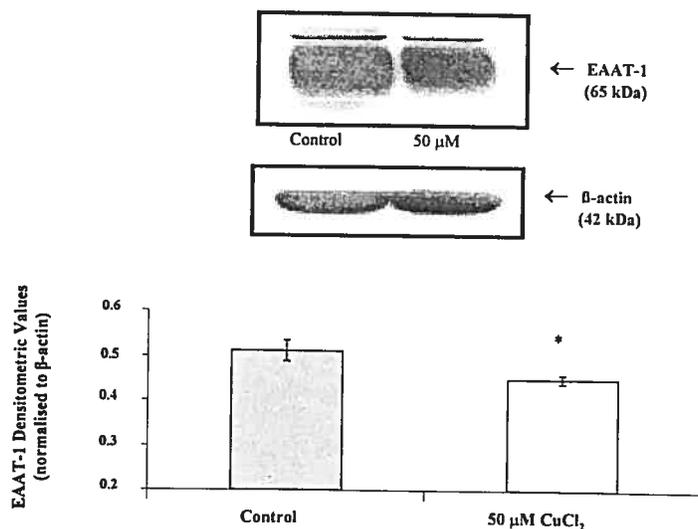


Figure 2.3. Effect of 50 μM CuCl₂ exposure for 3 days on EAAT-1 protein expression in primary cultured astrocytes. Top panel shows typical Western blots. Histogram shows mean densitometric values. Data represents the mean ± SEM, n=5. Experiments were performed in triplicate. * p< 0.05 compared to control cells.

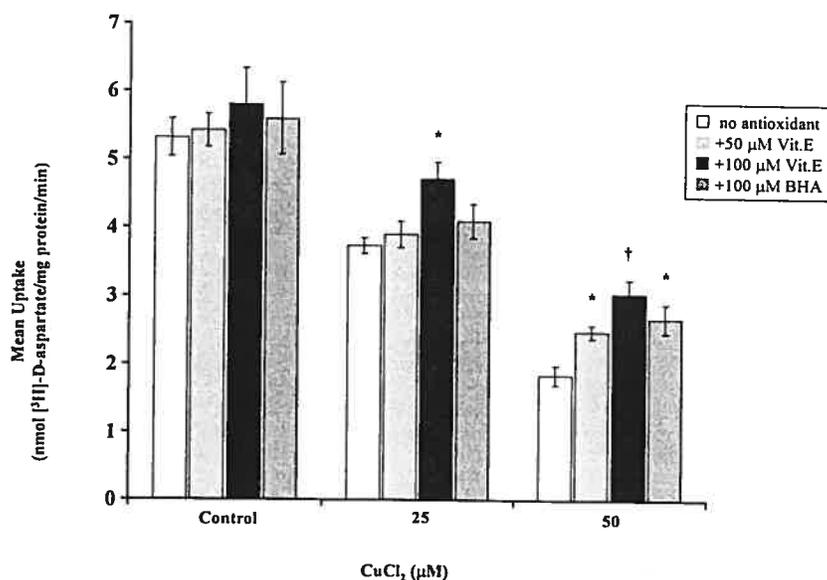


Figure 2.4. Effect of antioxidants a-tocopherol (Vit.E) and BHA on the high-affinity [3H]-D-aspartate uptake in primary cultured astrocytes exposed to varying concentrations of CuCl₂ (3 day exposure period). Error bars represent SEM of 4 determinations. Experiments were performed in duplicate. * p<0.05 and † p<0.001 compared to CuCl₂ alone (no a-tocopherol or BHA added).

CHAPITRE 3

3.1 Discussion

Nous proposons dans le présent mémoire un nouveau mécanisme physiologique contribuant à la pathologie cellulaire de la MW. Essentiellement, nous avons démontré qu'une exposition à des concentrations de cuivre pathologiquement pertinentes entraîne, de façon dose- et temps-dépendent, une réduction du transport à haute affinité du glutamate dans des astrocytes en culture.

Nous avons utilisé des astrocytes en culture non seulement parce que les astrocytes séquestrent avidement les métaux divalents (84), mais aussi, tel que mentionné antérieurement, parce que la majorité des études neuropathologiques portant sur la MW ont décelé une pathologie au niveau des cellules gliales. De plus, l'encéphalopathie hépatique et le manganisme, deux pathologies présentant une accumulation de métaux divalents (Cu^{2+} et Mn^{2+}) au cerveau, semblent également impliquer un défaut de re-capture des neurotransmetteurs libérés par les cellules gliales. Étant donné que des expositions au manganèse (73) et au mercure (74) réduisent le transport à haute affinité du glutamate dans des astrocytes en culture, nous avons décidé d'étudier l'effet du cuivre, un autre métal divalent, sur ce transport à haute affinité. Nous avons utilisé un système de culture cellulaire car ce modèle expérimental nous permettait non seulement d'examiner un type cellulaire bien défini, mais aussi de modifier son environnement, afin d'étudier un mécanisme physiologique qui lui est propre. Ayant l'avantage d'être plus accessible et moins dispendieux qu'un modèle animal, ce modèle de culture cellulaire nous offre ainsi un environnement uniforme et contrôlé, exempt de facteurs pouvant modifier à notre insu le mécanisme spécifiquement étudié. Quoique ce modèle expérimental permette l'étude d'un mécanisme physiologique dans un environnement relativement simple, l'interprétation du rôle, du

fonctionnement et des anomalies de ce mécanisme doit cependant tenir compte du contexte biologique *in vivo*, beaucoup plus complexe, dans lequel il se situe normalement. Dans ces conditions, la culture cellulaire s'est avérée un outil idéal pour débiter l'étude des effets d'un agent pathologique externe (le cuivre) sur le fonctionnement d'un mécanisme physiologique astrocytaire spécifique (le transport à haute affinité du glutamate). Par contre, la prudence s'impose lorsque nous voulons extrapoler ce mécanisme physiopathologique à un être humain atteint de la MW.

L'élimination du glutamate de la fente synaptique est un rôle fondamental des astrocytes (75). Le glutamate, un dérivé du glucose, est l'acide aminé excitateur principal du système nerveux central (SNC). Normalement, la concentration cérébrale extra-cellulaire en glutamate est d'environ 2 μM , tandis que les concentrations cytosoliques varient entre 1 et 10 mM, dépendamment du type cellulaire (76). Les concentrations extra-cellulaires sont ainsi maintenues à des niveaux extrêmement bas, non seulement pour permettre une transmission, une transduction et une potentialisation efficaces du signal par les cellules post-synaptiques, mais surtout parce que le glutamate peut s'avérer extrêmement toxique lorsque présent en concentrations trop élevées. Afin d'éviter une telle accumulation extracellulaire de glutamate, le SNC restreint l'accès de celui-ci à la barrière hématoencéphalique (la barrière est complètement imperméable au glutamate), en plus de s'occuper de sa synthèse et de sa compartimentation de façon totalement intrinsèque via le cycle glutamate-glutamine, tel que représenté à la figure 3.1.

