

Université de Montréal

Étude structure/fonction des cotransporteurs Na⁺/glucose

par

Louis Sasseville

Département de physique

Faculté des arts et sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de doctorat
en physique,
option biophysique et physiologie moléculaire

juin 2013

© Louis Sasseville, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Étude structure/fonction des cotransporteurs Na⁺/glucose

Présentée par :

Louis J. Sasseville

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Rikard Blunck, président-rapporteur

Jean-Yves Lapointe, directeur de recherche

Nazzareno D'Avanzo, membre du jury

Régis Pomès, examinateur externe

Christian Pellerin, représentant du doyen de la FES

Résumé

Cette thèse porte sur l'étude de la relation entre la structure et la fonction chez les cotransporteurs Na^+ /glucose (SGLTs). Les SGLTs sont des protéines membranaires qui se servent du gradient électrochimique transmembranaire du Na^+ afin d'accumuler leurs substrats dans la cellule.

Une mise en contexte présentera d'abord un bref résumé des connaissances actuelles dans le domaine, suivi par un survol des différentes techniques expérimentales utilisées dans le cadre de mes travaux.

Ces travaux peuvent être divisés en trois projets. Un premier projet a porté sur les bases structurelles de la perméation de l'eau au travers des SGLTs. En utilisant à la fois des techniques de modélisation moléculaire, mais aussi la volumétrie en voltage imposé, nous avons identifié les bases structurelles de cette perméation. Ainsi, nous avons pu identifier *in silico* la présence d'une voie de perméation passive à l'eau traversant le cotransporteur, pour ensuite corroborer ces résultats à l'aide de mesures faites sur le cotransporteur Na/glucose humain (hSGLT1) exprimé dans les ovocytes.

Un second projet a permis d'élucider certaines caractéristiques structurelles de hSGLT1 de par l'utilisation de la dipicrylamine (DPA), un accepteur de fluorescence dont la répartition dans la membrane lipidique dépend du potentiel membranaire. L'utilisation de la DPA, conjuguée aux techniques de fluorescence en voltage imposé et de FRET (fluorescence resonance energy transfer), a permis de démontrer la position extracellulaire d'une partie de la boucle 12-13 et le fait que hSGLT1 forme des dimères dont les sous-unités sont unies par un pont disulfure.

Un dernier projet a eu pour but de caractériser les courants stationnaires et pré-stationnaires d'un membre de la famille des SGLTs, soit le cotransporteur Na^+ /myo-inositol humain hSMIT2 afin de proposer un modèle cinétique qui décrit son fonctionnement. Nous avons démontré que la phlorizine inhibe mal les courants préstationnaires suite à une dépolarisation, et la présence de courants de fuite qui varient en fonction du temps, du

potentiel membranaire et des substrats. Un algorithme de recuit simulé a été mis au point afin de permettre la détermination objective de la connectivité et des différents paramètres associés à la modélisation cinétique.

Mots-clés : biophysique, protéines membranaires, cotransporteurs Na^+ /glucose (SGLTs), famille structurelle de LeuT, électrophysiologie, spectroscopie de fluorescence, modélisation moléculaire, modélisation cinétique, ovocyte de xénopes.

Abstract

This thesis is about the structure/function relationship in Na⁺/glucose cotransporters (SGLTs). SGLTs are membrane proteins which use the Na⁺ transmembrane electrochemical gradient to accumulate their substrates within the cell.

As an introduction, a short review of the current state of the field will be followed by a presentation of the different techniques used in this work.

This work can be divided in three main projects. In the first project, we investigated the structural basis of water permeation through SGLTs. By using molecular modeling technics, we have identified, *in silico*, a passive permeation pathway used by water to go through the cotransporter across the membrane. Using voltage-clamp volumetric measurement, we were able to corroborate these findings for hSGLT1 expressed in oocytes.

A second project allowed elucidation of some of hSGLT1 structural characteristics through the use of dipicrylamine (DPA), a fluorescence acceptor whose repartition in the lipid membrane is voltage-dependant. Use of DPA concomitantly with voltage-clamp fluorescence and FRET (fluorescence resonance energy transfer) has clearly demonstrated the extracellular localisation of part of the 12-13 loop which was previously assumed to be intracellular. In addition, we have shown that hSGLT1 forms a dimeric structure where the subunits are linked by a disulfide bridge.

A last project aimed at characterizing the steady-state and pre-steadystate currents of a member of the SGLT family named hSMIT2 (human Na/myo-inositol transporter 2). We showed that phlorizin is a poor inhibitor of pre-steady state currents following depolarisation, and the presence of a time, membrane potential and substrate dependent leak current. A simulated annealing algorithm was developed in order to allow objective determination of both the connectivity and the parameters associated with the optimal kinetic model.

Keywords : biophysics, membrane proteins, Na⁺/glucose transporters (SGLTs), LeuT structural family, electrophysiology, fluorescence spectroscopy, molecular modeling, kinetic modeling, *Xenopus laevis* oocytes.

Table des matières

Liste des abréviations.....	xiii
Symboles latins.....	xiii
Symboles grecs.....	xvii
Autres Symboles.....	xvii
1 Mise en contexte.....	2
1.1 Les protéines.....	2
1.1.1 La membrane.....	3
1.2 Les protéines membranaires.....	4
1.2.1 Types de transport.....	5
1.3 L'accès-alterné.....	9
1.3.1 Architecture du site de liaison.....	10
1.3.2 Mouvements macromoléculaires.....	12
1.3.3 Mouvement de cisaillement.....	14
1.4 La famille des SLC5.....	20
1.4.1 Survol historique.....	21
1.4.2 Les différents membres de la famille SLC5 importants pour l'homme.....	22
1.4.3 Les cotransporteurs Na ⁺ /glucose dans leurs contextes physiologiques.....	27
1.5 La famille structurelle de LeuT.....	30
1.5.1 L'architecture LeuT.....	31
1.5.2 Les membres cristallisés de la famille structurelle de LeuT.....	33
1.6 La relation structure/fonction chez les cotransporteurs Na ⁺ /glucose.....	37
1.6.1 Les sites de liaison des substrats.....	38
1.6.2 Le mécanisme de cotransport.....	44
1.6.3 Senseur de voltage.....	46
1.7 Références.....	48
2 Méthodologie.....	56
2.1 Expression hétérologue chez les ovocytes.....	56

2.2	Immunobuvardage de type Western.....	57
2.3	L'électrophysiologie	58
2.3.1	Voltage imposé à 2 électrodes.....	59
2.3.2	Le "Cut-Open".....	62
2.3.3	Mesure de volumétrie en voltage imposé	64
2.4	Spectroscopie de fluorescence	66
2.4.1	La fluorescence et le FRET.....	66
2.4.2	DPA et extinction de fluorescence	67
2.4.3	Fluorophores	69
2.4.4	Parcours optique	69
2.4.5	Spectroscopie de fluorescence en voltage imposé.....	70
2.5	La modélisation cinétique	73
2.5.1	L'équation d'Arrhenius.....	74
2.5.2	L'estimation des paramètres cinétiques	76
2.6	La modélisation moléculaire.....	80
2.6.1	Les structures cristallographiques	81
2.6.2	Modélisation par homologie	82
2.6.3	La dynamique moléculaire.....	85
2.6.4	Applications et algorithmes	87
2.7	Références.....	93
3	Éléments instigateurs.....	97
3.1	La perméation de l'eau.....	97
3.1.1	La controverse.....	98
3.1.2	Éléments déclencheurs.....	99
3.2	L'accessibilité extracellulaire de la boucle 12-13 de SGLT1 et la multimérisation de hSGLT1.	99
3.2.1	Le débat.....	100
3.2.2	Éléments déclencheurs.....	100
3.3	Modélisation cinétique	101

3.3.1	Les points de vue.....	101
3.3.2	Éléments déclencheurs.....	102
3.4	Références.....	102
4	The Structural Pathway for Water Permeation through Sodium-Glucose Cotransporters 106	
4.1	Contribution personnelle.....	106
4.2	Résumé	106
4.3	Abstract.....	107
4.4	Introduction.....	107
4.5	Methods	108
4.5.1	Molecular Dynamic, Grand-Canonical Monte-Carlo and Potential Mean of Force calculations	108
4.5.2	Oocyte preparation and injection	112
4.5.3	Solutions	112
4.5.4	Optical and electrophysiological measurement.....	113
4.6	Results.....	114
4.7	Discussion	122
4.8	Conclusion	126
4.8.1	Acknowledgements	126
4.9	Supporting Material.....	127
4.10	References.....	128
5	The Human Sodium-Glucose Cotransporter (hSGLT1) is a Disulfide-Bridged Homodimer with a Re-entrant Loop Between Transmembrane Segements 12 and 13	131
5.1	Contribution personnelle.....	131
5.2	Résumé	131
5.3	Abstract.....	132
5.4	Introduction.....	132
5.5	Experimental procedures	134
5.5.1	hVoS FRET quenching.....	134

5.5.2	Possibility of inter-monomer disulfide bridges	135
5.5.3	Spatially determined quenching of 12-13 loop	136
5.5.4	Oocyte Preparation and Injection	136
5.5.5	Voltage-clamp fluorometry	136
5.5.6	Plasma membrane preparation of oocytes and Western blot detection	137
5.5.7	hVoS explicit simulation	138
5.5.8	Modeling of loop 12-13	139
5.6	Results	139
5.6.1	hVoS FRET quenching	139
5.6.2	Dimer detection by Western blotting	142
5.6.3	hVoS quenching on E624C	145
5.6.4	hVoS FRET quenching explicit simulation	146
5.7	Discussion	147
5.7.1	hSGLT1 is expressed as a disulfide-bridged dimer	147
5.7.2	E624C is located on the extracellular side of the membrane	152
5.8	Conclusion	155
5.8.1	Acknowledgments	155
5.9	References	156
6	The Transport Mechanism of the Human Sodium/myo-Inositol 2 (SMIT2/SGLT6), a member of LeuT structural family	160
6.1	Contribution personnelle	160
6.2	Résumé	160
6.3	Abstract	161
6.4	Introduction	162
6.5	Methods	163
6.5.1	Oocytes preparation and injection	163
6.5.2	Electrophysiology	163
6.5.3	Kinetic modeling	164
6.6	Results	166

6.6.1	Poor inhibition of pre-steady-current by Pz.....	166
6.6.2	Discrepancy between Q_{on} and Q_{off}	170
6.6.3	Leak current characterisation	171
6.6.4	Determination of the optimal kinetic model using SA algorithm	173
6.7	Discussion	182
6.7.1	Voltage-dependence of Pz inhibition.....	182
6.7.2	Passive channel-like leak currents.....	183
6.7.3	Proposed kinetic model.....	186
6.8	Conclusion	191
6.9	Acknowledgement.....	191
6.10	References.....	192
7	Discussion.....	198
7.1	Identification d'une voie de perméation de l'eau au travers des SGLTs par dynamique moléculaire	198
7.1.1	Survol de la démarche et des résultats	198
7.1.2	Critique	204
7.1.3	Perspectives.....	207
7.2	Étude de SGLT1 par spectroscopie de fluorescence	209
7.2.1	Survol de la démarche et des résultats	209
7.2.2	Critique	217
7.2.3	Perspectives.....	219
7.3	Caractérisation fonctionnelle de hSMIT2.....	222
7.3.1	Survol de la démarche et des résultats	222
7.3.2	Critique	230
7.3.3	Perspectives.....	235
7.4	Références.....	238
8	Conclusions.....	246

Liste des tableaux

Tableau 1-1 Concentrations physiologiques transmembranaires	5
Tableau 1-2 La famille des SLC5	26
Tableau 1-3 Membres de la famille structurelle de LeuT	36
Tableau 7-1 Liste des mutations de hSGLT1 pour l'immunobuvardage de type Western.	215
Tableau 7-2 Paramètres associés aux différents modèles cinétiques.....	234

Liste des figures

Figure 1-1 Niveaux d'organisation de la structure des protéines.....	3
Figure 1-2 Perméabilité relative au travers de la membrane.....	4
Figure 1-3 Transport passif.....	7
Figure 1-4 Transport actif.....	8
Figure 1-5 Mouvement de charnière.....	14
Figure 1-6 Mouvement de cisaillement.....	15
Figure 1-7 Mécanismes d'accès-alterné.....	16
Figure 1-8 Le module senseur de voltage.....	18
Figure 1-9 Mécanismes proposés pour le VSD.....	19
Figure 1-10 Absorption transépithéliale de glucose.....	28
Figure 1-11 Symétrie inversée chez LeuT.....	32
Figure 1-12 Structure générale de vSGLT.....	39
Figure 1-13 Sites de liaison.....	41
Figure 1-14 Relation entre les sites de liaison du Na ⁺ chez LeuT.....	42
Figure 1-15 Hélices α brisées chez LeuT.....	43
Figure 1-16 Modèle d'accès-alterné de LeuT proposé par Forrest et coll.....	45
Figure 1-17 Le cycle de cotransport des cotransporteurs sodium/glucose.....	46
Figure 1-18 Résidus chargés de la boucle 12-13 de hSGLT1.....	47
Figure 2-1 Prise de données électrophysiologiques en voltage imposé à deux électrodes..	62
Figure 2-2 Schéma de la technique du « cut-open oocyte ».....	64
Figure 2-3 Prise de mesure de volumétrie en voltage imposé.....	65
Figure 2-4 Fluorescence et FRET.....	67
Figure 2-5 Extinction de fluorescence par le DPA.....	68
Figure 2-6 Prise de mesure en fluorescence.....	70
Figure 2-7 Extinction de FRET.....	72
Figure 2-8 Modèle cinétique typique de SGLT1.....	74
Figure 2-9 Recuit simulé.....	80

Figure 2-10 Alignement de séquences.....	84
Figure 2-11 GSBP.....	90
Figure 4-1 Complete MD system	111
Figure 4-2 Water permeation pathway.....	115
Figure 4-3 Constriction areas	117
Figure 4-4 Potential of Mean Force profile.....	118
Figure 4-5 Volumetric and electrophysiological assays	121
Figure 4-6 Putative substrate permeation pathways	127
Figure 5-1 Principle of hVoS FRET quenching	135
Figure 5-2 hVoS FRET quenching results	141
Figure 5-3 Western blot of wt and mutant myc-tagged hSGLT1	144
Figure 5-4 hVoS quenching of E624C.....	146
Figure 5-5 Explicit simulation of hVoS quenching on E624C	147
Figure 5-6 Cartoon of loop 7-8.....	152
Figure 5-7 Cartoon of loop 12-13	154
Figure 6-1 Poor inhibition by Pz	169
Figure 6-2 Apparent transferred charges.....	171
Figure 6-3 Apparent leak current.....	172
Figure 6-4 Assessed connectivities.....	177
Figure 6-5 Optimal connectivity.....	179
Figure 6-6 Fit of the experimental data.....	181
Figure 6-7 Fit of Q_{off}	182
Figure 7-1 Piston brownien	206
Figure 7-2 Cystéines mutées lors de l'immunobuvardage de type Western	214
Figure 7-3 Comparaison entre différents modèles cinétiques	233

Liste des abréviations

Symboles latins

A488	Alexa Fluor 488 C ₅ -maléimide
AdiC	échangeur agmatine/arginine
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
ApcT	transporteur d'acides aminés proton-dépendant
ATP	adénosine triphosphate
AQP	aquaporine
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messager
BetP	symporteur Na ⁺ /bétaine
Ca ²⁺	ion calcium
CaïT	antiporteur L-carnitine/ γ -butyrobétaine
Cl ⁻	ion chlore
DM	dynamique moléculaire
DPA	dipicrylamine
DTT	dithiothréitol
e	charge électronique élémentaire
e _b	électrode de bain
e _i	électrode de courant

e_v	électrode de voltage
E_a	énergie d'activation
F	constante de Faraday (96500 coulombs moles ⁻¹)
FRET	transfert d'énergie par résonance de type Förster (Förster resonance energy transfert)
FRG	glucosurie familiale rénale (familial renal glucosuria)
GGM	syndrome de malabsorption du glucose-galactose
GLUT	transporteurs de glucose
GSBP	potentiel généralisé à l'interface du solvant (generalised solvent boundary potential)
hSGLT1	isoforme humain du cotransporteur Na ⁺ /glucose
hVoS	fluorescence avec sondes sensibles au potentiel (hybrid voltage sensor)
k_{ij0}, k_{ji0}	constante de vitesse entre les états i et j d'un modèle cinétique
H ⁺	proton
K ⁺	ion potassium
k_B	constante de Boltzmann (1.380 x 10 ⁻²³ joules kelvins ⁻¹)
LacY	perméase du lactose
LeuT _{Aa}	transporteur de Na ⁺ /leucine de <i>Aquifex aeolicus</i>
L _P	perméabilité osmotique de l'eau (cm ³ s ⁻¹)
M	molaire (mol L ⁻¹)

M ⁺	cations monovalents
MFA	microscopie à force atomique
Mhp1	symporteur nucléobase/cation
MCGC	Monte-Carlo dans l'ensemble grand-canonique
Na ⁺	ion sodium
ns	nanoseconde
NSS	famille des symporteurs Na ⁺ /neurotransmetteur (neurotransmitter/ Na ⁺ symporter)
ORT	thérapie de réhydratation par voie orale (oral rehydration therapy)
PDB	code de référence de la RCSB Protein Data Bank
P _f	perméabilité (cm s ⁻¹)
PFM	potentiel de force moyenne
Pz	phlorizine
Q	charge transférée
r	distance donneur-accepteur
R	constante des gaz (8.31 Joule moles ⁻¹ kelvins ⁻¹)
R ₀	rayon de Förster
RMN	résonance magnétique nucléaire
SA	recuit simulé (simulated annealing)

SDS	laurylsulfate de sodium (sodium dodecyl sulfate)
SGLTs	cotransporteurs Na ⁺ /glucose
SGLT1	cotransporteur Na ⁺ /glucose à haute affinité
SGLT2	cotransporteur Na ⁺ /glucose à faible affinité
SGLT3	senseur de glucose
SGLT6	cotransporteur Na ⁺ / <i>myo</i> -inositol 2
SMIT2	cotransporteur Na ⁺ / <i>myo</i> -inositol 2
SLC	famille des transporteurs de solutés du sodium (solute carrier family)
SLC	famille 5 des transporteurs de solutés du sodium (solute carrier family)
SSS	famille des symporteurs Na ⁺ /soluté (sodium-solute symporter)
T	température
TEVC	voltage imposé à deux électrodes (two-electrode voltage-clamp)
TM	segment transmembranaire (transmembrane segment)
TMR	tétraméthylrhodamine C ₅ -maléimide
VCF	fluorométrie à voltage imposé (voltage-clamp fluorometry)
V _m	potentiel membranaire
VSD	domaine senseur de voltage (voltage sensor domain)

vSGLT	cotransporteur Na ⁺ /galactose de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
WHAM	méthode de l'algorithme à histogramme balancé (weighted histogram algorithm method)
wt	type sauvage (wild type)
z_i	charge de valence de la charge équivalente qui se déplace dans le champ électrique

Symboles grecs

α	asymétrie de la barrière d'énergie
β -ME	β -mercaptoéthanol
$\Delta F/F$	rapport de la variation de fluorescence sur la fluorescence totale
ΔG	différence d'énergie libre
$\Delta\pi$	amplitude du choc osmotique
τ	constante de temps
v_w	volume spécifique de l'eau
Ψ	potentiel transmembranaire

Autres Symboles

Å	ångström (10 ⁻¹⁰ mètre)
---	---------------------------------------

À mes parents

Remerciements

Je tiens évidemment à remercier l'ensemble des acteurs qui ont contribué de près ou de loin à cette aventure que furent mes études graduées.

