

2m11.2842.8

Université de Montréal

**Localisation intracellulaire du transporteur de cuivre, ATPase7b, dans les  
cellules HepG2 et les hépatocytes de rat**

par

Nancy Dallaire

Sciences Biomédicales  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maîtrise ès sciences (M. Sc.)  
en Sciences Biomédicales

juillet, 2000

© Nancy DALLAIRE, 2000



Am. 2842.8

Ministère de l'Éducation

L'Université d'Ottawa a le plaisir de vous adresser ce certificat de réussite en vue de votre admission à l'étude de la

W  
4  
U58  
2000  
N. 107

N

Programme

Faculté de Médecine

Le présent certificat est délivré en vertu de la loi sur l'accès à l'information et de la Loi sur l'accès à l'information.

1991



UNIVERSITÉ D'OTTAWA

Page d'identification du jury

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**Localisation intracellulaire du transporteur de cuivre, ATPase7b, dans  
les cellules HepG2 et les hépatocytes de rat**

présenté par:

Nancy DALLAIRE

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Moïse Bendayan	président rapporteur
Dr Steven R. Martin	membre du jury
Dr Fernando Alvarez	membre du jury
Dr Jean-Pierre Villeneuve	membre du jury

Mémoire accepté le 27 juillet

## Sommaire

La maladie de Wilson se caractérise par un défaut d'incorporation du cuivre à la céruloplasmine et une diminution importante de l'excrétion du cuivre hépatique dans la bile. Ces deux défauts proviennent de la mutation de l'ATPase7b qui est impliquée dans le transport du cuivre. La localisation de cette protéine permettra d'élucider en partie la pathogénèse de la maladie de Wilson ainsi que le mécanisme intracellulaire du transport du cuivre.

Il existe une controverse sur la localisation de la protéine. Elle a déjà été observée de façon variable dans l'appareil de Golgi, la membrane plasmique, la membrane canaliculaire (membrane apicale), dans les mitochondries, le réticulum endoplasmique et dans des compartiments vésiculaires en réponse à l'augmentation de cuivre dans la cellule. Cette étude pourrait également permettre d'élucider une partie des divergences observées sur la localisation de la protéine. Le défaut d'incorporation du cuivre à la céruloplasmine suggère que la protéine est localisée dans le réticulum endoplasmique et/ou l'appareil de Golgi où en général a lieu la synthèse et la modification des protéines avant l'excrétion de celles-ci. Le défaut d'excrétion du cuivre dans la bile, quant à lui, suppose que la protéine pourrait entre autre se retrouver dans les lysosomes ou dans la membrane canaliculaire.

La production d'anticorps polyclonaux contre la partie N et C-terminale de l'ATPase7b nous a permis de localiser la protéine. Deux formes différentes de l'ATPase7b ont été découvertes chez les cellules HepG2. L'immunoprécipitation de l'ATPase7b avec les deux différents anticorps montre que l'anticorps dirigé contre la partie N-terminale de la protéine immunoprécipite une forme protéique majeure de 160kD et une forme mineure de 140kD. L'anticorps en C-terminal montre le patron contraire, la forme majeure immunoprécipitée est de 140kD. Les résultats en immunofluorescence sur des cellules HepG2 montrent que les deux différents anticorps localisent la protéine dans l'appareil de Golgi. Cependant, avec l'anticorps

dirigé contre la partie C-terminale une localisation périnucléaire ainsi qu'une distribution cytoplasmique de la protéine ont été montrées. Ce patron de fluorescence est similaire à celui observé avec des anticorps anti-mitochondries. La technique d'immunoperoxydase sur des hépatocytes de rats normaux en culture a également permis de déterminer que la protéine est localisée dans la région périnucléaire. Aucun marquage n'a été observé dans le canalicule biliaire ou la membrane plasmique. Le sous-fractionnement cellulaire de foie de rats normaux a permis de confirmer ces résultats. Une protéine de 140kD a été détectée dans la fraction enrichie en mitochondries tandis qu'une forme de 160kD est prédominante dans la fraction enrichie pour l'appareil de Golgi. Ce patron est similaire pour les deux types d'anticorps.

Une relocalisation de la protéine a été observée chez les cellules HepG2 selon le contenu en cuivre de la cellule. La présence d'une concentration élevée de sulfate de cuivre dans le milieu cellulaire provoque un étalement de la fluorescence de façon pointillée à travers le cytoplasme. Ceci suggère qu'il y a un mouvement de la protéine de l'appareil de Golgi vers des structures vésiculaires distribuées de façon homogène dans le cytoplasme de ces cellules. Ces structures sont possiblement des mitochondries. Au contraire, la présence d'un chélateur de cuivre dans le milieu diminue la fluorescence et ne modifie pas la distribution périnucléaire de la protéine. Le sous-fractionnement cellulaire de foie de rats surchargés en cuivre par une diète riche en cet élément montre que l'expression de la protéine de 160kD est augmentée dans toutes les fractions spécialement celle enrichie pour l'appareil de Golgi. Par contre, la protéine de 140kD est exprimée en quantité plus faible dans la fraction mitochondriale contrairement à ce qui a été montré pour le sous-fractionnement de foie de rats normaux. Nous pouvons conclure que l'ATPase7b est présente dans l'appareil de Golgi des cellules hépatiques et dans une structure vésiculaire qui est possiblement mitochondriale. De plus, l'augmentation de la concentration de cuivre dans la cellule altère la quantité relative de synthèse des deux formes de l'ATPase7b aussi bien que la distribution intracellulaire de celles-ci.

## Table des matières

<b>Page de titre.....</b>	p.i
<b>Page d'identification du jury.....</b>	p.ii
<b>Sommaire.....</b>	p.iii
<b>Table des matières.....</b>	p.v
<b>Liste des figures.....</b>	p.vii
<b>Liste des abréviations.....</b>	p.viii
<b>1. Introduction.....</b>	p.1
1.1 Transport normal du cuivre.....	p.3
1.1.1 Transport du cuivre à travers le tube gastro- intestinal et dans le sang.....	p.3
1.1.2 Transport du cuivre vers le foie.....	p.5
1.1.2.1 L'albumine.....	p.5
1.1.2.2 L'histidine.....	p.6
1.1.2.3 La transcupréine.....	p.7
1.1.3 Transport intracellulaire du cuivre.....	p.7
1.1.3.1 Protéines chaperonnes.....	p.8
1.1.4 L'excrétion.....	p.11
1.1.4.1 Mécanismes d'élimination du cuivre dans la bile.....	p.13
1.2 La régulation.....	p.15
1.3 Pathophysiologie moléculaire et génétique de la maladie de Wilson.....	p.16
1.4 Les rats Long Evans Cinnamon (LEC).....	p.19

1.5 Maladie de Wilson.....	p.20
1.5.1 Manifestations cliniques.....	p.20
1.5.2 Diagnostic.....	p.21
1.5.3 Traitement.....	p.22
1.6 Localisation de la protéine.....	p.23
1.6.1 Localisation tissulaire.....	p.23
1.6.2 Localisation cellulaire.....	p.23
1.6.2.1 Localisation cellulaire de l'ATPase7a...	p.23
1.6.2.2 Localisation cellulaire de l'ATPase7b...	p.26
1.6.3 Rôle de la protéine.....	p.32
1.7 Hypothèses et objectifs.....	p.33
<b>2. Article: Localization of the Wilson's disease protein in two different forms to the Golgi apparatus and to the mitochondrial subcellular fraction.....</b>	<b>p.37</b>
Summary.....	p.38
Introduction.....	p.39
Materials and Methods.....	p.40
Results.....	p.43
Discussion.....	p.45
Acknowledgments.....	p.49
References.....	p.49
Legends.....	p.53
Figures.....	p.55
<b>3. Discussion et conclusions générales.....</b>	<b>p.61</b>
<b>4. Sources documentaires.....</b>	<b>p.75</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>p.ix</b>

## Liste des figures

- Figure 1** Métabolisme du cuivre chez l'homme..... p.4
- Figure 2** Trafic du cuivre chez la levure..... p.10
- Figure 3** Métabolisme du cuivre au niveau de l'hépatocyte..... p.12
- Figure 4** Structure du transporteur de cuivre ATPase7a et 7b..... p.18



## Liste des abréviations

ADN:	acide désoxyribonucléique
ADNc:	acide désoxyribonucléique complémentaire
AP-1:	$\gamma$ -adaptine-1
ARN:	acide ribonucléique
ARNm:	acide ribonucléique messenger
ATP:	adénosine triphosphate
cMOAT:	transporteur anionique multi organique (canalicular multi organic anionic transporter)
CFTR:	régulateur transmembranaire de la fibrose kystique (cystic fibrosis transmembrane regulator)
Cu:	cuivre
CuCl <sub>2</sub> :	dichlorure de cuivre
Cu-Zn SOD:	cuivre-zinc superoxide dismutase
E:	acide glutamique
GSH:	glutathion
GY:	Groningen Yellow
H:	histidine
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	peroxyde
Kb:	kilobase
kD:	kilodalton
L:	leucine
LE:	Long Evans
LEC:	Long Evans Cinnamon
MPR:	récepteur mannose 6-phosphate (mannose 6-phosphate receptor)
MT:	métallothionéine
P:	proline
S:	sérine
$\mu$ M:	micro molaire

## 1. INTRODUCTION

Le cuivre est un élément essentiel à la survie de l'homme, des animaux et des plantes. La déficience ou l'excès de cuivre ont des effets délétères sur les fonctions normales du corps humain (1). En effet, le cuivre est fondamental pour la croissance, les défenses immunitaires, le transport du fer, le métabolisme du glucose et du cholestérol, la contractilité du myocarde, la maturation des érythrocytes et des lymphocytes, ainsi que le développement du cerveau (2). La maladie de Menkes et la maladie de Wilson sont deux exemples de maladies génétiques reliées à un désordre du métabolisme du cuivre. Les deux maladies sont dues à des mutations dans des gènes différents, mais homologues, qui codent pour des ATPases de type P. La localisation et le comportement de la protéine de Menkes (ATPase7a) sont mieux connus que ceux de l'ATPase7b impliqué dans la maladie de Wilson. Étant donné l'homologie des gènes, des protéines et de leurs fonctions dans le transport du cuivre à travers la membrane cellulaire, nous pouvons supposer que la localisation et le comportement de ces deux protéines sont similaires.

La maladie de Menkes se caractérise par une déficience sévère en cuivre. Le défaut primaire de la maladie de Menkes est une réduction marquée du transport du cuivre au niveau de la membrane basolatérale des cellules de la muqueuse intestinale (3). Ces cellules accumulent donc le cuivre mais ne peuvent le transférer dans la circulation portale. La maladie est causée par une mutation dans le transporteur ATPase7a, dont la fonction serait de transporter le cuivre hors de la cellule. Par conséquent, lorsque le cuivre est abondant dans la cellule, le transporteur serait localisé dans la membrane plasmique. Par contre, quand la concentration de cet élément dans la cellule

est normale la protéine serait située dans l'appareil de Golgi (4). Le défaut de transport résulte en une déficience de ce métal dans plusieurs tissus et une activité réduite des enzymes qui ont besoin du cuivre pour être fonctionnelles. Plusieurs des symptômes cliniques sont attribuables à l'inactivité de ces enzymes. Parmi ces manifestations, il est possible d'observer une dégénérescence neurologique, une mauvaise régulation de la température corporelle, une hypopigmentation, une laxité des ligaments, ainsi que des cheveux tortillés (pili torti) et cassants (3). La maladie de Menkes est habituellement fatale durant l'enfance.

Chez les patients atteints de la maladie de Wilson, il y a une accumulation de cuivre dans plusieurs organes. La maladie se caractérise dans un premier temps par un manque d'incorporation du cuivre à la céruloplasmine au niveau du foie. Cette protéine incorpore normalement une partie du cuivre, qui se retrouve dans le foie, et le transporte dans le plasma. La maladie se caractérise également par une diminution de l'excrétion de cuivre hépatique dans la bile. Ce dernier défaut serait la cause majeure de l'accumulation de cuivre observée chez les patients. L'accumulation pourrait s'expliquer par une mutation dans une protéine nommée ATPase7b dont le rôle consiste à transporter les ions de cuivre. Cette protéine est principalement exprimée dans le foie, les reins, les yeux, le placenta et le système nerveux central (5). L'accumulation de cuivre dans les organes mentionnés précédemment est toxique et provoque des hépatites chroniques ou fulminantes ainsi que des troubles neurologiques. La localisation intracellulaire de l'ATPase7b est encore obscure. La détermination de la localisation intracellulaire du transporteur permettra de mieux comprendre la pathogénèse de la maladie de Wilson et d'élucider en partie le mécanisme de la maladie ainsi que celui du transport intracellulaire de cuivre.

## **1.1 TRANSPORT NORMAL DU CUIVRE**

### **1.1.1 Transport du cuivre à travers le tube gastro-intestinal et dans le sang**

Chez les mammifères, le cuivre contenu dans la diète est absorbé principalement dans l'intestin grêle après la digestion de la nourriture dans l'estomac et le duodénum. L'efficacité d'absorption de cet ion chez l'homme est élevée et se situe généralement entre 55 et 75% (6). La figure 1 résume plusieurs informations nutritionnelles et biochimiques concernant le cuivre ainsi que son métabolisme chez l'homme. Le transport du cuivre aux cellules intestinales et son transfert subséquent à travers la membrane basolatérale vers le fluide interstitiel et le sang s'effectue par deux mécanismes différents. Le transfert du cuivre à travers la muqueuse intestinale se fait par simple diffusion alors que le transfert à travers la membrane basolatérale des cellules intestinales s'effectue par un mécanisme saturable qui nécessite de l'énergie.

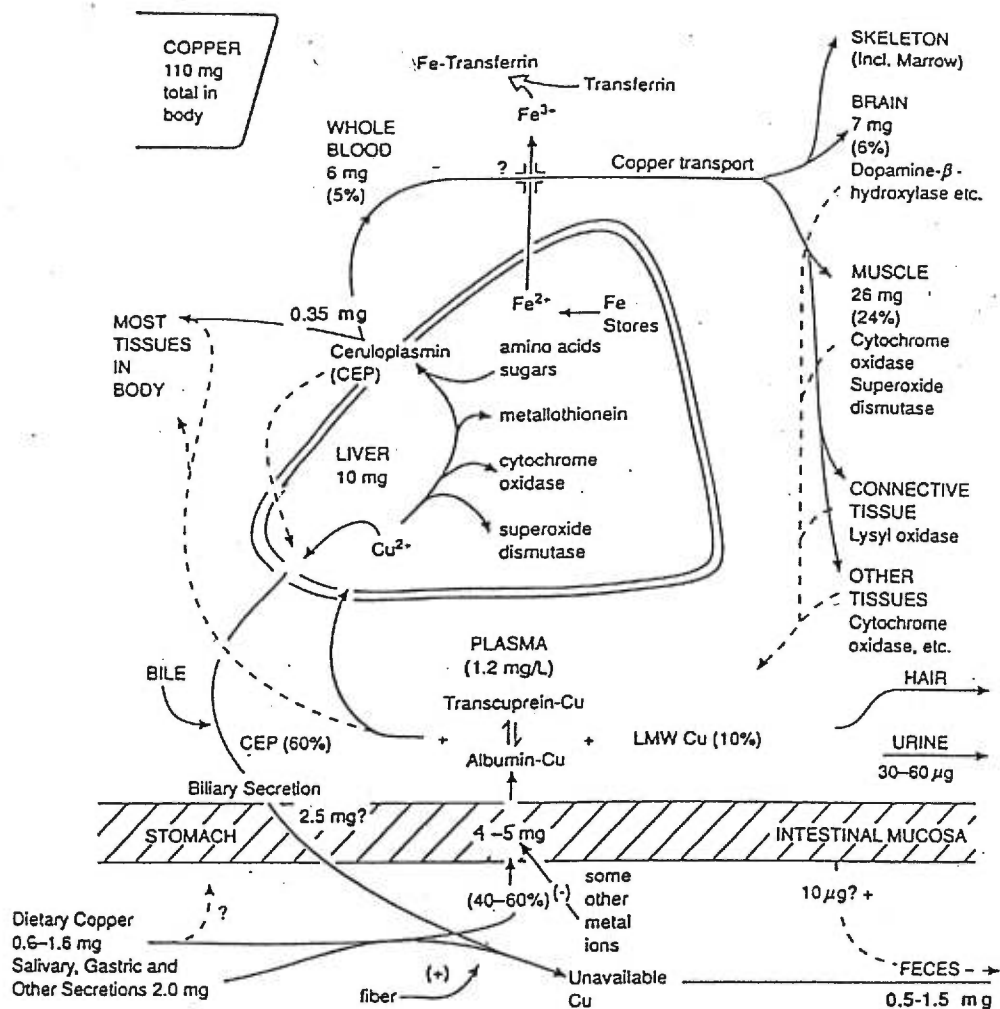


Figure 1: Résumé du métabolisme du cuivre chez l'homme adulte: Les valeurs concernant le cuivre indiquent la quantité quotidienne moyenne de cuivre ingérée, absorbée, sécrétée dans différents fluides et excrétée par diverses routes. Les concentrations de cuivre dans les fluides ainsi que sa quantité totale dans les différents tissus sont aussi montrées. Les pourcentages indiqués font référence au cuivre absorbé ou au pourcentage total de cuivre prévu dans un tissu spécifique. (Tiré de **Linder M.C., Hazegh M.**, Copper Biochemistry and Molecular Biology, Am. J. Clin. Nutr., 63, 797S-811S, 1996.)

### 1.1.2 Transport du cuivre vers le foie

Lorsque le cuivre entre dans le fluide interstitiel et le cytoplasme des cellules intestinales, il se lie immédiatement à plusieurs protéines dont la principale est l'albumine. Il est ensuite transféré dans la circulation portale et générale où il circule en association avec l'albumine (7). Une petite proportion du cuivre est également transportée au foie par la liaison du cuivre à l'histidine et possiblement à une protéine de transport, la transcupréine, dont l'existence demeure controversée (8). Ces 3 transporteurs ont des rôles et des effets différents au niveau de l'absorption du cuivre.

#### 1.1.2.1 L'albumine

Le rôle de l'albumine dans la circulation est vaste. La protéine contribue entre autre à l'équilibre de la pression osmotique, au transport des acides gras, de certaines hormones, des médicaments et de petits anions et cations tel le cuivre. Cet élément s'associe à l'albumine grâce à la présence d'une histidine, à l'extrémité N-terminale de la protéine, qui a une haute affinité pour le cuivre (9). Il a été montré qu'en présence de l'albumine, la capture du cuivre ionique par les hépatocytes est diminuée (10). Cependant, même si la vitesse d'absorption est moindre, la quantité de cuivre retenue par les cellules est plus importante en présence d'albumine (8).

L'albumine est une composante essentielle du réservoir de cuivre plasmatique échangeable même si elle ne semble pas requise pour la distribution du cuivre aux tissus. En effet, les rats Nagase qui ne possèdent pas d'albumine ne montrent aucune anomalie dans le transport et l'absorption de cuivre par le foie (11). Conséquemment, il semble que l'albumine joue un

rôle passif dans le transport du cuivre chez les rats normaux. Elle transporterait une grande partie du cuivre échangeable dans la circulation et le distribuerait à d'autres transporteurs pour qu'il puisse finalement être absorbé par les différentes cellules. Les transporteurs en question pourraient être la transcupréine et l'histidine, du moins chez les rongeurs.

Il est tout de même possible que l'albumine apporte le cuivre aux cellules hépatiques chez les rats normaux. Cependant, aucun récepteur de l'albumine n'a été identifié à la surface des hépatocytes (12). L'albumine en solution n'a que très peu d'affinité et d'interactions avec la surface des cellules hépatiques. Il a été proposé que les molécules d'albumine puissent subir un changement de conformation lorsqu'il y a une interaction avec la surface d'une cellule ce qui faciliterait la livraison du cuivre aux hépatocytes. Ceci produirait une sous-population d'albumine possédant une grande affinité pour les surfaces cellulaires. La taille de cette sous-population serait déterminée par la surface de contact disponible et par une cinétique régissant les échanges (12).

#### 1.1.2.2 L'histidine

Les acides aminés compétitionnent favorablement avec l'albumine pour le cuivre plasmatique. L'histidine déplace le cuivre de l'albumine lorsque les deux réagissent ensemble *in vitro* (13). De plus, il a été observé que lorsque l'histidine est en présence de l'albumine, elle augmente l'absorption du cuivre par le foie (14,15).

Les transporteurs membranaires à la surface des cellules reconnaissent soit le cuivre ionique, soit le complexe acide aminé-cuivre. L'histidine facilite

l'entrée du cuivre dans la plupart des cellules suggérant que cet acide aminé fait partie d'un complexe reconnu par le transporteur.