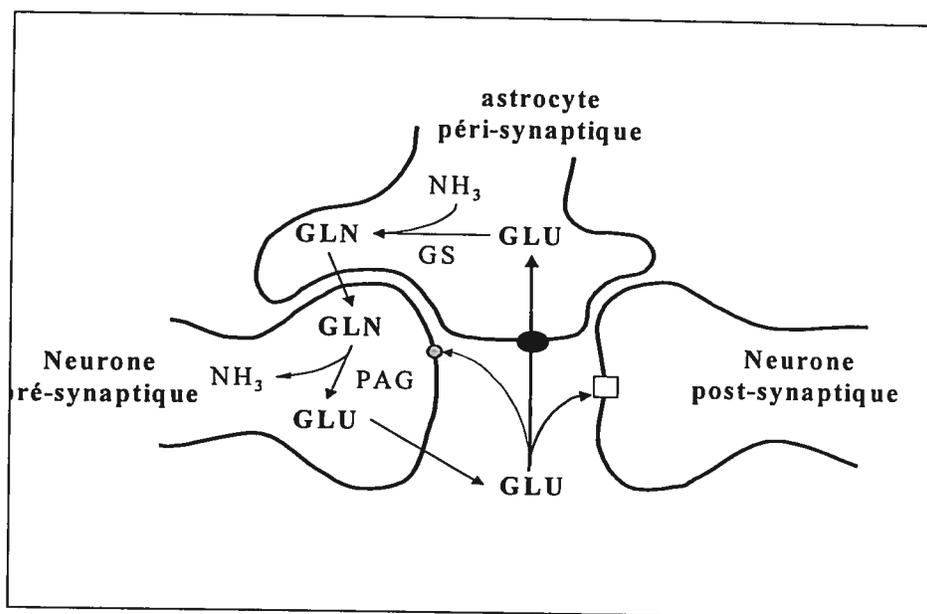


Figure 3.1. Le cycle glutamate-glutamine. Le glutamate pré-synaptique est contenu dans des vésicules relâchées par exocytose. Celui-ci active les récepteurs post-synaptiques, puis est rapidement éliminé de la fente synaptique principalement par le transport à haute affinité astrocytaire. Le glutamate astrocytaire est alors amidé en glutamine par l'ajout d'ammoniaque par l'enzyme GS (glutamine synthetase) (un processus énergie-dépendant), puis retourné aux neurones pré-synaptiques, où il est hydrolysé en glutamate par l'enzyme PAG (phosphate-activated glutaminase) (un processus énergie-indépendant).

Une réduction de la capacité astrocytaire à éliminer le glutamate de la fente synaptique, due à une accumulation extracellulaire de cuivre, pourrait conséquemment entraîner une accumulation extracellulaire de glutamate pouvant causer une mort neuronale de type excitotoxique reliée aux récepteurs NMDA et ainsi contribuer à la symptomatologie neurologique de la MW. Il existe deux principaux types de récepteurs post-synaptiques neuronaux pour le glutamate : les récepteurs ionotropiques, également dits non-NMDA (AMPA et kainate) et les récepteurs métabotropiques (NMDA). Comme le récepteur nicotinique à l'acétylcholine, les récepteurs ionotropiques forment des canaux perméables au Na^+ et au K^+ et contribuent à l'étape initiale du potentiel post-synaptique exciteur (PPSE). Les récepteurs neuronaux du glutamate de type NMDA (N-méthyl-D-

aspartate) sont également perméables au Na^+ et K^+ , en plus d'être fortement perméables au calcium (Ca^{2+}). Ces derniers possèdent une cinétique d'activation plutôt lente et ont la propriété d'être voltage-dépendants. Conséquemment, ils contribuent à la composante lente du PPSE et jouent un rôle important dans la régulation de la neuroplasticité post-synaptique dû à leur perméabilité au Ca^{2+} . Par contre, cette perméabilité au Ca^{2+} fait en sorte que ces récepteurs sont impliqués dans plusieurs pathologies cérébrales telles l'épilepsie, la sensibilité à l'éthanol, la mort de cellules neuronales et même certains défauts psychologiques (78). Une accumulation prolongée de glutamate dans la fente synaptique peut causer une sur-activation de ces récepteurs et conséquemment résulter en une accumulation intracellulaire de Ca^{2+} . Selon la théorie principale de la mort neuronale de type excitotoxique, cette accumulation intracellulaire de Ca^{2+} compromettrait la viabilité cellulaire par l'activation de protéases, d'endonucléases et de l'enzyme NOS (nitric oxyde synthase), par la production de radicaux libres et en causant une perméabilité des membranes mitochondriales (79).

Afin de déterminer les paramètres physiopathologiques d'une exposition au cuivre sur des astrocytes en culture, nous avons mesuré la viabilité cellulaire par suite de différentes expositions de cuivre sous forme cuprique (CuCl_2). Pour ce faire, nous avons mesuré le pourcentage de libération de l'enzyme LDH (lactate déhydrogénase), qui est en fait une indication de la libération du contenu enzymatique cytosolique dans le milieu extracellulaire par suite de nécrose. Certaines études avaient déjà examiné les effets du cuivre sur des astrocytes en culture. Par contre, ces études ont employé des concentrations de cuivre assez élevées (jusqu'à $500 \mu\text{M}$) et des temps d'exposition plutôt courts ($<24 \text{ hr}$) (80), qui selon nous ne représentent pas de façon adéquate les