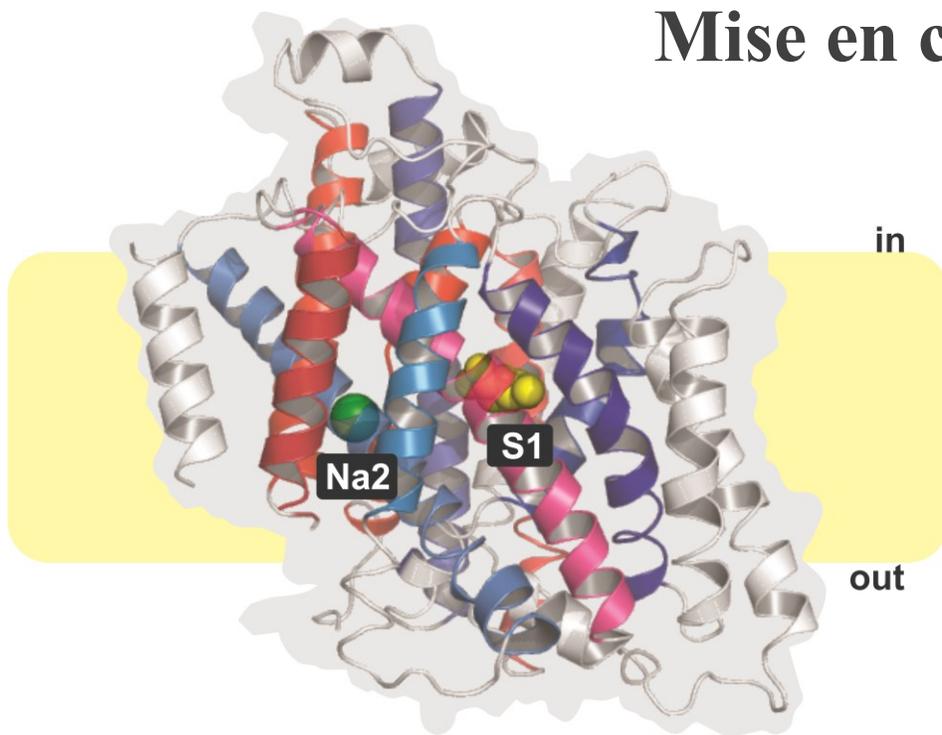
Je ne peux faire autrement que de remercier Jean-Yves Lapointe. Celui-ci a été un directeur de recherche exceptionnel. Jean-Yves a à cœur les intérêts de ses étudiants, leur permettant d'acquérir une formation complète et variée, à la fois scientifique et professionnelle. Cela nous bénéficie grandement et est tout à son honneur.

Aussi, je me dois de remercier Bernadette de m'avoir enseigné les rudiments de l'électrophysiologie, sa bonne humeur constante et sa patience par rapport à mon éparpillement expérimental. Mike pour m'avoir appris à exprimer mes émotions dans la langue de Shakespeare et pour m'avoir donné un regard critique sur la science et sa pratique. Jean-Philippe évidemment pour son aide tout au long de mes études graduées, mais aussi pour son humour incisif et sa camaraderie. Sandra pour son support technique et moral indéfectible. Yoann pour son entrain constant, sa curiosité incroyable et ses jeux de mots douteux. Pierre pour m'avoir permis d'acquérir une capacité élevée de dissociation lors d'immunobuvarages et pour sa bonne humeur puérile. Louise, Hélène et Pierrette pour avoir été maternantes chacune à sa façon.

Je devrais remercier l'ensemble des membres du GÉPROM individuellement, mais ça serait trop long. J'ai eu la chance de réaliser mes études dans un groupe offrant de nombreuses opportunités scientifiques, mais où une atmosphère de collaboration, d'entraide et de camaraderie règne. Trop souvent on oublie l'importance de cela.

Finalement, je ne peux passer sous silence l'apport immense de mes amis et ma famille. Particulièrement, mes parents Marc et Diane qui ont toujours su m'encourager et me soutenir, et Vanessa qui depuis le début m'a écouté, m'a permis de décrocher, et a su trouver la patience de m'endurer.

Mise en contexte



Tiré de (1)

1 Mise en contexte

L'homéostasie est la capacité d'un système à maintenir un état stable et constant. Dans le vivant, ceci se traduit par la capacité des êtres uni- et multicellulaires à moduler leurs conditions intracellulaires. À la base de cette homéostasie est la membranaire cellulaire, qui sépare les milieux intra- et extracellulaires. La membrane cellulaire est une structure complexe. Par sa composition de phospholipides, la membrane cellulaire est imperméable aux ions et molécules volumineuses. Cette imperméabilité est bien sûr avantageuse à plusieurs égards dans le maintien de l'homéostasie de la cellule. Par contre, les processus physiologiques de la cellule nécessitent l'apport constant d'ions et de nutriments. C'est ici qu'interviennent notamment les cotransporteurs, en permettant le passage sélectif au travers de la membrane de solutés pour lesquels celle-ci est imperméable. Par définition, les cotransporteurs effectuent ce « transport » d'un premier composé en se servant du gradient électrochimique transmembranaire favorable d'un second composé. Les cotransporteurs peuvent donc être assimilés à des « nanopompes ». Cette thèse porte sur l'étude de l'interrelation entre la structure et la fonction des cotransporteurs Na^+ /glucose.

1.1 Les protéines

Les protéines sont essentielles au fonctionnement de la cellule et sont impliquées dans pratiquement tous les processus nécessaires à la vie. Elles peuvent catalyser des réactions biochimiques, permettre la transmission d'informations, jouer un rôle structurel ou encore permettre la perméation de molécules au travers de la membrane cellulaire.

Cette ubiquité des protéines est d'autant plus remarquable qu'elles sont toutes formées, en général, à partir de chaînes composées des 20 acides aminés standards. L'étonnante polyvalence provient d'un phénomène d'émergence dû non seulement à l'ordre des acides aminés dans la chaîne (organisation primaire), mais aussi à l'organisation de ces acides aminés en motifs (boucles, hélices α et feuilletts β) au niveau de l'organisation

secondaire, l'interaction de ces motifs en domaines pour former l'organisation tertiaire, et finalement les interrelations entre ces domaines au niveau de l'organisation quaternaire.

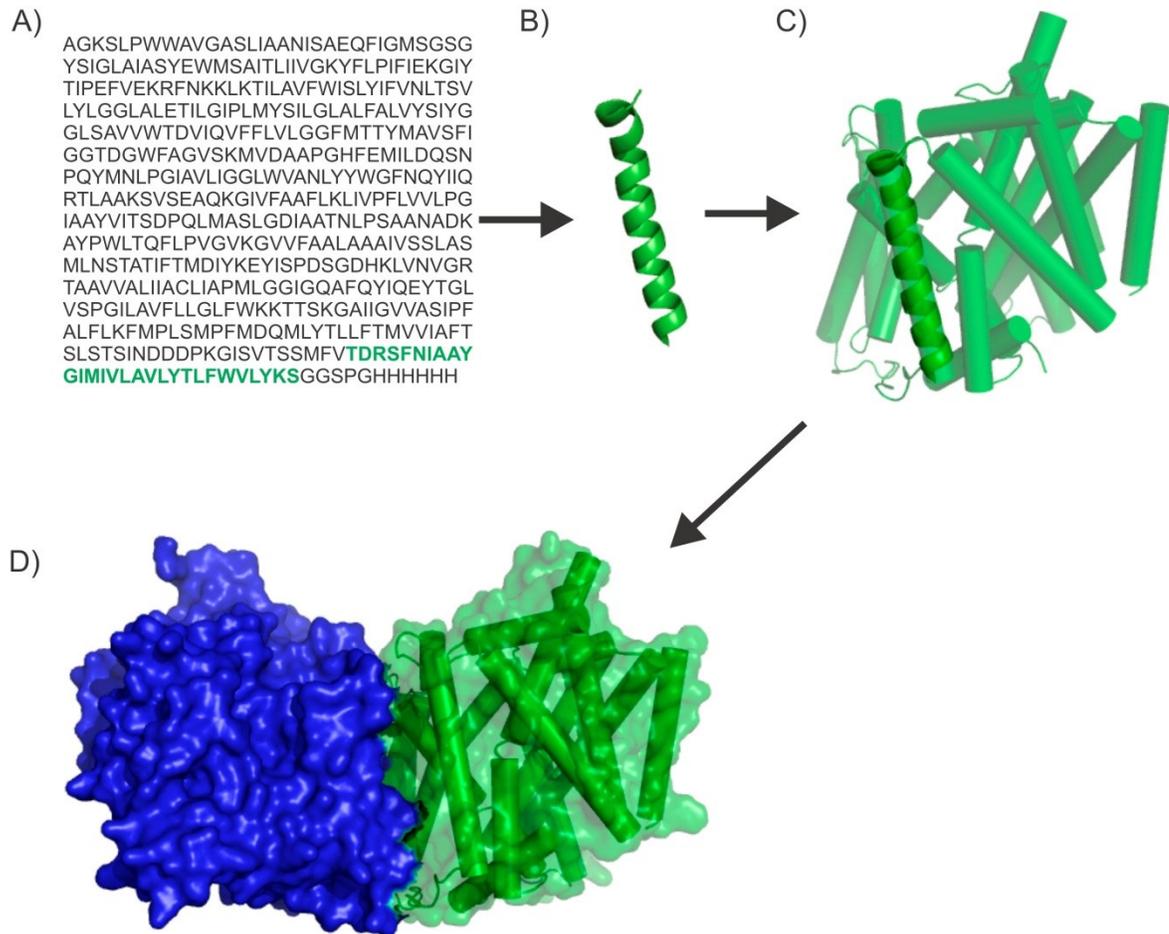


Figure 1-1 Niveaux d'organisation de la structure des protéines.

A) Structure primaire, déterminée par l'ordre des acides aminés dans la chaîne. B) Structure secondaire de motif hélice α . C) Organisation tertiaire. D) Organisation quaternaire. Fait à partir de PDB 3DH4 (2) et réalisé avec PyMOL (3).

1.1.1 La membrane

La membrane cellulaire a pour rôle principal de séparer les milieux intra- et extracellulaires. Les molécules les plus abondantes dans la membrane sont les phospholipides. Par définition, les phospholipides sont composés d'une tête hydrophile et

d'une queue hydrophobe. Ils sont donc amphipathiques. Cette propriété permet l'assemblage des phospholipides en une bicouche formée de 2 feuillets, totalisant une épaisseur d'environ 40 Å. Cette structure est ainsi appelée la « bicouche lipidique ». Ainsi, les têtes hydrophiles font face au milieu (c.-à-d. l'eau) et les queues hydrophobes se font face.

Ainsi, les molécules hydrophobes pourront diffuser facilement au travers de la membrane. Les petites molécules polaires auront plus de difficultés, tandis que les grosses molécules polaires seront en pratique bloquées. Finalement, la membrane sera totalement imperméable aux ions de par leurs charges.

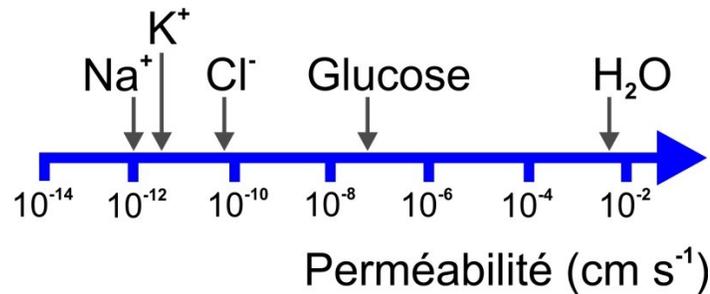


Figure 1-2 Perméabilité relative au travers de la membrane.

Adapté de (4).

Par contre, la cellule doit constamment échanger avec son environnement, à la fois pour aller chercher les nutriments nécessaires à ces processus internes et pour réagir à des changements au niveau du milieu extracellulaire. Une membrane composée exclusivement de phospholipides ne permettrait pas cela. C'est ici qu'entrent en jeu les protéines membranaires.

1.2 Les protéines membranaires

Par définition, les protéines membranaires sont des protéines qui sont en contact avec la bicouche lipidique. Ce contact peut être plus ou moins important, allant d'une simple ancre lipidique (lipid anchor) à plusieurs segments transmembranaires.

Les protéines membranaires jouent un rôle important dans la régulation de nombreux processus physiologique. L'importance des protéines membranaires peut être jugée par le fait qu'environ le tiers des protéines encodées dans le génome sont des protéines membranaires (5), et plus de la moitié des médicaments présentement sur le marché cibles des protéines membranaires intégrales (6).

Les protéines membranaires agissent en tant que récepteurs, transporteurs, éléments de la structure cellulaire et facteurs d'adhésion cellulaire. Le transport sélectif de molécules de part et d'autre de la bicouche lipidique par les protéines membranaires sera évidemment le centre d'attention de cette mise en contexte.

1.2.1 Types de transport

Afin de maintenir son homéostasie, la cellule doit conserver ses paramètres internes stables. Parmi ces paramètres se trouve la concentration des différents ions. Les conditions extracellulaires peuvent varier un peu mais oscillent le plus souvent à l'intérieur de plages restreintes. Cependant, les concentrations extracellulaires vues par la cellule seront rarement identiques aux concentrations intracellulaires qui sont appropriées au bon fonctionnement de la cellule (voir **Tableau 1-1**). C'est pourquoi la membrane cellulaire se sert de certains types de protéines membranaires afin de transporter de façon sélective les ions de part et d'autre de la membrane.

Tableau 1-1 Concentrations physiologiques transmembranaires

Soluté	Concentration intracellulaire libre (mM)	Concentration extracellulaire (mM)
Cations		
Na ⁺	5-15	145
K ⁺	140	5
Mg ²⁺	0.5	1-2
Ca ²⁺	10 ⁻⁴	1-2
H ⁺	pH 7.2	pH 7.4
Anions		
Cl ⁻	5-15	110

Adapté de (4).

1.2.1.1 Transport passif

Le type de transport le plus simple est le transport passif. Ceci nécessite que le transport suive le gradient électrochimique de l'ion. La perméation de l'ion se fera par l'intermédiaire d'une protéine membranaire. Deux types de protéines membranaires permettent le transport passif, soit les canaux et les transporteurs passifs (voir **Figure 1-3**). Un canal est ni plus ni moins qu'un tunnel sélectif dans la bicouche lipidique. Par sa sélectivité, il favorise le passage de certains ions. Le mode de fonctionnement des transporteurs passifs (aussi appelés perméases) est généralement plus complexe que celui des canaux car il implique un changement conformationnel afin d'exposer les sites des liaisons des ions de part et d'autre de la membrane de manière alternée. Par conséquent, les transporteurs passifs sont beaucoup moins rapides que les canaux, effectuant de 1 à 1000 cycles par seconde, comparativement à plus de 10^6 événements de perméation par seconde (7).

Finalement, la diffusion au travers de la bicouche lipidique peut être vue comme un dernier type de transport passif. Par contre, la perméabilité des grosses molécules polaires, par exemple le glucose, et à plus forte raison des ions est trop faible pour avoir un impact physiologique important.

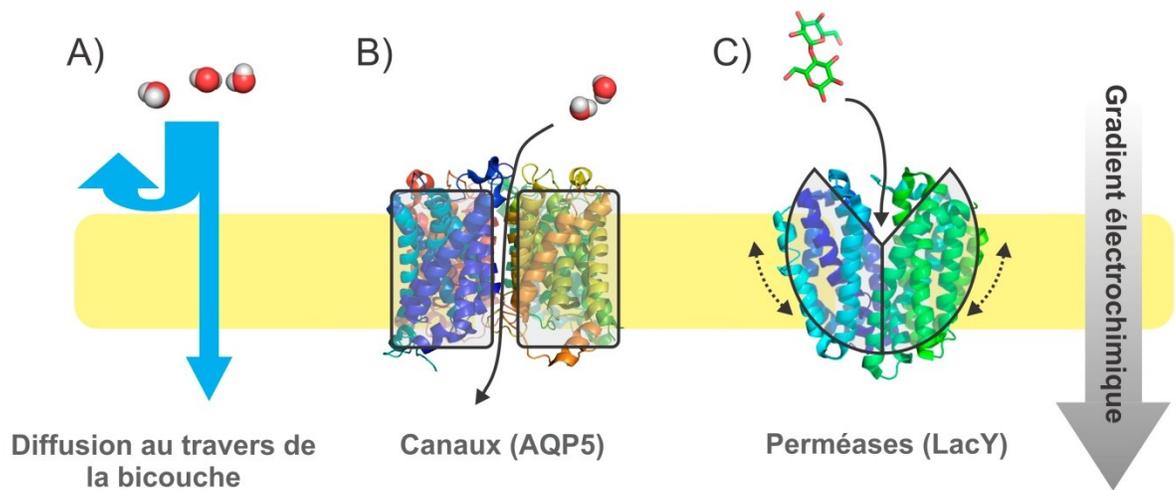


Figure 1-3 Transport passif

A) Diffusion au travers de la membrane de molécules d'eau. B) Passage de molécules d'eau au travers du canal à eau AQP5 (8). C) Transport du lactose au travers de la perméase à lactose LacY (9). Réalisé avec (3).

1.2.1.2 Transport actif

Lorsque la direction du transport de l'ion va à l'encontre du gradient électrochimique de celui-ci, le transport est de type actif.

Afin d'aller à l'encontre du gradient électrochimique, une source d'énergie est requise. L'exemple typique de ce type de transport est la pompe Na^+/K^+ -ATPase qui pompe contre leur gradient électrochimique respectif 3 Na^+ dans la cellule et 2 K^+ hors de la cellule. Parce qu'elle se sert directement de l'énergie provenant de l'hydrolyse d'une molécule ATP, ce type de transport est dit actif primaire.

La pompe Na^+/K^+ -ATPase produit donc un gradient d'ions Na^+ et K^+ à travers la membrane établissant ainsi un fort potentiel électrochimique. Les cotransporteurs Na^+ /glucose, sujets de ce travail, se servent de l'énergie du gradient de Na^+ afin d'énergiser le transport de glucose vers l'intérieur de la cellule. Parce qu'ils se servent du gradient électrochimique d'un premier soluté pour en transporter un autre, on appelle ces transporteurs des transporteurs secondairement actifs.

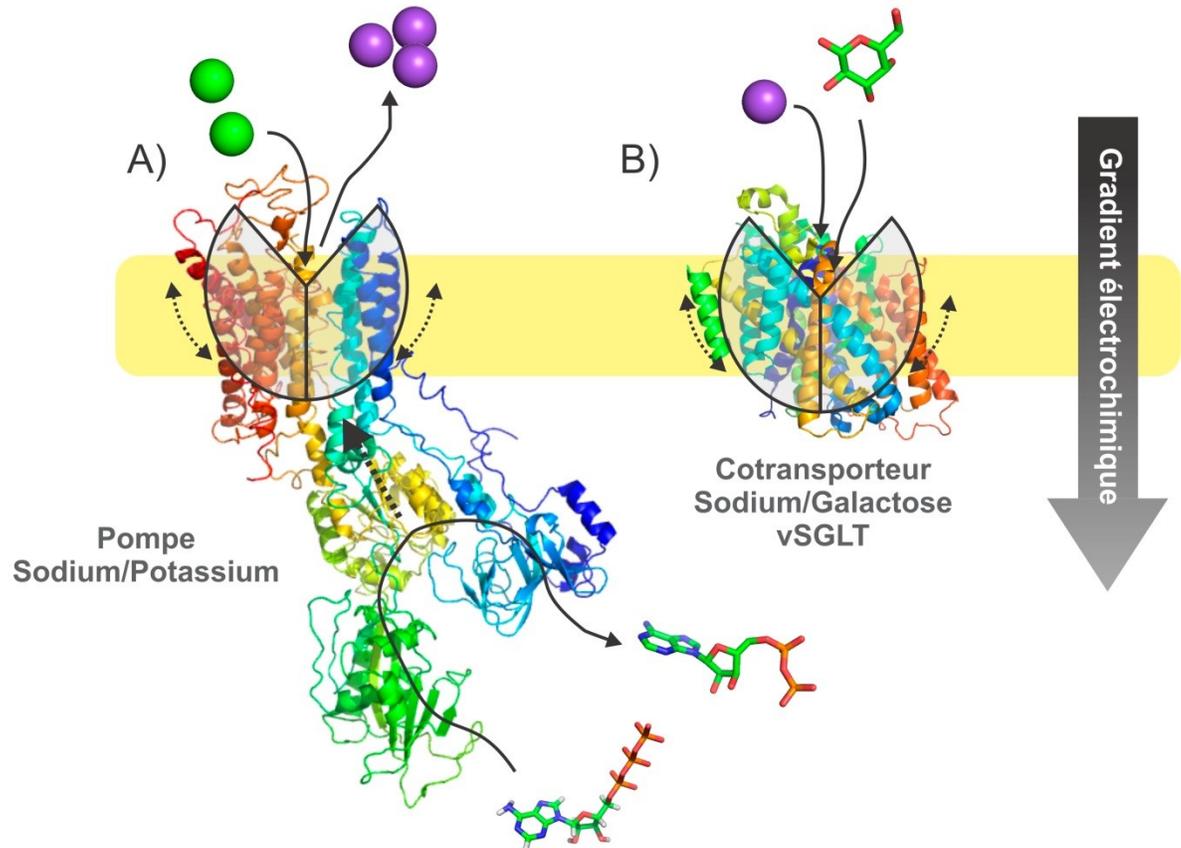


Figure 1-4 Transport actif

A) Transport actif primaire par la pompe Na⁺/K⁺-ATPase (10) et B) actif secondaire par le cotransporteur Na⁺/Galactose vSGLT (2). Réalisé avec (3).