#### 1.1.2.3 La transcupréine

Le gène de la transcupréine n'a pas encore été cloné et la protéine n'est pas encore bien caractérisée. La transcupréine, qui est une protéine circulante, fournirait un site de liaison immédiat pour le cuivre ionique dès son entrée dans le plasma. Ce transporteur compétitionnerait avec l'albumine pour la liaison du cuivre et il y aurait échange de l'ion entre les deux transporteurs dans la circulation portale. Cependant, la transcupréine aurait une meilleure affinité pour cet élément, car elle pourrait lier autant de cuivre que l'albumine même lorsqu'il y en a peu de disponible (6). La manière dont la transcupréine délivre le cuivre aux hépatocytes reste également à élucider.

#### **1.1.3 Transport intracellulaire du cuivre**

Le foie, plus particulièrement les hépatocytes, joue un rôle central dans le métabolisme du cuivre. Presque tout le cuivre est extrait de la circulation portale par les hépatocytes. La façon dont les hépatocytes captent le cuivre n'est pas encore bien comprise. Il a été suggéré qu'il existerait un transporteur passif, riche en histidine, à la surface des cellules qui reconnaîtrait le cuivre mais non la protéine le transportant (16). Ce transporteur n'a pas encore été identifié. Le cuivre pourrait également entrer dans la cellule à l'aide de l'albumine ou d'un récepteur de la transcupréine dont l'existence n'est pas prouvée. Dernièrement, un transporteur de la membrane plasmique, nommé Ctr1, a été découvert chez la levure



*Saccharomyces cerevisiae* et sur les hépatocytes humains (17,18). Cependant, ce transporteur n'est pas bien caractérisé non plus.

Lorsque le cuivre pénètre dans l'hépatocyte, il est distribué dans tous les organelles cellulaires. Le transport intracellulaire du cuivre est vital pour la livraison du cuivre à certaines protéines et serait assuré par des molécules cytosoliques appelées protéines chaperonnes (19-22). Le cuivre sert de cofacteur pour l'activation de plusieurs enzymes localisées dans les différents organelles. Il est essentiel pour le cytochrome-c-oxydase, la lysyl oxydase, la cuivre et zinc superoxide dismutase (Cu-Zn SOD), la tyrosinase et la dopamine  $\beta$ -hydroxylase (23,24). Ces enzymes ont des rôles critiques au niveau de la respiration cellulaire, les liens entre les tissus, les défenses anti-oxydantes, la formation des pigments et l'activation du neurotransmetteur de la dopamine respectivement. La portion de cuivre libre qui demeure dans le cytoplasme est toxique pour les cellules et doit donc s'associer avec des ligands intracellulaires telle la superoxide dismutase (SOD), le glutathion (GSH) et la métallothionéine (MT).

#### 1.1.3.1 Protéines chaperonnes

Récemment, une évolution rapide est survenue dans le domaine des protéines chaperonnes (19-22). Ces protéines mobilisent le cuivre dans le cytosol et l'accompagnent jusqu'à une autre protéine cytosolique ou délivrent le cuivre à une protéine située dans la membrane d'un compartiment cellulaire (figure 2). Le mécanisme de transport du cuivre et du fer a été remarquablement bien conservé au cours de l'évolution. En effet, la levure *Saccharomyces cerevisiae* possède un homologue de l'ATPase7b et de la céruloplasmine nommés respectivement Ccc2 et Fet3p. Chez cette levure, plusieurs

molécules chaperonnes ont été découvertes: Atx1, Lys7 et Cox17. La protéine Atx1 délivre le cuivre à la protéine Ccc2 qui est située dans la membrane de l'appareil de Golgi alors que la protéine Cox17 amène le cuivre à une protéine inconnue située dans la membrane de la mitochondrie qui, elle, va finalement acheminer le cuivre au cytochrome-c-oxydase. Quant à la protéine Lys7, elle mobilise le cuivre pour l'amener vers la Cu-Zn SOD dans le cytosol. Ces 3 protéines chaperonnes ont des homologues humains: Atx1/Hah1, Lys7/Ccs1, Cox17/Cox17 (22,25,26). De plus, ces protéines humaines sont fonctionnelles lorsqu'elles remplacent leurs homologues dans la levure. Les protéines chaperonnes, à haute affinité, sont actives dans la capture du cuivre seulement lorsqu'il y a peu de cuivre dans le milieu (19). Par exemple, les protéines Cox17 et Atx1 ne sont pas requises pour le trafic du cuivre lorsque la quantité de cet élément est élevée, et ces protéines ne semblent pas agir lors de la neutralisation de l'effet toxique du cuivre.

Plusieurs protéines peuvent lier le cuivre dans le cytosol. La métallothionéine, le glutathion, Atx1, Cox17, Lys7 compétitionneraient entre elles pour le cuivre disponible. Il serait intéressant de découvrir si cette compétition contribue à la régulation de la distribution du cuivre. Une meilleure connaissance des molécules chaperonnes nous permettra de mieux comprendre le mécanisme de transport et de distribution intracellulaire du cuivre.

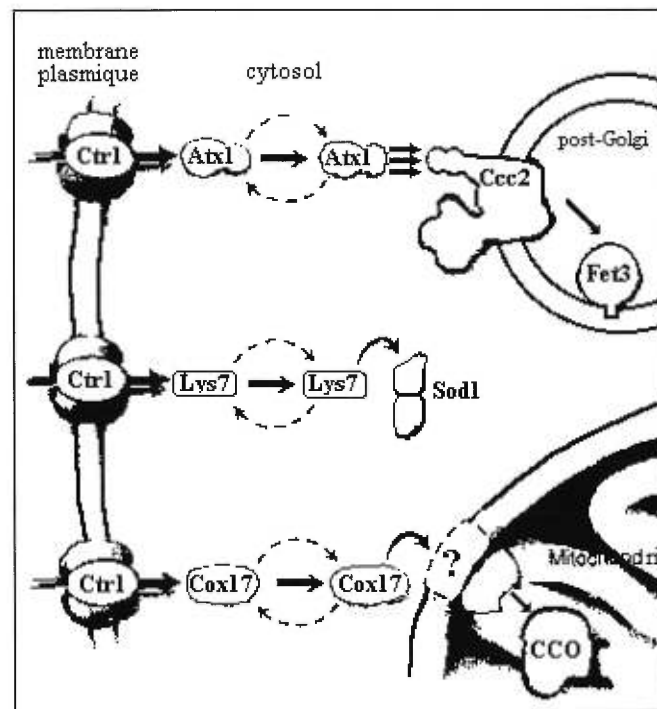


Figure 2: Trafic du cuivre chez la levure: Le cuivre dans la forme Cu(I) est transporté à travers la membrane plasmique par la protéine Ctr1 et est ensuite transporté dans le cytosol et mobilisé par les trois protéines chaperonnes connues: Atx1, Lys7, Cox17. Chaque protéine chaperonne transporte le cuivre à une protéine spécifique dans les différents compartiments cellulaires. (Adapté de **Valentine J.S., Gralla E.B.**, Delivering Copper Inside Yeast and Human Cells. *Science*, 278, 817-818, 1997.)

#### 1.1.4 L'excrétion

En condition normale, une partie du cuivre qui est entrée dans la cellule serait mobilisée par les protéines chaperonnes qui transporteraient le cuivre à différentes protéines, dont l'ATPase. Cette ATPase prendrait à son tour le cuivre pour l'incorporer à la céruloplasmine nouvellement synthétisée ou à des cuproprotéines afin de le transporter vers d'autres tissus. La figure 3 résume le métabolisme du cuivre dans l'hépatocyte. L'(apo)céruloplasmine est synthétisée principalement dans les hépatocytes et elle est sécrétée dans le plasma avec 6 atomes de cuivre par molécule sous la forme holocéruloplasmine qui possède une activité ferroxidase (27). Le cuivre lié à l'holocéruloplasmine ne fait pas partie du réservoir de cuivre plasmatique échangeable. En effet, la céruloplasmine doit incorporer le cuivre lorsqu'elle est synthétisée dans le foie. Cependant, une étude de la littérature suggère qu'il est également possible que la céruloplasmine mature incorpore spontanément le cuivre mais que ceci demeure un phénomène peu fréquent (65). L'holocéruloplasmine constitue de 90 à 95% du cuivre contenu dans le plasma (28). Cependant, la route principale d'élimination du cuivre est via la bile, car près de 80% de cet élément quitte le foie de cette façon (29). Le cuivre est unique parmi les métaux, parce qu'il est le seul élément de l'organisme dont la quantité est contrôlée par l'excrétion et non par l'absorption. Le foie est l'organe principal au niveau de l'excrétion du cuivre tandis que les reins en excrètent seulement une faible quantité en condition normale.

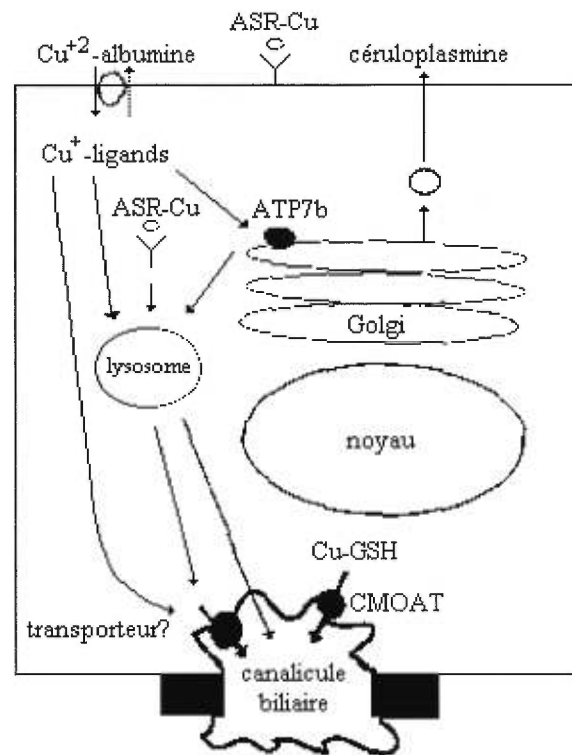


Figure 3: Métabolisme du cuivre dans l'hépatocyte: Le cuivre de la circulation portale, lié à l'albumine, est transporté dans l'hépatocyte à travers la membrane plasmique. Dans le cytosol il se lie à des ligands intracellulaires et est transporté vers l'ATPase7b qui l'incorpore à la céruloplasmine. Il peut aussi être transporté aux lysosomes pour excréation dans la bile ou transporté directement dans la bile à l'aide du transporteur cMOAT ou de l'ATPase7b. Le cuivre peut également pénétrer dans la cellule via le récepteur des asialoglycoprotéines qui est internalisé par endocytose. Le contenu des endosomes est ensuite transféré aux lysosomes. (Adapté de **Schilsky M.L.**, Wilson Disease: Genetic Basis of Copper Toxicity and Natural History, *Seminars in liver disease*, 16, 83-95,1996.)

#### 1.1.4.1 Mécanismes d'élimination du cuivre dans la bile

##### A) L'exocytose

Cette voie d'élimination du cuivre est un des mécanismes importants impliqués dans la sécrétion du cuivre dans la bile. Elle est particulièrement active lorsqu'il y a une surcharge en cuivre dans les hépatocytes (30). Lorsque le cuivre pénètre dans la cellule avec l'aide de l'albumine, il se lie à des ligands intracellulaires cytosoliques qui vont le transporter vers les lysosomes. Le cuivre peut également pénétrer dans la cellule via un récepteur hépatique pour les asialoglycoprotéines. La céruloplasmine circulante chargée en cuivre est une asialocéruloplasmine qui peut se lier au récepteur des asialoglycoprotéines à la surface des cellules hépatiques. Le complexe formé par le récepteur des asialoglycoprotéines, la céruloplasmine et le cuivre est alors internalisé par endocytose (31). Lorsque le complexe est défait, le contenu de l'endosome est transféré aux lysosomes tandis que le récepteur est recyclé à la surface de la cellule. Les données biochimiques et morphologiques indiquent que les lysosomes hépatiques peuvent entreposer le cuivre (1,32). Ceux-ci peuvent ensuite relâcher leur contenu directement dans la bile par exocytose. Cette voie d'excrétion du cuivre est indépendante du glutathion et pourrait être particulièrement utile pour éliminer le cuivre endogène ou celui provenant de la diète.

##### B) Élimination du cuivre par la voie dépendante du glutathion

Ballatori et collaborateurs (34) soutiennent que les systèmes de transport associés au glutathion, situés dans la membrane canaliculaire, sont impliqués

dans la sécrétion biliaire de plusieurs métaux dont l'arsenic, le mercure, le cadmium et le plomb. D'ailleurs, il a déjà été suggéré que le cuivre est sécrété dans la bile sous la forme d'un complexe avec le GSH (33,35). Il existe deux systèmes de transport couplés au GSH. Le premier nommé cMOAT, pour transporteur anionique multi-organique, utilise l'ATP (adénosine triphosphate) pour fonctionner (36). Lorsque le cuivre se retrouve à l'intérieur de la cellule, il se lie à des molécules intracellulaires, dont le glutathion, qui vont amener le cuivre à la membrane canaliculaire aussi nommée membrane apicale. Le complexe Cu-GSH va ensuite traverser le canal biliaire à l'aide du transporteur cMOAT. Ce mécanisme permet d'éliminer le cuivre lorsqu'il est administré par voie intraveineuse. En effet, il fonctionne lorsque la quantité physiologique de cuivre dans le foie est dépassée. Les rats Groningen-Yellow (GY) qui ont un défaut dans ce transporteur n'accumulent pas pour autant le cuivre, ce qui montre que ce mécanisme semble avoir moins d'importance que les autres mécanismes d'élimination du cuivre (33). Le deuxième type de transport qui dépend du GSH ne nécessite pas l'ATP. En effet, des systèmes de transport pour l'efflux du GSH-cuivre sont présents dans la membrane canaliculaire des hépatocytes (37).

### C) Transport du cuivre directement dans la bile à l'aide de l'ATPase7b

Dijkstra et collaborateurs ont été les premiers à montrer la présence d'un transport du cuivre nécessitant l'ATP comme source d'énergie chez les mammifères. Ce transport a été observé dans la membrane canaliculaire des hépatocytes (38,39). Ceci suggère que le cuivre contenu dans la cellule se lierait à des molécules qui transporteraient à leur tour cet ion au canal biliaire où un transporteur indépendant du GSH, mais qui nécessite l'ATP,

incorporerait le cuivre pour l'amener dans la bile. Le transport du cuivre dans la bile est inhibé lorsque les cellules sont mises en présence de vanadate, un inhibiteur des ATPases de type P (38). L'identification du gène de la maladie de Wilson et la caractérisation d'une ATPase de type P vient appuyer la découverte faite par l'équipe de Dijkstra (38,39). Cependant, ceci n'est pas une preuve finale puisque la littérature montre qu'il existe également un transport du cuivre, qui nécessite l'ATP, dans les vésicules canaliculaires des rats Long Evans Cinnamon alors que l'ATPase7b n'est pas censée être fonctionnelle chez ces rats (40).

## 1.2 LA RÉGULATION

La régulation est essentielle afin de conserver une quantité adéquate de cuivre pour les besoins physiologiques et d'en prévenir l'accumulation. Le premier mécanisme de régulation se situe au niveau de l'absorption gastro-intestinale. L'absorption du cuivre par le petit intestin est influencée par les acides aminés, l'acide ascorbique et d'autres facteurs diététiques tels que le zinc ou le fer (5). Le deuxième mécanisme de régulation, qui est le plus important, implique l'élimination du cuivre des hépatocytes par la sécrétion biliaire. Le cuivre se retrouve alors dans la lumière intestinale où une nouvelle réabsorption de cet ion pourrait survenir. La troisième façon de conserver l'homéostasie implique des mécanismes à l'intérieur des cellules pour séquestrer les ions de cuivre. En effet, le cuivre de la cellule pourrait être séquestré dans les lysosomes. Ce phénomène serait le précurseur de l'excrétion biliaire afin que le cuivre puisse finalement être éliminé. Le cuivre est également séquestré par la superoxyde dismutase, le glutathion et la métallothionéine dont le gène est induit par le cuivre (41). L'excès de cuivre est toxique pour les cellules car il réagit avec le  $H_2O_2$  et le superoxyde pour



former des radicaux libres selon la réaction de Fenton et Haber-Weiss (42). Ceci provoque la peroxydation des lipides des membranes, le bris de l'ADN, l'altération de la synthèse des protéines et des changements dans la morphologie de plusieurs organelles particulièrement au niveau des mitochondries (43). Finalement, plusieurs protéines telles la céruloplasmine et des cuproprotéines, qui ont besoin du cuivre pour leur activation, peuvent le mobiliser. Une altération d'un de ces mécanismes pourrait augmenter la susceptibilité d'une espèce donnée à une intoxication par le cuivre, comme c'est le cas pour la maladie de Wilson.

### **1.3 PATHOPHYSIOLOGIE MOLECULAIRE ET GENETIQUE DE LA MALADIE DE WILSON**

La maladie de Wilson se caractérise par une diminution d'excrétion du cuivre hépatique dans la bile d'où une accumulation de ce métal dans plusieurs organes. Elle se caractérise également par une activité enzymatique diminuée de la céruloplasmine plasmatique due au défaut d'incorporation du cuivre à cette protéine. Ce défaut d'incorporation a longtemps été attribué à une mutation dans le gène de la céruloplasmine. Cependant, il existe une maladie génétique rare, l'apocéruloplasminémie, où les patients ne possèdent pas de céruloplasmine et n'ont pas pour autant une accumulation de cuivre dans le foie et dans les autres organes (44). De plus, le clonage de la céruloplasmine a montré que le gène est situé sur un autre chromosome que celui de la maladie de Wilson et que celui-ci n'est pas muté chez les patients atteints de cette maladie (45).

La maladie se rencontre à une fréquence de 1/30 000 à travers le monde et une personne sur 90 est porteuse. Il y a quelques années, le gène a été cloné

par plusieurs groupes (5,46,47). Il couvre environ 80 kb du chromosome 13 et il est organisé en 22 exons (48). Chez l'homme, au moins 80 mutations ont été identifiées dans le gène (49). Ce sont principalement des transversions d'une seule paire de base ou des petites délétions. La plupart des mutations seraient situées à des sites critiques pour la fonction de la protéine (50).

Le transcrit d'ARNm de 7.5 kb est présent principalement dans le foie et les reins (5). Le gène code pour une ATPase de type P, l'ATPase7B, qui transporte le cuivre et qui possède une homologie de 65%, au niveau des acides aminés, avec l'ATPase7A de la maladie de Menkes (5,16). Ces ATPases possèdent également de l'homologie avec les ATPases bactériennes et de levures qui transportent le cuivre (5). Les ATPases font partie d'une grande famille de protéines membranaires qui pompent différents ions à travers la membrane et utilisent l'ATP comme énergie (16). La protéine possède plusieurs régions fonctionnelles importantes: 6 motifs de liaison du cuivre qui ont des résidus cystéines conservés à leur extrémité N-terminale, 8 domaines transmembranaires, un site de phosphorylation avec un aspartate conservé, un site de liaison de l'ATP et un motif qui rattache le site de liaison de l'ATP aux domaines transmembranaires (figure 4) (51). Il a été proposé que la liaison des ions de cuivre à l'extrémité N-terminale provoque un changement de conformation de la protéine, phosphorylation et déphosphorylation de l'aspartate par l'ATP et finalement le transfert du cuivre de l'autre côté de la membrane (16). Le nom ATPase de type P provient justement du fait que le résidu aspartate conservé est phosphorylé par l'ATP pendant le transport de l'ion.

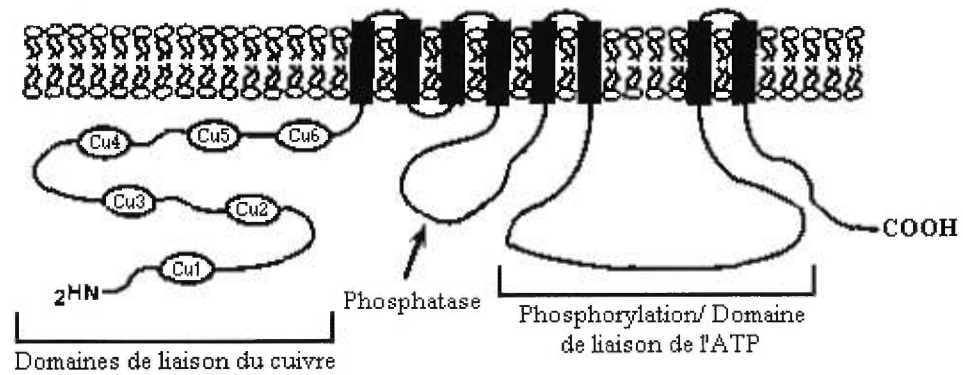


Figure 4: Structure du transporteur de cuivre ATPase7a et 7b. (Adapté de **DiDonato M., Sarkar B.**, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1360, 3-16, 1997.