conditions pathologiques observées chez l'humain lors de la MW. Nous avons d'abord tenté d'établir nos conditions de traitement selon les concentrations cérébrales de cuivre mesurées *in vivo* ou *post mortem* chez des patients atteints de la MW. Ces concentrations avaient déjà été mesurées par émission spectroscopique de masse (36, 38), mais ont été rapportées en unités de concentration de mg/g. De plus, étant donné qu'il n'y a toujours pas d'information concernant la distribution de cuivre entre les différents types cellulaires dans les régions du cerveau présentant une accumulation de cuivre lors de la MW, il s'est avéré difficile de déterminer les concentrations de cuivre à utiliser dans un système uniquement astrocytaire. Concernant les concentrations cérébrales de cuivre chez des patients atteints de la MW, plusieurs études ont démontré une accumulation jusqu'à 15 fois les concentrations normales dans certaines régions du cerveau, notamment les ganglions de la base, les noyaux sous-thalamiques, la matière blanche corticale et la matière grise corticale (37-41). Walshe et Gibbs (39) ont même proposé l'existence d'une concentration déclenchant le développement des symptômes neurologiques lors de la MW. Ayant déterminé des concentrations cérébrales moyennes de cuivre de 58.7 $\mu\text{g/g}$ (poids humide) chez des patients atteints de la MW présentant des symptômes neurologiques et de 34.8 $\mu\text{g/g}$ (poids humide) chez des patients neurologiquement asymptomatiques (comparés à une concentration moyenne de 5.2 $\mu\text{g/g}$ (poids humide) chez des individus normaux), ils ont ainsi déterminé qu'une concentration cérébrale supérieure à 40 $\mu\text{g/g}$ (poids humide) pouvait causer des symptômes neurologiques observés dans la MW. Nous avons donc établi nos conditions de traitement selon le protocole expérimental d'une étude réalisée par Hazell et Norenberg (73), portant également sur le transport à haute affinité du glutamate dans des

astrocytes en culture après une exposition à un métal divalent, le manganèse. Nous avons ainsi exposé nos cultures cellulaires soit à des concentrations de 10 μM à 100 μM CuCl_2 pour une période de 2 jours, soit à une concentration fixe de 50 μM CuCl_2 pour des périodes de temps allant jusqu'à 5 jours. Quoiqu'en moyenne 5 fois moins élevées que les concentrations cérébrales de cuivre mesurées *in vivo* chez des patients atteints de la MW, ces concentrations de cuivre permettent ainsi une comparaison directe de nos résultats avec ceux de Hazell et Norenberg, ainsi qu'avec ceux de plusieurs autres études traitant de l'exposition d'astrocytes en culture à des métaux (73, 74, 81), tout en reflétant de façon plus fidèle l'accumulation progressive de cuivre au cerveau observée chez des modèles animaux de la MW et chez des patients atteints de la maladie (103).

Les études sur la viabilité cellulaire ont démontré que le CuCl_2 induisait une augmentation de la nécrose d'astrocytes en culture seulement à des expositions de 100 μM pendant 2 jours ou de 50 μM pendant 5 jours. Afin de s'assurer que ces effets sur la viabilité cellulaire étaient bien causés par le Cu^{2+} , et non par les ions Cl^- libérés par la dissociation du CuCl_2 dans le milieu de culture, nous avons exposé nos cultures à du cuivre sous forme sulfate (CuSO_4), ainsi qu'à du chlorure de sodium (NaCl). Comme prévu, une exposition au CuSO_4 a produit exactement les mêmes résultats, tandis qu'une exposition au NaCl n'a montré aucun effet sur la mort cellulaire lorsque appliqué selon les même protocoles.

Ayant déterminé le seuil physiopathologique d'une exposition au CuCl_2 , nous avons ensuite démontré qu'une telle exposition entraînait, de façon proportionnelle à la concentration en cuivre et au temps d'exposition, une réduction du transport à haute affinité du glutamate. De plus, nous avons démontré que ces effets étaient spécifiques au

glutamate, car une telle exposition au cuivre n'a aucunement modifié le transport à haute affinité du [^3H]-citalopram, un analogue non-métabolisé de la sérotonine. Une étude de la cinétique du transport à haute affinité du glutamate a ensuite démontré une réduction de la V_{max} et une augmentations du K_m , toutes deux proportionnelles à la concentration en cuivre, se traduisant par une diminution des sites disponibles pour le transport du glutamate et de l'affinité du transporteur pour son substrat.

Nous avons ensuite étudié l'expression protéique du transporteur astrocytaire du glutamate, EAAT-1, et démontré une baisse de celle-ci, uniquement à partir du troisième jour d'exposition à une concentration de 50 μM CuCl_2 . Nous avons également déterminé que cette baisse des niveaux protéiques du transporteur n'était pas concomitante avec une baisse des niveaux de son ARNm. Une diminution des sites de transport à haute affinité du glutamate par suite d'une exposition au cuivre peut donc être attribuable à une diminution des niveaux protéiques du principal transporteur astrocytaire de glutamate.

Le transporteur EAAT-1 et son ARNm sont sélectivement exprimés dans les astrocytes (82). Jusqu'à présent, aucun astrocyte n'a été identifié comme n'exprimant pas EAAT-1 et EAAT-1 n'a jamais été démontré dans des neurones *in vivo*. De plus, les cultures astrocytaires non-différenciées provenant du cortex cérébral du rat (telles qu'utilisées dans nos expériences) expriment exclusivement le transporteur EAAT-1. Ce transporteur fait partie de la famille des transporteurs à haute affinité du glutamate, qui est composée de 5 sous-types : les transporteurs EAAT-1, EAAT-2, EAAT-3, EAAT-4, et EAAT-5. Initialement identifiés comme les transporteurs à haute affinité sodium-dépendants, ils sont maintenant désignés transporteurs des acides aminés excitateurs ou

EAAT, car ils sont aussi activés par des gradients de potassium (K^+). Les transporteurs EAAT-1 et EAAT-2 sont généralement exprimés dans le même astrocyte, mais en proportions différentes selon les régions du SNC. EAAT-3 est généralement neuronal, quoique présent en faibles concentrations dans le cytoplasme des astrocytes du cortex cérébral (83). EAAT-4 est exprimé principalement dans les cellules de Purkinje du cervelet, tandis que EAAT-5 est uniquement exprimé dans la rétine, chez le mammifère (83). EAAT-1 demeure par contre le principal transporteur péri-synaptique du glutamate dans le SNC (83) : il a été démontré que les astrocytes à proximité des synapses glutamatergiques expriment beaucoup plus de transporteurs EAAT-1 que les astrocytes se trouvant à proximité des capillaires (82), suggérant ainsi un rôle principal pour ce transporteur dans l'élimination synaptique du glutamate. Malgré cette information, nous avons déjà planifié de répéter nos expériences en utilisant un modèle de co-culture de neurones et d'astrocytes; les neurones stimulant l'expression du transporteur astrocytaire EAAT-2 via des facteurs diffusibles. Nous pourrions ainsi déterminer si une accumulation de cuivre affecte de la même façon cet autre transporteur du glutamate exprimé *in vivo* dans les astrocytes du SNC.