1.2.1.3 Uniporteur, symporteur et antiporteur

Un uniporteur est un transporteur qui pompe un type de soluté. Un symporteur pompe plus qu'un type de solutés dans la même direction, et peut aussi être appelé cotransporteur. Finalement, un antiporteur pompe différents types de solutés dans des directions opposées, et peut être qualifié d'échangeur. Selon les définitions données plus haut, les uniporteurs sont des transporteurs passifs tandis que les échangeurs et les symporteurs font du transport secondairement actif.

Les cotransporteurs Na⁺/glucose transportent le glucose et le Na⁺ dans le sens du gradient électrochimique du Na⁺, d'où leur appellation de cotransporteurs.

1.3 L'accès-alterné

Les transporteurs membranaires, qu'ils soient passifs, actifs primaires ou secondaires, uniporteurs, symporteurs ou antiporteurs, ont une fonction commune et partagent les mêmes principes structurels au niveau de leurs organisations primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire.

De par l'accès-alterné, les transporteurs ont une stœchiométrie fixe, c'est-à-dire le ratio entre les différentes molécules transportées est (théoriquement) toujours le même. Par exemple ce ratio est de 2 Na⁺ par glucose pour le cotransporteur Na⁺/glucose SGLT1. L'accès-alterné est une explication conceptuelle cohérente du mécanisme sous-jacent.

Le mécanisme d'accès-alterné propose que le transporteur possède (au moins) 2 conformations majeures. Une conformation où le site de liaison est exposé du côté intracellulaire (C_i), et une conformation où le site de liaison est exposé du côté extracellulaire (C_e). L'inter-conversion entre ces 2 conformations permet la translocation du substrat au travers de la membrane (11). Ce mécanisme implique donc des mouvements importants au niveau de la protéine et, dans certains cas, une certaine sensibilité au potentiel membranaire.

Dans cette section, je débiterai par une étude des sites de liaisons présents chez les protéines membranaires. J'aborderai d'abord l'architecture de ces sites, pour ensuite étudier leurs mécanismes de sélectivité et finalement étudier les rôles de la liaison des cations dans le mécanisme général de la protéine. Ensuite, je vais expliciter les mouvements macromoléculaires chez les protéines membranaires, caractériser les domaines senseurs de voltage connus (voltage sensing domain, VSD) et finalement résumer les deux principaux mécanismes de cotransport retrouvés dans la littérature. Ceci sera évidemment fait en mettant l'accent sur les protéines qui font du transport secondairement actif couplé au transport de cations monovalents.

1.3.1 Architecture du site de liaison

L'interaction entre les enzymes et leurs ligands a lieu à des endroits bien définis qu'on appelle les sites de liaison. Les interactions sont non covalentes et peuvent donc être des liaisons hydrogènes ou ioniques, des interactions de van der Waals, hydrophobiques ou cation- π , ou encore des ponts salins. Le site de liaison fournit une coordination de l'ion qui remplace avantageusement la coordination par le milieu aqueux. Je vais caractériser l'architecture des sites de liaison des cations, en accordant une attention particulière aux cations monovalents (M^+), plus particulièrement le Na^+ et le K^+ .

Une caractérisation systématique des sites de liaisons des ions métalliques a été réalisée par Harding (12-15). Il en ressort que la coordination des ions par les protéines est principalement due aux molécules d'eau, puis aux oxygènes des carbonyles de la chaîne principale du polypeptide. Bien que tous les acides aminés puissent être utilisés comme ligand, une faible préférence pour Ala, Gly, leu, Ile, Val, Ser, Thr, Asp et Asn est décelable. Dans le cas de Na^+ et de K^+ , jusqu'à 90 % des interactions répertoriées dans le «Cambridge structural database» sont avec des O (13). Les distances des interactions Na^+-O et K^+-O ont aussi été caractérisés, donnant une moyenne de 2.40 et de 2.77 Å, respectivement. Il est aussi connu que les sites de liaison des M^+ génèrent des coquilles de coordination tridimensionnelles intégrant généralement de 5 à 8 liaisons.

1.3.1.1 Mécanisme de sélectivité

Les sites de liaisons des protéines membranaires sont sélectifs, c'est-à-dire qu'ils peuvent distinguer entre les différents ions et substrat. Ceci est remarquable car, par exemple, la différence entre l'ion Na^+ et l'ion K^+ ne réside que dans une différence de rayon de 0.4Å ($K^+ : 1.33 \text{ \AA}$, $Na^+ : 0.97\text{\AA}$) (16). On utilise souvent deux concepts distincts dans l'analyse des mécanismes de sélectivité qui sont utilisés dans les sites de liaison des enzymes et d'autres protéines.

Une première vision, plus ancienne, propose des sites de liaison rigides qui doivent leur sélectivité à la rigidité de la structure locale. Cette théorie fut d'abord introduite chez

les enzymes par Fischer en 1894 sous le nom de mécanisme clé-serrure (Lock-and-key mechanism) (17). C'est cette vision qui fut mise de l'avant chez les protéines membranaires par Bezanilla et Armstrong (snug fit) en 1972 afin d'expliquer la sélectivité des canaux potassiques (18).

Une vision plus récente propose plutôt des sites de liaison flexibles dont la sélectivité est due aux interactions ligand-substrat et ligand-ligand. Encore une fois, cette théorie fut d'abord introduite chez les enzymes en 1958 par Koshland (induce fit) (19) et reprise dans les années 2000 par Roux pour expliquer la sélectivité des canaux potassiques (20). Il est à noter que c'est cette vision qui est cohérente (21) avec la théorie de la force du champ (Field Strength Model) proposé par Eisenman au début des années 1960 (22). Ainsi, selon la théorie de la force du champ, la sélectivité au niveau des ions provient de la différence d'énergie ΔE des différents ions causée par la déshydratation de l'ion par le site de liaisons :

$$\Delta E = E_{ion-site\ de\ liaison} - E_{ion-eau} \quad (1-1)$$

Aussi, il est suggéré dans la littérature par les défenseurs de chacun de ces deux modèles que ceux-ci sont mutuellement exclusifs, tant au niveau d'un même site de liaison qu'au niveau conceptuel. Par contre, ceci a été démontré inexact tel que dans le cas d'un site de liaison de type rigide chez la valinomycine et dans le cas de la coexistence d'un site de liaison rigide et d'un site de liaison flexible chez LeuT (23, 24).

1.3.1.2 Rôles des ions

Plusieurs protéines nécessitent la présence d'ions afin de pouvoir accueillir leurs substrats. Ceux-ci peuvent agir de 2 façons : comme cofacteur ou par allostérie. Dans le 1^{er} cas, l'ion sert à coordonner le substrat directement. Il fait donc partie du site actif. Dans le 2^e cas, la liaison de l'ion à son site déclenche des changements conformationnels au niveau du site actif, et ce sans être en contact direct avec le substrat. Une étude portant sur LeuT illustre bien ces 2 rôles (25). Il y est suggéré qu'un premier sodium se lie d'abord dans un

site éloigné du site de liaison de la leucine (Na2), ce qui permet à un ion Na^+ seul ou à un ion Na^+ associé à une leucine d'aller occuper un site adjacent au site de liaison de la leucine (Na1). Ceci reflète un rôle allostérique pour Na2 et un rôle de cofacteur pour Na1.

Bien que les cinétiques des mécanismes de cofacteur et d'allostérie soient théoriquement différenciables, il arrive souvent que les erreurs expérimentales empêchent une détermination sans équivoque du mécanisme (26). Les structures cristallographiques se révèlent donc extrêmement pertinentes pour déterminer le type de mécanisme et le fonctionnement de celui-ci.

1.3.2 Mouvements macromoléculaires

Les changements conformationnels globaux nécessaires au mécanisme d'accès alterné sont souvent réalisés par quelques déformations ponctuelles, laissant le reste de la structure inchangée. Ces mouvements doivent avoir un faible coût énergétique et donc être dus à des structures particulières.

Ces mouvements peuvent varier par rapport aux groupes impliqués (fragment, domaine, sous-unité) et par rapport à l'étendue du mouvement lui-même (distance parcourue, degré de torsion et de rotation). Les protéines peuvent être sensibles à de nombreux stimuli tels le pH, la présence de ligands, l'exposition à la lumière, l'application de forces mécaniques et évidemment le potentiel membranaire comme dans le cas des SGLTs.

Je vais donc caractériser les mécanismes qui permettent à certains cotransporteurs d'effectuer l'accès-alterné.

1.3.2.1 Mouvement de charnière

Le mouvement de charnière se fait de part et d'autre d'un pivot flexible au niveau de la chaîne principale. Si les 2 unités effectuant le mouvement sont reliées par une interface, le mouvement est parallèle à l'interface. Ce mouvement peut être effectué par un seul brin β , par un feuillet β ou par une hélice α (27).

Le mouvement de charnière au niveau du brin β est le plus simple car il n'implique que quelques grands changements au niveau des angles de torsion de la chaîne principale. Une rotation de près de 60° peut résulter de ce mouvement.

Le mouvement de charnière au niveau du feuillet β est déjà sensiblement plus complexe car il requiert que les brins β conservent leurs liens hydrogènes. La rotation de chaque brin doit donc être parallèle à la fois à l'autre brin et au plan de torsion général.

Finalement, le mouvement de charnière au niveau des hélices α (twist) est sujet à encore plus de contrainte au niveau stérique et au niveau des liens hydrogènes. Ceci force les déformations importantes à faire intervenir plusieurs torsions au niveau des résidus afin de produire une flexion importante de l'hélice.

Par contre, la présence d'une brisure de l'hélice α (kink) permet d'échapper aux contraintes stériques propres à l'hélice α . Souvent associé à la présence de prolines, ce motif permet des angles de torsion beaucoup plus importants et une flexibilité accrue (27). Ce motif crucial permet aussi de coordonner la liaison d'ions à la fois par des chaînes latérales et les chaînes principales ainsi exposées, mais aussi par le dipôle propre aux hélices α (28). Jusqu'à présent, cette structure a été identifiées chez un transporteur actif (SerCa), et quatre transporteurs secondaires (NhaA, LeuT_{Aa}, l'échangeur ClC H⁺/Cl⁻ et Glt_{Ph}) au niveau d'hélices transmembranaires.

Le motif de brisure des hélices α est fortement corrélé avec la présence d'une symétrie inversée entre les domaines d'une même protéine, qui est retrouvée chez les quatre transporteurs secondaires mentionnés ci-haut. Ceci est d'autant plus remarquable qu'une telle symétrie n'est ni décelable par la comparaison des 2 moitiés de la structure primaire d'une même protéine, ni par alignement de séquence entre une protéine dont la structure symétrique est connue et une autre dont la structure ne l'est pas. Tous ces éléments suggèrent que la brisure au niveau d'une hélice α joue un rôle prépondérant dans la translocation des substrats (28).

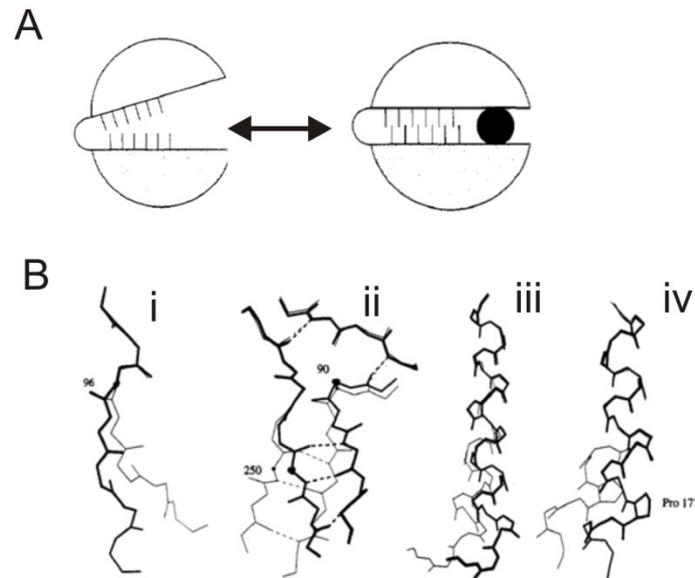


Figure 1-5 Mouvement de charnière

A. Mécanisme général. **B.** Mouvement de charnière au niveau d'un brin β (i), d'un feuillet β (ii), d'une hélice α (iii) et d'une brisure d'hélice α (iv)(27).

1.3.3 Mouvement de cisaillement

Le mouvement de cisaillement décrit le glissement qui se produit à l'interface de 2 unités. La principale contrainte structurelle de ce mouvement est au niveau des liens créés par l'interdigitation des chaînes latérales qui doivent être conservés, sous peine d'un fort coût énergétique. Ainsi, les chaînes latérales permettent le mouvement de cisaillement par de petits changements d'orientation ($<15^\circ$) tandis que les chaînes principales ne se déforment pas de façon appréciable. Ceci limite donc le mouvement relatif entre deux unités à 2 Å. Ainsi, l'addition du mouvement de cisaillement de plusieurs interfaces est nécessaire pour produire un changement important de la conformation.

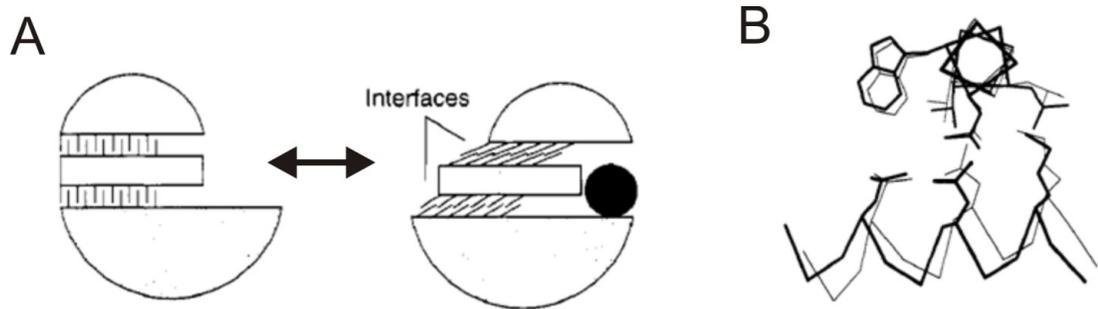


Figure 1-6 Mouvement de cisaillement

A. Schéma du mécanisme général. B. Mouvements typiques des chaînes latérales et principales. (27)

1.3.3.1 Pore à clapet, mouvement par point de pivot et cycle de transport

Durant leur cycle de transport les cotransporteurs doivent alterner entre une conformation où le site de liaison est exposé du côté intracellulaire et une conformation où le site de liaison est exposé du côté extracellulaire, soit C_i et C_e . Pour ce faire, deux mécanismes ont été proposés : les pores à clapet (gated-pore) (29) et le mouvement par point de pivot (rocker-switch movement) (30).

Le modèle de pores à clapet suggère un transporteur dont l'architecture générale s'apparente à celle d'un canal, mais qui possède 2 portes qui s'ouvrent en alternance. Le modèle de mouvement par point de pivot suggère plutôt une rotation des domaines eux-mêmes autour du site de liaison (11).

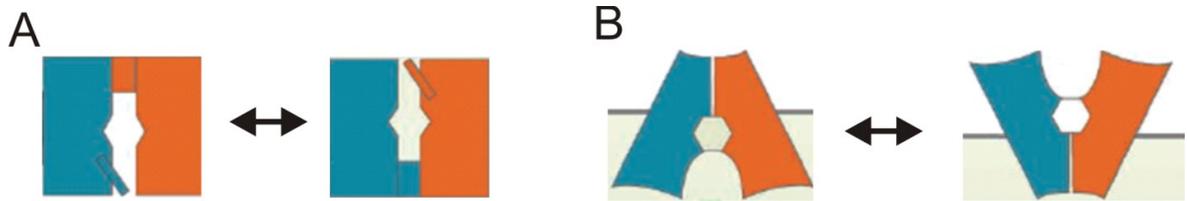


Figure 1-7 Mécanismes d'accès-alterné

A) Le pore à clapets. B) Le point de pivot. Tiré de (11)

Ces 2 mécanismes sont appuyés par des structures cristallographiques. Par exemple, le mécanisme du point de pivot est sûrement présent chez deux membres de la famille majeure des facilitateurs (Major Facilitator Superfamily (MFS)), la perméase de glycérol-3-phosphate GlpT (31) et la perméase de lactose LacY (32), tandis que les structures d'un homologue bactérien des transporteurs d'acides aminés excitateurs (Excitatory Amino Acid Transporters (EAATs)), le transporteur d'aspartate de *Pyrococcus horikoshii* Glt_{Ph} (33) et la structure du transporteur de leucine de *Aquifex aeolicus* LeuT_{Aa} (34), un homologue bactérien de la famille des symporteurs Na⁺/neurotransmetteurs, appuient le mécanisme du pore à clapet.

Ces mécanismes présentent 2 différences intrinsèques. Premièrement, le changement conformationnel effectué par les pores à clapet est beaucoup moins important que celui réalisé par le point de pivot. Deuxièmement, de par leur architecture plus proche de celle des canaux, les pores à clapet sont souvent pensé plus prompts à générer des courants de fuite (leak current) (11). Ainsi, ceux-ci pourraient être simplement dû à l'ouverture simultanée des clapets intra- et extracellulaires. Les courants de fuite sont observés entre autres chez SGLT1 (35).

Finalement, comme dans le cas du débat « site de liaison rigide/site de liaison flexible », la nature intègre ses 2 mécanismes et ce même parfois dans le même transporteur. C'est notamment le cas de l'homologue bactérien des SGLTs, le cotransporteur Na⁺/galactose de *Vibrio parahaemolyticus* (vSGLT) (36-38).

1.3.3.2 Le domaine senseur de voltage

Les domaines senseurs de voltage (voltage sensing domain, VSD) se retrouvent chez de nombreuses classes de protéines membranaires, notamment les canaux électrosensibles (voltage-gated) Ca^{2+} , Na^{+} et K^{+} , les phosphatases électrosensibles, les cotransporteurs Na^{+} /glucose et les pompes $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase. La présence d'un VSD permet de rationaliser l'effet du potentiel transmembranaire sur les transporteurs et les canaux. De manière très générale, les VSDs intègrent des charges qui perçoivent potentiel transmembranaire. Un changement de potentiel transmembranaire induit un changement au niveau du VSD, ce qui induit un changement sur la protéine associée. Parmi les différents VSDs, le domaine électrosensible du canal K^{+} de Shaker qui fait partie de la famille Kv1 est de loin le plus étudié (39).

Le canal K^{+} de Shaker est un homotétramère. Le domaine du pore est composé des deux hélices transmembranaires (S5 et S6) de chacun des quatre monomères et est responsable de la sélectivité au potassium via la boucle reliant ces deux hélices (boucle P). L'ouverture et la fermeture du pore sont quant à elles modulées par l'entrecroisement des hélices S6 des quatre monomères, qui agissent comme clapets (gates). La fermeture et l'ouverture de ce clapet sont directement influencées par le potentiel membranaire. Ainsi, chez les canaux potassiques sensibles au potentiel, le pore (S5-S6) est lié de façon covalente au VSD formé par les hélices transmembranaires S1-S4 par le maillon S4-S5 (S4-S5 linker) (40).

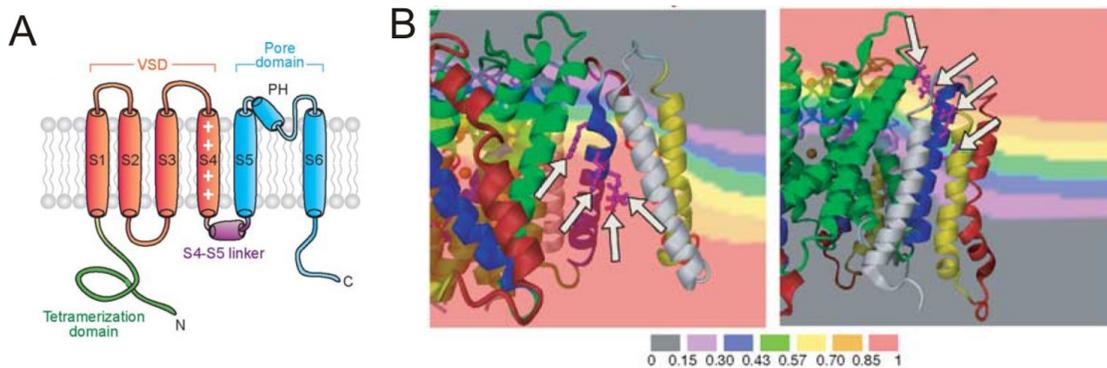


Figure 1-8 Le module senseur de voltage.