#### 1.4 LES RATS LONG EVANS CINNAMON (LEC)

Les rats Long Evans Cinnamon (LEC) ont une mutation dans un gène situé sur le chromosome 16 qui code pour une ATPase de type P impliquée dans le transport du cuivre. Cette ATPase, nommée Atpase7b, partage 87% d'homologie avec la protéine humaine (52). Contrairement à l'homme, l'ATPase7b chez les rats LEC a une seule grande délétion en C-terminale de la protéine (52). Il existe un désaccord sur la présence ou l'absence de l'ARNm de l'Atpase7b muté dans le foie des rats LEC. Le groupe de J. Gitlin a montré que l'ARNm est absent alors que de D. Cox et collaborateurs ont détecté l'ARNm chez les rats LEC (52,53).

Ces rats ont une accumulation de cuivre hépatique, un défaut d'excrétion du cuivre dans la bile, ainsi qu'une diminution de la quantité d'holocéruleplasmine dans le plasma (53-55). L'augmentation de la quantité de cuivre dans le foie entraîne des insuffisances hépatiques, dans 40% des cas, vers l'âge de 4 mois. Ceux qui survivent font souvent des hépatites chroniques et développent des hépatocarcinomes dans 100% des cas (54). L'accumulation de fer plutôt que de cuivre serait responsable de ce phénomène puisque une diète sans fer peut prévenir la formation d'hépatocarcinomes chez les rats LEC qui ne bénéficient plus de l'activité ferroxidase de la céruloplasmine (56).

Tout comme chez l'homme, il n'y aurait pas d'incorporation du cuivre à l'apocéruloplasmine. Ceci ne serait pas causé par un défaut du gène de la céruloplasmine puisque ce gène est situé sur le chromosome 3 et n'est pas muté chez les rats LEC. De plus, la quantité d'ARNm de la céruloplasmine est la même dans les foies de rats LEC que chez les rats normaux (55).

## **1.5 MALADIE DE WILSON**

La maladie de Wilson est un désordre autosomal récessif du métabolisme du cuivre. Elle a été décrite pour la première fois en 1912 par Kinnear Wilson (57).

### **1.5.1 Manifestations cliniques**

Au niveau clinique, les manifestations de la maladie de Wilson varient beaucoup. Il a été suggéré que les variations seraient dues aux différents génotypes de la maladie (50). Il est très difficile d'établir une corrélation génotype/phénotype car les patients atteints sont souvent des hétérozygotes composés, c'est-à-dire qu'ils possèdent des mutations différentes sur les deux allèles du gène (49). De plus, un ensemble de facteurs tels la diète, l'inductibilité du gène de la métallothionéine et la capacité de mobiliser le cuivre peuvent moduler la réponse phénotypique. Cependant, l'endroit où se trouve la mutation et le type de mutation peut aider à prédire la sévérité de la maladie. Par exemple, une mutation en C-terminale de la protéine amène la plupart du temps des symptômes hépatiques plutôt que neurologiques comme c'est le cas des rats LEC (50).

L'accumulation de cuivre dans le foie peut provoquer des hépatites chroniques ou fulminantes pendant l'enfance et/ou plus tard à l'âge adulte, des troubles neurologiques et psychiatriques. Ces manifestations cliniques sont causées par la déposition du cuivre dans le cerveau, spécialement le ganglion de la base, dans la dernière phase de la maladie (58). Les changements neurologiques sont habituellement chroniques et provoquent la plupart du temps des défauts au niveau des fonctions motrices et du langage.

Plusieurs autres manifestations ont été répertoriées telles que des troubles rénaux, squelettiques, ophtalmologiques, hématologiques et cardiaques (59).

### 1.5.2 Diagnostic

Le diagnostic de la maladie est basé sur l'observation de plusieurs manifestations cliniques et une combinaison de tests (48). Un des signes le plus facilement observable chez la plupart des patients symptomatiques est la formation de l'anneau de Kayser-Fleisher dans la cornée causé par la déposition de granules de cuivre à cet endroit.

Parmi les tests biochimiques, la preuve la plus sensible est le dosage de la quantité de cuivre excrétée dans l'urine après administration de la D-pénicillamine qui est un chélateur de cuivre. Bien que plusieurs hépatopathies cliniques entraînent une augmentation de l'excrétion de cuivre dans l'urine, la quantité de ce dernier devrait augmenter d'avantage chez les patients atteints de la maladie de Wilson. De plus, un dosage de la céruloplasmine s'avère utile car chez 95% des patients la quantité de céruloplasmine circulante qui possède une activité oxydase est réduite.

Une biopsie du foie doit également faire partie du diagnostic afin d'en évaluer l'histologie et de déterminer la quantité de cuivre dans le foie. Lorsque la biopsie est contre indiquée, il est possible d'administrer au patient du cuivre radioactif ( $^{64}\text{Cu}$ ) et de mesurer son incorporation à la céruloplasmine. Cette épreuve est discriminatoire mais la réalisation et l'interprétation des résultats sont complexes. Malgré les développements significatifs au niveau du diagnostic moléculaire, il n'existe pas encore de

méthodes pratiques utilisées en laboratoire, car il existe au moins 80 mutations différentes.

### 1.5.3 Traitement

La stratégie la plus simple dans le traitement de la maladie consiste à diminuer les sources de cuivre de la diète. Le patient peut également être traité avec une thérapie par le zinc afin de prévenir l'absorption intestinale de cuivre. Cependant, ce traitement ne diminue pas la surcharge tissulaire en cuivre (3). Le traitement actuel le plus efficace est centré sur les chélateurs de cuivre afin de mobiliser le cuivre des organes affectés et de promouvoir son excrétion dans l'urine. Le chélateur le plus populaire demeure la D-pénicillamine prise quotidiennement pendant la durée de vie du patient. Le mécanisme d'action de ce chélateur serait d'induire l'expression de la métallothionéine hépatique (60). La métallothionéine séquestrerait le cuivre intracellulaire le rendant ainsi non toxique. Par contre, la D-pénicillamine ne décuivre pas les organes du cuivre qui s'y est déjà accumulé. Il permettrait seulement au patient d'éliminer le cuivre qu'il absorbe en trop à partir du moment où il prend le chélateur. S'il y a arrêt de la prise de la D-pénicillamine une hépatite fulminante peut survenir causée par la grande quantité de cuivre déjà présente dans les organes. Il existe aussi d'autres chélateurs utilisés lorsque la D-pénicillamine provoque trop d'effets secondaires, tels que la trientine (triéthylentétramine dihydrochloride), le BAL (2,3-dimercaptopropanol) et le tetrathiomolybdate (TTM) qui en est encore à l'étape de l'expérimentation chez l'homme et les animaux mais qui permettrait l'élimination du cuivre intracellulaire accumulé. Dans les cas extrêmes où les patients ont subi des dommages sérieux et irréversibles au foie, la greffe s'avère nécessaire.

## **1.6 LOCALISATION DE LA PROTÉINE**

### **1.6.1 Localisation tissulaire**

Les localisations tissulaires de l'ATPase7A et 7B sont connues. L'ATPase7B est exprimée principalement dans le foie et de façon moins importante dans les reins, les poumons et le placenta. Elle est aussi détectée, par Northern Blot, en très faible quantité dans le cerveau, les muscles, le pancréas et le coeur (5). L'ATPase7A, protéine de Menkes, au contraire, est exprimée dans tous les tissus à l'exception du foie (5).

### **1.6.2 Localisation cellulaire**

Il y deux ans, très peu de littérature était disponible sur la localisation intracellulaire de l'ATPase7B (Wilson). Les résultats concernant la localisation provenaient de l'observation de l'incorporation du cuivre à des vésicules provenant de sous-fractionnements cellulaires. Le manque d'anticorps contre l'ATPase7B rendait très difficile la localisation de la protéine d'une façon directe. Par contre, la localisation de l'ATPase7A (Menkes) était mieux connue grâce aux études de sous-fractionnement et d'immunofluorescence (4,53). Étant donné l'homologie de séquence, de structure et de fonction entre ces deux protéines, il est possible que la localisation et le comportement soient les mêmes.

#### **1.6.2.1 Localisation cellulaire de l'ATPase7a**

L'ATPase7a contient dans sa séquence d'acides aminés plusieurs sites potentiels de glycosylation, ce qui n'est pas le cas de l'ATPase7b. Les études



pour caractériser biochimiquement la protéine à l'aide de l'endoglycosidase H et F, ont montré que l'ATPase7a possède dans sa forme mature des carbohydrates complexes (61). Ceci suggère que la protéine transite à travers le complexe médial de l'appareil de Golgi. Afin de déterminer avec plus de précision la localisation de la protéine, du sous-fractionnement cellulaire a été effectué sur des cellules HeLa (61). L'ATPase7a a été colocalisée avec deux marqueurs: la  $\gamma$ -adaptine (AP-1) et le récepteur du mannose-6-phosphate (MPR) (61). Ces marqueurs sont tous les deux situés dans le trans-Golgi. Par contre, le MPR peut aussi être localisé dans les endosomes tardifs et dans la membrane plasmique. Les résultats des études biosynthétiques et de fractionnement révèlent donc que la protéine est localisée dans un compartiment intracellulaire situé dans la dernière partie de la voie sécrétoire (61). Dans le but de caractériser plus spécifiquement le compartiment cellulaire où se trouve la protéine, plusieurs groupes ont utilisé l'immunofluorescence indirecte (4,61,62). L'équipe de J. Gitlin a observé que la protéine était concentrée de façon périnucléaire avec un signal variable dans des vésicules du cytoplasme des cellules HeLa (61). Ils ont montré, par double immunofluorescence, que la protéine se trouvait dans le trans-Golgi et dans des compartiments vésiculaires avec le MPR. Aucun signal n'a été détecté dans les lysosomes, sur la membrane plasmique, ou sur les mitochondries (20,61,63). Le fait que la protéine se retrouve tout le long de la voie sécrétoire suggère qu'un ou des mécanismes puissent être utilisés par la cellule pour changer la localisation de la protéine, probablement en réponse aux demandes métaboliques spécifiques de la cellule. D'ailleurs, le groupe de Camakaris a montré par immunofluorescence sur des cellules CHO (chinese hamster ovary), résistantes jusqu'à 70 fois la quantité normale de cuivre, que l'emplacement de la protéine changeait selon le contenu en cuivre de la cellule (4). Chez les cellules cultivées dans un milieu dont la

concentration en cuivre est de  $0,8\mu\text{M}$  (milieu basal), l'ATPase7a est localisée au trans-Golgi. Cependant, lorsque les cellules sont cultivées pendant 24 heures dans un milieu dont la concentration en cuivre est élevée à  $189\mu\text{M}$ , la protéine change sa localisation périnucléaire pour une distribution pointillée et dispersée à travers le cytoplasme. Chez les cellules les plus résistantes au cuivre, ils ont observé beaucoup de fluorescence soulignant la périphérie de la cellule, ce qui suppose qu'une quantité significative de protéine est associée à la membrane plasmique (4). Il a été suggéré que le rôle de la protéine est de faire sortir l'excès de cuivre de la cellule. Par microscopie électronique, ils ont montré que la protéine se retrouvait dans la membrane plasmique seulement lorsqu'il y a un excès de cuivre et que le marquage de la membrane plasmique est toujours associé avec le côté cytoplasmique de la membrane. Ils ont également observé l'ATPase7a dans des vésicules cytoplasmiques lorsque les cellules sont cultivées en présence d'une grande quantité de cuivre. Lorsque les cellules retournent à l'état basal, la protéine est rapidement recyclée à sa situation initiale dans le trans-Golgi. En réponse à l'élévation de cuivre dans le milieu, la redistribution de l'ATPase7a est détectable en 10 minutes et reste perceptible pendant une heure, ce qui suppose que la relocalisation est causée par la circulation de la protéine plutôt que par la synthèse de nouvelles protéines (4). Cette hypothèse est supportée par le fait que la cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse de nouvelles protéines, soit incapable d'influencer ce processus. Les résultats en Northern et Western blot montrent que le cuivre dans les cellules CHO n'a pas d'influence sur la régulation du gène de Menkes au niveau transcriptionnel ou traductionnel, mais qu'il influence plutôt la localisation de la protéine (4). Le même groupe suggère également qu'il y a un recyclage constitutif de la protéine du trans-Golgi à la membrane plasmique, même en condition basale.

Par conséquent, l'ATPase7a doit être maintenue dans le trans-Golgi en récupérant continuellement la protéine de la membrane plasmique.

La recirculation de la protéine, en fonction de la quantité de cuivre, a aussi été observée dans les fibroblastes (62). La protéine est localisée dans la région périnucléaire, comme dans les deux autres études, et redistribuée à la membrane plasmique si la quantité de cuivre est abondante dans le milieu cellulaire ou dans la cellule. L'ATPase7a conserve les mêmes propriétés dans les cellules CHO et les fibroblastes puisque la protéine est capable de se relocaliser dans les deux types de cellules. Donc, l'ATPase7a se retrouve de façon prédominante dans le trans-Golgi, ce qui indique que le premier rôle de la protéine est de transporter le cuivre du cytosol vers la voie sécrétoire pour l'incorporer à des cuproprotéines nouvellement synthétisées, ainsi que pour l'exporter hors de la cellule. Il existe cependant une controverse sur l'emplacement de la protéine dans la membrane plasmique. Le groupe de J. Gitlin n'a pas détecté, en immunofluorescence, la présence de la protéine dans la membrane plasmique des cellules HeLa, même si par fractionnement ils ont montré qu'il y avait une petite quantité de la protéine dans la fraction où se trouve le MPR (61). De plus, le marquage à l'iode des protéines de surface, suivi d'une immunoprécipitation avec un anticorps contre l'ATPase7a, n'a pas révélé la présence de la protéine dans la membrane plasmique et ceci malgré le fait que la protéine soit sensée être dans la membrane de façon constitutive (4,62).

#### 1.6.2.2 Localisation cellulaire de l'ATPase7b

Peu d'études sur la localisation de l'ATPase7b sont disponibles. Dijkstra et collaborateurs (38,39) ont été les premiers à observer qu'il y avait un

transport du cuivre nécessitant l'ATP chez les mammifères. Ils ont fait du fractionnement de foie humain et de rat afin d'obtenir des vésicules de la membrane basolatérale et canaliculaire. Ils ont ensuite mesuré l'incorporation de  $^{64}\text{Cu}$  aux différentes vésicules. Ce transport nécessite l'ATP puisque le vanadate, un inhibiteur bien connu des ATPases de type P, inhibe l'incorporation du  $^{64}\text{Cu}$  aux vésicules selon la concentration de celui-ci. De plus, sans ATP dans le système, l'incorporation du cuivre est de 3 à 4 fois plus faible. L'incorporation du cuivre est 20% inférieure dans les vésicules de membranes basolatérales que dans celles des membranes canaliculaires chez le rat, et cette proportion augmente à 70% chez l'humain. L'incorporation observée dans les vésicules de membranes basolatérales peut être causée par la contamination de vésicules de la membrane canaliculaire. Les auteurs ont montré que les autres organelles tels les lysosomes et le réticulum endoplasmique ne contaminaient que très peu leur préparation de membranes plasmiques et que cette contamination ne pouvait pas expliquer les écarts observés de l'incorporation du cuivre au niveau des deux types de vésicules membranaires. Il est possible qu'il y ait deux ATPases impliquées chacune dans leur membrane respective. Cependant, ces résultats indiquent clairement qu'il y a une activité de transport du cuivre nécessitant l'ATP situé principalement dans la membrane canaliculaire. Le transport de cuivre observé dans la membrane canaliculaire par Dijkstra ne serait pas causé par le transporteur cMOAT également situé dans la membrane canaliculaire et qui utilise aussi l'ATP comme source d'énergie. En effet, les rats Groningen Yellow (GY), qui ont un défaut congénital dans l'activité de leur transporteur cMOAT, ont un transport du cuivre stimulé par l'ATP similaire aux rats contrôles dans les vésicules de membranes canaliculaires. La localisation de l'ATPase mutée dans la membrane canaliculaire peut expliquer la diminution de sécrétion du cuivre dans la bile chez les patients atteints de la maladie de

Wilson. Cependant, un transport du cuivre nécessitant l'ATP a également été observé dans les vésicules de la membrane canaliculaire chez les rats LEC alors que l'atpase7b n'est pas censée être fonctionnelle chez ces animaux (40). Ceci suggère que le transport du cuivre montré par Dijkstra dans les vésicules de membrane canaliculaire n'est probablement pas causé par l'ATPase7b. Par contre, il est possible que le transport observé chez ces rats soit causé par le transporteur cMOAT situé dans la membrane canaliculaire et qui nécessite l'ATP pour fonctionner.

La maladie de Wilson résulte aussi en une diminution de l'incorporation du cuivre à la céruloplasmine, ce qui ne peut être expliqué par la localisation de la protéine dans la membrane plasmique. Bingham et collaborateurs ont argumenté que la protéine devait être située dans un compartiment intracellulaire à un croisement dans le métabolisme qui soit commun à la sécrétion de la céruloplasmine et à l'excrétion du cuivre dans la bile (64). Par sous-fractionnement de foie de rat, ils ont montré qu'il existe un transport du cuivre nécessitant l'ATP comme source d'énergie dans les vésicules de microsomes (64).

La synthèse de la céruloplasmine n'est pas altérée chez les rats LEC (55). Par contre, il n'y a pas d'incorporation du cuivre à la céruloplasmine dans les hépatocytes de ces rats (55). Sato et coll. ont souligné que le cuivre est incorporé à la céruloplasmine nouvellement synthétisée dans les premiers stades de sa synthèse (65). Cependant, l'endroit où se fait l'incorporation du cuivre n'avait jamais été élucidé jusqu'à ce que l'équipe de Murata montre, par sous-fractionnement, que l'incorporation du cuivre se fait dans l'appareil de Golgi (62). En effet, la céruloplasmine doit être mature et glycosilée pour incorporer le cuivre. Par conséquent, elle doit nécessairement transiter par

l'appareil de Golgi où les étapes finales de la maturation des protéines ont lieu. La diminution d'holocéruleplasmine observée dans le sérum des patients atteints de la maladie de Wilson et des rats LEC pourrait donc s'expliquer par la localisation de l'ATPase7b mutée dans l'appareil de Golgi. Il existe des divergences sur la localisation de la protéine mutée chez les rats LEC. Bingham et coll. ont également fait du sous-fractionnement cellulaire de foie de rat LEC et de foie de rat contrôle. Ils ont ensuite fait des corrélations entre des marqueurs enzymatiques pour différentes fractions cellulaires et l'activité de transport du cuivre observé dans les vésicules microsomales. Contrairement aux rats contrôles, le transport du cuivre observé montre une forte corrélation avec un marqueur spécifique du réticulum endoplasmique et non l'appareil de Golgi. Ceci suggère donc que la protéine mutée serait située dans le réticulum endoplasmique (67). La même équipe a montré par PCR qu'une partie de l'ARNm de l'atpase7b est présente chez les rats LEC. L'ARNm observé proviendrait de la partie qui est en amont de la délétion présente dans le gène des rats LEC. Ils suggèrent que la mutation donne naissance à un ARNm qui est traduit et que la protéine produite est insérée dans le réticulum endoplasmique. La protéine mutée aurait perdu sa dépendance à l'ATP puisqu'aucun transport de cuivre nécessitant l'ATP n'a été observé chez les rats LEC. Ils suggèrent également que la mutation causerait une perte du signal requis pour diriger la protéine vers l'appareil de Golgi.

La production d'anticorps contre l'ATPase7b a permis de localiser la protéine par immunohistochimie. Plusieurs travaux d'immunofluorescence ont montré que la protéine se trouve dans le trans-Golgi chez une lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain, les cellules HepG2 (68,69,70). La protéine se retrouve également dans la région périnucléaire de fibroblastes ou

de cellules COS-1 transfectées avec des plasmides contenant le gène de l'ATPase7b (62,71). L'introduction de l'ADNc du gène de la maladie de Wilson dans le foie des rats LEC à partir d'un adénovirus recombinant a permis de montrer par immunofluorescence, sur des coupes de foie de rats infectés, l'expression de la protéine dans le cytoplasme des cellules du foie (72). Pour déterminer avec plus de précision la localisation de la protéine, du sous-fractionnement cellulaire de foie des rats infectés a été fait. Il a alors été déterminé que la protéine se trouvait uniquement dans l'appareil de Golgi et qu'il n'y avait aucun signal dans le réticulum endoplasmique, les lysosomes et le cytosol des cellules (68,72). Nagano et coll. ont également effectué de l'immunofluorescence sur des hépatocytes de rats LEC transfectés avec le gène de l'ATPase7b (71). Par contre, leurs résultats semblent suggérer une localisation de la protéine dans la région périnucléaire et dans la membrane plasmique. La transfection des hépatocytes de rats LEC suggère qu'il y a probablement une surexpression de la protéine ce qui pourrait amener une fausse localisation de la protéine causé par la grande quantité de protéines présentes.