Étant donné qu'une diminution protéique du transporteur EAAT-1 ne survient qu'après une exposition à 50 μM de CuCl_2 pendant 3 jours, nous ne pouvons expliquer les réductions du transport à haute affinité du glutamate observées à des temps inférieurs à 3 jours (à une concentration de 50 μM) ou à des concentrations inférieures à 50 μM (pendant 3 jours). De plus, cette baisse des niveaux protéiques ne peut expliquer la réduction de l'affinité du transporteur pour son substrat. Afin de déterminer les mécanismes responsables de cette baisse d'affinité et de cette réduction du transport du

glutamate, avant qu'il n'y ait diminution protéique du transporteur EAAT-1, nous allons analyser la composition, la physiologie et la régulation de ce transport, afin de déterminer les mécanismes pathologiques pouvant être induits par une accumulation de cuivre. Dans un article de synthèse, Anderson et Swanson (76) précisent que le transport à haute affinité du glutamate astrocytaire est géré, d'une part, par l'expression des transporteurs et, d'autre part, par l'activité de ceux-ci; cette activité étant elle-même modifiée par des forces thermodynamiques et par des facteurs cinétiques. Les forces thermodynamiques sont les forces affectant le transport membranaire, c'est-à-dire le potentiel membranaire et les gradients Na^+ , K^+ et H^+ , tandis que les facteurs cinétiques représentent les changements intrinsèques du transporteur (ou ceux de son environnement immédiat) pouvant modifier sa vitesse de transport et son affinité envers son substrat.

Un lien possible entre une accumulation de cuivre et une modification de l'activité des transporteurs de glutamate astrocytaires réside dans les propriétés d'électrovalence du cuivre; les ions de cuivre pouvant être fortement réducteurs ou oxydants peuvent agir comme médiateurs d'un stress oxydatif. De plus, nous savons que les astrocytes ont la propriété d'accumuler des métaux divalents tels le manganèse, le mercure et le cuivre (84, 85). La forme réduite du cuivre pouvant causer une augmentation de radicaux oxygène réactifs (ROS) potentiellement toxiques, tels le radical hydroxyl ($\cdot\text{OH}$), l'anion superoxyde (O_2^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le fait que l'anion superoxyde puisse transférer un électron à l'ion cuprique (Cu^{2+}) pour le réduire en cupreux (Cu^+) (la forme réactive pour la production des radicaux libres), peuvent causer une insulte oxydative pouvant dérégler certains mécanismes du SNC. Selon plusieurs, cette augmentation de ROS, causée par une accumulation de

cuivre, serait à l'origine des dommages hépatiques et cérébraux de nature oxydative observés lors de la MW et serait un mécanisme primordial de la physiopathologie de la maladie (37, 66, 87). Une étude de von Herbay (88) suggère fortement la présence d'une attaque oxydative dans la MW. Cette étude a, en effet, démontré une réduction hépatique d'éléments antioxydants (surtout une baisse des niveaux de vitamine E et de glutathione (GSH)), une augmentation des niveaux de lipides peroxydés en circulation, ainsi qu'une diminution des niveaux plasmatiques de vitamine E (tous caractéristiques d'une attaque oxydative) chez des patients atteints de la MW.

Les radicaux libres et les ROS générés par une accumulation de cuivre peuvent modifier l'activité des transporteurs astrocytaires du glutamate de plusieurs façons. Par exemple, il a été proposé qu'une attaque oxydative puisse altérer les forces thermodynamiques du transport du glutamate en modifiant l'activité de l'enzyme Na^+ K^+ -ATPase. Un stress oxydatif peut en effet diminuer l'activité de cet enzyme (89, 90), altérant du même coup les gradients ioniques trans-membranaires de Na^+ et de K^+ . Il a également été démontré que des conditions extracellulaires de potassium (K^+) élevées et de sodium (Na^+) réduites bloquent et/ou induisent une inversion du transport du glutamate dans des préparations de "whole cell patch clamp" (91). Cependant, Judd (92) et Longuemarre (93) précisent que ces conditions extracellulaires n'ont que très peu d'effet sur le transport à haute affinité du glutamate dans des astrocytes intacts, car ceux-ci répondent à de telles conditions extracellulaires en diminuant leur concentration intracellulaire de Na^+ , empêchant ainsi une diminution du gradient Na^+ . Il s'agit en effet d'un mécanisme de protection contre les changements de forces thermodynamiques, qui pourraient autrement résulter en concentrations extracellulaires toxiques de glutamate.

Selon Judd et Longuemarre, un transporteur du glutamate ne fonctionnant pas selon les conditions d'équilibre thermodynamique suggère plutôt une influence de type cinétique.

Plusieurs facteurs cinétiques affectant l'activité des transporteurs de glutamate ont été identifiés. Cependant, nous allons uniquement mentionner ceux pouvant être modifiés par une accumulation de cuivre et/ou par une attaque oxydative. Trotti a démontré la présence d'éléments redox-sensitifs dans la structure des transporteurs du glutamate (94). Ces éléments, identifiés sur les transporteurs EAAT-1 et EAAT-2, contiennent des résidus cystéine fonctionnels pouvant contrôler le transport à haute affinité du glutamate via l'oxydation des groupes thiols présents à même la structure de la protéine. Ces éléments, sensibles à la formation oxydative de ponts cystéine et donc extrêmement vulnérables aux oxydants biologiques, réduisent le passage du glutamate à travers le transporteur. Donc le cuivre, via son action oxydante, pourrait ainsi causer une réduction du transport astrocytaire à haute affinité du glutamate en modifiant ces résidus cystéine du transporteur même. En effet, plusieurs études ont démontré que les radicaux libres ainsi que les ROS pouvaient modifier les transporteurs du glutamate et conséquemment diminuer le transport à haute affinité de celui-ci (95, 96). Dans une étude utilisant des cultures primaires d'astrocytes corticaux provenant du rat, Sorg a démontré que plusieurs ROS (incluant le peroxyde d'hydrogène et le peroxy-nitrite) diminuaient de façon concentration-dépendante le transport à haute affinité du glutamate (97). De plus, il a démontré que la puissance et l'efficacité de l'effet du peroxyde d'hydrogène étaient potentialisées par l'ajout d'ions cupriques, supportant ainsi le potentiel neurotoxique du radical hydroxyl et démontrant un rôle potentiellement néfaste du cuivre sur ce mécanisme de transport. Utilisant le même modèle expérimental, Miralles (98) a ensuite démontré qu'une attaque oxydative, générée par l'ajout de

peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou de *tert.*-butyl hydroperoxyde (*t*-bOOH), avait également comme effet de réduire le transport à haute affinité du glutamate, en plus de réduire les niveaux de GSH, sans toutefois réduire l'expression protéique des transporteurs du glutamate. Ces résultats coïncident particulièrement bien avec les nôtres, car ils démontrent qu'une attaque oxydative (possiblement causée par les ions Cu^{2+}) est capable de réduire le transport à haute affinité du glutamate sur une période relativement courte, bien avant qu'il y ait diminution protéique des transporteurs. Afin d'étudier cette possibilité, nous avons joint à nos expositions de cuivre un puissant anti-oxydant, le α -tocophérol (vitamine E). Celui-ci a eu comme effet de partiellement rétablir le transport à haute affinité du glutamate dans les cellules traitées au $CuCl_2$, nous permettant ainsi d'affirmer qu'une attaque oxydative engendrée par le cuivre peut en effet modifier le transport à haute affinité du glutamate astrocytaire.

L'ensemble de ces récents travaux portant sur les effets d'un stress oxydatif sur le transport à haute affinité du glutamate supporte une théorie soutenue par Trotti, Danbolt et Volterra (94), stipulant que les mécanismes oxydatifs de la mort cellulaire sont étroitement liés aux mécanismes excitotoxiques et que ce lien soit à la base de la mort cellulaire observée dans plusieurs pathologies cérébrales, incluant la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique, les traumatismes crâniens et l'ischémie. Bien sûr, les résultats que nous présentons et le lien que nous établissons entre l'accumulation cérébrale de cuivre et la réduction du transport à haute affinité du glutamate astrocytaire lors de la MW semblent correspondre plutôt bien avec cette théorie.

En plus de leur rôle oxydant, plusieurs métaux de transition, incluant le cuivre, peuvent modifier de façon nuisible la structure moléculaire des protéines et des peptides (67). Le cuivre par exemple se complexe avidement aux résidus histidine, cystéine et méthionine de certaines protéines, suggérant qu'une accumulation de cuivre dans le cerveau et dans les astrocytes puisse modifier la structure des transporteurs de glutamate, riches en résidus cystéine, et ainsi entraver leur fonctionnement normal. Ceci peut donc également expliquer la baisse de l'affinité du transporteur EAAT-1 pour son substrat, ainsi que la baisse du transport à haute affinité du glutamate, avant même la diminution protéique des transporteurs astrocytaire du glutamate. De plus, cette capacité du cuivre à modifier physiquement la structure protéique du transporteur EAAT-1 peut expliquer le fait que le α -tocophérol soit incapable de rétablir le transport à haute affinité du glutamate dans les astrocytes en culture exposés au cuivre. Nous proposons donc une interaction, voir même un effet cumulatif, de ces différents mécanismes d'actions du cuivre sur le transport astrocytaire à haute affinité du glutamate.

Il faut également mentionner l'existence d'un débat concernant les rôles joués par une dysfonction hépatique et par une baisse potentielle du métabolisme cérébral dans la pathologie et la symptomatologie neurologique de la MW. Selon Victor (99), la pathologie cérébrale observée lors de la MW serait uniquement attribuable à une dysfonction hépatique concomitante. Selon Lutsenko et Cooper (100), cette pathologie cérébrale serait plutôt attribuable à une mutation du gène WD, qui serait à l'origine d'une dysfonction mitochondriale pouvant affecter le métabolisme énergétique des neurones cérébraux. Plusieurs études ont cependant démontré le contraire : en utilisant la technique spectroscopique ($^1\text{H-MRS}$), celles-ci ont démontré qu'une déficience

hépatique ne contribuait aucunement à la dysfonction cérébrale observée dans la MW, et que par surcroît, il n'y avait aucune preuve de métabolisme énergétique cérébral défaillant dans cette pathologie (101, 102). Quel que soit le verdict de ce débat, une réduction du transport astrocytaire du glutamate pourra toujours agir en sus de ces mécanismes physiopathologiques et contribuer aux symptômes neuropsychiatriques observés dans la maladie.

En terminant, il est important de noter que nous envisageons reprendre la même panoplie d'expériences en utilisant un système de co-culture d'astrocytes et de neurones (les astrocytes exprimant alors le transporteur EAAT-2) afin de nous rapprocher le plus possible des conditions *in vivo*. Ceci fait, nous pourrons ensuite entreprendre une étude sur les niveaux cérébraux extracellulaires de cuivre et de glutamate sur des modèles animaux de la MW.

3.2 Conclusions

En conclusion, très peu d'études ont traité de l'aspect neuropathologique de la maladie de Wilson. La majorité de la recherche a plutôt mis l'emphase sur l'aspect génétique de la maladie, ainsi que sur les conséquences hépatiques de celle-ci. Les quelques études traitant de l'aspect neurologique de la maladie attribuent la totalité des lésions cérébrales à un mécanisme oxydatif attribuable aux propriétés pro-oxydantes du cuivre. Nos études ont toutefois permis de révéler un nouveau mécanisme pouvant aussi contribuer à la neuropathologie observée lors de la MW : une diminution du transport à haute affinité du glutamate astrocytaire pouvant causer une mort cellulaire excitotoxique reliée aux récepteurs NMDA. Quoique causée par une diminution du transporteur astrocytaire EAAT-1, cette diminution du transport à haute affinité du glutamate peut également être affectée par les effets oxydants néfastes du cuivre, ainsi que par l'interaction directe de celui-ci avec les protéines riches en résidus cystéine. En plus d'être en accord avec le principe émergent selon lequel il y a une liaison étroite entre les mécanismes oxydatifs et excitotoxiques de la mort neuronale, ce mécanisme est également partagé par deux autres pathologies présentant une accumulation de métaux divalents au cerveau : l'encéphalopathie hépatique et le manganisme. Les résultats présentés dans ce mémoire pourront non seulement aider à la modification des stratégies thérapeutiques pour la maladie de Wilson, mais ils pourront également servir de base à l'étude de nouveaux mécanismes physiopathologiques pour d'autres maladies présentant une accumulation cérébrale de métaux divalents chez l'humain.