A. Architecture du VSD de type S1-S4 des canaux Kv (41). **B.** Modulation du potentiel membranaire par le canal potassique Shaker (42). Les bandes colorées correspondent à des fractions du potentiel transmembranaire total.

Malgré ces axiomes de base, le mécanisme général de perception du voltage n'est pas résolu. La difficulté majeure dans l'élaboration d'un mécanisme est due au fait que le courant généré par le VSD est fonction non pas de la distance parcourue par les charges, mais du champ électrique ressenti par les charges, champ qui ne varie pas de façon linéaire au travers de la membrane.

C'est de là que proviennent les différences fondamentales entre les modèles. La controverse oppose 3 classes de modèles, tous proposés pour le VSD des canaux Kv. Ce sont le modèle du transporteur (transporter model), le modèle de l'hélice-vis (helical screw model) et le modèle de la pagaie électrosensible (paddle model ou chicken wing model). Je vais mettre en lumière les implications de chacun.

Le modèle du transporteur propose qu'au repos les charges soient dans une crevasse en contact avec le milieu intracellulaire. Lors de l'activation, les charges se déplacent dans une autre crevasse, mettant celles-ci en contact avec le milieu extracellulaire. Pour ce faire, un changement de l'angle de l'axe de l'hélice α par rapport à la membrane, une rotation de l'hélice α et aussi un changement conformationnel au niveau des crevasses est nécessaire. Ce modèle nécessite donc un déplacement minimal des charges qui sont sur le VSD, soit de 2 à 3 Å (41).

Dans le modèle de l'hélice-vis, l'hélice S4 tourne sur elle-même tout en se déplaçant parallèlement à son axe. Ceci permet de déplacer les charges au travers du champ transmembranaire en alternant leur exposition aux milieux intra et extracellulaire. Les différentes variations de ce modèle suggèrent des rotations de 60 à 180° accompagnées de translations de 4 à 15 Å (41).

Finalement, dans le modèle de la pagaie électrosensible, S4 et la partie extracellulaire de S3 forment un motif de boucle en épingle, la pagaie, qui se déplace en bloc au travers de la membrane. Dans l'état au repos, S4 est situé profondément dans la membrane, à proximité de l'interface intracellulaire. Lors de la dépolarisation, la pagaie se rend jusqu'à l'interface extracellulaire, se déplaçant de 15 à 20 Å. Point important, les arginines de S4 sont continuellement exposées aux lipides dans ce modèle, contrairement aux deux modèles précédents (41). Il est à noter que ce modèle est ici présenté pour sa valeur historique, la conformation l'ayant inspiré étant due à un artefact de cristallisation.

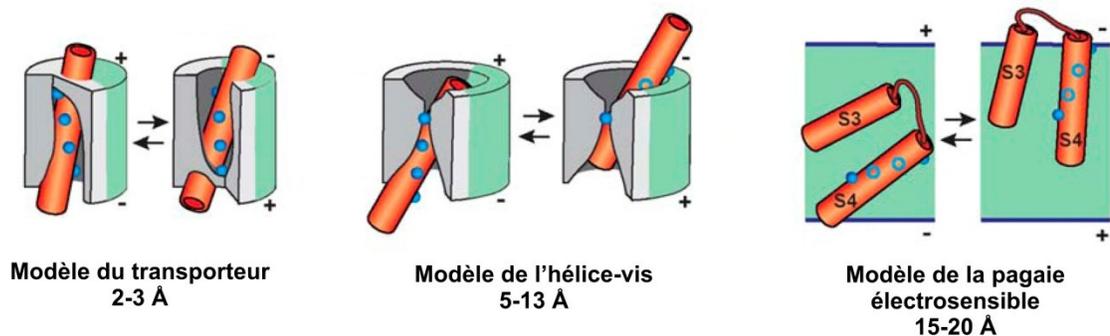


Figure 1-9 Mécanismes proposés pour le VSD

La protéine est identifiée en gris, les lipides en vert, les charges positives par des points bleus, et les cylindres rouges représentent l'hélice S4 sauf si noté autrement. Adapté de (41).

Plus récemment, un modèle dit « consensus » a été proposé (43). Ainsi, un modèle de l'état au repos du VSD (basé sur la structure cristallographique du VSD de canaux potassiques voltage dépendant dans un état actif) est généré en y intégrant plusieurs contraintes structurelles découlant d'interactions résidu-résidu déduites d'observations

expérimentales. De façon fort intéressante, le modèle résultant possède des caractéristiques cohérentes avec les 3 classes de modèles proposés. Ainsi, le mouvement le plus important est la translation de S4 le long de son axe principal tel que prédit pas le modèle de l'hélice-vis. Par contre, plusieurs des résidus du VSD sont exposés aux lipides membranaires tel que prédit pas le modèle de la pagaie électrosensible. Finalement, une réorganisation importante des crevasses aqueuses permet une modulation du potentiel perçu par les charges du VSD, tel que décrit par le modèle du transporteur.

Bien que le mécanisme exact ne soit pas connu, la présence d'une architecture générale similaire chez les senseurs de voltage des canaux potassiques, des canaux calciques, des pores protoniques électrosensibles et les phosphatases électrosensibles (39) permet de présumer une modularité au senseur de type S1-S4 (39).

Il est à noter que la présence d'un VSD non « standard » a été rapportée chez les canaux KcsA (44, 45). Essentiellement, la présence du potentiel transmembranaire cause la réorientation de la chaîne latérale du résidu Glu71, affectant son interaction avec Asp80 ce qui déstabilise la conformation ouverte du filtre de sélectivité. Ainsi, le filtre de sélectivité devient non-conductif suivant un processus qui rappelle l'inactivation de type C des canaux Kv.

1.4 La famille des SLC5

Maintenant que les bases conceptuelles sont posées, nous pouvons nous attaquer à la caractérisation de la famille des SLC5 (solute carrier family 5). C'est en effet à cette famille de gènes qu'appartiennent les SGLTs, le sujet de ce travail.

La famille SLC5 comprend 12 gènes chez l'homme. Ceux-ci sont exprimés dans de nombreux tissus. La fonction de 11 de ces 12 protéines est connue. Dix d'entre elles sont des cotransporteurs Na^+ /substrat. Seulement trois de ces 10 sont strictement des cotransporteurs Na^+ /sucre, soit SGLT1, 2 et 4. La protéine restante, SGLT3, est un senseur de glucose (46).

Cette section débutera par un survol historique de l'étude des SGLTs, suivie par une énumération succincte des différents membres de la famille SLC5 exprimés chez l'homme ainsi qu'un homologue bactérien (vSGLT), et finalement de l'importance physiologique des SGLTs.

1.4.1 Survol historique

Le mécanisme général pour le transport actif de glucose a été proposé pour la 1^{ière} fois au début des années 60 par Robert Crane. Ce mécanisme impliquait le cotransport secondairement actif du glucose qui agit au niveau de la membrane en bordure en brosse de l'épithélium de l'intestin en se servant du gradient électrochimique du sodium qui est généré par la pompe Na^+/K^+ -ATPase. Des études subséquentes ont validé ce modèle, qui est maintenant accepté de manière généralisée. Durant les années 1980, il fut établi qu'au niveau du rein, le début du tubule proximal (early proximal tubule) comportait un cotransporteur Na^+ /glucose à basse affinité/haute capacité, alors que la fin du tubule proximal (late proximal tubule) comportait un cotransporteur Na^+ /glucose à haute affinité/faible capacité.

Presque 30 ans plus tard, le clonage des cotransporteurs Na^+ /glucose humain SGLT1 et SGLT2 suivi par le clonage de cotransporteurs homologue permit le regroupement de ceux-ci dans la famille des SLC5. La famille des SLC5 est formée chez l'homme par 12 membres et inclus des cotransporteurs sodium-dépendant pour le glucose, le galactose, le *myo*-inositol et aussi quelques autres substrats. Le clonage permit l'expression dans différents systèmes d'expression hétérologues, notamment les ovocytes de xénopes. Ceci permit la détermination des stœchiométries de transport pour les différents cotransporteurs Na^+ /glucose ainsi que le raffinement de leurs modèles cinétiques à l'aide notamment de l'électrophysiologie et de test de transport (uptakes) radioactifs (47).

Plus récemment, la cristallisation en 2008 d'un homologue bactérien des SGLTs (2, 48), le cotransporteur Na^+ /galactose de *Vibrio parahaemolyticus* (vSGLT), permet maintenant l'étude au niveau atomistique du mécanisme de cotransport. Étonnamment, ceci

mit en évidence que les SGLTs partagent une architecture générale commune avec plusieurs familles de gènes de transporteurs sans liens apparents avec la famille des SLC5 (36-38).

1.4.2 Les différents membres de la famille SLC5 importants pour l'homme

1.4.2.1 SGLT1

Le cotransporteur Na⁺/glucose 1 (SGLT1, *SLC5A1*) est de loin le membre le plus étudié des SGLTs. Ceci est en partie dû au fait qu'il ait été le premier membre de cette famille à être cloné en 1987, mais aussi à son expression robuste dans un nombre varié de systèmes d'expression (notamment les ovocytes de xénopes, les lignées cellulaires de mammifères et d'insectes, les bactéries et les protéines recombinantes purifiées) et finalement à son importance physiologique.

SGLT1 est une protéine membranaire d'environ 75 kDa (49). Elle est principalement exprimée dans l'intestin grêle et dans les tubules proximaux du rein, où elle est responsable du transport de glucose et du galactose (47, 50). Elle est aussi présente dans le cœur et dans les glandes salivaires (50). En tant que cotransporteur actif secondaire, SGLT1 utilise le gradient électrochimique du Na⁺ généré par la pompe Na⁺/K⁺-ATPase afin de pomper 1 sucre par 2 ions Na⁺ au travers la membrane cellulaire vers le milieu intracellulaire (50, 51). SGLT1 transporte le glucose ($K_m = 0.4$ mM) ainsi que le galactose, et est inhibé par la phlorizine. En comparaison avec SGLT2, SGLT1 est un transporteur à haute affinité/faible capacité (52).

SGLT1 est un cotransporteur électrogénique. Ceci signifie que chaque événement de cotransport (c.-à-d. le pompage de 1 sucre au travers la membrane) cause le transfert net de 2 charges élémentaires (e) (c.-à-d. les 2 ions Na⁺) d'un côté à l'autre de la membrane. Cette caractéristique, combinée à une expression robuste de SGLT1 dans les systèmes d'expression hétérologues tels les oocytes de xénopes, a permis des études

électrophysiologiques poussées, menant à l'élaboration des bases du mécanisme de cotransport.

1.4.2.2 SGLT2

Le cotransporteur humain Na^+ /glucose 2 (SGLT2, SLC5A2) s'exprime principalement au niveau des tubules proximaux des reins. Il y est responsable de la réabsorption de 90% du glucose filtré, le reste étant transporté par SGLT1. SGLT2 présente une faible affinité pour le glucose ($K_m=2$ mM) (52) et une stœchiométrie de 1 Na: 1 glucose. Ceci implique que la force électromotrice d'un seul Na est disponible durant le cotransport, réduisant ainsi la capacité de SGLT2 à concentrer le Na^+ par rapport à SGLT1, qui a une stœchiométrie de 2 Na: 1 glucose.

Malgré son clonage au début des années 90, le très faible niveau d'expression de SGLT2 dans les systèmes d'expression hétérologues (47, 51) a limité de façon considérable son étude. Ayant depuis peu été identifié comme une nouvelle cible thérapeutique pour le contrôle de la glycémie chez les diabétiques, SGLT2 est présentement le sujet d'une attention considérable (52).

1.4.2.3 SGLT3-5

SGLT3 (SLC5A4) a été décrit comme un senseur de glucose chez l'homme, de par le fait qu'il transporte extrêmement faiblement le glucose tout en générant, en présence de glucose externe, un fort courant entrant qui contribue à la dépolarisation de la cellule. En opposition à cela, chez le porc SGLT3 couple de façon stricte le transport du Na^+ et du glucose. Chez l'humain, SGLT3 est présent dans les muscles et les neurones (47, 50).

SGLT4 (SLC5A9) est considéré comme un cotransporteur Na^+ /Mannose. La présence ARN messenger dans l'intestin grêle et le rein suggère l'expression de SGLT4 dans ces tissus (53).

Peu est connu à propos de SGLT5 (SLC5A10), sinon qu'il s'exprime dans le rein (47).

1.4.2.4 SMIT1-2, NIS, SMCT1-2, SMVT et CHT1

Le cotransporteur $\text{Na}^+/\text{myo-inositol}$ 1 (SMIT1, SLC5A3) est principalement un cotransporteur $\text{Na}^+/\text{myo-inositol}$, mais est aussi connu pour transporter le D-glucose avec une affinité faible (47). Le *myo-inositol* est un "osmolyte compatible", c'est-à-dire permet à la cellule de contrôler son osmolarité sans avoir d'autres effets significatifs (54). Dans le rein, le *myo-inositol* est un des quelques osmolytes compatibles qui est accumulé dans les cellules afin d'atteindre une haute osmolarité intracellulaire sans augmenter la concentration en ions du cytosol (55).

SMIT2 (SLC5A11) est lui aussi un cotransporteur $\text{Na}^+/\text{myo-inositol}$. Parce qu'il est lui aussi connu pour cotransporter faiblement le D-glucose, il est aussi parfois nommé SGLT6. Sa stœchiométrie est de 2 Na^+ : 1 substrat. Cette protéine de 75 kDa est exprimée dans le rein, le cœur, les muscles squelettiques, le foie et le cerveau. SMIT2 est responsable pour le transport luminal du *myo-inositol* dans l'intestin et les tubules proximaux des reins (55).

NIS (SLC5A5) est un transporteur Na^+/iode . Sa stœchiométrie est de 2 Na^+ :1 iode, et il est exprimé dans la thyroïde, les glandes salivaires, les muqueuses gastriques et les glandes mammaires (56).

Le transporteur $\text{Na}/\text{monocarboxylate}$ 1 (SMCT1, SLC8A8) à une stœchiométrie de 2 Na^+ : 1 monocarboxylate. Il est impliqué dans l'absorption des acides gras volatiles (short chain fatty acids) dans le colon et l'intestin grêle, dans la réabsorption du lactate et du pyruvate dans le rein et dans l'absorption (uptake) cellulaire de lactates et des corps cétonés dans les neurones. Il a été démontré que SMCT1 est inhibé par certains anti-inflammatoires non-stéroïdiens tels que l'ibuprofène, la kétoprofène et la fénoprofène (57).

SMCT2 (SLC5A12) est un transporteur $\text{Na}^+/\text{monocarboxylate}$ à basse affinité. Il est localisé dans l'intestin et les tubules proximaux du rein, mais est aussi présent dans les astrocytes du cerveau et les cellules de Müller de la rétine. Le transport effectué par

SMCT2 est électroneutre, ce qui suggère une stoechiométrie de 1 Na⁺: 1 monocarboxylate (57).

Le transporteur de multivitamine Na⁺-dépendant SMVT (SLC5A6) est responsable pour le transport de l'acide pantothénique, la biotine et le l'acide lipoïque. Des affinités de 1-3 μM et de 8-20 μM ont été rapportées, pour le panthothénate et la biotine respectivement. Une certaine controverse subsiste par rapport à la possibilité d'une stoechiométrie de 1 ou 2 Na⁺ par substrat cotransporté. SMVT est exprimé de façon ubiquitaire dans les tissus de mammifères, mais des concentrations plus élevées d'ARN messenger sont présentent dans l'intestin, le rein et le placenta (58).

Le transporteur de choline à haute affinité CHT1 (SLC5A7) est responsable pour la réabsorption de la choline des fentes synaptiques vers les neurones présynaptiques. CHT1 partage une identité de séquence que de 20-26 % avec les autres membres de la famille des SLC5 (59).

Tableau 1-2 La famille des SLC5

Nom de la protéine	Gène chez l'homme	Substrat principal
SGLT1	<i>SLC5A1</i>	glucose, galactose
SGLT2	<i>SLC5A2</i>	glucose
SGLT3	<i>SLC5A4</i>	Na ⁺
SGLT4	<i>SLC5A9</i>	mannose
SGLT5	<i>SLC5A10</i>	
SMIT1	<i>SLCA3</i>	<i>myo</i> -inositol
SMIT2 or SGLT6	<i>SLC5A11</i>	<i>myo</i> -inositol
NIS	<i>SLC5A5</i>	iode
SMCT1	<i>SLC5A8</i>	monocarboxyles
SMCT2	<i>SLC5A12</i>	monocarboxyles
SMVT	<i>SLC5A6</i>	acide pantothénique, biotine, acide lipoïque
CHT1	<i>SLC5A7</i>	choline

1.4.2.5 vSGLT

Le transporteur Na⁺/galactose de *Vibrio parahaemolyticus* (vSGLT) est un membre bactérien de la famille SLC5. vSGLT transporte de façon Na-dépendante le galactose, le fucose et le glucose, et est inhibé par la phlorizine. Sa stœchiométrie est de 1 Na⁺ : 1 sucre (60).

Malgré son origine bactérienne qui permet son expression en grande quantité, il y a un manque cruel de données fonctionnelles sur ce cotransporteur, vSGLT revêt une importance particulière pour l'étude des membres des SLC5 présents chez l'homme. En effet, c'est le seul membre de la famille des SLC5 dont la structure a été résolue à un niveau

atomistique à ce jour. Une étude détaillée de la structure de vSGLT, et des implications pour les autres membres des SLC5, sera faite à la section suivante.

1.4.3 Les cotransporteurs Na^+ /glucose dans leurs contextes physiologiques

1.4.3.1 Transport transépithélial du glucose dans l'intestin et le rein.

De loin le rôle physiologique le plus important, ou du moins le plus étudié, des SGLTs est le transport transépithélial du glucose dans l'intestin et le rein. Je vais donc commencer par situer les SGLTs dans le contexte du transport transépithélial.

La présence d'un gradient électrochimique de Na^+ est essentielle au fonctionnement des SGLTs. Ce gradient est généré par la pompe Na^+/K^+ -ATPase, localisée du côté basolatéral de la cellule épithéliale. La pompe Na^+/K^+ -ATPase est un antiporteur actif primaire qui pompe 3 Na^+ hors de la cellule contre 2 K^+ dans la cellule, en utilisant l'énergie découlant de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Le gradient de Na^+ ainsi créé permet aux SGLTs de pomper le glucose au travers de la membrane apicale de la cellule épithéliale. Les molécules de glucose pourront alors traverser la membrane basolatérale par les uniporteurs passifs de glucoses (GLUTs, famille SLC2). C'est ainsi que ces 3 groupes de protéines (pompe Na^+/K^+ -ATPase, SGLTs et GLUTs) permettent l'absorption transépithéliale de glucose. Si le glucose sanguin a une concentration de 5 mM, la concentration intracellulaire doit monter au dessus de 5 mM pour pouvoir permettre la sortie basolatérale passive de glucose. C'est le travail du cotransporteur apical d'atteindre cette forte concentration intracellulaire face à des concentrations qui peuvent être beaucoup plus faibles. Ce mécanisme général est valide dans l'intestin et le rein (50).