Tout comme l'ATPase7a, il est possible que l'ATPase7b soit une protéine recirculée selon les besoins métaboliques de la cellule ou la quantité de cuivre dans le milieu. Chez les cellules HepG2, la protéine serait redistribuée de l'appareil de Golgi à des compartiments vésiculaires cytoplasmiques (68). La protéine n'a pas été détectée dans la membrane plasmique malgré l'incubation prolongée des cellules avec 200 $\mu$ M de sulfate de cuivre. L'utilisation de plusieurs méthodes de perméabilisation de la membrane cellulaire afin de détecter si la protéine pouvait être localisée dans la membrane plasmique mais exposée du côté cytosolique plutôt que sur le côté extracellulaire n'a pu montrer en immunofluorescence la présence de la

protéine dans la membrane plasmique. D'autres méthodes telles l'immunofluorescence sur des membranes plasmiques isolées, provenant de cellules HepG2, et le marquage à l'iode des protéines de surface suivi d'une immunoprécipitation n'ont pas non plus réussi à détecter la protéine dans la membrane plasmique (68,69). Le mouvement de la protéine serait donc différent de celui observé pour l'ATPase7a où le cuivre induit une relocalisation de la protéine dans la membrane plasmique. La relocalisation de la protéine a également été montrée *in vivo* (73). Lors de cette étude, l'administration de  $\text{CuSO}_4$  à des rats normaux a fait changer la localisation de la protéine d'une distribution périnucléaire vers des vésicules cytoplasmiques situées près du canalicule biliaire. Cependant, la redistribution de l'ATPase7b n'est pas observée dans toutes les études. En effet, Yang et coll. n'ont remarqué aucun changement dans la localisation de la protéine chez les cellules HepG2 lorsqu'elles sont cultivées avec un complexe cuivre-histidine dont la concentration est de  $200\mu\text{M}$  (69). De plus, il semble que la protéine ne soit pas non plus relocalisée dans les fibroblastes transfectés avec l'ADNc du gène de la maladie de Wilson et mis en présence de  $189\mu\text{M}$  de  $\text{CuCl}_2$  (62).

Récemment, deux formes de l'ATPase7b ont été découvertes (69). Il y aurait dans le foie un transcrit prédominant qui code pour une protéine possédant un poids moléculaire de 160kD. Cependant, deux formes de la protéine peuvent être détectées dans le foie et d'autres organes, particulièrement le cerveau, où il se produit de l'épissage alternatif dans l'ARNm de l'ATPase7b. Ce phénomène donnerait naissance à une protéine de 160kD et une plus petite protéine de 140kD. Par immunofluorescence sur des cellules HTB9 (human bladder carcinoma) transfectées avec des plasmides contenant le gène de la protéine correspondant aux formes de 160kD ou de 140kD, il a été montré que ces deux protéines sont localisées dans des endroits



différents. La forme de 160kD serait située dans l'appareil de Golgi alors que la protéine de 140kD serait localisée dans le cytosol (69). Les exons 7 et 8 que ne possèdent pas la plus petite protéine coderaient pour un domaine transmembranaire nécessaire pour maintenir la protéine dans la membrane du réticulum endoplasmique et/ou l'appareil de Golgi. Lutsenko et collaborateurs ont montré que les deux formes de la protéine sont présentes dans les cellules HepG2 (70). Une protéine de 160kD est localisée dans le trans-Golgi et une plus petite protéine de 140kD est située dans les mitochondries. En Western blot avec un lysat de protéines provenant de cellules HepG2, l'anticorps dirigé contre la région C-terminale reconnaît une forme protéique majeure de 140kD et une forme mineure de 160kD. Contrairement à l'anticorps C-terminal, l'anticorps contre la région N-terminale reconnaît de façon prédominante une protéine de 160kD.

Lutsenko et collaborateurs n'ont pu mettre en évidence le phénomène d'épissage alternatif dans l'extrémité 5' de l'ARNm (exon 2 et 7) de l'ATPase dans les cellules HepG2. Ils suggèrent donc que les 2 formes de la protéine seraient la conséquence d'une modification post-traductionnelle. L'extrémité N-terminale de la protéine de 160kD serait coupée pour donner naissance à la protéine de 140kD.

### **1.6.3 Rôle de la protéine**

Plusieurs études montrent que le rôle de l'ATPase7a et 7b est de transporter les ions de cuivre à travers les membranes. Ceci a d'abord été montré chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* où le gène *Ccc2* (homologue du gène de Menkes et Wilson) code pour une protéine essentielle au transfert des ions de cuivre du cytosol dans la membrane de l'appareil de Golgi pour incorporation

à la protéine Fet3p (homologue de la céruloplasmine chez la levure). L'expression de la protéine de Wilson humaine dans des levures déficientes en Ccc2 a restauré l'incorporation du cuivre à la protéine Fet3p (68). Il a également été montré par un autre groupe qu'il y avait une correction du transport du cuivre dans les fibroblastes défectueux des patients atteints de la maladie de Menkes par l'expression de l'ATPase de Wilson ou Menkes dans ces cellules (62). L'ATPase7b n'est pas exprimée dans les fibroblastes mais l'expression de la protéine à partir d'un ADNc amène aussi la correction du défaut de transport de cuivre chez les fibroblastes de patients atteints de la maladie de Menkes à un niveau moindre. De plus, l'introduction du gène de l'ATPase7b dans le foie des rats LEC permet de restaurer la synthèse d'holocéruloplasmine (72). Ceci corrobore les études précédentes et confirme que le rôle de l'ATPase est de transporter le cuivre à travers une membrane pour incorporation à la céruloplasmine.

## **1.7 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS**

La localisation intracellulaire de l'ATPase7b nous permettra d'analyser la pathogénèse de la maladie de Wilson. Plus important encore, elle nous aidera à élucider une partie du mécanisme de transport de cuivre à l'intérieur de la cellule. Il existe beaucoup de divergences sur la localisation de l'ATPase7b. La protéine a été observée de façon variable, par des techniques de sous-fractionnement cellulaire ou par immunohistochimie et immunofluorescence, dans l'appareil de Golgi, la membrane plasmique, la membrane canaliculaire, les mitochondries, le réticulum endoplasmique ou dans des vésicules cytoplasmiques en réponse à l'élévation de cuivre dans la cellule (38,39,40,64,66,68,69,70,71,72,73,85). Cette étude pourra également nous aider à confirmer la localisation controversée de la protéine. Les divergences

sur la localisation peuvent provenir de l'utilisation par chaque équipe de son propre anticorps, différent de celui des autres groupes. En effet, les travaux de localisation ont été effectués avec différents anticorps qui sont dirigés vers la partie N ou C terminale de la protéine, ce qui pourrait influencer les endroits où la protéine a été localisée. De plus, l'utilisation de différentes lignées cellulaires cancéreuses ou non ainsi que l'utilisation de cellules transfectées surexprimant la protéine ont probablement contribué à la controverse.

La diminution de l'excrétion du cuivre hépatique dans la bile pourrait suggérer que le transporteur défectueux serait situé dans la membrane canaliculaire de l'hépatocyte. Puisque les lysosomes sont aussi impliqués dans la sécrétion biliaire du cuivre, il est possible que la protéine se retrouve également à cet endroit. De plus, le rôle de l'ATPase7b dans l'incorporation du cuivre à la céruloplasmine nécessite la présence de celle-ci dans les organelles impliqués dans la sécrétion des protéines tels l'appareil de Golgi et/ou le réticulum endoplasmique. La même protéine pourrait se retrouver dans tous ces différents endroits ou bien il pourrait s'agir de différentes isoformes de la protéine. Cette théorie est appuyée par le fait qu'il existe un exemple d'épissage alternatif dans l'ARN de l'ATPase7b et par le fait que d'autres membres de la famille des ATPases de type P sont connus pour avoir différentes isoformes localisées dans divers organelles (69,74). Les manifestations cliniques variées de la maladie pourraient être en rapport avec les diverses isoformes de la protéine. De plus, nous pensons qu'il est également possible que la protéine se retrouve à un seul endroit dans la cellule qui soit une jonction commune à la sécrétion de la céruloplasmine et à l'excrétion du cuivre dans la bile. L'appareil de Golgi est un organelle important pour diriger les protéines vers leur destination cellulaire ou pour

les exporter hors de la cellule. L'ATPase7b défectueuse située dans l'appareil de Golgi pourrait résulter en une excrétion biliaire du cuivre diminuée.

Nous proposons de localiser l'ATPase7b par immunofluorescence et immunoperoxydase à l'aide de deux différents anticorps dirigés contre la partie N et C-terminale de la protéine. Cette localisation se fera sur la lignée cellulaire HepG2 et des hépatocytes de rats normaux. Les hépatocytes représentent un meilleur modèle que les cellules HepG2 puisqu'ils peuvent se regrouper et former des canalicules biliaires lorsqu'ils sont en culture. Ceci nous permet donc de vérifier si la protéine est localisée à cet endroit. Le sous-fractionnement cellulaire de foie de rats normaux nous aidera à confirmer la localisation de la protéine.

Par immunofluorescence avec les cellules HepG2, nous tenterons de montrer qu'il existe une recirculation de la protéine dans la cellule lorsqu'il y a un excès de cuivre dans le milieu. En effet, plusieurs protéines telles la furine et la TGN38 ont des signaux à des endroits précis dans la séquence de leurs acides aminés qui permettent à la protéine d'être recyclée de la membrane plasmique au trans-Golgi (75-78). En se basant sur la présence de ces mêmes signaux dans la séquence de l'ATPase7b, nous pensons que la protéine puisse être recyclée. Le sous-fractionnement cellulaire de foie de rats surchargés en cuivre par une diète riche en cet ion, nous indiquera également si la distribution de la protéine est modifiée *in vivo*. En effet, le métabolisme des cellules en culture est probablement différent des conditions et du métabolisme qui prévalent *in vivo* et cette différence pourrait affecter la localisation de la protéine.

**Localization of the Wilson's disease protein in two different forms  
to the Golgi apparatus and to the mitochondrial subcellular  
fraction.**

**Nancy Dallaire, Fernando Alvarez, Steven R Martin\***

**Department of Pediatrics, University of Montreal, Centre de Recherche,  
Hôpital Sainte Justine.**

Submitted in European Journal of Biochemistry, May 2000

**\*Corresponding author:**

Dr Steven R Martin  
Division of Gastroenterology and Nutrition  
Hôpital Sainte Justine  
3175 Côte Sainte Catherine  
Montréal, Québec, H3T 1C5,  
Canada  
Telephone: (514) 345-4626  
Fax: (514) 345-4999  
E-mail: [martinst@magellan.umontreal.ca](mailto:martinst@magellan.umontreal.ca)



**Abbreviations:** LE, Long Evans; LEC , Long Evans Cinnamon; WD, Wilson's disease; PBS, phosphate buffered saline; MEM, minimal essential medium; FITC, fluorescein isothiocyanate

Running title: **Wilson's Disease protein localization**

**Summary:**

The Wilson's disease protein has been variably observed in the Golgi apparatus, the plasma membrane, the bile canalicular membrane or the mitochondria. The aim of this study was to further investigate the subcellular localization of the Wilson's disease protein, especially in normal hepatocytes. *Methods:* Two antibodies recognizing the N-terminal or C-terminal regions of the Wilson's disease protein were used to examine Long Evans rat hepatocytes by immunoperoxidase staining and HepG2 cells by immunofluorescence under normal and elevated copper concentrations and after copper chelation with ammonium tetrathiomolybdate. Confirmatory studies included immunoblot analysis of subcellular fractions of normal rat liver, liver of dietary copper overloaded rats and immunoprecipitation of labeled rat liver proteins. *Results:* The Wilson's disease protein was observed in the Golgi apparatus but not in the bile canaliculus or plasma membrane. Elevated copper concentrations led to diffuse cytoplasmic staining, sometimes in a punctate or vesicular distribution. A 140 kDa form was detected in fractions enriched for mitochondria while a 165 kDa form was predominant in the Golgi-enriched fractions. In-vivo copper loading reduced the expression of the 140 kDa form associated with the mitochondria-enriched fractions and increased the expression of the 165 kDa form associated with the Golgi. *Conclusions:* A 165 kDa form of the Wilson's disease protein is present in Golgi-enriched membranes; a 140 kDa form is present mainly in the mitochondria-associated fraction in normal liver. Elevated liver copper levels influence the predominant form in each subcellular compartment.

**Keywords:** copper transport, hepatocytes, P-type ATPase, Wilson's disease, HepG2 cells.

## Introduction

Wilson's disease (WD) is an autosomal recessive disorder characterized by a defect in copper incorporation into ceruloplasmin and a lack of excretion of excess hepatic copper into the bile, resulting in copper retention in the liver, kidneys, eyes and brain [1]. Copper is an essential element that acts as a co-factor for many enzymes. However; free copper is highly toxic to the cell such that mechanisms exist to sequester the metal. Intracellular copper is bound to glutathione, to metallothionein, the major storage protein, to cellular enzymes or is incorporated into ceruloplasmin for release to the circulation [2-5]. In Wilson's disease, failure of copper incorporation into apoceruloplasmin results in either the degradation of the protein or the secretion of predominantly apoceruloplasmin, an enzymatically inactive form. The incorporation of copper into apoceruloplasmin was shown to occur between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus[6-8]. The WD gene has been localized to chromosome 13 and codes for a P-type copper transporting ATPase (ATP7B) showing a high degree of homology (65%) with the Menkes disease gene and with genes coding for bacterial and yeast copper transporting ATPases [2,9]. ATP7B is expressed in the liver, kidney and placenta, while the Menkes gene is expressed in most tissues other than the liver. The intracellular localization of the Wilson's disease protein remains controversial. Hung and coworkers observed the Wilson's disease protein in HepG2 cells, a protein of 160 kDa, in the trans-Golgi [10]. They also described a copper-induced translocation of Golgi-located fluorescence to a cytoplasmic vesicular compartment. Others suggest that the protein is also located at the plasma membrane [10-12], the bile canalicular membrane [14,15], the mitochondria [16] or in unidentified intracytoplasmic vesicular structures [10]. The extra-Golgi localization of WD protein has been mainly observed after *in-vitro* administration of copper [10,13]. Recently, two forms of the Wilson's disease protein were found in HepG2 cells; a 160 kDa form located in the trans-Golgi, and a 140 kDa in the mitochondria [16]. This study was undertaken to elucidate further the dual localization and the influence of intracellular copper concentration on the apparent redistribution of the Wilson's disease protein, particularly after *in-vivo* copper loading by means of a copper enriched diet.



## **Materials and Methods**

### **Antibody production**

A synthetic peptide (250 $\mu$ g) representing the rat Wilson's disease protein (Atp7b) C-terminal sequence (aa Arg 1366-Ser 1386) was conjugated to bovine serum albumin, mixed with complete Freund's adjuvant and used to immunize New Zealand White rabbits. This sequence was chosen because of its homology between rat Atp7b and human ATP7B and because it codes for a computer-predicted, putative antigenic site. The rabbits were boosted with 150 $\mu$ g of the same antigen at four and six weeks after the first injection. The specificity of the antibody was subsequently tested and shown to react with the peptide by dot blot while pre-immune serum was negative. In addition, the antibody reacted by Western blot with the crude microsomal fraction of HepG2 cells. Finally, the antibody immunoprecipitated proteins synthesized by in-vitro transcription and translation from a partial cDNA containing the antigenic site. The cDNA coding for the N-terminal of the ATP7B protein was kindly provided by Dr J Gitlin, Washington University, St Louis. This region of the protein was cloned in the pGEX vector and expressed as a recombinant protein with glutathione-S-transferase. This molecule was purified using a glutathione-Sepharose 4B column, before injection. Immunization was carried out as described for the synthetic peptide described above. The immune rabbit serum was subsequently shown to react with the purified isolated recombinant protein by immunoblot; pre-immune serum was negative.

### **Immunofluorescence**

HepG2 (human hepatoma cells) were cultured in MEM (Gibco/ BRL) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). Cells were grown to 70% confluency on cover glass slips and fixed with 100% methanol at  $-20^{\circ}$  C or 4% paraformaldehyde at room temperature. Fixed cells were washed twice in phosphate buffered saline (PBS) and permeabilized with 0.2% Triton-X100 in PBS for 10 minutes at room temperature. Cells were then blocked for one hour in 3% BSA in PBS followed by incubation with primary antibody for 2 hours and then FITC-conjugated secondary antibody for 90 minutes at room temperature. In some experiments, cells were grown in medium containing 40  $\mu$ mol copper

sulfate (Fischer Scientific, Nepean, ON), 200  $\mu$ mol copper sulfate or the copper chelator ammonium tetrathiomolybdate (Aldrich Chemical Co, Milwaukee, MI), 40  $\mu$ mol for 2 hours prior to immunofluorescence studies. Under these conditions, viability was always greater than 95% as estimated by trypan blue exclusion.

Primary antibodies included rabbit anti-C-terminal Atp7b (rat), rabbit anti-N-terminal ATP7B (human), mouse monoclonal anti-Golgi 58 kDa protein (Sigma, Oakville, Ontario), mouse monoclonal anti-mannosidase II (Babco, Richmond, California), rabbit polyclonal anti-cytochrome-c-oxidase (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz California), human primary biliary cirrhosis serum (donated by Professor M Huet, Hôpital St Luc, Montreal). Secondary antibodies were goat anti-rabbit IgG (Medicorp, Montreal, Canada), goat anti-mouse IgG (Medicorp) and goat anti-human IgG (Medicorp). After staining, coverslips were mounted in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, California) and examined using a Zeiss fluorescence microscope.

### **Immunoperoxidase**

LE rat hepatocytes were isolated as previously described [17] and allowed to adhere to coverslips coated with type-1 collagen (Collagen Corporation, Fremont, California) for three hours. The culture medium (MEM, 10% FCS) was changed and the cells were incubated overnight. The cells were fixed with 2% or 4% paraformaldehyde for 20 minutes, quenched with 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in PBS and permeabilized in 0.2% Triton X-100 in PBS for 10 minutes. Cells were washed twice in PBS and blocked in 0.2% PBS-gelatin for one hour followed by an incubation with a primary antibody for two hours and with peroxidase-conjugated secondary antibody (Medicorp) for 90 minutes. Finally, the cells were developed in a solution of 3% 3,3'-diaminobenzidine (Sigma, Oakville, Ontario). Following staining, coverslips were mounted on slides with glycerol.

### **Cell Fractionation**

Long Evans rat liver, or liver from LE rats fed 0.15% copper acetate in the drinking water for 8 weeks, was homogenized with six strokes of a tight Potter-Elvehjem teflon homogenizer, 1g per 5 ml of HB buffer: Hepes 10 mM, sucrose 250 mM,

Complete™ mini protease inhibitor cocktail, (Boehringer Mannheim, Laval, Quebec), pH 7.5. Fractions were prepared by differential fractionation: 1) 5 minutes x 1000g, representing mainly cell nuclei, heavy mitochondria and unvesiculated, large sheets of subcellular membrane (Golgi stack) 2) 10 minutes x 3000g, representing heavy mitochondria; 3) 10 minutes x 6000g, representing mitochondria, lysosomes, peroxisomes and Golgi membranes; 4) 15 minutes x 20,000g, representing lysosomes, peroxisomes, Golgi membranes, large and dense vesicles; 5) 30 minutes x 205,000g, representing endoplasmic reticulum vesicles, plasma membrane, Golgi, endosomes. The pellets were resuspended in HB buffer and the protein concentration determined by the Lowry method [18].

### **Immunoblot**

60µg of each liver fraction was loaded on a SDS-PAGE 7.5% gel and transferred to nitrocellulose paper and processed for immunoblot as previously described [19]. Primary antibodies included anti-ATP7B, N-terminal, anti-Atp7b C-terminal and, as controls, anti 58 kDa Golgi associated protein and anti-cytochrome-c-oxidase.

### **Immunoprecipitation**

HepG2 cells were grown to confluence in a 6-well plate. Approximately  $1 \times 10^6$  cells were rinsed with PBS and incubated at 37°C for 30 minutes in MEM without methionine or cysteine. This medium was replaced with fresh MEM supplemented with  $^{35}\text{S}$  methionine and  $^{35}\text{S}$  cysteine both at 250µCi/ml (Amersham,) and maintained at 37°C for 3 hours. This was followed by a chase period of 30 minutes in serum-free medium. Immunoprecipitation followed by electrophoresis and fluorography was then carried out as previously described.<sup>20</sup> The primary antibodies included pre-immune rabbit serum, anti-Atp7b C-terminal, anti-alpha-1-antitrypsin (Dakopatts, Denmark) and anti-ceruloplasmin (Dakopatts).