Bibliographie

1. Linder MC. The biochemistry of copper. New York: Plenum, 1991.
2. Johnson PE, Milne DB, Lykken GI, 1992. Effects of age and sex on copper absorption, biological half-life, and status in humans. *J Clin Nutr.* 56 : 917-25.
3. National Research Council. Recommended daily allowances. 10th ed. Washington, DC: National Academy Press, 1989.
4. Turnlund JR, Keyes WR, Anderson HL, Acord LL, 1989. Copper absorption and retention in young men at three levels of dietary copper using the stable isotope, ⁶⁵Cu. *Am J Clin Nutr.* 49: 870-9.
5. Walker WR, 1982. The results of a copper bracelet clinical trial and subsequent studies. In: JRJ Sorenson, ed. Inflammatory diseases and copper. Clifton, NJ: Humana Press: 469-78.
6. Linder MC, Hazegh-Azam M, 1996. Copper biochemistry and molecular biology. *Am J Clin Nutr.* 63: 997S-811S.
7. Cohen NL, Illowsky B, Linder MC, 1979. Altered copper absorption in tumor bearing and estrogen treated rats. *Am J Physiol.* 236: E309-15.
8. Linder MC, Weiss KC, Vu HM, Rucker RB, 1987. Structure and function of transcuprein in transport of copper by mammalian blood plasma. In: Hurley LC, Lonnerdal B, Keen C, eds. Trace elements in man and animals (TEMA-6). New York: Plenum : 141-4.
9. Owen CA Jr., 1982. Biochemical aspects of copper. Copper deficiency and toxicity. Physiological aspects of copper. Park Ridge, NJ: Noyes.
10. Weiss KC, Linder MC, 1985. Copper transport in rats involving a new plasma protein. *Am J Physiol.* 249: E77-88.
11. Wirth PL, Linder MC, 1985. Distribution of copper among multiple components of human serum. *J Natl Cancer Inst.* 75; 277-84.
12. Tsai MT, Dinh CT, Linder MC, 1992. Interaction of transcuprein and albumin in copper transport. *FASEB J.* 6: A1095 (abstr).
13. Vargas EJ, Shoho AR, Linder MC, 1994. Copper transport in the Nagase analbuminemic rat. *Am J Physiol.* 267: G259-69.
14. Scott KC, Turnlund JR, 1994. Compartment model of copper metabolism in adult men. *J Nutr Biochem.* 5: 342-5.

15. Lau S, Sarkar B, 1984. Comparative studies of manganese(II)-, nickel(II)-, zinc(II)-, copper(II)-, cadmium(II)-, and iron(II)- binding components in human cord and adult sera. *Can J biochem Cell Biol.* 62: 449-55.
16. Olivares M, Uauy R, 1996. Copper as an essential nutriment. *Am J Clin Nutr.* 63: 791S-96S.
17. Bode AM, Miller LA, Faber J, Saari JT, 1992. Mitochondrial respiration in heart, liver and kidney of copper deficient rats. *J Nutr Biochem.* 3: 668-73.
18. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, and al., 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 362: 59-62.
19. Felix K, Lengfelder, Hartmeann H-J, Weser U, 1993. A pulse radiolytic study on the reaction of hydroxyl and superoxide radicals with yeast Cu (I) thionein. *Biochem Biophys Acta.* 1203: 104-8.
20. Satoh M, Naganuma A, Imura N, 1992. Effect of preincubation of metallothionein on paraquat toxicity in mice. *Arch toxicol.* 66: 145-8.
21. Kressner MS, Stockert RJ, Morell AG, Sternlieb I, 1984. Origins of biliary copper. *Hepatology.* 4: 867-70.
22. Iyengar V, Brewer GJ, Dick RD, Owyang C, 1988. Studies of cholecystokinin-stimulated biliary secretions reveal a high molecular weight copper binding substance in normal subjects that is absent in patients with Wilson's disease. *J Lab Clin Med.* 111: 267-74.
23. Chowrimootoo GFE, Seymour CA, 1994. The role of ceruloplasmin in copper excretion. *Biochem Soc Trans.* 22: 190S (abstr.).
24. Tavassoli M, Kishimoto T, Kataoka M, 1986. Liver endothelium mediates the hepatocyte's uptake of ceruloplasmin. *J Cell Biol.* 102: 1298-303.
25. Campbell CH, Brown R, Linder MC, 1981. Circulating ceruloplasmin is an important source of copper for normal and malignant cells. *Biochem Biophys Acta.* 678: 27-38.
26. Linder MC, 1983. Changes in the distribution and metabolism of copper in cancer: a review. *J Nutr Growth Cancer.* 1: 27-38.
27. Mercer JFB, Grimes A, Ambrossini L, and al., 1994. Mutation in the murine homologue of the Menkes gene in dappled and blotchy mice. *Nature Genet.* 6: 374-8.

28. Yamaguchi Y, Heiny ME, Gitlin JD, 1993. Isolation and characterization of a human cDNA as a candidate gene for Wilson's disease. *Biochem Biophys Res Comm.* 197: 271-7.
29. Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, et al., 1993. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nature Genet.* 53: 864-73.
30. Solioz M, Odermatt A, Krapf R, 1994. Copper pumping ATPase: common concepts in bacteria and man. *FEBS Lett.* 346: 44-7.
31. Cox DW, 1999. Disorders of copper transport. *Brit Med Bull.* 3: 544-55.
32. Bull PC, Cox DW, 1994. Wilson and Menkes disease: new handles on heavy-metal transport. *Trends Genet.* 10: 246-52.
33. Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Wilson Cox D, 1993. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nature Genet.* 5: 327-37.
34. Ferenci P, Gilliam TC, Gitlin JD, Packman S, Schilsky ML, Sokol RJ, Sternlieb I, 1996. An international symposium on Wilson's and Menkes' diseases. *Hepatology.* 24(4): 952-8.
35. Suzuki M, Gitlin JD, 1999. Intracellular localization of the Menkes and Wilson's disease proteins and their role in intracellular copper transport. *Pediatr Int.* 41(4): 436-42.
36. Mzhe'Iskaia TI, Larskii EG, Oashchenko LA, Gladkikh SP, Ivanova-Smolenskaia IA, Markova ED, 1989. [Analysis of trace elements of the brain and liver tissues in Wilson's disease] *Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova.* 89(7):69-73.
37. Waggoner DJ, Bartnikas TB, Gitlin JD, 1999. The role of copper in neurodegenerative disease. *Neurobiol Dis.* Aug;6(4): 221-230.
38. Faa G, Lisci M, Caria MP, Ambu R, Sciot R, Nurchi VM, Silvagni R, Diaz A, Crisponi G, 2001. Brain copper, iron, magnesium, zinc, calcium, sulfur, and phosphorus storage in Wilson's disease. *J Trace Elem Med Biol.* 15(2-3):155-60.
39. Walshe JM, Gibbs KR, 1987. Brain copper in Wilson disease. *Lancet.* Oct 31;2(8566):1030.
40. Nalbandyan RM, 1983. Copper in Brain. *Neurochem Res.* 8(10):1211-1231.
41. Alt ER, Sternlieb I, Goldfisher S, 1990. The cytopathology of metal overload. *Int rev Exp Pathol.* 31: 165-88.