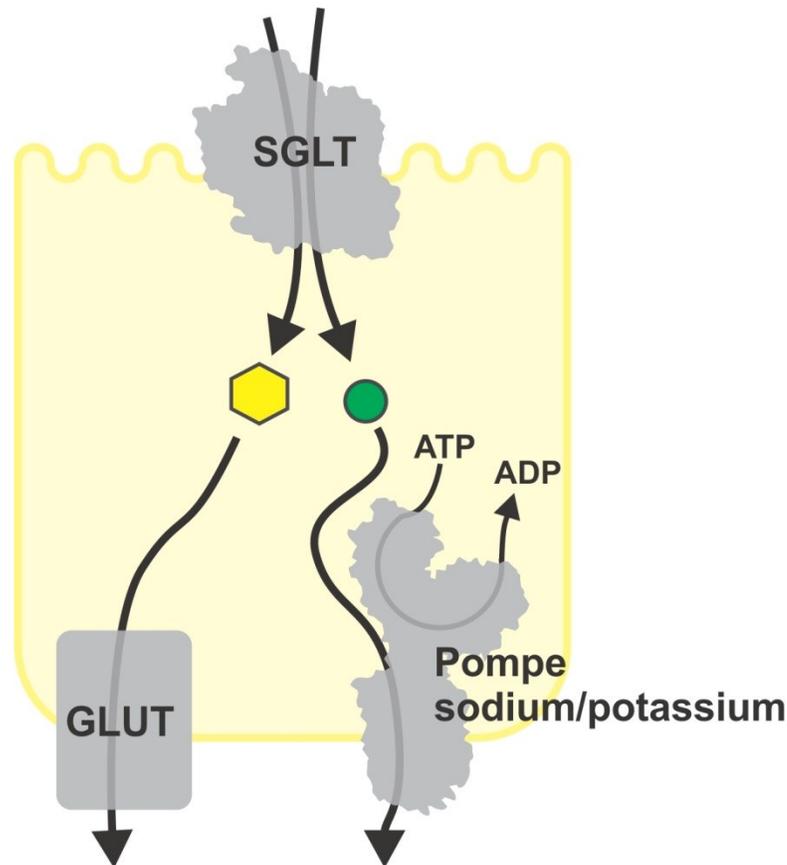


Figure 1-10 Absorption transépithéliale de glucose.

La pompe Na^+/K^+ -ATPase utilise l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP afin de pomper hors de la cellule le sodium de manière active primaire. Ceci a pour effet de baisser la concentration intracellulaire et par conséquent générer un gradient transmembranaire de sodium. Ce gradient permet aux cotransporteurs sodium/glucose de réaliser le transport actif secondaire de sucre (hexagone jaune) et de sodium (cercle vert) au travers de la membrane apicale. Le sucre traverse par la suite la membrane basolatérale via les transporteurs passifs GLUTs. Traduit de (1).

1.4.3.1.1 Absorption du glucose dans le rein

SGLT2 est un transporteur à faible affinité/haute capacité, alors que SGLT1 est un transporteur à haute affinité/faible capacité. Ceci leur permet de jouer un rôle complémentaire dans la réabsorption du glucose au niveau du rein.

SGLT2 est exprimé dans le début des tubules proximaux (early proximal tubules) du rein. Grâce à sa haute capacité, il est responsable de jusqu'à 90% de la réabsorption

totale de glucose au niveau du rein. Exprimé à la section S3 du tubule proximal (late proximal tubule), SGLT1 se charge du 10% restant de par sa haute affinité. Cette combinaison SGLT1 et 2 est responsable de la presque totalité de la réabsorption du glucose, ce qui correspond normalement à environ 180 g de glucose par jours (52).

1.4.3.2 La malabsorption glucose-galactose et la glucosurie rénale familiale

Il est connu qu'une expression déficiente des SGLT1 dans l'intestin cause la maladie connue sous le nom du syndrome de la malabsorption glucose-galactose (GGM). La GGM est due à l'incapacité de l'intestin d'absorber le glucose et le galactose, causant ainsi des diarrhées potentiellement mortelles chez les nouveau-nés (47). Plus qu'une trentaine de mutations causant la GGM ont été identifiées au niveau du gène SLC5A1. La plupart de ces mutations empêchent l'acheminement correct de SGLT1 à la membrane apicale, bien que certaines mutations semblent produire des SGLT1 mutés qui sont à la membrane apicale mais qui sont non fonctionnels (51).

La glucosurie familiale rénale (FRG) est quant à elle causée par un défaut d'expression de SGLT2. La FRG cause l'excrétion excessive ($>1 \text{ g jours}^{-1}$) de glucose dans l'urine, bien que les niveaux de glucose sanguin restent normaux (49). La FRG cause une perte accrue de glucose dans l'urine, mais ne présente autrement aucune problématique pathologique sérieuse (52). Ainsi, les patients atteints de la FRG ne présentent pas de pathologies rénales chroniques et ne tombent pas en hypoglycémie. C'est d'ailleurs un des éléments qui encourage le développement actuel d'inhibiteurs de SGLT2 dans l'optique de traiter le diabète de type 2 (49).

1.4.3.3 Importance pharmaceutique des SGLTs

1.4.3.3.1 La thérapie de réhydratation par voie orale

La thérapie de réhydratation par voie orale (ORT) est un traitement remarquablement efficace pour corriger la déshydratation associée aux diarrhées infectieuses. L'administration par voie orale d'une solution aqueuse contenant du Na^+ et du glucose

stimule le cotransport associé à SGLT1 au niveau de l'intestin, ce qui encourage alors l'absorption d'eau par osmose (50).

1.4.3.3.2 SGLT2 et le diabète de type 2

La suppression du cotransport associé à SGLT2 stimule une excrétion accrue du glucose, ce qui ramène les concentrations de glucose dans le plasma sanguin à des concentrations normales et génère peu d'effets secondaires. SGLT2 permet donc l'étude de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement du diabète de type 2. L'inhibition de SGLT2 aiderait les patients diabétiques à réguler leur glycémie, et ainsi limiter les effets délétères de l'hyperglycémie sur de nombreux organes, dont les reins (néphropathies diabétiques). L'utilisation de phlorizine, l'inhibiteur classique de SGLT2, est prohibée par sa faible biodisponibilité, son manque de spécificité pour SGLT2 et l'inhibition d'un de ses métabolites (la phlorétine) sur GLUT1. Ceci a stimulé le développement de nouveaux inhibiteurs spécifiques à SGLT2, basé sur la structure de la phlorizine. Quelques-unes de ces molécules ont présentement complétés les essais cliniques de phase III (52).

1.5 La famille structurale de LeuT

Jusqu'à présent, seules 2 structures cristallographiques de protéines de la famille des SLC5 ont été résolues, toutes deux pour l'homologue bactérien vSGLT (Protein Databank accession codes (PDBs) 3DH4 and 2XQ2). Elles permettent pour la première fois de visualiser la structure d'un membre de la famille des SLC5 à un niveau atomistique. Ces 2 structures comportent 14 segments transmembranaires (TMs) et des extrémités N- et C-terminales extracellulaires. Toutes 2 comportent un vestibule intracellulaire, suggérant une conformation ouverte vers l'intérieur.

De façon tout à fait inattendue, la disposition des hélices α centrales de vSGLT présente une forte homologie structurale avec celle des hélices centrales d'un membre de la famille des symporteurs Na^+ /neurotransmetteurs (Neurotransmitter/ Na^+ Symporter. NSS), le transporteur de leucine LeuT. Il fut par la suite démontré que cette même architecture générale est aussi partagée par **1**) l'échangeur agmatine/arginine AdiC (61) de la

superfamille des facilitateurs majeurs (Major Facilitator Superfamily, MFS), **2**) par le symporteur de nucléobases/cation Mhp1 (62) de la famille des symporteurs-nucléobase-cation-1 (nucleobase-cation-symport-1 family, NCS1), **3**) le symporteur Na⁺/bétaine BetP (63) et l'antiporteur L-carnitine/ γ -butyrobétaine CaiT (64), tous deux de la famille des transporteurs de bétaine/choline/carnitine (betaine/choline/carnitine transporters family, BCCT), **4**) le transporteur d'acides aminés proton-dépendant ApcT (65) et l'antiporteur L-glutamate/acide γ -aminobutyrique GadC (66), de la famille des transporteurs d'acides aminés, polyamines et organocations (amino acid, polyamine, and organocation (APC) transporters family). Ces transporteurs, c.-à-d. *vSGLT*, *LeuT*, *Adic*, *Mhp1*, *BetP*, *CaiT*, *ApcT* et *GadC*, forment une nouvelle famille structurale, nommée "la famille structurale de LeuT".

vSGLT est homologue par sa séquence avec les membres humains de la famille des SLC5. Il présente par exemple une identité de séquence de 32% avec hSGLT1. Ceci permet l'utilisation de la structure cristallographique de *vSGLT* comme un modèle fiable pour l'architecture générale des membres de la famille des SLC5. Bien qu'il n'y ait pas de similarité de séquence importante entre les différents membres de la famille structurale de LeuT, de fortes similarités structurales permettent de faire des comparaisons pertinentes. Ceci se révèle particulièrement significatif étant donné que les différents membres de la famille structurale de LeuT ont été cristallisés **1**) dans différentes conformations (ouverte vers l'intérieur ou vers l'extérieur, occluse ou non) et **2**) avec différents substrats dans leur site de liaison, notamment un second ion Na⁺ (38).

1.5.1 L'architecture LeuT

Bien que la présence d'une architecture commune entre des membres de famille sans liens soit intéressante, les particularités mêmes de cette architecture sont à la fois surprenantes et fascinantes. Dû à l'identification initiale de cette architecture chez LeuT, la convention actuelle veut que les 10 hélices α formant le domaine central soient numérotées de 1 à 10. Ainsi, pour *vSGLT*, l'hélice α N-terminale devient le segment transmembranaire -1 (TM -1), le suivant devient TM1, et ainsi de suite. « L'architecture LeuT » est

caractérisée par une symétrie inversée. Ceci signifie que les TM1-5 et les TM6-10 sont superposables suite à une rotation d'environ 180° autour d'un axe parallèle au plan de la membrane (voir **Figure 1-11**). Ceci est inattendu, car il n'y a pas de similarité de séquence significative entre les TM1-5 et les TM6-10 (36, 38). Il est à noter que d'autres architectures se retrouvant chez d'autres transporteurs tels que LacY, le transporteur d'ATP/ADP, NhaA et Glt_{Ph}, présentent aussi des répétitions structurales et/ou des symétries inversées (37, 38).

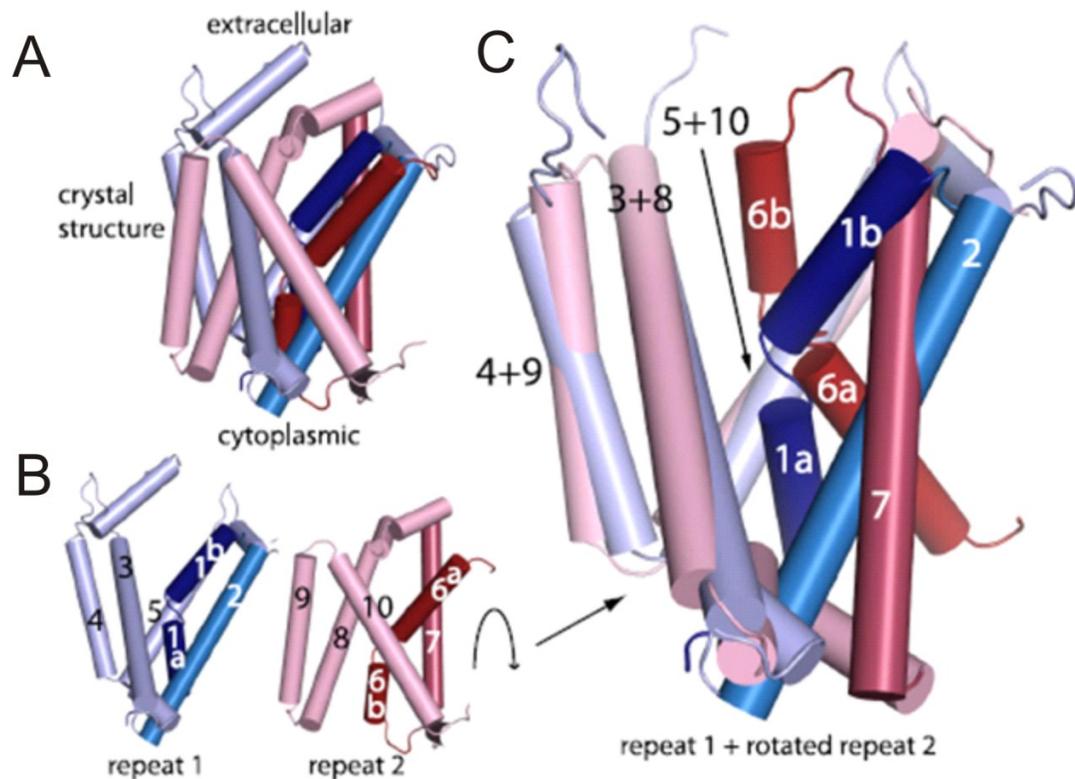


Figure 1-11 Symétrie inversée chez LeuT

A. Structure générale de LeuT. B. Mise en évidence des 2 domaines symétriques. C. Superposition des domaines par une rotation de 180° . Tiré de (67).

1.5.2 Les membres cristallisés de la famille structurale de LeuT

1.5.2.1 LeuT

Le transporteur de leucine de *Aquifex aeolicus* LeuT_{Aa} est un homologue bactérien de la famille des symporteurs Na⁺/neurotransmetteurs, aussi appelé SLC6 (68). Les membres de cette famille utilisent les gradients électrochimiques de Na⁺ et Cl⁻ afin de pomper une large gamme de substrats, incluant des amines biogènes (sérotonine, dopamine, norépinéphrine), des acides aminés (acide γ -aminobutyrique, glycine, proline, taurine) et des osmolytes (bétaine, créatine) (69). Les transporteurs de dopamine et de sérotonine DAT et SERT font notamment partie de cette famille (68).

Ainsi, un mauvais fonctionnement des symporteurs Na⁺/neurotransmetteurs contribue à de nombreuses maladies, incluant la dépression, le Parkinson, l'intolérance orthostatique et l'épilepsie. De plus, les symporteurs Na⁺/neurotransmetteurs sont les cibles de plusieurs substances addictives telles que la cocaïne et les amphétamines, ainsi que de médicaments tels les antiépileptiques (69).

1.5.2.2 Mhp1

Les transporteurs de la famille des symporteurs-nucléobase-cation-1 NCS1 sont des éléments essentiels des voies de recyclage des nucléobases et des métabolites associés. Le transporteur de benzyle-hydatoiné de *Microbacterium liquefaciens* Mhp1 fait partie de cette famille. Parmi les substrats connus, on retrouve l'allatoïne, l'uracile, la cytosine, la purine, la thiamine et la nicotinamide riboside. Mhp1 ne présente des identités de séquence que de 15% et 16 % avec LeuT et vSGLT (62).

1.5.2.3 BetP

Le transporteur de bétaine de *Corynebacterium glutamicum*. BetP est un membre de la famille des transporteurs de bétaine/choline/carnitine BCCT. Les membres de cette famille se retrouvent chez les bactéries et les archaea, et transportent tous des petites

molécules possédant un groupement ammonium quaternaire tel que la bétaïne, la choline, la L-carnitine et la γ -butyrobétaïne (70, 71).

BetP est osmorégulé. Ainsi, BetP permet de prévenir les effets délétères de gradients osmotiques en accumulant l'osmolyte compatible bétaïne pour obtenir de très hautes concentrations allant jusqu'à 2 M (70). BetP a été cristallisé sous la forme d'un trimère. Cette architecture quaternaire est appuyée par des études en conditions physiologiques qui suggèrent que la trimerisation est nécessaire à l'osmorégulation (72).

1.5.2.4 CaiT

L'antiporteur de carnitine/butyrobétaïne CaiT fait aussi partie de la famille des transporteurs de bétaïne/choline/carnitine BCCT (73). Il a lui aussi été cristallisé en tant que trimère, ce qui est appuyé par des études en conditions physiologiques (74). Par contre, il n'est pas osmorégulé (75) et est sodium- et proton-indépendant (64, 73).

1.5.2.5 AdiC

L'antiporteur bactérien de L-arginine/agmatine AdiC fait partie de la superfamille des transporteurs d'acides aminés, de polyamines et d'organocations APC (76). Chez *E. Coli*, AdiC est une composante essentielle des systèmes de résistance à l'acidité (acid-resistance system) de par l'expulsion d'un proton par cycle d'antiport (77).

La superfamille des APC comprend plus de 250 membres chez divers organismes (77), notamment ApcT et GadC. Les membres de cette famille jouent des rôles essentiels au niveau de l'absorption de nutriments, le recyclage de neurotransmetteurs, l'homéostasie ionique et la régulation du volume de la cellule (65). De plus la superfamille APC englobe deux familles de transporteurs eucaryotes qui affectent la santé humaine : les transporteurs d'acides aminés cationiques CATs et les transporteurs de L-acides aminés LATs. Des membres des LATs sont directement impliqués dans le maintien de l'équilibre de la cellule au niveau de l'oxydoréduction (cell redox balance), l'infection par herpèsvirus humain de type 8, la dépendance à la cocaïne et le cancer (76).

1.5.2.6 ApcT

ApcT est lui aussi un membre de la superfamille des APC. ApcT est un transporteur Na^+ -indépendant à large spécificité d'acides aminés qui est actifs à pH acide. Ainsi, il a été démontré qu'il transporte de façon stéréospécifique la L-acide glutamique, L-Alanine, L-Sérine, L-glutamine et L-phénylalanine. Ce transport est probablement couplé à un transport de protons (65).

1.5.2.7 GadC

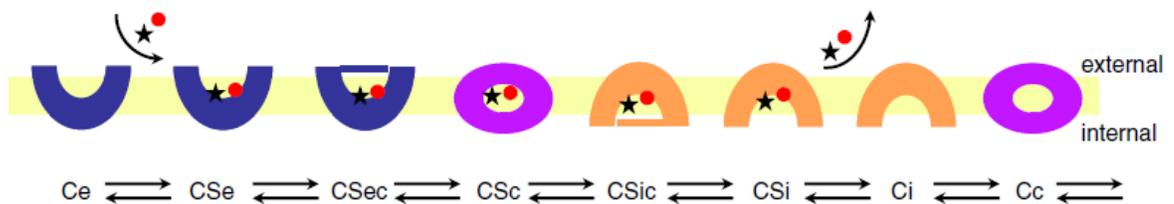
L'antiporteur de glutamate/acide γ -aminobutyrique GadC est lui aussi un membre de la superfamille des APC et est impliqué dans les systèmes de résistance à l'acidité. Bien que peu d'information existe sur son mode de fonctionnement, on sait que le transport associé à GadC n'est robuste qu'en présence de pH inférieur à 5.5 (66).

Tableau 1-3 Membres de la famille structurale de LeuT

Transporteur famille	Type de transport	Conformations cristallisées†	PBD
LeuT	Symport	C _{Sec}	2A65
NSS	Na ⁺ /leucine	C _{Se}	3F3A
SLC6		C _{Sec}	3F48
		C _{Sec}	2QEI
		C _{Sec}	2QJU
		C _{Sec}	3GWV
		C _{Se}	3GJC
vSGLT	Symport	C _{Sic}	3DH4
SSS	Na ⁺ /glucose	C _i	2XQ2
SLC5			
Mhp1	Symport	C _e	2JLN
NCS1	Na ⁺ /hydantoin	C _{Sec}	2JLO
		C _i	2X79
BetP	Symport	C _{Sic}	2WIT
BCCT	Bétaïne-glycine/Na ⁺	C _{Si}	3P03
CaiT	Antiport	C _{Si}	3HFX
BCCT	L-carnitine/ γ -butyrobétaïne	C _i	2WSW
		C _{Si}	2WSX

AdiC	Antiport	Ce	3NCY
APC	Arginine/agmatine	Ce	3LRB
		Ce	3LRC
		CSec	3LIL
		CSe	3OB6
ApcT	Symport	Cic	3GIA
APC	H+/acide amine		
GadC	Antiport	Ci	4DJK
APC	glutamate /acide γ -aminobutyrique		

†Les conformations cristallisées font référence aux états:



Adapté de (38).

1.6 La relation structure/fonction chez les cotransporteurs Na^+ /glucose

L'analyse des différentes structures des membres de la famille structurale de LeuT nous permet une compréhension nouvelle des caractéristiques structurales des cotransporteurs Na^+ /glucose.

1.6.1 Les sites de liaison des substrats

Le site S1 de liaison du sucre a été directement identifié dans un des cristaux de vSGLT (PDB 3DH4). De plus, sa position relative est conservée chez les autres membres de la famille structurale de LeuT. S1 est situé approximativement au milieu de la membrane, au centre du domaine central. Ceci correspond à des segments « déroulés » des premiers TMs de chacune des répétitions structurales (c.-à-d. le TM1 dans la répétition TM1-5 et le TM6 dans la répétition TM6-10). Un rôle important dans la liaison des substrats est attribué à ces segments déroulés de par l'environnement polaire qu'ils permettent de générer. Bien que la position des sites de liaison soit conservée entre les différents membres de la famille structurale de LeuT, les interactions spécifiques permettant d'accommoder les différents substrats varient considérablement. Chez vSGLT, les groupes hydroxyles de la molécule de galactose sont coordonnés par les atomes hydrogène des chaînes latérales des TM1, 6, 7 et 10 (36).