## Results

### Immunoprecipitation

The antibody recognizing the C-terminal region of the Wilson's disease protein immunoprecipitated a 140 kDa band from HepG2 cells. With longer exposure a faint 160 kDa band became visible. The anti-N-terminal antibody immunoprecipitated only the 160 kDa protein (figure 1). The 160 kDa band was considered to be same as the 165 kDa band observed by immunoblot, the slight difference in size attributed to the different techniques. No protein was immunoprecipitated by pre-immune serum, supplementary proof of the specificity of the antibodies.

### Localization of Atp7b product by immunohistochemistry.

The localization of the Wilson's disease protein in HepG2 cells by indirect immunofluorescence is shown in figure 2. The antibody recognizing the N-terminal of the protein produced staining in a perinuclear pattern typical of trans-Golgi localization as previously described by J. Gitlin and co-workers [10] (Figure 2a). The C-terminal antibody (figure 2b) stained in a perinuclear fluorescence pattern not unlike that produced by the antibodies anti-58 kDa protein, (figure 2c) and anti-alpha-mannosidase (figure 2d). Two proteins located in the Golgi complex. Moreover, we also observed a punctate, cytoplasmic distribution of fluorescence similar to that obtained when staining with mitochondria-specific antibodies such as serum from a patient with primary biliary cirrhosis (figure 2e), or anti-cytochrome-c-oxidase (figure 2f). In some cells, particularly with the C-terminal antibody there was observed a staining of large vesicular structures (figure 2b). Due to the high autofluorescence of LE rat hepatocytes we examined the localization of Wilson's disease protein in primary cultures of hepatocytes by immunoperoxidase techniques. The peri-canalicular region was examined for staining by observing hepatocyte couplets (figure 3). While a perinuclear pattern was observed using the anti-N terminal antibody, consistent with that observed by immunofluorescence in

HepG2 cells, no staining was observed at the bile canalicular membrane. No antibody reactivity was observed with the plasma membrane.

### **Localization of Wilson's disease protein in subcellular liver fractions**

In order to confirm the results obtained by immunofluorescence, subcellular fractions of LE rat liver were prepared and subjected to protein electrophoresis (figure 4). The anti-N-terminal antibody recognized by immunoblot a 140 kDa protein in the nuclear and heavy mitochondrial fractions (1 and 2), whereas a 165 kDa protein was detected in fractions 4 and 5 enriched for endoplasmic reticulum vesicles, endosomes, and plasma membrane and Golgi membranes. No band was detected in the fraction enriched for peroxisomes and lysosomes. Anti-C-terminal antibody showed a similar pattern but the 140 kDa protein was the main form recognized, the 165 kDa band in fraction 5 being extremely faint (data not shown).

### **Atp7b distribution under conditions of altered copper concentrations**

Following intracellular copper chelation with 40  $\mu\text{mol}$  ammonium tetrathiomolybdate, the overall fluorescence was reduced, leaving only a close perinuclear Golgi staining with the N-terminal antibody (Figure 5a). In contrast, elevated copper concentrations in the medium resulted in a spreading of the fluorescence distribution throughout the cell cytoplasm (Figure 5 b, c). At copper concentrations of 200  $\mu\text{mol}$ , more peripheral, punctate staining of the cytoplasm was observed (Figure 5c) and was most pronounced with the C-terminal antibody in which the staining pattern appeared to be vesicular in nature (Figure 5d).

Following eight weeks of dietary copper overload, liver subcellular fractions were prepared and examined by immunoblot. (Figure 6 ) In contrast to normal liver, following *in-vivo* copper loading the fractions enriched for heavy mitochondria contain only small amounts of the 140 kDa form. The level of expression of the 165 kDa form was proportionately greater, especially in the fractions containing Golgi membranes. The same amount of protein per lane was loaded on each gel and exposure time was equal to that used in fractions from normal liver (figure 4).

## Discussion

Defining the subcellular localization and function of the copper transporting ATPases should provide insight into the mechanisms of copper related liver disease and the specific effects of particular mutations on copper transport function. Our current knowledge is drawn mainly from studies of the Menkes gene, the Wilson's disease gene and the *Saccharomyces cerevisiae* gene, *ccc2*, and their related gene products, copper-transporting ATPases. The functional interrelationships between these ATPases is demonstrated by the ability of the Menkes and Wilson's protein to deliver copper to Fet3P, a ceruloplasmin homologue of yeast cells and to correct the defective copper transport of fibroblasts from a Menkes patient [10,13,21]. A trans-Golgi localization was observed for the *ccc2p* protein [21]. A similar location for the WD protein would correspond with the observed site of incorporation of copper into ceruloplasmin, in the secretory pathway between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus[6-8]. This location, moreover, incorporates the proposed pathway of copper transport from the basolateral membrane, high affinity copper transporter *Ctrl*, via the recently described copper chaperone *Hah1*, to a copper-transporting ATPase situated in a trans-Golgi compartment [22]. Using primary antibodies produced against the amino terminal of the Menkes protein, a trans-Golgi localization was reported in cells and subcellular fractions from HepG2 cells [23], CHO cells [24], HeLa cells [25] and copper-resistant CHO cells [26]; similar observations using an antibody to the C-terminal were made in normal fibroblasts [13,27]. The trans-Golgi localization was attributed to a Golgi retention signal in the third transmembrane region and a Golgi retrieval sequence at the carboxyl-terminal of the protein [27-29]. In conditions of elevated copper, Menkes protein translocates to the plasma membrane [26]. For the Wilson's disease protein the picture is less clear. Trans-Golgi staining was reported for the Wilson's protein following adenovirus and liposomal mediated delivery of ATP7B cDNA to LEC rats, the animal model for Wilson's disease[11,30]. Although localization of WD to the plasma membrane under basal copper conditions was described by Nagano and colleagues [11], images of plasma membrane staining using anti-WD antibodies both by fluorescent microscopy and immunoelectron microscopy were not convincing. Moreover, the findings were observed in LEC hepatocytes

transfected with the ATP7B gene suggesting that the observations may result from overexpression of the protein leading to sorting from the trans-Golgi to the plasma membrane via a default bulk pathway. In contrast, Yang et al described WD localization to the Golgi under basal conditions in HepG2 cells, but were unable, under conditions of increased copper concentration, to observe relocalization either to a cytoplasmic compartment or to the plasma membrane [12]. Using a polyclonal antibody recognizing the N-terminal region of WD protein, Hung et al demonstrated, the localization of a 165 kDa form of Wilson's protein, in HepG2 cells and CaCo2 cells, to the trans-Golgi network [10]. In conditions of elevated intracellular copper the protein appeared to redistribute, producing a diffuse, punctate and sometimes vesicular staining of the cytoplasm that was not associated with the plasma membrane nor endoplasmic reticulum, lysosomes or microsomes. Immunoelectron microscopy was not performed to confirm the findings. In the present study we examined normal rat hepatocytes and observed the localization of WD protein to the Golgi apparatus, but we were unable to detect its presence at the sinusoidal or bile canalicular plasma membrane. Although indirect evidence for a canalicular location for WD protein was suggested from observations of a vanadate-inhibited copper transporting ATPase in isolated canalicular membranes [14], whether this transporter is actually the Wilson's protein is questionable because similar findings were made in the Long Evans Cinnamon rat [15]. Our observations, taken together with the majority of published data, would suggest that the Wilson's disease protein has no direct role in copper transport at the canalicular membrane.

Recently, two forms of the WD protein were found in HepG2 cells; a 160 kDa form was localized to the trans-Golgi, while a 140 kDa form, believed to be formed by cleavage of the N-terminal, was localized to the mitochondria [16]. These authors tested the N-terminal antibody used in Hung's studies and found a 140 kDa form, particularly in mitochondria-enriched fractions, suggesting that the vesicular compartment described by Hung may also have been the mitochondria. Using antibodies recognizing the C-terminal and -N-terminal, we also observed two forms of WD protein. A 165 kDa protein was immunoprecipitated from HepG2 cells primarily by the N-terminal antibody and was found mainly in subcellular fractions of normal rat liver enriched for Golgi membranes.

In fractions enriched for mitochondria, a 140 kDa protein was present. We were unable to detect a small molecular weight cleavage product using the N-terminal antibody (data not shown) making it unlikely that the 140 kDa protein represents simply a cleavage product of the 160 kDa form, as suggested previously [16]. In contrast, the C-terminal antibody immunoprecipitated mainly the 140 kDa form from HepG2 cells. and, as also observed by Lutsenko, was associated with the mitochondria-enriched fractions of rat liver. The different patterns of recognition shown by antibodies to the C-terminal and N-terminal remains to be explained. Possibly, a modification of the membrane topology of the protein by copper binding, changes in protein folding or alterations in the membrane insertion of the protein in different organelles will modify the exposure of epitopes recognized by each antibody.

In dietary copper overload there is a shift to greater expression of the 165 kDa Golgi-associated form with little of the 140 kDa mitochondria-associated form. It is tempting to speculate that this may serve to protect the mitochondria from excess copper exposure. It might be argued that the 140 kDa form in mitochondria-enriched fractions corresponds to large endosomal vesicles. We did observe a fluorescence distribution in HepG2 cells in normal and elevated copper conditions that, especially with the anti-C-terminal antibody, appeared in vesicular cytoplasmic structures. In copper overload conditions the density of vesicles may be increased allowing them to sediment in earlier fractions. However, little of the 140 kDa form is expressed in hepatocytes of copper loaded rats making this explanation less likely. Several arguments may be offered to support a mitochondrial membrane localization for WD protein. Copper is required as a co-factor for critical mitochondrial enzymes including cytochrome-c-oxidase and enzymes involved in heme and protoporphyrin synthesis [3]. Bacterial homologues of WD protein (Cop B) are located in cell membranes functioning in analogous fashion to the mitochondrial membrane [31]. In conditions of dietary copper overload and in Wilson's disease, morphological alterations in mitochondria are common [32]. In yeast, the copper chaperone Cox17 participates in the transfer of copper (I) from Ctr1 to mitochondria [33,34]. This transport mechanism utilizes high affinity pathways, active in low-copper conditions and may be bypassed under high copper conditions. The amino acid



terminal of copper chaperones contains the MXCXXC motif, the same copper-binding domain repeated six-fold in the Menkes and Wilson's disease ATPases, leading to the speculation that WD may serve the role of the as yet unidentified mitochondrial membrane transport protein accepting copper from the copper chaperone [33,34]. Until recently it was considered unusual for ER-derived, Golgi-resident, proteins to be found in the mitochondria. Mitochondrial proteins are generally synthesized in cytoplasmic ribosomes and inserted in the membrane post-translationally or co-translationally [35]. However, the migration of a glycoprotein from the ER to the mitochondrial inner membrane has been demonstrated [36], possibly via the mitochondrial-associated membrane of the ER [37].

The 140 kDa form may represent the mitochondrial form of the protein following co- or post-translational removal of an N-terminal signal peptide. Alternatively, the synthesis of proteins of two sizes from a single gene may also arise via a differential splicing of the RNA or translation from different start sites of the same mRNA [38]. Several putative ATG start sites are found at the 5' region of the mRNA of which one theoretically may give rise to a 140 kDa protein containing N-terminal target sequences specific to the mitochondria, while the 160 kDa form localizes to the Golgi complex. Indeed, the N-terminal amphiphilic region contains putative mitochondrial targeting sequences [38] (and personal communication). Alternative mRNA splicing has been documented for ATP7B in the brain and to a lesser degree in the liver [39]. The normal and alternately spliced variants were expressed in HTB9 cells and produced 160 kDa and 140 kDa proteins respectively; the smaller protein localized to the cytoplasm rather than the Golgi apparatus.<sup>12</sup> Since the alternately spliced variant lacked exons 6,7 and 8 comprising the first three membrane spanning regions, it was suggested that a putative Golgi/ER retention signal might have been lost similar to that described for the membrane spanning region of both  $\beta$  1,4 galactosyltransferase and Menkes protein [28,40].

In conclusion, the present study confirms both the Golgi complex localization of the WD protein and the existence of a smaller form of the protein associated with the mitochondria-enriched fractions. We found no evidence for either a plasma membrane or

bile canalicular localization of the protein. Much of the current controversy might be resolved by clear immunoelectron microscopic examination of hepatocytes; such studies have to date been lacking possibly for technical reasons. Further studies are necessary to conclusively determine the organelle associated with the 140 kDa form, and the mechanism of its formation .

### **Acknowledgments:**

Grant support was provided by the Hospital for Sick Children Foundation, Toronto, Ontario, Canada

### **References**

1. Cuthbert, J.A. (1995) Wilson`s disease: a new gene and an animal model for an old disease. *J Invest Med* , **43**, 323-336.
2. Vulpe, C.D., Packman, S. (1995) Cellular copper transport *Annu Rev Nutr* , **15**, 293-322.
3. Harris, Z.L., Gitlin, J.D. (1996) Genetic and molecular basis for copper toxicity. *Am J Clin Nutr* , **63**, 836S-41S.
4. Sternlieb, I. (1980) Copper and the liver. *Gastroenterology*, **78**, 1615-1628.
5. Harris, E.D.(1991) Copper transport: an overview. *Soc Exp Biol Med*, 130-140.
6. Sato, M., Gitlin, J.D. (1991) Mechanisms of copper incorporation during the biosynthesis of ceruloplasmin. *J Biol Chem*, **266**, 5128-34.
7. Tereda, K., Kawarada, Y., Miura, N., Yasui, O., Koyama, K., Sugiyama, T. (1995) Copper incorporation into ceruloplasmin in rat livers. *Biochim Biophys Acta*, **1270**, 58-62.
8. Murata, M., Yamakawa, E., Iizuka, T., Kodama, H., Abe, T., Seki, Y., Kodama, M. (1995) Failure of copper incorporation into ceruloplasmin in the Golgi apparatus of LEC rat hepatocytes. *Biochim Biophys Res Commun*, **209**, 349-55.
9. Bull, P.C., Thomas, G.R., Rommens, J.M., Forbes J.R., Cox, D.W. (1993) The Wilson`s disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nature Genetics* , **5**, 327-337.

10. Hung, I.H., Suzuki, M., Yamaguchi, Y., Yuan, D.S., Klausner, R.D., Gitlin, J.D. (1997) Biochemical characterization of the Wilson's disease protein and functional expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **272**, 21461-21466.
11. Nagano, K., Nakamura, K., Urakami, K.I., Umeyama, K., Uchiyama, H., Koiwai, K., Hattori, S., Yamamoto, T., Matsuda, I., Endo, F. (1998) Intracellular distribution of the Wilson's disease gene product (ATPase7b) after in vitro and in vivo exogenous expression in hepatocytes from the LEC rat, an animal model of Wilson's disease. *Hepatology*, **27**, 799-807.
12. Yang, X.L., Miura, N., Kawarada, Y., Terada, K., Petrukhin, K., Gilliam, T.G., Sugiyama, T. (1997) Two forms of Wilson's disease protein produced by alternative splicing are localized in distinct cellular compartments. *Biochem J*, **326**, 897-902.
13. LaFontaine, S., Firth, S.D., Camaraskis, J., Englezou, A., Theophilos, M.B., Petris, M.J., Howie, M., Lockhart, P.J., Greenough, M., Brooks, H., Reddel, R.R., Mercer, J.F.B. (1998) Correction of the copper transport defect of Menkes patient fibroblasts by expression of the Menkes and Wilson ATPases. *J Biol Chem*, **273**, 31375-31380.
14. Dijkstra, M., In't Veld, G., Vandenberg, G.J., Muller, M., Kuipers, F., Vonk, R.J. (1995) Adenosine triphosphate-dependent copper transport in isolated rat liver plasma membranes. *J Clin Invest*, **95**, 412-416.
15. Adachi, Y., Okuyama, Y., Miya, H., Kamisako, T. (1997) Presence of ATP-dependent copper transport in the hepatocyte canalicular membrane of the Long Evans Cinnamon rat, an animal model of Wilson's disease. *J Hepatology*, **26**, 216-217.
16. Lutsenko, S., Cooper, M.J. (1998) Localization of the Wilson's disease protein product to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 6004-6009.
17. Tong, J.Z., Sarrazin, S., Cassio, D., Gauthier, F., Alvarez, F. (1994) Application of spheroid culture to human hepatocytes and maintenance of their differentiation. *Biol Cell*, **81**, 77-81.
18. Lowry, O.H., Roseborough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**, 265-75.

19. Crestiel, D., Ciccarelli, E., Soni, T., Alonso, M.A., Jacobs, P., Bollen, A., Alvarez, F. (1990) BiP expression is not increased by the accumulation of PiZ  $\alpha$ 1-antitrypsin in the endoplasmic reticulum. *Febs Lett*, **267**, 277-280.
20. Tong, J.Z., De Lagaresie, P., Furlan, V., Crestiel, D., Bernard, O., Alvarez, F. (1992) Long term culture of adult rat hepatocyte spheroids. *Exp Cell Res*, **200**, 326-332.
21. Yuan, D.S., Dancis, A., Klausner, R.D. (1997) Restriction of copper export in *Saccharomyces cerevisiae* to a late Golgi or post-Golgi compartment in the secretory pathway. *J Biol Chem*, **272**, 25787-25793.
22. Klomp, L.W., Lin, S.J., Yuan, D.S., Klausner, R.D., Culotta, V.C., Gitlin, J.D. (1997) Identification and functional expression of HAH1, a novel human gene involved in copper homeostasis. *J Biol Chem*, **272**, 9221-9226.
23. Yamaguchi, Y., Heiny, M., Suzuki, M., Gitlin, J.D. (1996) Biochemical characterization and intracellular localization of the Menkes disease protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 14030-14035.
24. Dierick, H.A., Adam, A.A., Escara-Wilke, J.F., Glover, T.W. (1997) Immunocytochemical localization of the Menkes copper transport protein (ATP7A) to the trans-Golgi network. *Human Mol Genet*, **6**, 409-416.
25. Payne, A.S., Gitlin, J.D. (1998) Functional expression of the Menkes disease protein reveals common biochemical mechanisms among the copper transporting P-type ATPases. *J Biol Chem*, **273**, 3765-3770.
26. Petris, M.J., Mercer, J.F.B., Culveno, J.G., Lockhart, P., Gleeson, P.A., Camarakis, J. (1996) Ligand-regulated transport of the Menkes copper P-type ATPase efflux pump from the Golgi apparatus to the plasma membrane: a novel mechanism of regulated trafficking. *Embo J*, **15**, 6084-6095.
27. Qi, M., Byers, P.H. (1998) Constitutive skipping of alternately spliced exon 10 in the ATP7A gene abolishes Golgi localization of the Menkes syndrome and produces the occipital horn syndrome. *Human Mol Genet*, **7**, 465-469.
28. Petris, M.J., Camarakis, J., Greenough, M., LaFontaine, S., Mercer, J.F.B. (1998) A c-terminal di-leucine is required for localization of the Menkes protein in the trans-Golgi network. *Hum Mol Genet*, **7**, 2063-2071.

29. Francis, M.J., Jones, E.E., Levy, E.R. (1998) A Golgi -localized signal identified in the Menkes gene. *Hum. Mol. Genet*, **7**, 1245-1252.
30. Terada, K., Nakako, T., Yang, X.L., Iida, M., Aiba, N., Minamiya, Y., Nakai, M., Sakaiki, T., Miura, N., Sugiyama, T. Restoration of holoceruloplasmin synthesis in LEC rat after infusion of recombinant adenovirus bearing WND cDNA. *J Biol Chem*, **273**, 1815-1820.
31. DiDonato, M., Sarkar, B. (1997) Copper transport and its alterations in Menkes and Wilson`s diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1360, 3-16.
32. Sternlieb, I., Quintana, N., Volenberg, I., Schilsky, M.L. (1995) An array of mitochondrial alterations in the hepatocytes of Long-Evans Cinnamon rats. *Hepatology*, **22**, 1782-1787.
33. Valentine, J.S., Gralla, E.B. (1997) Delivering copper inside yeast and human cells. *Science*, **278**, 817-818.
34. Glerum, D.M., Shtanko, A., Tzagoloff. (1996) Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. *J. Biol Chem*, **271**, 14504 -14509.
35. Schatz, G., Dobberstein, B. (1996) Common principles of protein translocation across membranes. *Science*, **272**, 1519-1526.
36. Chandra, N.C., Spiro, M.J., Spiro, R.G. (1998) Identification of a glycoprotein from rat liver mitochondrial inner membrane and demonstration of its origin in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **273**, 19715-19721.
37. Rusinol, A.E., Cui, Z., Chen, M.H., Vance, J.E. (1994) A unique mitochondria-associated membrane fraction from rat liver has a high capacity for lipid synthesis and contains pre-Golgi secretory proteins including nascent lipoproteins. *J. Biol Chem*, **269**, 27494-27502.
38. Claros, M.G., Vincens, P. (1996) Computational method to predict mitochondrial imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem*, **241**, 779-786.
39. Petruhkin, K., Lutsenko, S., Chernov, I. Ross, B.M., Kaplan, J.H., Gilliam, T.C. (1994) Characterization of the Wilson`s disease gene encoding a P-type copper

transporting ATPase: genomic organization, alternative splicing, and structure/function predictions. *Human Mol Genet*, **3**, 1647-1656.