42. Di Donato M, Sarkar B, 1997. Copper transport and its alterations in Menkes' and Wilson's diseases. *Biochem Biophys Acta*. 1360: 3-16.
43. Kodama H, Okabe I, Yanagisawa M, Nomiyama H, Nomiyama K, Nose O, Kamoshita S, 1988. Does CSF copper level in Wilson disease reflect copper accumulation in the brain? *Pedriatr Neurol*. 4: 35-7.
44. Strausak D, Mercer JFB, Dieter HH, Stremmel W, Multhaup G, 2001. Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases. *Brain Res Bull*. 55(2): 175-85.
45. Coyle JT, Puttfarcken P, 1993. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science*. 262: 689-95.
46. Walshe JM, Yealland M, 1992. Wilson's disease: the problem of delayed diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 55 : 692-96.
47. Caca K, Weizenegger M, Kress S, Mössner J, Berr F, 2001. Rapid detection of Morbus Wilson by DNA strip technology. *Z. Gastroenterol*. 39: 244 (abstract).
48. Gollan JL, Gollan TJ, 1998. Wilson disease in 1998: genetic, diagnostic and therapeutic aspects. *Hepatology*. 28: 28-36.
49. Steindl P, Ferenci P, Dienes HP, and al., 1998. Wilson's disease in patients with liver disease: a diagnostic challenge. *Gastroenterology*. 113: 212-8.
50. Gibbs K, Walshe JM, 1990. Liver copper concentrations in Wilson's disease: effect of treatment with anti-copper agents. *J Gastroenterol Hepatol*. 5(4): 420-5.
51. Walshe JM, 1973. Copper chelation in patients with Wilson's disease: A comparison of penicillamine and triethylenetetramine dihydrochloride. *Quart J Med*. 42: 441-52.
52. Domingo JL, Gomez M, Jones MM, 2000. Comparative efficacy of several potential treatments for copper mobilization in copper over-loaded rats. *Biol Trace Elem Res*. 74(2): 127-39.
53. Hoogenraad TU, Koevoet R, DeRuyter-Korver EGWM, 1996. Oral zinc sulphate as long term treatment for Wilson's disease (hepatolenticular degeneration). *Eur Neurol*. 18: 205-11.
54. Hoogenraad TU, 2001. Zinc monotherapy for treatment of Wilson's disease. *Z. Gastroenterol*. 39: 250 (abstr).
55. Horoupian DS, Sternlieb I, Scheinberg ICH, 1998. Neuropathological findings in penicillamine-treated patients with Wilson's disease. *Clin Neuropathol*. 7: 62-7.

56. Mossakowski MJ, Renkawek K, Krasnicka Z, Smialek M, Pronaszko A, 1970. Morphology and histochemistry of Wilsonian and hepatic gliopathy in tissue culture. *Acta Neuropathol (Berl)*. 16(1): 1-16.
57. Mossakowski MJ, Weinrauder H, 1984. Immunomorphology of Wilsonian and hepatic gliopathy in vitro. *Neuropatol Pol*. 22(2): 161-78.
58. Bertrand E, Lechowics W, Szpak GM, Lewandowska E, Czlonkowska A, Dymecki J, 1997. Quantitative study of pathological forms of astroglia in Wilson's disease. *Folia Neuropathol*. 35(4): 227-32.
59. Bertrand E, Lewandowska E, Szpak GM, Hoogenraad T, Blaauwgers HG, Czlonkowska A, Dymecki J, 2001. Neuropathological analysis of pathological forms of astroglia in Wilson's disease. *Folia Neuropathol*. 39(2): 73-9.
60. von Hösslin C, Alzheimer A, 1912. ein Beitrag zur Klinik und pathologischen Anatomie der Westphal-Strümpellschen Pseudosklerose. *Ztschr f d ges Neurol u Psychiat*. 8: 183-209.
61. Brumback RA, Lapham LW, 1989. DNA synthesis in Alzheimer type II astrocytosis. The question of astrocytic proliferation and mitosis in experimentally induced hepatic encephalopathy. *Arch Neurol*. Aug;46(8): 845-8.
62. Ma KC, 2001. Alzheimer-Type I astrogliopathy (AIA) and its implications for dynamic plasticity in astroglia: a historical review of the significance of AIA. *J Neuropathol Exp Neurol*. 60(2) : 121-31.
63. Sobel RA, DeArmond SJ, Forno LS, Eng LF, 1981. Glial fibrillary acidic protein in hepatic encephalopathy. *J Neuropathol exp Neurol*. 40 : 625-32.
64. Kimura T, Budka H, 1986. Glial fibrillary acidic protein and S-100 protein in human hepatic encephalopathy: immunohistochemical demonstration of dissociation of two glia-associated proteins. *Acta Neuropathol (Berl)*. 70: 17-21.
65. Perry G, Sayre LM, Atwood GS, Castellani RJ, Cash AD, Rotkamp CA, Smith MA, 2002. The role of iron and copper in the aetiology of neurodegenerative disorders. *CNS Drugs*. 16(5): 339-52.
66. Rotilio G, Carri MT, Rossi L, Ciriolo MR, 2000. Copper-dependent oxidative stress and neurodegeneration. *IUBMB Life*. 50: 309-14.
67. Halliwell B, 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*. 59: 1609-23.
68. Butterworth RF, 1994. Hepatic Encephalopathy. *The Liver: Biology and Pathobiology, Third Edition*. Raven Press, Ltd., New York ©1994.