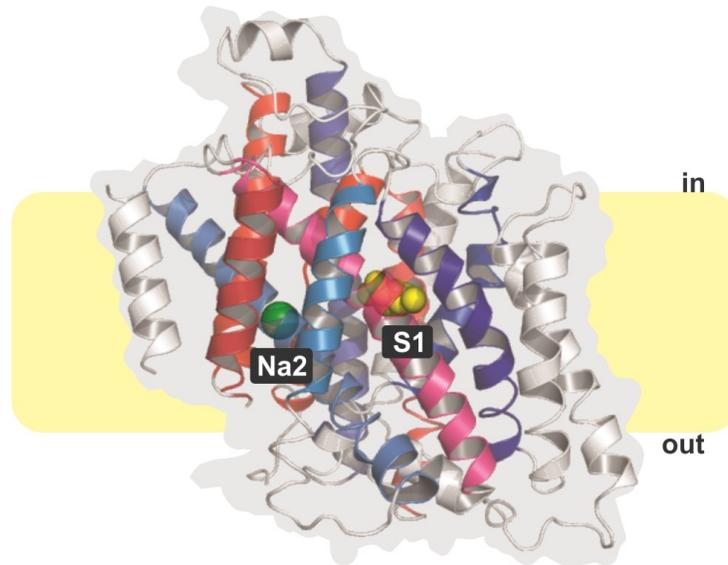


Figure 1-12 Structure générale de vSGLT

Les répétitions structurales formant la symétrie inverse sont identifiées par des tons de rouge (TM1-5) et de bleu (TM6-10). S1 est présenté avec un galactose lié (en jaune), et Na2 avec un sodium lié (en vert). Les TMs supplémentaires (TM -1, 11-13) sont en blanc, la silhouette de la représentation volumétrique de vSGLT en gris pâle, et la membrane cellulaire en jaune pâle. Tiré de (1).

1.6.1.1 Les sites de liaison des Na⁺

Tous les membres Na⁺-dépendant de la famille structurale de LeuT (LeuT, vSGLT1 et BetP) possèdent un site de liaison du Na⁺ éloigné de 7-10 Å du site de liaison du substrat S1. Ce site, nommé Na2 pour des raisons historiques, est situé à l'intersection des TM1 et TM8. La nécessité de la présence de Na pour la liaison du sucre suggère une régulation allostérique de S1 par Na2. Chez les membres de la famille structurale de LeuT ayant une stœchiométrie de 2 Na⁺:1 substrat (LeuT et BetP), le second ion Na⁺ interagit directement avec le substrat lié en S1 (37).

vSGLT possède une stœchiométrie (1 Na⁺ :1 galactose). Conséquemment, un seul site de liaison du Na⁺ a été identifié chez vSGLT (78), soit Na2. Par contre, 2 sites sont présents chez LeuT (79).

Le site de liaison du Na⁺ de vSGLT est situé à l'intersection des TM1 et TM8, à près de 10 Å du site de liaison du galactose. Le Na⁺ est donc probablement coordonné par les oxygènes des carbonyles de Ala-62, Ile-65 (TM1) et Ala-361 (TM8) et les oxygènes des hydroxyles de Ser-365 (TM8). Ce site est homologue au 2^e site de liaison du Na⁺ retrouvé chez LeuT par la coordination du Na⁺ et par son emplacement.

Le 1^{er} site de liaison du Na⁺ de LeuT, qui est absent chez vSGLT, présente une configuration octaédrale incorporant l'oxygène du carboxyle du substrat, la leucine, les oxygènes des carbonyles de Ala-22 (TM1) et Thr-254 (TM6), les oxygènes des carbonyles des chaînes latérales de Asn-27 (TM1) et Asn-28 (TM7) et l'oxygène de l'hydroxyle de Thr-254 (TM6).

Il est à noter que des simulations de dynamique moléculaire de la structure de vSGLT avec un ion Na⁺ assigné en Na2 (PDB 3DH4) indiquent que la forme cristallisée de vSGLT serait dans un état qui favorise le relâchement du Na⁺. En effet, l'ion Na quitte spontanément son site de liaison durant les premières ns de simulation (36, 37).

1.6.1.2 Site de liaison du substrat

Le site de liaison du galactose de vSGLT se situe au milieu de la membrane, entre des résidus hydrophobiques formant les clapets intra et extracellulaire, et est constitué des chaînes latérales des hélices TM2, TM3, TM7, TM8 et TM11. Les résidus Tyr-263 se positionnent directement sous le galactose tout en formant un clapet prévenant la sortie du sucre vers la large cavité hydrophile faisant face au milieu intracellulaire (78).

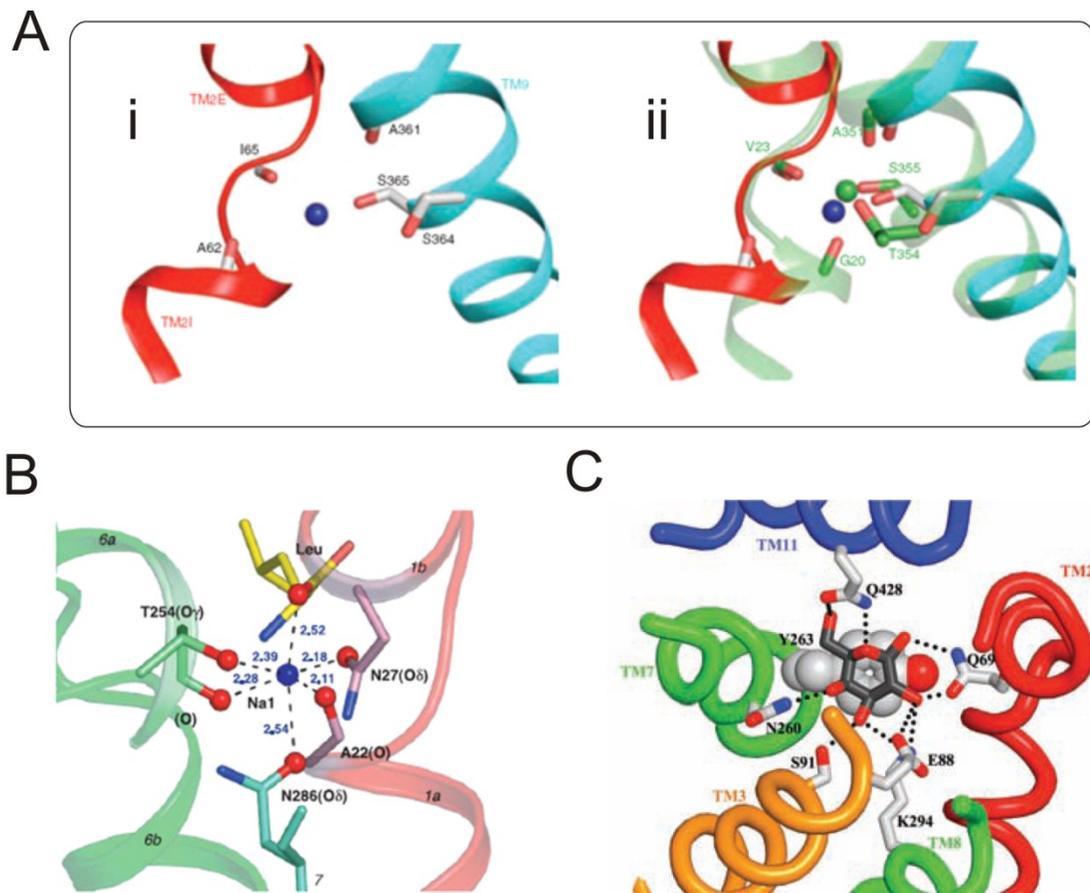


Figure 1-13 Sites de liaison

A.i. Site de liaison proposé du Na⁺ de vSGLT. ii. Superposition du site de vSGLT et du second site de LeuT (78). B. Site de liaison du sodium 1 (Na1) de LeuT (79). C. Site de liaison de galactose de vSGLT (78).

1.6.1.3 Mécanisme de sélectivité, ordre de liaison et type d'interaction

Il est difficile à priori de s'avancer au sujet du mécanisme de sélectivité, de l'ordre de liaison et du type d'interaction (allostérique vs cofacteur) impliqué dans la liaison des Na⁺ et du substrat des différents membres de la famille des SGLTs. En effet, seule deux structure de vSGLT sont connues, et de surcroit elles ne contiennent évidemment qu'un site de liaison du Na⁺. Par contre, la forte analogie structurelle entre LeuT et vSGLT, la présence d'une même stœchiométrie chez SGLT1, SMIT2 et LeuT (2Na⁺ : 1 substrat) et l'intérêt d'un mécanisme général (indépendamment des détails fins) m'incitent à considérer

une série d'articles de modélisation moléculaire sur LeuT portant précisément sur ces thèmes (25, 80, 81).

Il ressort de ces articles que les 2 sites de liaison du Na^+ sont hautement sélectifs vis-à-vis du K^+ et du Li^+ . De plus, les 2 sites de liaisons sont directement reliés car les 2 Na^+ sont respectivement coordonnés par les oxygènes des carbonyles des résidus Ala-22 et Val-23 (25). La dynamique moléculaire montre que l'absence d'ions dans le site de liaison du Na^+ le plus éloigné de la leucine (Na2) annihile la sélectivité du site de liaison du Na^+ en contact avec la leucine (Na1). Par contre, la sélectivité de Na2 est peu affectée par la présence ou l'absence de la leucine ou d'un ion en Na1. De plus, la leucine coordonne directement Na1 par son groupe carboxylate chargé négativement, ce qui révèle un lien évident entre le site de liaison du substrat et Na1 (25). Le retrait de cette charge négative du modèle diminue considérablement la sélectivité du site au Na^+ .

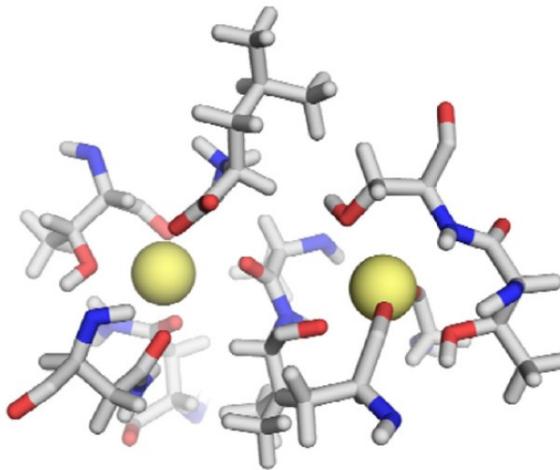


Figure 1-14 Relation entre les sites de liaison du Na^+ chez LeuT

Organisation des sites de liaison Na1 et Na2. Les ions sodiums sont présentés par des sphères jaunes. Tiré de (25).

Finalement, l'utilisation d'un modèle-jouet met en lumière les facteurs responsables de la sélectivité des 2 domaines. Seuls les groupes fonctionnels de la première couche de

coordination de Na1 et Na2 y sont inclus. Lorsque l'on permet aux groupes fonctionnels de bouger librement à l'intérieur d'une sphère de 3.5Å, le site Na1 maintient une forte sélectivité pour le Na⁺ par rapport au K⁺ tandis que Na2 perd toute sélectivité. Ceci démontre donc que la sélectivité de Na1 est principalement due aux interactions ion-ligand et ligand-ligand, selon le modèle de site flexible, tandis que la sélectivité de Na2 nécessite la présence de contraintes structurales locales, selon le modèle de site rigide (25).

Les auteurs suggèrent donc qu'un premier sodium se lie d'abord en Na2. Ceci stabilise Na1, ce qui permet à un ion Na⁺ seul ou à un ion Na⁺ associé à une leucine d'aller occuper Na1. Ceci reflète un rôle allostérique pour Na2 et un rôle de cofacteur pour Na1.

1.6.1.4 Hélice brisée et symétrie inversée

vSGLT et LeuT sont des exemples de motifs à hélice α brisée. Les brisures d'hélices α permettent la coordination des ions Na⁺ à la fois par les résidus ainsi exposés, mais aussi par les dipôles des hélices (28).

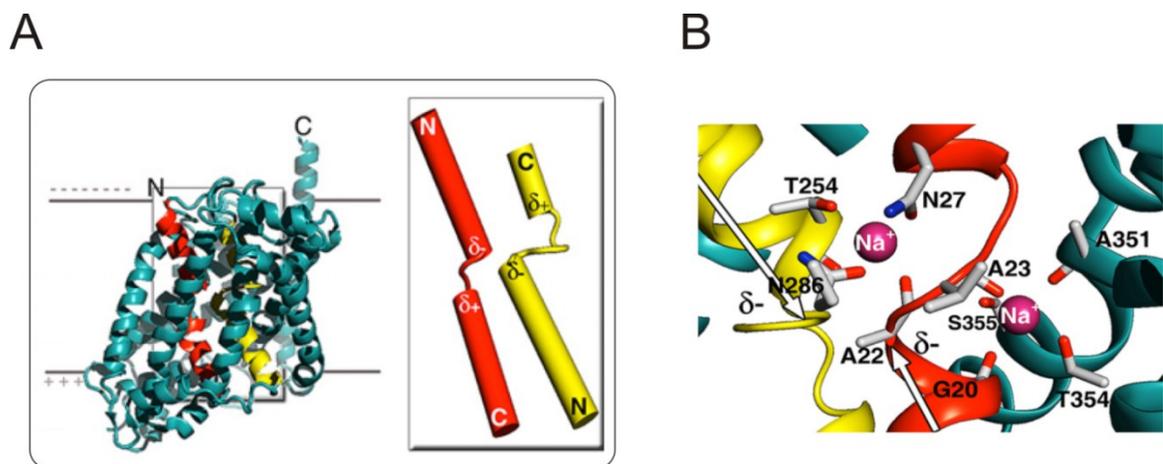


Figure 1-15 Hélices α brisées chez LeuT

A. Mise en évidence des hélices α brisées de LeuT. B. Contribution des hélices α brisées aux sites de liaison des ions de LeuT. (28)

1.6.2 Le mécanisme de cotransport

Les structures cristallographiques des membres de la famille structurale de LeuT suggèrent que les SGLTs présentent à la fois des caractéristiques propres aux mécanismes d'accès-alternés de pores à clapet et de point de pivot (36-38). Chez vSGLT, des chaînes latérales des TMs 1, 2, 6 et 10 forment des clapets intra- et extracellulaires, pouvant occlure l'accès au site de liaison à partir des vestibules intra/extracellulaire correspondant. Ainsi, de petits mouvements de ces chaînes latérales modulent l'accès au site de liaison d'une manière rappelant le mécanisme de pores à clapet. De plus, l'analyse des structures des membres de la famille structurale de LeuT cristallisés dans des conformations diverses suggère que vSGLT subit des changements conformationnels majeurs durant son cycle de cotransport. L'agencement structurel surnommé "la fagot de 4 hélice" (four-helix bundle) formé par les deux premiers TMs de chacune des répétitions structurales (c.-à-d. les TMs1, 2, 6 et 7) peut pivoter par jusqu'à 25°, ouvrant/fermant ainsi les vestibules intra/extracellulaire d'une manière rappelant le mécanisme d'accès-alterné par point de pivot (36, 38). Le pivot du fagot à 4 hélices revient essentiellement à interchanger les conformations des deux répétitions structurales. Ceci démontre qu'une forte corrélation relie les mécanismes d'accès-alterné et la symétrie inversée retrouvée dans la structure des transporteurs (38).

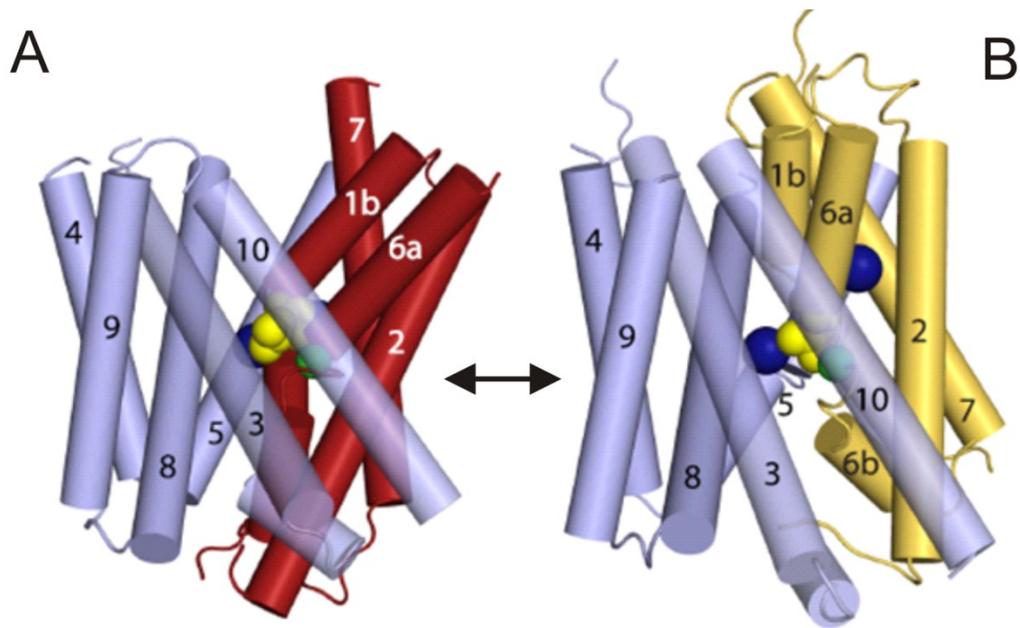


Figure 1-16 Modèle d'accès-alterné de LeuT proposé par Forrest et coll.

A. Structure cristallographique de LeuT dans l'état C_e. **B.** Prédiction de la structure de l'état C_i basée sur le motif de symétrie. Tiré de (67).

Ainsi, le mécanisme de cotransport putatif des transporteurs de la famille structurale de LeuT, basé sur le concept d'accès alterné, va comme suit. Dans l'état initial, les sites de liaison sont accessibles du côté extracellulaire seulement. Un premier ion Na⁺ peut alors se lier au site Na2 du transporteur, provoquant une augmentation de l'affinité du site de liaison S1 pour son substrat. La liaison subséquente du substrat (avec ou sans la liaison d'un second Na⁺, selon la stœchiométrie) provoque la fermeture des clapets extracellulaire, déclenchant la rotation du fagot de 4 hélices, entraînant la fermeture du vestibule intracellulaire et l'ouverture du vestibule intracellulaire. Ceci est suivi par l'ouverture du clapet intracellulaire, permettant un relâchement intracellulaire des ions Na⁺ et du substrat. Il est assumé que le transporteur vide subit un processus semblable afin de retourner à sa conformation initiale, réexposant ses sites de liaison au milieu extracellulaire (36). Finalement, de par leur homologie de séquence, il est raisonnable d'assumer que les membres de SLC5 partagent ce même mécanisme de cotransport général.

Bien que l'ordre de liaison chez les transporteurs Na/glucose est généralement accepté comme étant les ions en un premier temps puis le substrat, l'ordre de relâchement reste à être éclairci. Par contre, le relâchement spontané du Na^+ présent dans la structure cristallographique de vSGLT lors de simulation de dynamique moléculaire (36, 37) suggère que les ions Na^+ sont d'abord relâchés, suivi par le substrat.

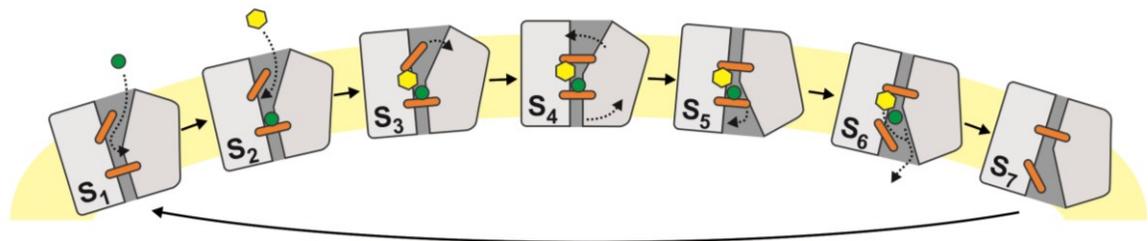


Figure 1-17 Le cycle de cotransport des cotransporteurs sodium/glucose

Le cotransporteur est initialement dans l'état S_1 , où les sites de liaisons sont exclusivement accessibles de par le côté extracellulaire. La liaison du sodium (cercle vert) mène à l'état S_2 , qui a une affinité accrue pour les sucres. La liaison du sucre (hexagone jaune) (état S_3) induit la fermeture des clapets extracellulaires (bâtonnets orange) (état S_4), ce qui permet la fermeture du vestibule extracellulaire et l'ouverture du vestibule intracellulaire de par la rotation du fagot de 4 hélices (pointe grise) (état S_5). S'ensuit l'ouverture des clapets intracellulaire (bâtonnets orange) (état S_6), ce qui permet le largage intracellulaire des substrats. Il est assumé que le transporteur vide (état S_7) suit un processus similaire afin de retourner au stade initial S_1 et réexposer les sites de liaison des substrats au côté extracellulaire.