40. Teasdale, R.D., D'Agostaro, G., Gleeson, P.A. (1992) The signal for Golgi retention of bovine  $\beta$ 1,4,-galactosyltransferase is in the transmembrane domain. *J Biol Chem*, **267**, 4084-4096.

## Legends

**Figure 1** Immunoprecipitation of Atp7b from HepG2 cells. Using anti-C-terminal antibody a 140 kDa band is observed.(c) With anti-N-terminal antibody a faint 160 kDa band (equivalent to the 165 kDa band of figures 3 and 5) is observed. No protein was immunoprecipitated by pre-immune sera.(b, d)

**Figure 2** Indirect immunofluorescence of HepG2 cells using primary antibodies recognizing: a) N-terminal ATP7B; b) C-terminal Atp7b; c) 58 kDa Golgi-associated protein; d)  $\alpha$ -mannosidase (Golgi); e) mitochondrial protein (primary biliary cirrhosis); f) cytochrome-c-oxidase (mitochondria). Anti-WD reactivity (a, b) is localized to the perinuclear region typical of the Golgi apparatus (c, d). In addition, a punctate, cytoplasmic distribution suggestive of mitochondrial staining is seen (e, f). Similarities between (b) and (f) are particularly striking.

**Figure 3** Immunoperoxidase staining of LE rat hepatocytes using anti-N terminal antibody. Perinuclear staining consistent with Golgi apparatus as well as punctate cytoplasmic staining is seen (arrow) , while no staining is observed at the bile canalicular membrane (arrowhead) nor the plasma membrane.

**Figure 4** Immunoblot of subcellular fractions of liver from normal LE rat using anti-N-terminal antibody. Lane 1, nuclei, heavy mitochondria unvesiculated; large sheets of subcellular membranes including Golgi stack. Lane 2, heavy mitochondrial fraction; Lane 3, mitochondria, lysosomes, peroxisomes and Golgi membranes; Lane 4, lysosomes and peroxisomes; Lane 5, microsomal (including Golgi) fraction. A 140 kDa protein is recognized mainly in fractions 1 and 2, enriched for mitochondria, as demonstrated using anti-cytochrome-c-oxidase (Cox) antibody. A 165 kDa protein was detected in lanes 4

and 5, the Golgi enriched fractions, as seen using antibody to 58 kDa Golgi-associated protein. The difference in distribution may be attributed to a trans-Golgi localization of WD protein and a more generalized Golgi distribution of 58 kDa protein.

**Figure 5** Indirect immunofluorescence of HepG2 cells using anti-N-terminal (a-c) and anti-C-terminal (d) antibodies. Cells were incubated with (a) 40  $\mu$ Mol ammonium tetrathiomolybdate; (b) 40  $\mu$ Mol  $\text{CuSO}_4$ ; (c, d) 200 $\mu$ Mol  $\text{CuSO}_4$ . Copper chelation reduces overall fluorescence with staining concentrated at the perinuclear region. Elevated copper concentrations results in more diffuse cytoplasmic staining using the N-terminal antibody; a punctate cytoplasmic distribution similar to mitochondrial staining is seen with the C-terminal antibody. (cf figures 4d and 1f)

**Figure 6** Subcellular fractions of liver from rats treated for 8 weeks copper acetate supplemented water. In comparison with normal controls (figure3) fraction 1 expresses the 165 kDa form preferentially to the 140 kDa form; expression of the 140 kDa form is markedly reduced. The relative abundance of the 165 kDa form is increased in all fractions containing Golgi proteins (lanes 3-5).



Figure 1

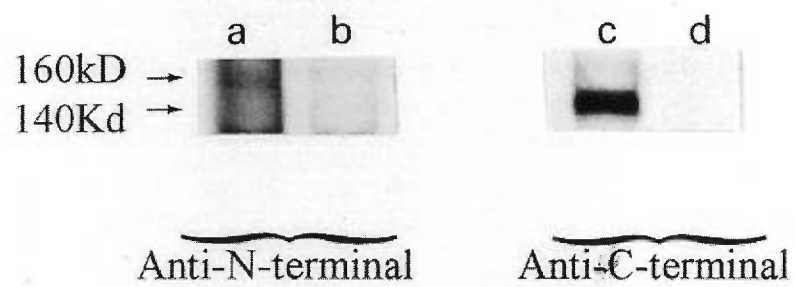
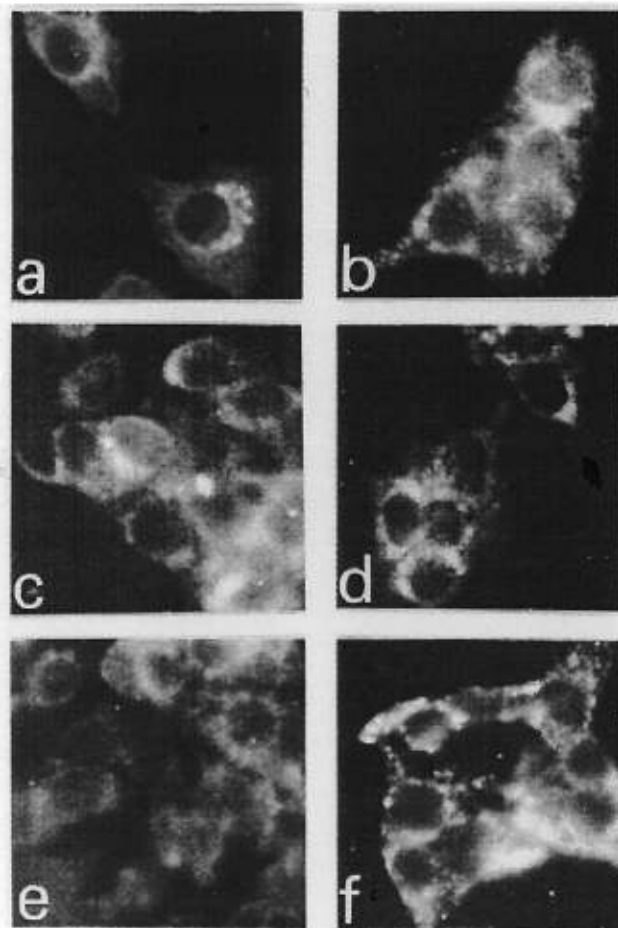
IMMUNOPRECIPITATION OF ATPase7b  
FROM HepG2 CELLS

Figure 2



**Figure 3**

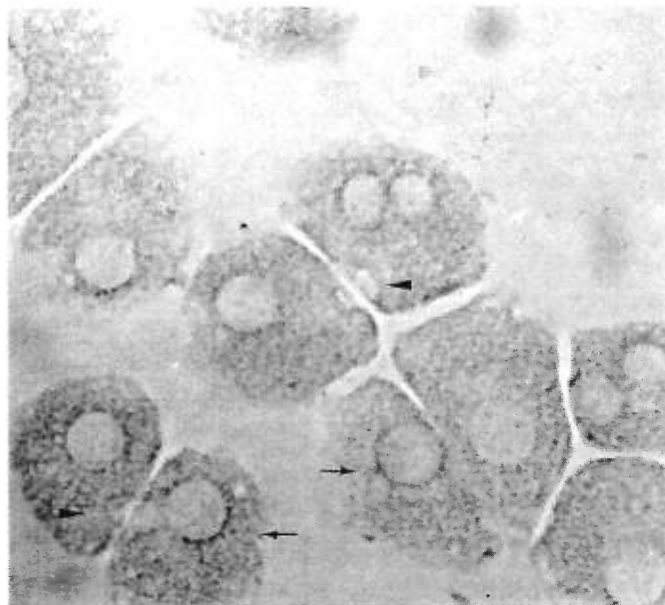


Figure 4

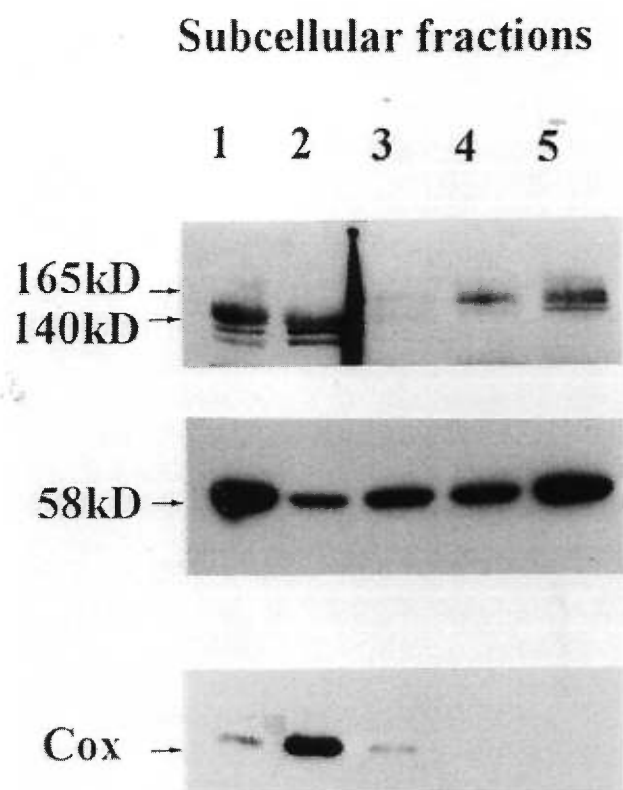


Figure 5

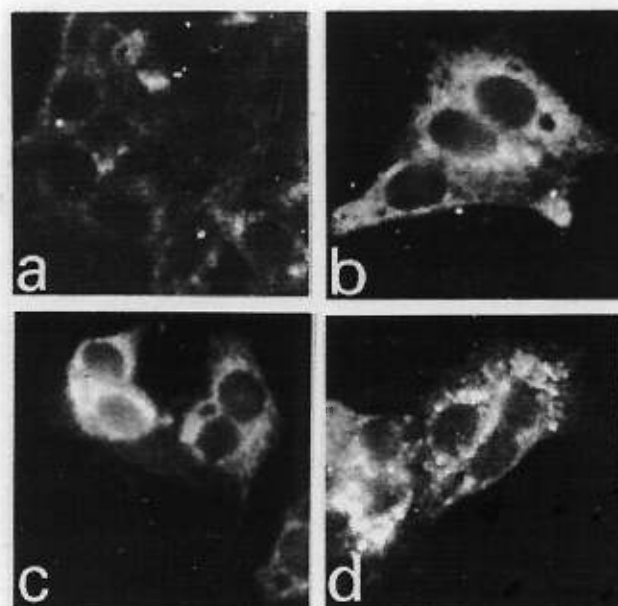
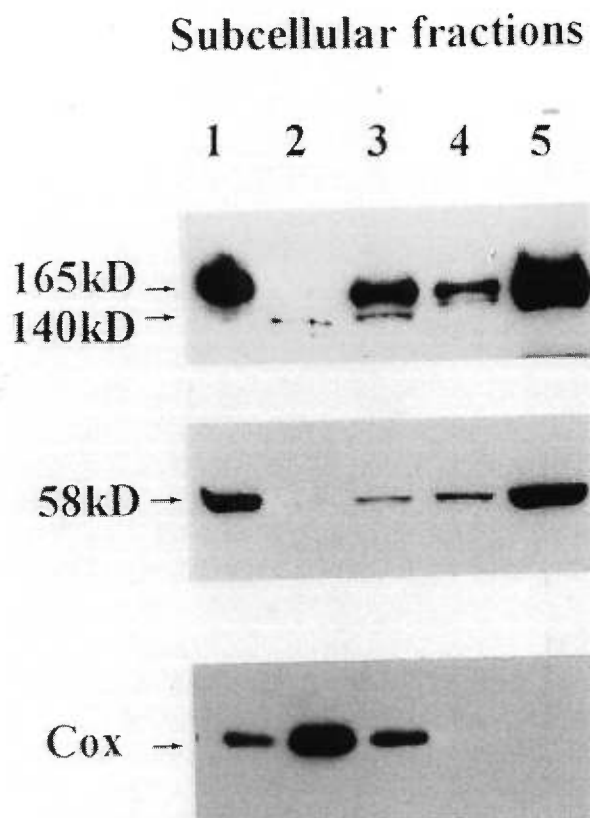


Figure 6



### 3. DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

La localisation de l'ATPase7b est controversée. La protéine a été localisée à différents endroits dans les cellules hépatiques: appareil de Golgi, mitochondries, membrane plasmique, canalicule biliaire et endosomes.

La détermination de la localisation intracellulaire de l'ATPase7b, devrait nous aider à élucider une partie du problème portant sur le transport du cuivre. De plus, la localisation de cette protéine pourrait expliquer les deux défauts observés chez les patients atteints de la maladie de Wilson, soit le manque d'incorporation du cuivre à la céruloplasmine et la diminution de l'excrétion du cuivre dans la bile.

L'immunoprécipitation de l'ATPase7b à l'aide de deux différents anticorps dirigés contre les régions N ou C-terminales de la protéine, montre qu'il existe deux formes de la protéine dans les cellules HepG2. L'anticorps contre la partie C-terminal immunoprécipite principalement une protéine de 140kD ainsi qu'une forme protéique mineure d'environ 160kD. Par contre, l'anticorps contre la région N-terminale immunoprécipite de façon prédominante une protéine de 160 kD et une petite quantité de la protéine de 140kD. Les deux formes de la protéine pourraient avoir des fonctions et des localisations différentes. La présence d'épissage alternatif dans l'ARN de l'ATPase7b supporte l'existence des deux formes de la protéine (74).

Nos résultats en immunofluorescence, sur les cellules HepG2, montrent avec l'anticorps N-terminal une localisation périnucléaire de la protéine qui ressemble au patron de fluorescence produit par l'anti-58kD et l'anti-alpha-mannosidase. Ces deux anticorps sont dirigés contre des protéines situées

dans l'appareil de Golgi. La localisation périnucléaire a également été montrée par plusieurs autres groupes (68,69,70). Puisque l'anticorps anti N-terminal immunoprécipite de façon prédominante une protéine de 160 kD et localise la protéine dans la région périnucléaire, nous supposons que cette forme de la protéine se retrouve principalement dans l'appareil de Golgi. L'emplacement de la protéine à cet endroit est en accord avec le rôle de l'ATPase7b dans l'incorporation du cuivre à la céruloplasmine nouvellement synthétisée. En effet, il a été montré que la céruloplasmine est présente dans les fractions cellulaires de foie enrichies en appareils de Golgi (79). De plus, l'incorporation du cuivre à la céruloplasmine dans l'appareil de Golgi et le transport subséquent du complexe cuivre-céruloplasmine hors de la cellule exclut le cuivre des étapes de la voie sécrétoire antérieures à l'appareil de Golgi. L'exclusion du cuivre du réticulum endoplasmique permet à la cellule de préserver son potentiel redox pour la formation des ponts disulfure et le repliement des polypeptides naissants dans cet organelle.

Avec l'anticorps dirigé contre la partie C-terminale de la protéine, nous avons observé en plus de la distribution périnucléaire, une fluorescence cytoplasmique dispersée et pointillée. Cette distribution ressemble à celle produite par des anticorps anti-mitochondries tel l'anti-cytochrome-c-oxidase et ceux provenant de patients atteints de cirrhose biliaire primitive. La forme de 140kD immunoprécipitée par l'anticorps anti C-terminal pourrait possiblement être localisée dans les mitochondries. Un double marquage en immunofluorescence serait nécessaire pour montrer que l'anticorps anti C-terminal est les anticorps anti mitochondries génèrent une distribution identique. Il est possible de vérifier que la forme de 140kD soit ciblée vers les mitochondries contrairement à la forme de 160kD. En partant de l'hypothèse que les deux formes de la protéine proviennent de l'épissage



alternatif dans le gène de l'ATPase7b, il faudra montrer l'existence de deux ARNm de tailles différentes par Northern blot ou par PCR (polymerase chain reaction). La transcription et traduction *in vitro* seront ensuite utiles pour déterminer si les deux ARNm donnent naissance à des protéines distinctes de 140 et 160kD. De plus, la traduction *in vitro* avec des microsomes canins ou des mitochondries de rats permettra également de déterminer quelle forme prédominante est associée à chaque type membranaire.

Les résultats obtenus par sous-fractionnement de foie de rats normaux confirment les données obtenues en immunofluorescence. L'anticorps dirigé contre la région N-terminale détecte une protéine de 140kD dans la fraction nucléaire et celle enrichie en mitochondries lourdes (fraction 1 et 2). Cet anticorps reconnaît également une protéine de 160kD dans les fractions de densité moins élevées correspondant aux vésicules de réticulum endoplasmique, les endosomes, les membranes de l'appareil de Golgi, ainsi que les membranes plasmiques (fraction 4 et 5). Aucun signal n'a été détecté dans les fractions enrichies en peroxysomes et lysosomes. L'anticorps anti C-terminal montre un patron similaire à l'anticorps dirigé contre la région N-terminale, il reconnaît les protéines dans les mêmes fractions. Cependant, la protéine de 140kD est la forme principale reconnue par cet anticorps tandis que le signal de la protéine de 160kD dans la fraction enrichie en microsomes (fraction 5) est extrêmement faible. Pourquoi les deux types d'anticorps semblent reconnaître des formes différentes de la protéine doit être élucidé. Nous pouvons supposer qu'il se produit une modification de la topologie de la protéine suite à plusieurs événements tels la liaison du cuivre, la dégradation, un changement dans le repliement de la protéine ou une altération dans l'insertion de la protéine aux membranes de différents organelles. Ces différents phénomènes provoqueraient une modification des

épitopes exposés et reconnus par les anticorps. L'utilisation d'anticorps dirigés contre la partie N ou C terminale de la protéine a probablement joué un rôle dans la controverse sur la localisation de l'ATPase7b.

La forme protéique de 140kD peut provenir de la disparition du signal peptide de la protéine de 160kD. En effet, Lutsenko et collaborateurs ont suggéré que la protéine de 140kD provient d'une modification post-traductionnelle (70). Un fragment d'environ 15kD serait coupé à l'extrémité N-terminale de la protéine de 160kD. Cependant, en Western blot avec l'anticorps dirigé contre la partie N-terminale, nous n'avons pu détecter la présence d'une protéine de 15kD. Ceci suggère qu'il est peu probable que la protéine de 140kD représente une modification post-traductionnelle. De plus, lors de travaux antérieurs, nous avons utilisé la transcription et la traduction *in vitro* afin de vérifier la spécificité de nos anticorps. Nous avons systématiquement obtenu trois protéines de différentes tailles dans des conditions où la dégradation de la protéine est peu probable. L'examen de l'extrémité 5' de l'ARNm révèle qu'il existe plusieurs codons de départ (ATG) qui précèdent la séquence hydrophobique caractéristique du signal peptide. Un de ces ATG peut donner naissance à une protéine de 140kD qui contient une séquence potentiellement active pour cibler la protéine vers les mitochondries. L'épissage alternatif pourrait également être responsable pour les différentes formes de la protéine. Le groupe de Lutsenko n'a pu détecter d'évidence d'épissage alternatif dans l'exon 2 et 7, situés dans la partie N-terminale, de l'ATPase7b chez les cellules HepG2. Cependant, il a déjà été montré par RT-PCR qu'il existe de l'épissage alternatif dans la partie 5' (entre les exons 5 et 9) de l'ARNm de l'ATPase7b au niveau du foie (74). D'autre part, nos résultats préliminaires en Northern blot avec des cellules HepG2 résistantes à 200 $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> montrent l'existence de deux ARNm de

tailles différentes (résultats non publiés). Il a été suggéré que l'épissage alternatif pourrait représenter un mécanisme de régulation de la quantité de protéines fonctionnellement actives. Ce phénomène pourrait également donner naissance à des protéines qui ont des tailles et des fonctions distinctes.

Plusieurs arguments peuvent supporter la présence de l'ATPase7b dans la membrane mitochondriale. Premièrement le cuivre est requis comme co-facteur pour plusieurs enzymes mitochondriales tel le cytochrome-c-oxydase ainsi que les enzymes impliquées dans la synthèse des protoporphyrines et des hèmes (3). Deuxièmement, les homologues bactériens de l'ATPase7b sont localisés dans les membranes cellulaires fonctionnant d'une manière similaire aux membranes mitochondriales (16). Troisièmement, en condition de surcharge de cuivre ou chez les rats et les patients atteints de la maladie de Wilson, des altérations morphologiques des mitochondries sont fréquentes (80). Le quatrième argument est relié aux protéines chaperonnes. Ces dernières sont impliquées dans le transport du cuivre chez la levure. Atx 1, Lys 7 et Cox 17 participent au transfert du cuivre de Ctr 1, un transporteur membranaire à haute affinité, vers un compartiment du post-Golgi, à la Cu-Zn SOD et vers les mitochondries respectivement (81). La protéine Cox17 amène le cuivre à une protéine inconnue qui serait située dans la membrane des mitochondries. Cette dernière protéine transporterait à son tour le cuivre vers le cytochrome-c-oxydase. Des homologues humains ont été décrits pour chaque protéine chaperonne identifiées chez la levure (20,22,25,26). Il existe une grande similarité de structure et de motif des acides aminés entre les domaines de liaison du cuivre de Cox 17 et de l'ATPase7b. Nous pouvons donc spéculer que l'ATPase7b joue le rôle de la protéine membranaire mitochondriale, non encore identifiée, qui accepte le cuivre de la protéine chaperonne (81).