69. Pomier-Layrargues GP, Shapcott D, Sphar L, Butterworth RF, 1995. Accumulation of manganese and copper in pallidum of cirrhotic patients: role in pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 10(4): 353-6.
70. Barbosa ER, Costa MDL, Bacheschi LA, Cançado ER, Omuro AMP, Leite CC, Scaff M. 2001. Magnetic resonance imaging (MRI) in Wilson's disease (WD): Follow-up study of 14 patients. *Z. Gastroenterol.* 39: 242 (abstr.).
71. Mochizuki H, Lamakura K, Masaki T, Okano M, Nagata I, Inui A, Fujisawa T, Kaji T. 1997. Atypical MRI features of Wilson's disease: high signal in globus pallidus on T1-weighted images. *Neuroradiology.* 39(3): 171-4.
72. Chan H, Butterworth RF, 1999. Evidence for an astrocytic glutamate transporter deficit in hepatic encephalopathy. *Neurochem Res.* 24(11): 1397-401.
73. Hazell AS, Norenberg MD, 1997. Manganese decreases glutamate uptake in cultured astrocytes. *Neurochem Res.* 22(12): 1443-7.
74. Dave V, Mullanay KJ, Goderie S, Kimelberg HK, Aschner M, 1994. Astrocytes as mediators of methylmercury neurotoxicity: effects on D-aspartate and serotonin uptake. *Dev Neurosci.* 16(3-4): 222-31.
75. Schousboe A, Drejer J, Hertz L, 1988. Uptake and release of glutamate and glutamine in neurons and astrocytes in primary cultures. Pages 21-39, in Kvamme, E. (ed.), *Glutamine and glutamate in mammals*, Vol. II, CRC Press, Boca Raton.
76. Anderson CM, Swanson RA, 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia.* 32: 1-14.
77. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF, 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* 51: 7-61.
78. Choi DW, 1995. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci.* 18:58-60.
79. Sonnewald U, Westergaard, Schousboe A, 1997. Glutamate transport and metabolism in astrocytes. *Glia.* 21: 56-63.
80. Watt NT, Hooper NM, 2001. The response of neurons and glial cells to elevated copper. *Brain Res Bull.* 55(2): 219-24.
81. Brookes N, 1988. Specificity and reversibility of the inhibition by HgCl₂ of glutamate transport in astrocyte cultures. *J Neurochem.* 50(4): 117-22.
82. Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, and al., 1994. Localisation of neuronal and glutamate transporters. *Neuron.* 13: 713-25.

83. Danbolt NC, 2001. Glutamate Uptake. *Progress Neurobiol.* 65: 1-105.
84. Tiffany- Castiglioni E, Qian Y, 2001. Astroglia as metal depots: molecular mechanisms for metal accumulation, storage and release. *Neurotoxicology.* Oct 22(5): 577-92.
85. Hidalgo J, Garcia A, Oliva AM, Giralt M, Gasull T, Gonzalez B, Milnerowicz H, Wood A, Bremner I, 1994. Effects of zinc, copper and glucocorticoids on metallothionein levels of cultured neurons and astrocytes from rat brain. *Chem Biol Interact.* Dec 93(3): 197-219.
86. Chaudhry FA, Lehre KP, van Lookeren Campagne M, Ottersen OP, Danbolt NC, Storm-Mathisen J, 1995. Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron.* 15: 711-20.
87. Sayre LM, Perry G, Smith MA, 1999. Redox metals and neurodegenerative disease. *Curr Opin Chem Biol.* 3: 220-5.
88. von Herbay A, de Groot H, Hegi U, Stremmel W, Strohmeyer G, Sies H, 1994. Low vit. E content in plasma of patients with alcoholic liver disease, hemochromatosis and Wilson's disease. *Hepatology.* 20: 41-6.
89. Streck EL, Zugno AI, Tagliari B, Franzon R, Wannmacher CM, Wajner M, Wyse AT, 2001. Inhibition of rat brain Na⁺, K⁺-ATPase activity induced by homocysteine is probably mediated by oxidative stress. *Neurochem Res.* Nov;26(11): 1195-200.
90. Shukla GS, Malhotra KM, Chandra SV, 1983. Effects of manganese on rat brain microsomal Mg²⁺-Na⁺-K⁺-ATPase: in vivo and in vitro studies. *Environ Res.* Oct;32(1): 212-9.
91. Szatkowski M, Babour B, Attwell D, 1990. Non-vesicular release of glutamate from glia cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature.* 348: 443-6.
92. Judd MG, Nagaraja TN, Brookes N, 1996. Potassium-induced stimulation of glutamate uptake in mouse cerebral astrocytes: the role of intracellular pH. *J Neurochem.* 66: 169-76.
93. Longuemare MC, Swanson RA, 1997. Net glutamate release from astrocytes is not induced by extracellular potassium concentrations attainable in brain. *J Neurochem.* 69: 879-82.
94. Trotti D, Danbolt NC, Volterra A, 1998. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol Sci.* 19(8): 328-34. Review.

95. Volterra A, Trotti D, Floridi S, Racagni G, 1994. Reactive oxygen species inhibit high-affinity glutamate uptake: molecular mechanism and neuropathological implications. *Ann NY Acad Sci.* Nov 17; 738: 153-62. Review
96. Muller A, Maurin L, Bonne C, 1998. Free radical and glutamate uptake in the retina. *Gen Pharmacol.* 30(3): 315-8.
97. Sorg O, Horn TF, Yu N, Gruol DL, Bloom FE, 1997. Inhibition of astrocyte glutamate uptake by reactive oxygen species: role of antioxidant enzymes. *Mol Med.* Jul; 3(7): 431-40.
98. Miralles VJ, Martinez-Lopez I, Zaragoza R, Borrás E, Garcia C, Pallardo FV, Vina JR, 2001. Na⁺ dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) in primary astrocyte cultures: effect of oxidative stress. *Brain Res.* 13; 922(1): 21-9.
99. Victor M, 1986. Neurologic manifestation of gastrointestinal diseases. In: Asbury AK, McKann CM, McDonald WI (eds) Diseases of the nervous system. Clinical neurobiology, Saunders, Philadelphia, pp 1470-82.
100. Lutsenko S, Cooper MJ, 1998. Localization of the Wilson's disease protein product in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 6004-9.
101. Kraft E, Trenkwalder C, Then Bergh F, Auer DP, 1999. Magnetic resonance spectroscopy of the brain in Wilson's disease. *J Neurol.* 246: 693-9.
102. Alanen A, Komu M, Penttinen M, Leino R, 1999. Magnetic resonance imaging and proton MR spectroscopy in Wilson's disease. *Br J Radiol.* Aug;72(860): 749-56.
103. Yamaguchi Y, Heiny ME, Shimizu N, Aoki T, Gitlin JD, 1994. Expression of the Wilson disease gene is deficient in the Long-Evans Cinnamon rat. *Biochem J.* 301: 1-4.