1.6.3 Senseur de voltage

La présence d'un mécanisme sensible au voltage chez certains membres des SGLTs (notamment SGLT1 et SMIT2) est requise par la présence de courants préstationnaires (qui sont des courants de déplacement de charge), la dépendance en voltage des courants stationnaires et la dépendance en voltage de l'affinité du Na^+ et du MI. Il est donc clair que certaines transitions dans le mécanisme de cotransport doivent dépendre du potentiel membranaire, ce qui est inévitable lorsqu'un transporteur est électrogénique, ne serait-ce qu'au niveau de la translocation des espèces chargées. Par contre, de nombreux détails

restent irrésolus, notamment la présence ou non de charges intrinsèques au cotransporteur, la source de ces charges et leur mécanisme d'action.

Parce qu'on peut détecter des courants préstationnaires même en absence de Na^+ dans le milieu externe, on assume la présence d'un module senseur de voltage (82-85). Au mieux de mes connaissances, aucune étude basée sur les structures cristallographiques n'a permis de résoudre les bases structurelles de la sensibilité au voltage chez les SGLTs. Il est donc difficile de spéculer sur la nature de ce VSD.

Par contre, il est intéressant de noter que la boucle 12-13 de hSGLT1 comporte 12 résidus chargés répartis en 3 groupes séparés par 2 segments de 17 résidus et ayant des charges nettes importantes. Suivant la conformation suggérée à la **Figure 1-18**, cette boucle pourrait donc agir comme VSD selon un mécanisme semblable à ceux proposés pour les VSD des canaux Kv.

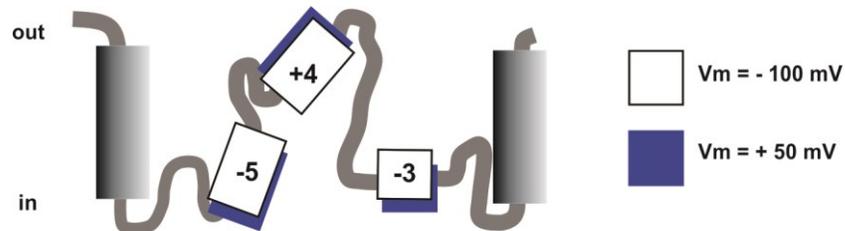


Figure 1-18 Résidus chargés de la boucle 12-13 de hSGLT1

Représentation schématique d'un arrangement transmembranaire plausible de la boucle 12-13 de hSGLT1 lui permettant de faire office de VSD.

1.7 Références

1. Sasseville, L. J., and J. Y. Lapointe. 2012. Structure and Function of Na⁺/Glucose Cotransporters. In *Encyclopedia of metalloproteins*. V. N. U. a. E. A. P. Robert H. Kretsinger, editor. Springer-Verlag New York Inc., New York.
2. Faham, S., A. Watanabe, G. M. Besserer, D. Cascio, A. Specht, B. A. Hirayama, E. M. Wright, and J. Abramson. 2008. The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na⁺/sugar symport. *Science* (New York, N.Y. 321:810-814.
3. Schrödinger_LLC. The PyMOL Molecular Graphics System.
4. Bruce Alberts, A. J., Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. Garland Science, New York.
5. Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, and W. FitzHugh. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.
6. Kumar, A., N. K. Tyagi, E. Arevalo, K. W. Miller, and R. K. H. Kinne. 2007. A proteomic study of sodium/D-glucose cotransporter 1 (SGLT1): topology of loop 13 and coverage of other functionally important domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics* 1774:968-974.
7. Ashcroft, F., D. Gadsby, and C. Miller. 2009. Introduction. The blurred boundary between channels and transporters We dedicate this volume to the memory of Peter Läuger, a pioneer of the link between channels and pumps. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364:145-147.
8. Horsefield, R., K. Nordén, M. Fellert, A. Backmark, S. Törnroth-Horsefield, A. C. T. van Scheltinga, J. Kvassman, P. Kjellbom, U. Johanson, and R. Neutze. 2008. High-resolution x-ray structure of human aquaporin 5. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:13327-13332.
9. Chaptal, V., S. Kwon, M. R. Sawaya, L. Guan, H. R. Kaback, and J. Abramson. 2011. Crystal structure of lactose permease in complex with an affinity inactivator yields unique insight into sugar recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:9361-9366.
10. Morth, J. P., B. P. Pedersen, M. S. Toustrup-Jensen, T. L. M. Sørensen, J. Petersen, J. P. Andersen, B. Vilsen, and P. Nissen. 2007. Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature* 450:1043-1049.
11. Nathan K. Karpowich, D.-N. W. 2008. Symmetric Transporters for Asymmetric Transport. In *Science* (New York, N.Y.
12. Harding, M. M. 2006. Small revisions to predicted distances around metal sites in proteins. In *Acta Crystallographica*.

13. Harding, M. M. 2002. Metal-ligand geometry relevant to proteins and in proteins: sodium and potassium. In *Acta Crystallographica*.
14. Harding, M. M. 2001. Geometry of metal-ligand interactions in proteins. In *Acta Crystallographica*.
15. Harding, M. M. 2004. The architecture of metal coordination groups in proteins. In *Acta Crystallographica*.
16. Carrell, C. J., L. A. Bush, F. S. Mathews, and E. Di Cera. 2006. High resolution crystal structures of free thrombin in the presence of K^+ reveal the molecular basis of monovalent cation selectivity and an inactive slow form. *Biophysical chemistry* 121:177-184.
17. Fischer, E. 1984. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. In *Berichte der Deutschen chemischen*
18. ARMSTRONG, F. B. a. C. M. 1972. Negative Conductance Caused by Entry. In *THE JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY*.
19. E, K. D. 1958. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. In *PNAS*.
20. Roux, B. 2005. ION CONDUCTION AND SELECTIVITY IN K^+ CHANNELS. In *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*.
21. Eisenman, G. 2011. Ion selectivity of proteins: lessons from molecular dynamics simulations on valinomycin. *The Journal of general physiology* 138:375-375.
22. Eisenman, G., and R. Horn. 1983. Ionic selectivity revisited: the role of kinetic and equilibrium processes in ion permeation through channels. *The Journal of membrane biology* 76:197-225.
23. Sergei Yu. Noskov, B. R. 2006. Ion selectivity in potassium channels. In *Biophysical Chemistry*.
24. Sergei Yu. Noskov, S. B. B. R. 2004. Control of ion selectivity in potassium channels by electrostatic and dynamic properties of carbonyl ligands. In *NATURE*.
25. Sergei Y. Noskov, B. R. 2008. Control of Ion Selectivity in LeuT: Two Na^+ Binding Sites with Two Different Mechanisms. In *J. Mol. Biol.*
26. MICHAEL J. PAGE, E. D. C. 2006. Role of Na^+ and K^+ in Enzyme Function. In *Physiol Rev*.
27. Mark Gerstein, A. M. L. a. C. C. 1994. Structural Mechanisms for Domain Movements in Proteins. In *Biochemistry*.
28. Emanuela Screpanti, C. H. 2007. Discontinuous membrane helices in transport proteins and their correlation with function In *Journal of Structural Biology*.

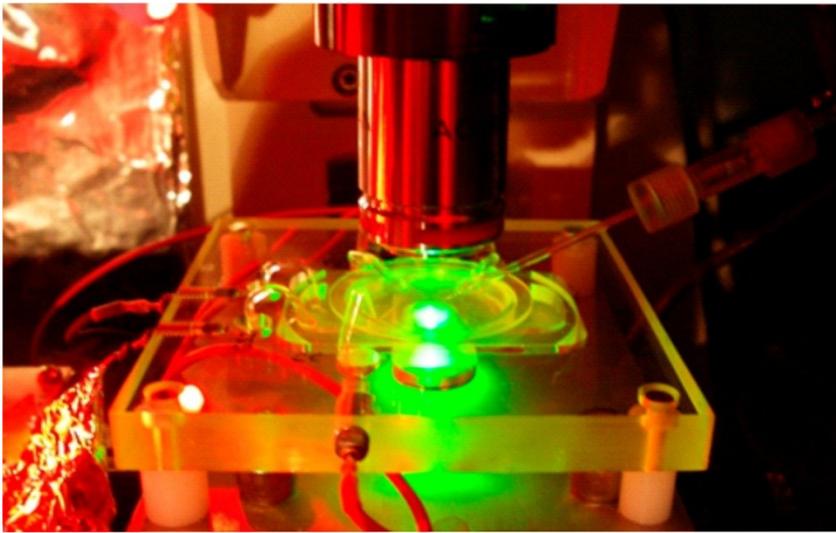
29. Vivader, G. A. 1966. Inhibition of parallel Flux and Augmentation of Counter Flux Shown by Transport Models not Involving a Mobile Carrier In *Journal of Theoretical Biology*.
30. Patlak, C. S. 1957. Contributions to the Theory of Active Transport: II. The gate Type non-Carrier Mechanism and Generalizations Concerning Tracer Flow, Efficiency, and Measurement of Energy Expenditure. In *Bulletin of Mathematical Biophysics*.
31. Yafei Huang, M. J. L., Jinmei Song, Manfred Auer, Da-Neng Wang. 2003. Structure and Mechanism of the Glycerol-3-Phosphate Transporter from *Escherichia coli*. In *Science* (New York, N.Y).
32. Jeff Abramson, I. S., Vladimir Kasho, Gillian Verner, H. Ronald Kaback, So Iwata. 2003. Structure and Mechanism of the Lactose Permease of *Escherichia coli*. In *Science* (New York, N.Y).
33. Dinesh Yernool, O. B., Yan Jin & Eric Gouaux. 2004. Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. In *Nature*.
34. Atsuko Yamashita, S. K. S., Toshimitsu Kawate¹, Yan Jin & Eric Gouaux. 2005. Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. In *Nature*.
35. Donald D. F. Loo, B. A. H., Anne-Kristine Meinild, Grischa Chandy, Thomas Zeuthen and Ernest M. Wright. 1999. Passive water and ion transport by cotransporters. In *Journal of Physiology*.
36. Abramson, J., and E. M. Wright. 2009. Structure and function of Na⁺-symporters with inverted repeats. *Current opinion in structural biology* 19:425-432.
37. Boudker, O., and G. Verdon. 2010. Structural perspectives on secondary active transporters. *Trends in pharmacological sciences*.
38. Forrest, L. R., R. Krämer, and C. Ziegler. 2010. The structural basis of secondary active transport mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*.
39. Bezanilla, F. 2008. How membrane proteins sense voltage. In *Nature Reviews*.
40. Vardanyan, V., and O. Pongs. 2012. Coupling of voltage-sensors to the channel pore: a comparative view. *Frontiers in Pharmacology* 3.
41. Francesco Tombola, M. M. P. a. E. Y. I. 2006. How Does Voltage Open an Ion Channel? In *The Annual Review of Cell and Developmental Biology*.
42. Baron Chanda, O. K. A., Rikard Blunck, Benoît Roux & Francisco Bezanilla. 2005. Gating charge displacement in voltage-gated ion channels involves limited transmembrane movement. In *Nature*.
43. Vargas, E., F. Bezanilla, and B. Roux. 2011. In search of a consensus model of the resting state of a voltage-sensing domain. *Neuron* 72:713-720.

44. Cordero-Morales, J. F., L. G. Cuello, and E. Perozo. 2006. Voltage-dependent gating at the KcsA selectivity filter. *Nature structural & molecular biology* 13:319-322.
45. Cordero-Morales, J. F., L. G. Cuello, Y. Zhao, V. Jogini, D. M. Cortes, B. Roux, and E. Perozo. 2006. Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter. *Nature structural & molecular biology* 13:311-318.
46. Díez-Sampedro, A., B. A. Hirayama, C. Osswald, V. Gorboulev, K. Baumgarten, C. Volk, E. M. Wright, and H. Koepsell. 2003. A glucose sensor hiding in a family of transporters. *Science Signalling* 100:11753.
47. Wright, E. M., and E. Turk. 2004. The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 447:510-518.
48. Watanabe, A., S. Choe, V. Chaptal, J. M. Rosenberg, E. M. Wright, M. Grabe, and J. Abramson. 2010. The mechanism of sodium and substrate release from the binding pocket of vSGLT. *Nature* 468:988-991.
49. Wright, E. M., D. D. F. Loo, and B. A. Hirayama. 2011. Biology of human sodium glucose transporters. *Physiological Reviews* 91:733.
50. Sabino-Silva, R., R. Mori, A. David-Silva, M. Okamoto, H. Freitas, and U. Machado. 2010. The Na⁺/glucose cotransporters: from genes to therapy. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 43:1019-1026.
51. Bergeron M., G. P., Gougoux A., Lapointe J.Y. 2000. Pathophysiology of renal hyperaminoacidurias and glucosuria. In *The Kidney*. In *The Kidney*, 3rd edition. D. W. S. G. Giebish, editor. Lippincott Williams & Wilkins, New-York. 2211-2233.
52. Chao, E. C., and R. R. Henry. 2010. SGLT2 inhibition—a novel strategy for diabetes treatment. *Nature Reviews Drug Discovery*.
53. Tazawa, S., T. Yamato, H. Fujikura, M. Hiratochi, F. Itoh, M. Tomae, Y. Takemura, H. Maruyama, T. Sugiyama, and A. Wakamatsu. 2005. SLC5A9/SGLT4, a new Na⁺-dependent glucose transporter, is an essential transporter for mannose, 1, 5-anhydro-D-glucitol, and fructose. *Life sciences* 76:1039-1050.
54. Yancey, P. H. 2005. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of Experimental Biology* 208:2819-2830.
55. Lahjouji, K., R. Aouameur, P. Bissonnette, M. J. Coady, D. G. Bichet, and J. Y. Lapointe. 2007. Expression and functionality of the Na⁺/myo-inositol cotransporter SMIT2 in rabbit kidney. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1768:1154-1159.
56. Bizhanova, A., and P. Kopp. 2009. The sodium-iodide symporter NIS and pendrin in iodide homeostasis of the thyroid. *Endocrinology* 150:1084.

57. Ganapathy, V., M. Thangaraju, E. Gopal, P. M. Martin, S. Itagaki, S. Miyauchi, and P. D. Prasad. 2008. Sodium-coupled monocarboxylate transporters in normal tissues and in cancer. *The AAPS Journal* 10:193-199.
58. Prasad, P. D., and V. Ganapathy. 2000. Structure and function of mammalian sodium-dependent multivitamin transporter. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 3:263.
59. Ribeiro, F. M., S. A. G. Black, V. F. Prado, R. J. Rylett, S. S. G. Ferguson, and M. A. M. Prado. 2006. The “ins” and “outs” of the high affinity choline transporter CHT1. *Journal of neurochemistry* 97:1-12.
60. Leung, D., E. Turk, O. Kim, and E. Wright. 2002. Functional Expression of the *Vibrio parahaemolyticus* Na⁺/Galactose (vSGLT) Cotransporter in *Xenopus laevis* Oocytes. *Journal of Membrane Biology* 187:65-70.
61. Fang, Y., H. Jayaram, T. Shane, L. Kolmakova-Partensky, F. Wu, C. Williams, Y. Xiong, and C. Miller. 2009. Structure of a prokaryotic virtual proton pump at 3.2 Å resolution. *Nature* 460:1040-1043.
62. Weyand, S., T. Shimamura, S. Yajima, S. Suzuki, O. Mirza, K. Krusong, E. P. Carpenter, N. G. Rutherford, J. M. Hadden, and J. O'Reilly. 2008. Structure and molecular mechanism of a nucleobase-cation-symport-1 family transporter. *Science Signalling* 322:709.
63. Ressler, S., A. C. T. van Scheltinga, C. Vornrhein, V. Ott, and C. Ziegler. 2009. Molecular basis of transport and regulation in the Na⁺/betaine symporter BetP. *Nature* 458:47-52.
64. Tang, L., L. Bai, W. Wang, and T. Jiang. 2010. Crystal structure of the carnitine transporter and insights into the antiport mechanism. *Nature structural & molecular biology* 17:492-496.
65. Shaffer, P. L., A. Goehring, A. Shankaranarayanan, and E. Gouaux. 2009. Structure and mechanism of a Na⁺-independent amino acid transporter. *Science (New York, N.Y)* 325:1010-1014.
66. Ma, D., P. Lu, C. Yan, C. Fan, P. Yin, J. Wang, and Y. Shi. 2012. Structure and mechanism of a glutamate-GABA antiporter. *Nature* 483:632-636.
67. Lucy R. Forrest, Y.-W. Z., Miriam T. Jacobs, Joan Gesmonde, Li Xie, Barry H. Honig, and Gary Rudnick. 2008. Mechanism for alternating access in neurotransmitter transporters. In *PNAS*.
68. Chen, N. H., M. E. A. Reith, and M. W. Quick. 2004. Synaptic uptake and beyond: the sodium-and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 447:519-531.

69. Yamashita, A., S. K. Singh, T. Kawate, Y. Jin, and E. Gouaux. 2005. Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. *Nature* 437:215-223.
70. Ziegler, C., S. Morbach, D. Schiller, R. Krämer, C. Tziatzios, D. Schubert, and W. Kühlbrandt. 2004. Projection Structure and Oligomeric State of the Osmoregulated Sodium/Glycine Betaine Symporter BetP of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Molecular Biology* 337:1137-1147.
71. Perez, C., C. Koshy, S. Ressler, S. Nicklisch, R. Krämer, and C. Ziegler. 2011. Substrate specificity and ion coupling in the Na⁺/betaine symporter BetP. *The EMBO Journal* 30:1221-1229.
72. Perez, C., K. Khafizov, L. R. Forrest, R. Krämer, and C. Ziegler. 2011. The role of trimerization in the osmoregulated betaine transporter BetP. *EMBO reports* 12:804-810.
73. Schulze, S., S. Köster, U. Geldmacher, A. C. T. van Scheltinga, and W. Kühlbrandt. 2010. Structural basis of Na⁺-independent and cooperative substrate/product antiport in CaiT. *Nature* 467:233-236.
74. Vinothkumar, K. R., S. Raunser, H. Jung, and W. Kühlbrandt. 2006. Oligomeric structure of the carnitine transporter CaiT from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 281:4795-4801.
75. Jung, H., M. Buchholz, J. Clausen, M. Nietschke, A. Revermann, R. Schmid, and K. Jung. 2002. CaiT of *Escherichia coli*, a new transporter catalyzing l-carnitine/ γ -butyrobetaine exchange. *Journal of Biological Chemistry* 277:39251-39258.
76. Kowalczyk, L., M. Ratera, A. Paladino, P. Bartoccioni, E. Errasti-Murugarren, E. Valencia, G. Portella, S. Bial, A. Zorzano, and I. Fita. 2011. Molecular basis of substrate-induced permeation by an amino acid antiporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:3935-3940.
77. Gao, X., F. Lu, L. Zhou, S. Dang, L. Sun, X. Li, J. Wang, and Y. Shi. 2009. Structure and mechanism of an amino acid antiporter. *Science Signalling* 324:1565.
78. Salem Faham, A. W., Gabriel Mercado Besserer, Duilio Cascio, Alexandre Specht, Bruce A. Hirayama, Ernest M. Wright, Jeff Abramson. 2008. The Crystal Structure of a Sodium Galactose Transporter Reveals Mechanistic Insights into Na⁺/Sugar Symport. In *Science* (New York, N.Y.).
79. Atsuko Yamashita, S. K. S., Toshimitsu Kawate, Yan Jin & Eric Gouaux. 2005. Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. In *Nature*.
80. David A. Caplan, J. O. S. a. S. Y. N. 2008. Molecular Mechanism of Ion-Ion and Ion-Substrate Coupling in the Na⁺ -dependent leucine transporter LeuT. In *Biophysical Journal*.