Comment une protéine membranaire qui est synthétisée dans le réticulum endoplasmique peut se retrouver dans les mitochondries? L'épissage alternatif de l'ARNm de l'ATPase pourrait causer la perte d'exons qui codent pour des régions transmembranaires de la protéine très importantes. Ces dernières seraient nécessaires pour l'intégration de la protéine dans les membranes. Il a été suggéré que la protéine de 140kD aurait perdu un signal de rétention qui garde la protéine dans le réticulum endoplasmique et/ou l'appareil de Golgi, similaire à ce qui a été décrit pour la  $\beta$  1,4 galactosyltransferase (82). La séquence protéique de l'ATPase7b a été analysée par un programme informatique prédisant si une protéine peut être mitochondriale ou non (Manuel G. Claros, Espagne). L'analyse montre qu'il y a une très courte région amphiphile en N-terminal de la protéine qui pourrait potentiellement servir de séquence pour cibler la protéine aux mitochondries. Les protéines mitochondriales sont généralement synthétisées dans les mitochondries ou dans le cytosol. Dans ce dernier cas, elles sont alors insérées dans la membrane mitochondriale par une translocation co-translationnelle ou post-translationnelle. Cependant, la littérature montre qu'il existe des protéines qui sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique et qui se retrouvent aux mitochondries sans passer par le cytosol (83,84). Ces protéines seraient transférées directement du réticulum endoplasmique vers les mitochondries via une région du réticulum endoplasmique qui est en contact avec les membranes mitochondriales. Le pont formé entre les deux organelles fonctionneraient comme un compartiment pré-Golgi de la voie sécrétoire et n'impliquerait pas de facteurs cytosoliques (83,84).

Les hépatocytes de rat sont un bon modèle pour la localisation de la protéine. Ces derniers ne sont pas des cellules cancéreuses et peuvent acquérir une

polarité lorsqu'ils sont en culture et ainsi former des canalicules biliaires. L'immunofluorescence et l'immunoperoxydase sur des hépatocytes de rats LE normaux, avec les anticorps dirigés contre les parties N ou C terminales, montrent une distribution périnucléaire et une certaine réactivité cytoplasmique de la protéine. En utilisant ces 2 mêmes techniques, aucun signal n'a été détecté dans le canalicule biliaire et la membrane plasmique des hépatocytes de rat. Cependant, Schaeffer et collaborateurs ont observé par immunohistochimie sur des coupes de foie humain normaux, la présence de l'ATPase7b au niveau des membranes adjacentes entre les hépatocytes, ce qui leur fait suggérer que la protéine pourrait être localisée dans le canalicule biliaire (85). Par double marquage en immunofluorescence avec un anticorps localisant une glycoprotéine située dans la membrane canaliculaire et un anticorps anti ATPase7b, ils ont également tenté de montrer que l'ATPase7b était présente dans la membrane canaliculaire. Les images présentées sont difficiles à interpréter et il n'y a pas de colocalisation évidente des 2 protéines (85). Un autre groupe a aussi observé, par un double marquage en immunofluorescence sur des coupes de foie de rats surchargés en cuivre, la présence de la protéine concentrée près du canalicule biliaire de la membrane plasmique des hépatocytes (73). Les études de Dijkstra et collaborateurs (38,39), montrent également la présence d'une protéine transportant le cuivre dans la membrane canaliculaire (apicale). Lors de leurs expérimentations, ils ont isolé différents organelles ainsi que des vésicules de la membrane basolatérale et canaliculaire. Ils ont ensuite mesuré l'incorporation du cuivre à ces différentes vésicules et montré que l'incorporation observée nécessitait l'ATP. Leurs résultats proviennent donc d'une méthode indirecte. Ils n'ont fourni aucune preuve que la protéine qui transportait le cuivre était bien l'ATPase7b et non une autre protéine utilisant l'ATP comme source d'énergie. L'enrichissement des différentes membranes

plasmiques étaient plus ou moins pures, il est possible qu'une autre ATPase ait été impliquée dans le transport de cuivre observé. Plusieurs données peuvent appuyer le fait que l'ATPase7b ne soit pas située dans le canalicule biliaire comme l'a suggéré Dijkstra. Un transport du cuivre nécessitant l'ATP a été observé dans des vésicules de la membrane canaliculaire des rats LEC (40). Ceci suppose que le transport observé par Dijkstra n'est pas causé par l'ATPase7b. De plus, un transport du cuivre n'utilisant pas l'ATP et 10 fois plus actif que l'ATPase7b a récemment été observé dans la membrane plasmique des hépatocytes de rats (67). Il a également été observé dans notre laboratoire que l'excrétion basale du cuivre dans la bile n'est diminué que très légèrement chez les rats LEC par rapport aux rats LE (Long Evans) normaux (résultats non publiés).

Le groupe de Nagano a montré la présence de l'ATPase7b dans la membrane plasmique des hépatocytes de rats LEC transfectés avec le gène de la protéine (71). Cependant, les travaux d'immunofluorescence effectués sur des hépatocytes de rats LE normaux n'ont pas permis de confirmer ce résultat puisque la protéine n'a pas été détectée dans la membrane plasmique. Il manque à l'étude du groupe de Nagano des images convaincantes en immunofluorescence et par microscopie électronique du marquage de la membrane plasmique des cellules. En effet, il n'y a pratiquement pas de différences entre les images où ils montrent que la protéine est située dans la membrane plasmique ou dans la région périnucléaire. De plus, il est possible d'argumenter que la localisation dans la membrane plasmique a été trouvée chez des hépatocytes de rats LEC transfectés avec le gène de l'ATPase7b suggérant qu'il y a une surexpression de la protéine. Cette surexpression peut résulter en un mouvement de la protéine de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique dû à un mécanisme de transport défectueux causé par la

trop grande quantité de protéines. De plus, les hépatocytes de rats LEC sont naturellement surchargés en cuivre de par leur défaut génétique. Il est possible que le contenu en cuivre de ces cellules ait altéré la localisation de la protéine.

La relocalisation de la protéine a été vérifiée, *in vitro*, en mettant les cellules HepG2 en présence de sulfate de cuivre ou d'un chélateur de cuivre. Nos observations montrent que la présence d'une grande quantité de sulfate de cuivre dans le milieu résulte en une augmentation de la fluorescence et un éparpillement de celle-ci à travers le cytoplasme. Nos données suggèrent qu'il y aurait un mouvement de la protéine de l'appareil de Golgi vers des structures vésiculaires qui sont possiblement des mitochondries. Aucun marquage de la membrane plasmique n'a été observé chez ces cellules. Ces observations sont en accord avec celles du groupe de J. Gitlin où il montrait que la protéine se relocalisait dans des compartiments vésiculaires lorsque les cellules étaient mises en présence d'une grande quantité de cuivre (68). Ces compartiments vésiculaires inconnus étaient possiblement les mitochondries. Nous avons également observé chez les cellules HepG2 que suite à la chélation intracellulaire du cuivre avec l'ammonium tetrathiomolybdate (TTM), la fluorescence est réduite laissant seulement une localisation périméridienne de la protéine. La distribution mitochondriale est beaucoup moins évidente lorsque les cellules sont exposées à un chélateur de cuivre. Il existe d'autres protéines dont la localisation change en réponse à un stimulus. Entre autre la protéine Glut4, un transporteur de glucose, qui change sa localisation dans la cellule du trans-Golgi à la membrane plasmique en réponse à l'insuline (86). D'autres protéines telles la furine et la TGN38, qui ont un signal de rétention dans la troisième région transmembranaire ou dans la partie C-terminale de leurs acides aminés, sont aussi connues pour être

recyclées de la membrane plasmique au trans-Golgi (75-78). Le mouvement de l'ATPase7b induit par le cuivre est différent de celui observé pour l'ATPase7a chez les cellules CHO résistantes au cuivre. Chez ces cellules, le cuivre induit la relocalisation de la protéine de Menkes du trans-Golgi à la membrane plasmique (4). Le signal sur la membrane plasmique est détecté seulement chez les cellules exprimant de 10 à 70 fois plus de protéines par rapport aux cellules normales. Il est possible que la localisation sur la membrane plasmique soit causée par la surexpression de la protéine et que ceci provoque un mouvement en masse de la protéine vers un endroit alternatif dans la cellule. Ce phénomène a déjà été observé pour d'autres protéines où un signal de tri utilise une voie saturée pour parvenir à localiser la protéine (87). Cependant, l'immunofluorescence effectuée sur des cellules HepG2 résistantes de 200 jusqu'à 400 $\mu$ M sulfate de cuivre montre une localisation de l'ATPase7b dans des vésicules possiblement mitochondriales encore plus prononcée que chez les mêmes cellules simplement incubées avec le cuivre pour une courte période de temps (résultats non publiés) .

Il est difficile d'observer la relocalisation de la protéine chez les hépatocytes en culture. Ces derniers sont très fragiles et ne supportent pas la présence de cuivre même en très faible quantité. Il est donc difficile de vérifier si l'ATPase7b change sa localisation périnucléaire pour la membrane plasmique ou le canalicule biliaire. Nous pouvons supposer que le métabolisme des hépatocytes en culture diffère probablement des conditions *in vivo* et que cette différence puisse affecter la localisation de la protéine. Pour cette raison, du sous-fractionnement cellulaire de foie de rats LE surchargés par une diète riche en cuivre a été effectué. Le sous-fractionnement peut nous renseigner sur la localisation de l'ATPase7b et sur la redistribution de la protéine *in vivo*. La surcharge en cuivre des foies de



rats normaux change la forme de la protéine associée à la fraction enrichie en mitochondries (fraction 2). La forme protéique majeure associée à cette fraction est celle de 160kD et non de 140kD contrairement au sous-fractionnement de foie de rats normaux. De plus, l'expression de la protéine de 160kD semble augmentée, spécialement dans la fraction enrichie pour l'appareil de Golgi. Le cuivre semble induire l'expression de la protéine de 160kD dans la fraction enrichie en appareil de Golgi et diminuer l'expression mitochondriale de la protéine de 140kD. Ceci semble contradictoire avec les données obtenues en immunofluorescence chez les cellules HepG2 surchargées en cuivre. Chez ces cellules, il est possible d'observer un éparpillement de la fluorescence, de l'appareil de Golgi vers possiblement les mitochondries, beaucoup plus prononcé avec l'anticorps C-terminal, qui immunoprécipite la forme protéique de 140kD. Nous pouvons supposer que l'augmentation de l'expression de la protéine de 160kD dans la fraction enrichie pour l'appareil de Golgi, chez les rats surchargés en cuivre, soit causée par la présence de la protéine dans des vésicules d'exocytose qui sédimenteraient dans la même fraction que l'appareil de Golgi. La quantité de cuivre qui augmente dans la cellule provoquerait l'augmentation de la présence de la protéine dans les vésicules d'exocytose afin d'éliminer le cuivre de la cellule.

Chez les mammifères, le cytoplasme des hépatocytes est l'endroit principal où a lieu l'entreposage de cuivre et la sécrétion biliaire est le seul mécanisme d'excrétion du cuivre (50). La concentration de cuivre dans les cellules serait le premier déterminant du mouvement de l'ATPase7b de l'appareil de Golgi vers un compartiment cellulaire. Ce compartiment est probablement nécessaire pour la protection de la cellule contre la toxicité du cuivre ainsi que pour la séquestration de cet ion avant son exocytose. Nous pouvons

spéculer que certaines mutations dans la protéine perturberaient le mouvement de l'ATPase plutôt que sa fonction *per se*. Ceci a déjà été observé pour le CFTR (régulateur transmembranaire de la fibrose kystique) (88).

Le mouvement de la protéine provoqué par une grande quantité de cuivre est probablement un mécanisme essentiel pour conserver l'homéostasie de ce métal dans la cellule. Il se pourrait que le cuivre soit directement impliqué dans le processus de relocalisation de la protéine. Une des hypothèses avancée pour expliquer le changement de localisation de la protéine est le changement de conformation du domaine N-terminal. Ce domaine est celui qui lie le cuivre. Par contre, il ne servirait pas seulement à lier le cuivre mais il agirait également comme une sonde (89). A basse concentration, le cuivre est transporté normalement mais lorsque la concentration augmente, la liaison d'atomes de cuivre additionnel pourrait amener un changement conformationnel dans le domaine N-terminal ce qui permettrait le mouvement de la protéine. Il serait également possible que le cuivre plutôt que d'être directement impliqué dans la relocalisation de la protéine serve de médiateur à un événement subséquent telle la phosphorylation. Ceci serait ensuite interprété comme un signal pour le mouvement de la protéine. La phosphorylation qui provoque la relocalisation de la protéine a, entre autre, été observée pour le récepteur mannose 6-phosphate et le Glut4 (90,91). Dans ces deux cas, le mouvement de la protéine est prédit partiellement par des signaux dans des domaines cytoplasmiques en C-terminal de la protéine. Les signaux importants pour la localisation intracellulaire des protéines de membranes ont été identifiés dans les domaines extracellulaires, les domaines transmembranaires et les régions cytoplasmiques. La troisième région transmembranaire de la protéine de Menkes semble nécessaire pour

conserver la protéine dans l'appareil de Golgi (92). Puisque l'ATPase7a est une protéine recyclée de la membrane plasmique à l'appareil de Golgi selon la quantité de cuivre, un second mécanisme est nécessaire pour récupérer les protéines de la surface cellulaire. Un motif di-leucine en C-terminal de la protéine servirait de signal pour la récupération des protéines. Le signal agirait en regroupant les protéines à la surface cellulaire dans des vésicules enveloppées de clathrines avant l'endocytose. Les vésicules délivreraient ensuite les protéines dans des compartiments endosomaux qui vont les diriger vers l'appareil de Golgi. Lorsque le motif di-leucine est muté il y a une augmentation de la quantité de protéines présentes sur la membrane plasmique (93). Par conséquent, les di-leucines seraient également impliquées dans la rétention de la protéine de Menkes dans l'appareil de Golgi (93). L'ATPase7b possède 3 leucines consécutives correspondant aux mêmes positions que celles observées pour l'ATPase7a. Il est possible que ces leucines retiennent l'ATPase7b dans l'appareil de Golgi par un mécanisme similaire à celui utilisé par la protéine de Menkes. Des travaux récents ont aussi montré que l'histidine en position 1069, de l'ATPase7b, a un rôle critique pour la localisation de la protéine. Si cet acide aminé est muté la protéine se situe dans le réticulum endoplasmique plutôt que dans l'appareil de Golgi (94). L'histidine 1069 fait partie d'un motif SEHPL (sérine, acide glutamique, histidine, proline, leucine) conservé à travers toutes les ATPases transportant le cuivre (74). Le motif est localisé entre le site de phosphorylation et le domaine de liaison de l'ATP. Aucune fonction spécifique n'a encore été attribuée à cette région. Selon les études effectuées sur la sodium, potassium et calcium ATPase, il est possible de spéculer que le changement de conformation dans la région du motif SEHPL soit essentiel pour la liaison du cuivre qui stimulera la phosphorylation de la protéine (95-99).

Nous pouvons conclure que les deux types d'anticorps reconnaissent des formes différentes de l'ATPase7b. Une forme de 160kD a été détectée, par l'anticorps dirigé contre la région N-terminale, dans l'appareil de Golgi des cellules HepG2 et des hépatocytes de rats normaux. Avec l'anticorps C-terminal, une protéine de 140kD a été découverte dans une structure ressemblant aux mitochondries. Avec ces deux anticorps, aucun marquage de la membrane plasmique ou du canalicule biliaire n'a été observé chez les hépatocytes de rats normaux. Il faut donc revoir l'hypothèse de départ où nous proposons que la protéine défectueuse était située dans la membrane canaliculaire et que ceci provoquait la diminution de l'excrétion du cuivre dans la bile. Le cuivre dans la bile n'est pas sous sa forme libre, il est plutôt lié à différentes protéines encore mal caractérisées. On peut supposer que le manque d'excrétion du cuivre dans la bile vient du fait que celui-ci ne serait pas incorporé aux protéines qui l'amènent dans la bile. L'incorporation du cuivre à ces protéines se fait probablement au niveau de l'appareil de Golgi. La protéine serait donc localisée principalement à cet endroit qui serait le point central du métabolisme du cuivre dans la cellule

Nos données confirment donc que la protéine est localisée dans l'appareil de Golgi et dans une structure vésiculaire qui ressemble aux mitochondries. La protéine n'a pas été détectée dans le canalicule biliaire des hépatocytes ou dans la membrane plasmique. De la microscopie électronique sur des hépatocytes de rats normaux et LEC serait essentielle pour confirmer la localisation des 2 formes de la protéine. D'autres études seront également nécessaires pour établir le mécanisme de la formation de la protéine de 140kD et montrer comment et pourquoi la forme protéique de 140kD est ciblée de façon préférentielle vers des structures mitochondriales.

#### 4. SOURCES DOCUMENTAIRES

1. **Mason K.E.**, A Conspectus of Research on Copper Metabolism and Requirements of Man. J. Nutr., 109, 1979-2066, 1979.
2. **Danks D.M.**, Copper Deficiency in Humans. Annu. Rev. Nutr., 8, 235-257, 1988.
3. **Didonato M., Sarkar B.**, Copper Transport and its Alteration in Menkes and Wilson Disease. Biochim. Biophys. Acta, 1360, 3-16, 1997.
4. **Petris M.J., Mercer J.F.B., Culvenor J.G., Lockhart M.G., Gleeson P.A., Camakaris J.**, Ligand-Regulated Transport of the Menkes Copper P-Type ATPase Efflux Pump from the Golgi Apparatus to the Plasma Membrane: a Novel Mecanism of Regulated Trafficking. Embo J., 15, 6084-6095, 1996.
5. **Bull P.C., Thomas G.R., Rommens J.M., Forbes J.R., Cox D.W.**, The Wilson Disease Gene is a Putative Copper Transporting P-Type ATPase Similar to the Menkes Disease Gene. Nat. Gen., 5, 327-337, 1993.
6. **Linder M.C., Hazey-Azam M.**, Copper Biochemistry and Molecular Biology. Am. J. Clin. Nutr., 63, 797S-811S, 1996.
7. **Cousin R.J.**, Absorption, Transport and Metabolism of Copper and Zinc: Special Reference to Metallothionein and Ceruloplasmin. Physiol. Rev., 65, 238-309, 1985.
8. **Harris E.D.**, Copper Transport an Overview. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 196, 130-140, 1991.
9. **Dixon J.W., Sarkar B.**, Isolation, Amino Acids Sequence and Copper (II)-Binding Properties of Peptide (1-24) of Dog Serum Albumin. J. Biol. Chem., 249, 5872-5877, 1974.
10. **Ettinger M.J., Darwish H.M., Schmitt R.C.**, Mechanism of Copper Transport from Plasma to Hepatocytes. Fed. Proc., 45, 2800-2804, 1986.

11. **Vargas E.J., Shoho A.R., Linder M.C.**, Interactions of Copper Transport in the Nagase Analbuminemic rat. Am. J. Physiol., 267, G259-G269, 1994.
12. **Reed R.G., Burrington C.M.**, The Albumin Receptor Effect may be due to a Surface-Induced Conformational Change in Albumin. J. Biol. Chem., 264, 9867-9872, 1989.
13. **Lau S.-J., Sarkar B.**, Ternary Co-ordination Complex between Human Serum Albumin, Copper (II), and L-Histidin. J. Biol. Chem., 246, 5938-5943, 1971.
14. **Darwish H.M., Cheney J.C., Schmitt R.C., Ettinger M.J.**, Mobilization of copper (II) from Plasma Components and Mechanisms of Hepatic Copper Transport. Am. J. Physiol., 246, G72-G79, 1984.
15. **McArdle H.J., Gross S.M., Danks D.M.**, Uptake of Copper by Mouse Hepatocytes. J. Cell. Physiol., 136, 373-378, 1988.
16. **Vulpe C., Packman S.**, Cellular Copper Transport. Annu. Rev. Nutr., 15, 293-322, 1995.
17. **Dancis A., Haile D., Yuan D.S., Klausner R.D.**, The *Saccharomyces cerevisiae* Copper Transport Protein (Ctr1p). Biochemical Characterization, Regulation by Copper, and Physiologic Role in Copper Uptake. J. Biol. Chem., 269, 25660-25667, 1994.
18. **Zhou B., Gitschier J.**, hCTR1: a Human Gene for Copper Uptake Identified by Complementation in Yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 7481-7486, 1997.
19. **Lin S.J., Pufahl R.A., Dancis A., O'Halloran T.V., Culotta V.C.**, A Role for the *Saccharomyces cerevisiae* ATX1 Gene in Copper Trafficking and Iron Transport. J. Biol. Chem., 272, 9215-9220, 1997.
20. **Glerum D.M., Shtanko A., Tzagoloff A.**, Characterization of COX17, a Yeast Gene involved in Copper Metabolism and Assembly of Cytochrome Oxidase. J. Biol. Chem., 271, 14 504-14 509, 1996.
21. **Pufahl R.A., Singer C.P., Pearisa K.L., Lin S.J., Schmidt P.J., Fahrni C.J., Culotta V.C., Penner-Hahn J.E., O'Halloran T.V.**

- Metal Ion Chaperone Function of the Soluble Cu(I) Receptor Atx1. Science, 278, 853-856, 1997.
22. **Culotta V.C., Klomp L.W., Strain J., Casareno R.L., Krems B., Gitlin J.D.**, The Copper Chaperone for Superoxide Dismutase. J. Biol. Chem., 272, 23469-23472, 1997.
  23. **Sternlieb I.**, Copper and the Liver. Gastroenterology, 78, 1615-1628, 1980.
  24. **Cox D.W.**, Genes of the Copper Pathway. Am. J. Hum. Genet., 56, 828-834, 1995.
  25. **Klomp L.W., Lin S.J., Yuan D.S., Klausner R.D., Culotta V.C., Gitlin J.D.**, Identification and Functional expression of HAH1, a Novel Human Gene Involved in Copper Homeostasis. J. Biol. Chem., 272, 9221-9226, 1997.
  26. **Amaravadi R., Glerum D.M., Tzafoloff A.**, Isolation of a cDNA Encoding the Human Homolog of COX17, a Yeast Gene Essential for Mitochondrial Copper Recruitment. Hum. Genet., 99, 329-333, 1997.
  27. **Messerschmidt A., Huber R.**, The Blue Oxidase, Laccase and Ceruloplasmin. Modeling and Structural Relationships. Eur. J. Biochem., 187, 341-352, 1990.
  28. **Orena S.J., Goode C.A., Linder M.C.**, Binding and Uptake of Copper from Ceruloplasmin. Biochem. Biophys. Res. Commun., 132, 822-829, 1986.
  29. **Winge D.R., Mehra R.K.**, Host Defenses against Copper Toxicity. International Review of Experimental Pathology, 31, 47-83, 1990.
  30. **Gross J.B., Myers B.M., Kost L.J., Kuntz S.M., LaRusso N.F.**, Biliary Copper Excretion by Hepatocyte Lysosomes in the Rat. J. Clin. Invest., 83, 30-39, 1989.
  31. **Schilsky M.L., Stockert R.J., Sternlieb I.**, Pleotropic Effect of LEC Mutation: a Rodent Model for Wilson's Disease. Am. J. Physiol., 266, G907-G913, 1994.

32. **Sternlieb I., Van der Hamer C. J.A., Morell A.G., Alpert S., Gregoriadis G., Scheinberg I.H.**, Lysosomal Defects of Hepatic Copper Excretion in Wilson's Disease (Hepatolenticular Degeneration). Gastroenterology, 64, 99-105, 1973.
33. **Houwen R., Dijkstra M., Kuipers F., Smit E.P., Havinga R. Vonk R.J.**, Two Pathways for Biliary Copper Excretion in the Rat: The Role of Glutathione. Biochem. Pharmacol., 39, 1039-1044, 1990.
34. **Ballatori N., Clarkson T.W.**, Biliary Secretion of Glutathione and Glutathione-metal Complexes. Fundam. Appl. Toxicol., 5, 816-831, 1985.
35. **Alexander J., Aseth J.**, Biliary excretion of Cu and Zn in the Rat as Influenced by Diethylmaleate, Selenite and Diethyldithiocarbonate. Biochem Pharmacol., 29, 2129-2133, 1980.
36. **Arias I.M., Che M., Gatmaitan Z., Leveille C., Nishida T., St- Pierre M.**, The Biology of the Bile Canaliculus. Hepatology, 17, 318-329, 1993.
37. **Fernandez-Checa J.C., Takikawa H., Harie T., Ookhtens M., Kaplowitz N.**, Canalicular Transport of Reduced Glutathione in Normal and Mutant Eisai Hyperbilirubinemic Rats. J. Biol. Chem., 267, 1667-1673, 1992.
38. **Dijkstra M., In't Veld G., Van der Berg G.J., Müller M., Kuipers F., Vonk R.**, Adenosine Triphosphate-Dependent Copper Transport in Isolated Rat Liver Plasma Membranes. J. Clin. Invest., 95, 412-416, 1995.
39. **Dijkstra M., Van der Berg G.J., Wolters H., In't Veld G., Sloof M.J.H., Heymans H.S.A., Kuipers F., Vonk R.J.**, Adenosine Triphosphate-Dependent Copper Transport in Human Liver. J. of Hepatology, 25, 37-42, 1996.
40. **Adachi Y., Okuyama Y., Miya H., Kamasako T.**, Presence of ATP Dependent Copper Transport in the Hepatocyte Canalicular Membrane of the Long-Evans Cinnamon Rat, an Animal Model of Wilson Disease. J. of Hepatology, 26, 216-217, 1997.



41. **Hamer D.H.**, Metallothionein. Annu. Rev. Biochem., 55, 913-951, 1986.
42. **Halliwell B.**, Free Radicals and Antioxydants: a personal view. Nutr Rev., 52, 253-265, 1994.
43. **Sternlieb I.**, Copper and Zinc. The Liver: Biology and Pathobiology, third Edition, 585-596, 1994.
44. **Harris Z.L., Takahashi Y., Miyajama H., Serizawa M., MacGillivray R.T., Gitlin J.D.**, Aceruloplasminemia: Molecular characterization of this disorder of iron metabolism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 2539-2543, 1995.
45. **Yang F., Naylor S.L., Lum J.B. Cutshaw S., McCombs J.L., Naberhaus K.H., McGill J.R., Adrian G.S., Moore C.M., Barnett D.R. et al.**, Characterization, mapping and expression of the human caeruloplasmin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 3257-3261, 1986.
46. **Tanzi R.E., Petrukhin K., Chernov I., Pellequer J.L., Wasco W., Ross B., Romano D.M., Parano E., Pavone L., Brzustowicz L.M.**, The Wilson Disease Gene is a Copper Transporting ATPase. Nat. Genet., 5, 344-350, 1993.
47. **Yamaguchi Y., Heiny M.E., Gitlin J.D.**, Isolation and Characterization of a Human Liver cDNA as a candidate gene for Wilson Disease. Biochem. Biophys. Res. Commun., 30, 271-277, 1993.
48. **Schilsky M.L.**, Wilson Disease: Basis of Copper Toxicity and Natural History. Seminar in Liver Disease, 1, 83-95, 1996.
49. **Maier-Dobersberger T., Nazer H., Ferenci P., Cox D.W.**, Mutation Analysis in Exon 8 of the Wilson Disease Gene. Abstract, Hepatology congress, page 617a, 1998.
50. **Thomas G.R., Forbes J.R., Roberts E.A., Walshe J.M., Cox D.W.**, The Wilson Disease Gene: Spectrum of Mutation and their Consequences. Nat. Gen., 9, 210-217, 1995.
51. **Nanji M.S., Nguyen V.T.T., Kawasol J.H., Inui K., Endo F., Nakajima T., Anezaki T., Cox D.W.**, Haplotype and Mutation

- Analysis in Japanese Patients with Wilson Disease. Am. J. Hum. Genet., 60, 1423-1429, 1997.
52. **Wu J., Forbes J.R., Chen H.S., Cox D.W.**, The LEC Rat has a Deletion in the Copper Transporting ATPase Gene Homologous to the Wilson Disease Gene. Nat. Gen., 7, 541-545, 1994.
53. **Yamaguchi Y., Heiny M.E., Shimizu N., Aoki T., Gitlin J.D.**, Expression of the Wilson Disease Gene is Deficient in the Long-Evans Cinnamon rat. Biochem. J., 301, 1-4, 1994.
54. **Li Y., Togashi Y., Sato S., Emoto T., Kang J.H., Takeichi N., Kobayashi H., Kajima Y., Une Y., Uchino J.**, Spontaneous Hepatic Copper Accumulation in Long-Evans Cinnamon Rats with Hereditary Hepatitis. A Model of Wilson Disease. J. Clin. Invest., 87, 1858-61, 1991.
55. **Yamada T., Agui T., Suzuki Y., Sato M., Matsumoto K.**, Inhibition of the Copper Incorporation into Ceruloplasmin Leads to the Deficiency in Serum Ceruloplasmin Activity in Long-Evans Cinnamon mutant rat. J. Biol. Chem., 268, 8965-8971, 1993.
56. **Kato A., Kobune M., Kohgo Y., Sugawara N., Hisai H., Nakamura T., Sakamaki S., Sawada M., Nitsu Y.**, Hepatic Iron Deprivation Prevents Spontaneous Development of Fulminant Hepatitis and Liver Cancer in Long-Evans Cinnamon Rats. J. Clin. Invest., 98, 923-929, 1996.
57. **Wilson S.A.K.**, Progressive Lenticular Degeneration: a Familial Nervous Disease Associated with Cirrhosis of the Liver. Brain, 34, 295-509, 1912.
58. **Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D.**, Metabolic and Molecular Basis of Herited Disease, McGraw Hill, septième édition, volume 2, chapitre 68, 1995.
59. **Pleskow R.G., Grand R.J.**, Wilson's disease, Pediatric Gastrointestinal disease, volume 2, 1014-1024, 1991.
60. **Heilmaier H.E., Jian J.L., Greim H., Scramel P., Summer K.H.**, D-Penicillamine Induces Rat Hepatic Metallothionein, Toxicology, 42, 23-31, 1986.

61. **Yamaguchi Y., Heiny M.E., Suzuki M, Gilin J.D.,** Biochemical Characterization and Intracellular Localization of the Menkes Disease Protein. Proc. Natl. Acad. Soc. USA, 93, 14 030-14 035, 1996.
62. **Lafontaine S., Firth S.D., Camakaris J., Englezou A., Theophilos M.B., Petris M.J., Howie M., Lockhart M.G., Brooks H., Reddel R.R., Mercer F.B.,** Correction of the Copper Transport Defect of Menkes Patient Fibroblasts by Expression of the Menkes and Wilson ATPases. J. Biol. Chem., 273, 47, 31 375- 31 380, 1998.
63. **Lin S.J., Culotta V.C.,** The ATX1 Gene of *Saccharomyces cerevisiae* Encodes a Small Metal Homeostasis Factor that Protects Cells against Reactive oxygen Toxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 3784-3788, 1995
64. **Bingham M.J., Burchell A., McArdle H.J.,** Identification of an ATP Dependent Copper Transport System in Endoplasmic Reticulum Vesicles Isolated from Rat Liver. J. Physiol., 482, 583-587, 1995.
65. **Sato M., Gitlin J.D.,** Mechanisms of Copper Incorporation During the Biosynthesis of Human Ceruloplasmin. J. Biol. Chem., 266, 5128-5134, 1991.
66. **Murata Y., Yamakawa E., Lizuka T., Kodama H., Abe T., Seki Y., Kodama M.,** Failure of Copper Incorporation into Ceruloplasmin in the Golgi Apparatus of LEC rat hepatocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun., 209, 349-355, 1995.
67. **Bingham M, Ong T.J., Summer K.H., Middleton R.B., McArdle H.J.,** Physiologic Function of the Wilson Disease Gene Product ATP7b. Am. J. Clin. Nutr., 67(suppl), 982S-987S, 1998.
68. **Hung I.H., Suzuki M., Yamaguchi Y., Yuan D.S., Klausner R.D., Gitlin J.D.,** Biochemical Characterization of the Wilson Disease Protein and Functional Expression in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem., 272, 21 461-21 466, 1997.
69. **Yang X.L., Miura N., Kawarada Y., Terada K., Petrukhin D., Gilliam T.C., Sugiyama T.,** Two Forms of Wilson Disease Protein

Produced by Alternative Splicing are Localized in Distinct Cellular Compartments. Biochem. J., 326, 897-902, 1997.

70. **Lutsenko S., Cooper M.J.**, Localization of the Wilson's Disease Protein Product to Mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 6004-6009, 1998.
71. **Nagano K., Nakamura D., Urakama K.-I., Umeyama K., Koiwai K., Hattori S., Yamamoto T., Matsuda I., Endo F.**, Intracellular Distribution of the Wilson's Disease Gene Product (ATPase7b) After in vitro and in vivo Exogenous Expression in Hepatocytes from the LEC rat, an Animal Model of Wilson's Disease. Hepatology, 27, 799-807, 1998.
72. **Terada K., Nakako T., Yang X.-L., Iida M., Aiba N., Minaniya Y., Nakai M., Sakaki T., Miura N., Sugiyama T.**, Restoration of Holoceruloplasmin Synthesis in LEC Rat after Infusion of Recombinant Adenovirus Bearing WND cDNA. J. Biol. Chem., 273, 1815-1820, 1998.
73. **Schaefer M., Hopkins R.G., Failla M.L., Gitlin J.D.**, Hepatocyte-specific Localization and Copper-dependant trafficking of the Wilson's Disease Protein in the Liver. Am. J. Physiology, 276, G639-G646, 1999.
74. **Petrukhin K., Lutsenko S., Chernov I., Ross B.M., Kaplan J.H., Gilliam T.C.**, Characterization of the Wilson Disease Gene Encoding a P-Type Copper Transporting ATPase: Genomic Organization, Alternative Splicing, and Structure/Function Predictions. Hum. Mol. Genet., 3, 1647-1656, 1994.
75. **Molloy S.S., Thomas L., Van Slyke J.K., Stenberg P.E., Thomas G.**, Intracellular Trafficking and Activation of the Furin Protein Convertase: Localization of the TGN and Recycling from the Cell Surface. Embo J., 13, 18-33, 1994.
76. **Bos K., Wraight C., Stanley K.K.**, TGN 38 is Maintained in the Trans-Golgi Network by a Tyrosine-Containing Motif in the Cytoplasmic Domain. Embo J., 12, 2219-2218, 1993.
77. **Rohrer J., Schweiger A., Johnson K.F., Kornfield S.**, A Determinant in the Cytoplasmic Tail of the Cation-Dependent Mannose 6-Phosphate

- Receptor Prevents Trafficking to Lysosomes. J. Cell Biol., 130,1297-1306,1995.
78. **Valiquette M., Bonin H., Hinatowich M., Caron M.G., Lefkowitz R.J., Bouvier M.**, Involvement of Tyrosine Residues Located in the Carboxy Tail of the Human  $\beta$ 2 Adrenergic Receptor in Agonist-Mediated Down Regulation of the Receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 5089-5093, 1990.
  79. **Terada K., Kawarada Y., Miura N., Yasui O., Koyama K., Sugiyama T.**, Copper Incorporation into Ceruloplasmin in Rat Liver. Biochim. Biophys. Acta, 1270, 58-62,1995.
  80. **Sternlieb I., Quintana N., Vilenberg I., Schilsky M.L.**, An Array of Mitochondrial Alterations in the Hepatocytes of Long-Evans Cinnamon Rat. Hepatology, 22,1782-1787, 1995.
  81. **Valentine J.S., Gralla E.B.**, Delivering Copper inside Yeast and Human Cells. Science, 278, 817-818, 1997.
  82. **Teasdale R.D., D'Agostara G., Gleeson P.A.**, The Signal for Golgi Retention of Bovine Beta 1,4-Galactosyltransferase is in the Transmembrane Domain. J. Biol. Chem., 267, 4084-4096, 1992.
  83. **Rusinol A.E., Cui Z., Chen M.H., Vance J.E.**, A Unique Mitochondria-Associated Membrane Fraction From Rat Liver has a High Capacity for Lipid Synthesis and Contains Pre-Golgi Secretory Proteins Including Nascent Lipoproteins. J. Biol. Chem., 269, 27494-27502, 1994.
  84. **Chandra N.C., Spiro M.J., Spiro R.E.**, Identification of a Glycoprotein from Rat Liver Mitochondrial Inner Membrane and Demonstration of its Origin in the Endoplasmic Reticulum. J. Biol. Chem., 273- 19715-19721, 1998.
  85. **Schaefer M., Relofsen H., Wolters H., Walter J., Hofmann M.M., Kuipers F., Stremmel W., Vonk R.J.**, Localization of the Wilson's Disease protein in Human Liver, Gastroenterology, 117, 1380-1385, 1999.

86. **Robinson L.J., Pang S., Harris D.S., Huiser J., James D.E.,** Translocation of the Glucose Transporter (Glut4) to the Cell Surface in Permeabilised 3T3-L1 Adipocytes: Effects of ATP, Insulin and GTP gamma-S and Localization of Glut4 to Clathrin Lattices. J. Cell. Biol., 117, 1181-1196, 1992.
87. **Marks M.S., Woodruff L., Bonifacio J.S.,** Protein Targeting by Tyrosine and di-Leucine-Based Signals: Evidence for Distinct Saturable Components. J. Cell Biol., 135, 341-354, 1996.
88. **Welsh M.J., Smith A.E.,** Molecular Mechanisms of CFTR Chloride Channel Dysfunction in Cystic Fibrosis. Cell, 73, 1251-1254, 1993.
89. **DiDonato M., Narindrasorasak S., Forbes J.R., Cos D.W., Sarkar B.,** Expression, Purification and Metal Binding Properties of the N-Terminal Domain from the Wilson Disease Putative Copper-Transporting ATPase (ATP7b). J. Biol. Chem., 272, 33279-33282, 1997.
90. **Kornfeld S., Mellman I.,** The Biogenesis of Lysosomes. Annu. Rev. Cell. Biol., 5, 483-525, 1989.
91. **Czech M.P.,** Molecular Actions of Insulin on Glucose Transport. Annu. Rev. Nutr., 15, 441-471, 1995.
92. **Frances M.J., Jones E.E., Levy E.R., Ponnambalam S., Chelly J., Monaco A.P.,** A Golgi Localization Signal Identified in the Menkes Recombinant Protein. Hum. Mol. Genet., 7, 1245-1252, 1998.
93. **Petris M.J., Camakaris J., Greenough M., Lafontaine S., Mercer J.F.B.,** A C-Terminal di Leucine is Required for Localization of the Menkes Protein in the Trans-Golgi Network. Hum. Mol. Genet., 7, 2063-2071, 1998.
94. **Payne A.S., Kelly E.J., Gitlin F.D.,** Functional Expression of the Wilson Disease Protein Reveals Mislocation and Impaired Copper-dependent Trafficking of the Common H1069Q Mutation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 10854-10859, 1998.

95. **James P., Inui M., Tada M., Chiesi M., Carafoli E.**, Nature and Site of Phospholamban Regulation of the  $\text{Ca}^{+2}$  Pump of Sarcoplasmic Reticulum. Nature, 342, 90-92, 1989.
96. **Toyofuku T., Kurzydlowki K., Tada M., MacLennan D.H.**, Identification of Regions in the Ca-ATPase of Sarcoplasmic Reticulum that Affect Functional Association with Phospholamban. J. Biol. Chem., 268, 2809-2815, 1993.
97. **Larsen F.L., Vincen Z.I.**, Calcium Transport Across the Plasma Membrane: Stimulation by Calmodulin. Science, 204, 306-308, 1979.
98. **Larsen F.L., Katz S., Roufogalis G.D.**, Calmodulin Regulation of  $\text{Ca}^{+2}$  Transport in Human Erythrocytes. Biochem. J., 200, 185-192, 1981.
99. **Falchetto R., Vorherr T., Brunner J. Carafoli E.**, The Plasma Membrane  $\text{Ca}^{+2}$  Pump Contains a Site that Interacts both with Calmodulin and With another Part of the Pump. J. Biol. Chem., 266, 2930-2936, 1991.

## Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Dr Steven R. Martin. Son esprit scientifique, son sens critique et son support financier ont largement contribué à ma formation et à la réalisation de ce projet. Je tiens également à remercier mon co-directeur de recherche, le Dr Fernando Alvarez pour sa disponibilité, ses qualités pédagogiques et sa source inépuisable d'idées.

Je remercie aussi toute l'équipe: Francine Boucher, Oumnia Hajoui, Pascal Lapiere et Idriss Saiah pour leur aide technique et leur amitié. Votre inestimable sens de l'humour a contribué à faire de ces deux années un moment très agréable.

Finalement, un merci spécial à Alain et à tous ceux qui m'ont accompagné tout au long de cette maîtrise.