81. Noskov, S. Y. 2008. Molecular mechanism of substrate specificity in the bacterial neutral amino acid transporter LeuT. In *Proteins*.
82. Gagnon, D. G., C. Frindel, and J. Y. Lapointe. 2007. Effect of substrate on the pre-steady-state kinetics of the Na⁺/glucose cotransporter. *Biophysical journal* 92:461-472.
83. Longpré, J. P., L. J. Sasseville, and J. Y. Lapointe. 2012. Simulated annealing reveals the kinetic activity of SGLT1, a member of the LeuT structural family. *The Journal of general physiology* 140:361-374.
84. Loo, D. D. F., B. A. Hirayama, M. Sala-Rabanal, and E. M. Wright. 2008. How drugs interact with transporters: SGLT1 as a model. *Journal of Membrane Biology* 223:87-106.
85. Lucie Parent, S. S., Donald D.F. Loo, and Ernest M. Wright. 1992. Electrogenic Properties of the Cloned Na⁺/Glucose Cotransporter: II. A Transport Model under Nonrapid Equilibrium Conditions. In *J. Membrane Biol.*



Méthodologie

2 Méthodologie

2.1 Expression hétérologue chez les ovocytes

Le système d'expression privilégié dans le cadre de mes travaux a été les ovocytes de *Xenopus laevis*. L'utilisation des ovocytes de xénopes présente plusieurs avantages, notamment qu'un ovocyte est une (immense) cellule qui peut atteindre près de 1300 µm de diamètre (86), et est donc manipulable de façon macroscopique. De plus, la machinerie cellulaire présente dans cette cellule d'amphibien est capable de traduire le matériel génétique (ADN ou ARN messager (ARNm)) de protéines de mammifère en protéines fonctionnelles correctement acheminées à la membrane cellulaire. Ainsi, l'injection, par exemple, d'ARNm codant pour hSGLT1 dans un ovocyte permet d'obtenir une cellule macroscopique exprimant des hSGLT1 fonctionnels à sa membrane. Ceci ouvre la porte à plusieurs techniques expérimentales basées sur l'électrophysiologie, la fluorescence ou la volumétrie.

Les ovocytes sont prélevés chirurgicalement de xénopes anesthésiés à la tricaine. Les follicules sont enlevés des ovocytes en les incubant dans une solution Barth (88 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.82 mM MgSO₄, 0.41 mM, CaCl₂, 0.33 mM Ca(NO₃)₂ et 5 mM HEPES, pH 7.60) contenant 2-3 U/ml de collagénase pour 1 à 2 heures, suivi par l'agitation des ovocytes dans une solution de Barth sans Ca²⁺ durant 45 min. Les ovocytes défoliculés sont ensuite mis à 18C dans une solution Barth contenant 5 % de sérum de cheval, 2.5 mM de pyruvate de sodium, 100 U/ml de pénicilline, et 0.1 mg/ml de streptomycine (87). Un à deux jours plus tard, les ovocytes sains sont typiquement injectés avec 4.6 ng d'ARNm à une concentration de 0.1 µg/µl. Dans le cas de hSGLT1 et hSMIT2, l'expression optimale est atteinte de 4-5 après l'injection, et les ovocytes sont viables jusqu'à 10 jours.

2.2 Immunobuvardage de type Western

L'immunobuvardage de type Western est une méthode qui détecte et identifie des protéines qui ont préalablement été séparées selon leur poids. Cette technique permet principalement de démontrer la présence ou l'absence d'une protéine dans un échantillon donné. Dans le présent travail, cette technique a permis de déterminer l'importance de ponts disulfures chez hSGLT1 wt et différents mutants. La méthode sera décrite de manière succincte.

Il faut tout d'abord préparer un échantillon, préférablement enrichi, contenant les protéines à l'étude. Dans mon cas, des ovocytes exprimant la protéine à l'étude ont été homogénéisés puis centrifugés pour ne garder que la fraction enrichie en membrane totale (88), c'est-à-dire la membrane plasmique mais aussi les membranes internes de l'ovocyte.

On ajoute ensuite de la solution Laemmli à cet échantillon. La solution de Laemmli est composée de plusieurs éléments. Un tampon garde le pH stable, et le bleu de bromophénol donne une couleur à l'échantillon pour ainsi en faciliter la manipulation. Par contre, les deux éléments "actifs" sont le laurylsulfate de sodium (sodium dodecyl sulfate, SDS) et le β -mercapthoéthanol (β -ME). Le SDS est un détergent chargé négativement qui se lie aux régions hydrophobes des protéines. Ainsi, il dénature les protéines et leur associe une charge négative proportionnelle à leur taille. Le β -ME quant à lui a pour rôle spécifique de briser les ponts disulfures (4).

L'échantillon peut alors être déposé sur un gel de polyacrylamide et soumis à un champ électrique. Le gel de polyacrylamide peut être vu comme une matrice dont la grosseur des pores est ajustée pour ralentir la migration des protéines. Les protéines se distribueront alors sur une certaine distance le long du gel où elles migrent à une vitesse inversement proportionnelle à leur taille (4).

Une fois les protéines suffisamment dispersées, elles peuvent être transférées (en gardant leurs positions relatives) sur une membrane de nitrocellulose. On marque ensuite les

protéines à l'étude à l'aide d'un anticorps primaire. L'anticorps primaire se veut spécifique et ne reconnaît en principe que la protéine étudiée. Cet anticorps primaire est ensuite à son tour marqué par un anticorps secondaire. Comme l'anticorps secondaire porte un groupement peroxydase, il est alors possible de révéler le résultat à l'aide d'une solution de détection par chimioluminescence.

2.3 L'électrophysiologie

En milieu physiologique, un potentiel électrochimique peut être associé à chaque type d'ions. Celui-ci est modulé par la concentration et la charge de l'ion, ainsi que par le potentiel électrique ambiant. Le potentiel électrochimique μ est donc défini comme:

$$\mu = RT \ln[S] + zF\psi \quad (2-1)$$

où R est la constante des gaz parfaits, T est la température, [S] est la concentration de substrat, z est le nombre de valence, F est la constante de Faraday et Ψ est le potentiel transmembranaire.

Pour un ion donné qui est présent de part et d'autre d'une membrane, on trouve que le potentiel membranaire qui va faire en sorte que son potentiel électrochimique soit égal de part et d'autre de la membrane est donné par l'équation de Nernst :

$$V_{eq} = -\frac{RT}{zF} \ln\left(\frac{[S_{ext}]}{[S_{int}]}\right) \quad (2-2)$$

où V_{eq} est le potentiel membranaire à l'équilibre, z est le nombre de valence, F est la constante de Faraday, [S] est la concentration de substrat dans le milieu intérieur et extérieur et R et T ont leur signification habituelle.

Finalement, on peut déterminer le courant généré par le transport des ions à l'aide de l'équation de Nernst-Planck:

$$I = -zFD \left(\frac{dc}{dx} + \frac{zFc}{RT} \frac{d\psi}{dx} \right) \quad (2-3)$$

où I est le courant généré, D le coefficient de diffusion, c le profil de concentration, ψ le profil de potentiel transmembranaire et R, T, F et z ont leur signification habituelle. En électrophysiologie expérimentale, c'est ce courant généré I que nous mesurons.

Si le cycle de transport d'une protéine est électrogénique, c.-à-d. qu'il produit un transfert net de charge au travers de la membrane, il est alors possible de le caractériser à l'aide de méthodes électrophysiologiques. Ainsi, en faisant varier le potentiel transmembranaire et/ou les concentrations des différents substrats, il est possible de caractériser et étudier le transport associé à des protéines électrogéniques telles que SGLT1.

2.3.1 Voltage imposé à 2 électrodes

Le voltage imposé à 2 électrodes (two-electrode voltage-clamp, TEVC) est une méthode électrophysiologique qui s'est établie comme un standard dans le domaine de l'étude des protéines membranaires électrogéniques. Le TEVC permet de mesurer le courant transmembranaire généré par un ovocyte avec une résolution temporelle de l'ordre de la milliseconde tout en contrôlant à la fois le potentiel transmembranaire et la composition du milieu extracellulaire. L'expression de protéines électrogéniques dans l'ovocyte permet donc d'étudier les courants spécifiques à cette protéine.

Lors de cette procédure expérimentale, un ovocyte de xénope exprimant la protéine membranaire électrogénique étudiée est empalé par 2 électrodes (l'électrode de voltage (e_v) et l'électrode de courant (e_i)) et est plongé dans un bain dont on contrôle le contenu et qui contient deux autres électrodes macroscopiques (une électrode mesure le potentiel du bain

(e_{bv}) et l'autre permet de récolter les courants qui sortent ou qui entrent dans le bain (e_{bi}). Les microélectrodes sont préparées en étirant des capillaires de borosilicate et sont remplies d'une solution KCl 1M. L'électrode de bain qui amène le courant est un simple fil d'argent recouvert d'AgCl. L'électrode qui mesure le potentiel du bain peut aussi être une électrode d'Ag/AgCl ou elle peut être un pont d'agar contenant du KCl 1M. Un premier circuit de rétroamplification applique sur e_i un potentiel qui est égal à la valeur du « gain » fois la différence entre le potentiel désiré, appelé potentiel de commande, et le potentiel membranaire tel que mesuré entre e_v et e_{bv} . Avec un gain suffisamment élevé, typiquement autour de 500 fois, le potentiel membranaire est très proche du potentiel de commande et le courant injecté par e_i est la mesure du courant membranaire nécessaire pour atteindre ce potentiel. Étant donné qu'il peut passer de grands courants par e_{bi} , le potentiel du bain est activement maintenu (clampé) à 0 mV par un second circuit de rétroamplification utilisant e_{bi} et e_{bv} .

Un protocole typique comporte une série de sauts de potentiel durant lesquels on fait passer le potentiel membranaire de l'ovocyte de -50 mV, le potentiel de repos d'un ovocyte sain, à des potentiels de commande allant typiquement de -155 mV à + 70 mV. On obtient alors une série de courbes de courant en fonction du temps qui sont dues au transport des ions au travers de la membrane. Typiquement, des mesures sont prises sous différentes conditions expérimentales, en présence et en absence d'inhibiteur spécifique. Dans le cas de SGLT1 par exemple, la soustraction des courants en présence de phlorizine (Pz), l'inhibiteur classique des SGLTs, aux courants en absence de Pz permet d'obtenir les courants sensibles à la Pz. Les courants sensibles à la Pz représentent donc les courants dus à SGLT.

Il est alors possible d'extraire 3 paramètres importants de ces courbes. Les courants préstationnaires nous permettent d'obtenir les constantes de temps et la charge transférée, et les courants stationnaires nous permettent d'obtenir l'amplitude du courant à l'état stationnaire.

Les constantes de temps nous renseignent sur la vitesse à laquelle s'effectuent les étapes électrogéniques du cotransport et sont obtenues en faisant concorder (to fit) les courants préstationnaires par une série d'exponentielles. La charge transférée est proportionnelle au mouvement des charges de la population des cotransporteurs, qui est dû au passage d'un état d'équilibre des différentes conformations à un autre, suite à un changement de potentiel membranaire. Elle est obtenue en calculant l'aire sous la courbe des courants préstationnaires sensible à la Pz, ce qui revient à intégrer les courants préstationnaires. Finalement, l'amplitude du courant à l'état stationnaire est simplement proportionnelle au taux de transport des ions au travers de la membrane.

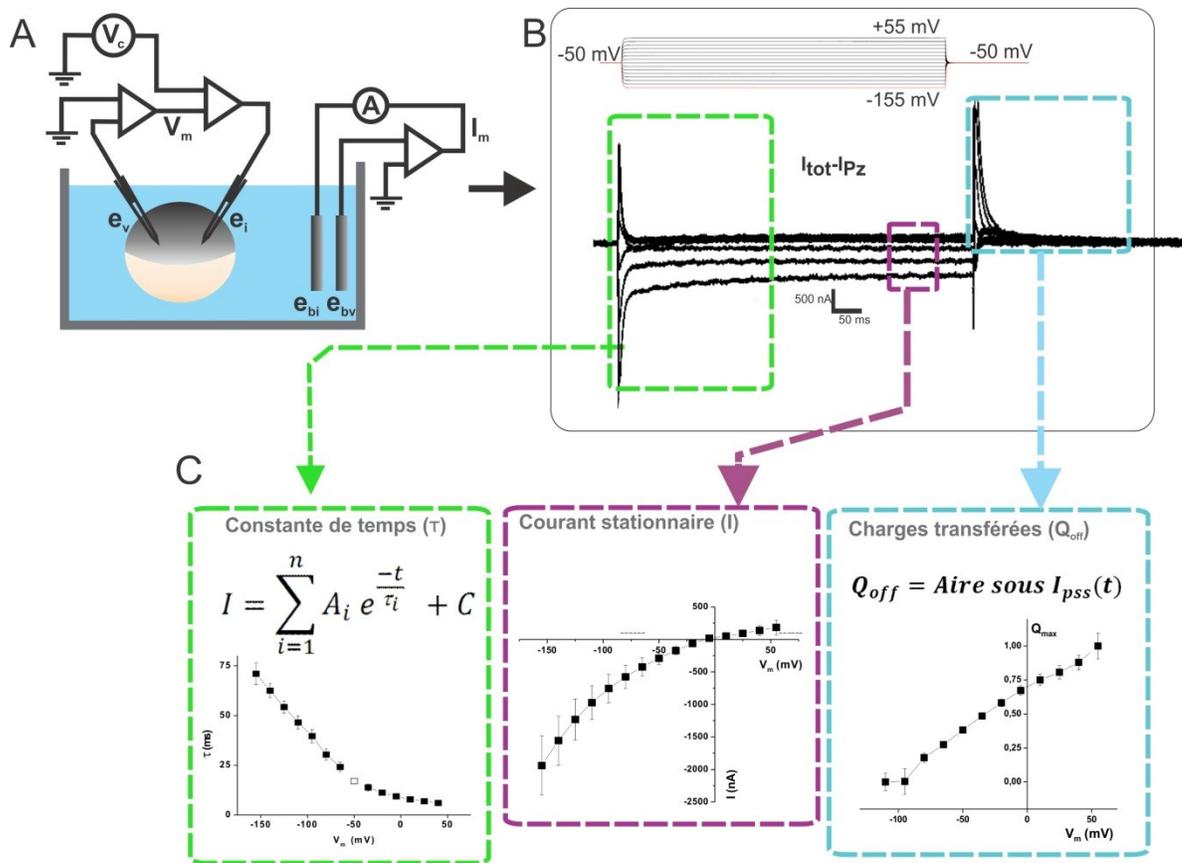


Figure 2-1 Prise de données électrophysiologiques en voltage imposé à deux électrodes.

A. Schéma de la méthode de voltage imposé à deux électrodes. **B.** Protocole de prise de mesure typique. Les courants sensibles à la Pz sont présentés. **C.** Analyse des données.

2.3.2 Le "Cut-Open"

La technique du «cut-open oocyte» présente deux avantages significatifs par rapport à la technique de voltage imposé à deux électrodes : 1) une meilleure résolution temporelle (de l'ordre de la centaine de μ s), et 2) l'accès au milieu intracellulaire. Sinon, les mesures électrophysiologiques générées en cut-open seront similaires à celles provenant d'expériences en TEVC.

Le montage comporte 3 bains (voir **Figure 2-2**). Le bain A contient le milieu extracellulaire et la partie de la membrane isolée. Le bain B sert à réduire au minimum les courants de fuite entre les bains A et C. Le bain C contient la surface perméabilisée de l'ovocyte. Explicitement, le principe du cut-open est d'établir 3 zones distinctes sur la membrane de l'ovocyte, chaque zone étant en contact avec un des 3 bains de la chambre expérimentale. Pour ce faire, l'ovocyte est placé sur une ouverture de 700 μm pratiquée dans le bain B. Ceci permet d'exposer une portion de la membrane au bain C, où la présence d'un détergent va la perméabiliser. Le bain A est alors posé sur l'ovocyte. Une seconde ouverture de 700 μm permet d'exposer une portion de la membrane au milieu contenu dans la chambre A. C'est aux travers de cette portion de membrane que les courants membranaires seront mesurés. Le bain B, situé entre les bains A et C, sert de « pare-feu électrique » (bath guard) et ainsi limiter la fuite de courant entre les bains A et C. En effet, la résistance de la jonction n'est pas très élevée (0.5 à 2 $\text{M}\Omega$ (89)) et on doit donc limité le courant de fuite en s'assurant qu'il n'y a pas de différence de potentiel entre les bain A et B.

D'un point de vue plus technique, l'électrode de [4] (voir **Figure 2-2**) est préparée en étirant des capillaires de borosilicate et est remplie d'une solution KCl 1M. Les électrodes de bain sont composées de Ag-AgCl. La membrane de l'ovocyte exposé au bain est perméabilisée par une courte exposition à la saponine. La saponine est un détergeant qui forme des pores dans la membrane. Ceux-ci génèrent une voie d'accès de faible résistance électrique vers l'intérieur de l'ovocyte et permettent des changements au niveau de la composition du milieu intracellulaire (90).

Le système électronique est composé de 2 parties (voir **Figure 2-2**) : **1**) l'électrode de voltage [4] lit la différence de potentiel entre elle-même et son électrode de bain [5]. Un circuit de rétroamplification [7] injecte par l'électrode de courant (I) un courant proportionnel à la différence entre le potentiel de commande et le courant lu. **2**) Les bains A

et B sont maintenus au même potentiel à l'aide des amplificateurs [2] et [3], réduisant au minimum les courants de fuite.

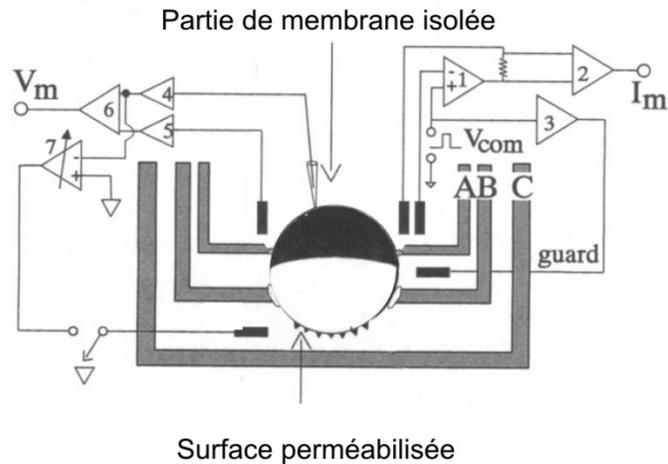


Figure 2-2 Schéma de la technique du « cut-open oocyte ».

Voir description dans le texte ci-haut. Adapté de (89).

2.3.3 Mesure de volumétrie en voltage imposé

La présence de milieux extérieurs hypo- ou hypertoniques cause le gonflement/contraction des cellules. Ceci est dû au mouvement net de molécules d'eau au travers de la membrane suivant le gradient osmotique transmembranaire. Dans la plupart des cellules, la perméabilité à l'eau est permise par l'intermédiaire de canaux à eau que l'on appelle les aquaporines. Il est aussi largement accepté que d'autres protéines membranaires comme les cotransporteurs permettent le passage d'eau de façon significative (91).

Le TEVC permet déjà de contrôler à la fois le potentiel transmembranaire de l'ovocyte et son milieu extérieur. L'ajout d'un système optique permet de mesurer la "silhouette" de l'ovocyte et donc d'en inférer son volume. Ce système optique est composé d'un bain dont le fond est transparent, d'une diode électroluminescente immergée dans le bain permettant l'illumination de l'ovocyte par le haut, et d'une caméra reliée à un microscope inversé permettant de mesurer la section transverse de l'ovocyte en temps réel. Il est alors possible de mesurer le taux de gonflement d'un ovocyte exprimant une protéine

à l'étude (par exemple hSGLT1) tout en contrôlant à la fois le potentiel transmembranaire et la composition du milieu extérieur. Avec un objectif de 3X relié à une caméra de 2 mégapixels, le volume calculé à partir de la section de l'ovocyte, mesurée 25 fois par seconde, présente une excellente précision correspondant à 0.1 % du volume mesuré.

Durant un protocole typique, un ovocyte exprimant la protéine à l'étude est empalé par deux électrodes, suivant la technique du TEVC. Cet ovocyte est placé dans un bain permettant un changement rapide de solution. Le système optique permet de mesurer les changements de volume en temps réel (voir **Figure 2-3**). L'ovocyte est d'abord stabilisé dans une solution isotonique. Une fois le volume stabilisé (moins de 0.2 % de variation en 1 min), la solution isotonique est remplacée par une solution hypotonique, ce qui cause un mouvement d'eau vers l'intérieur de l'ovocyte. Il est alors possible de faire varier le potentiel membranaire et/ou la composition du bain pour mesurer leurs effets sur le taux de gonflement de l'ovocyte.

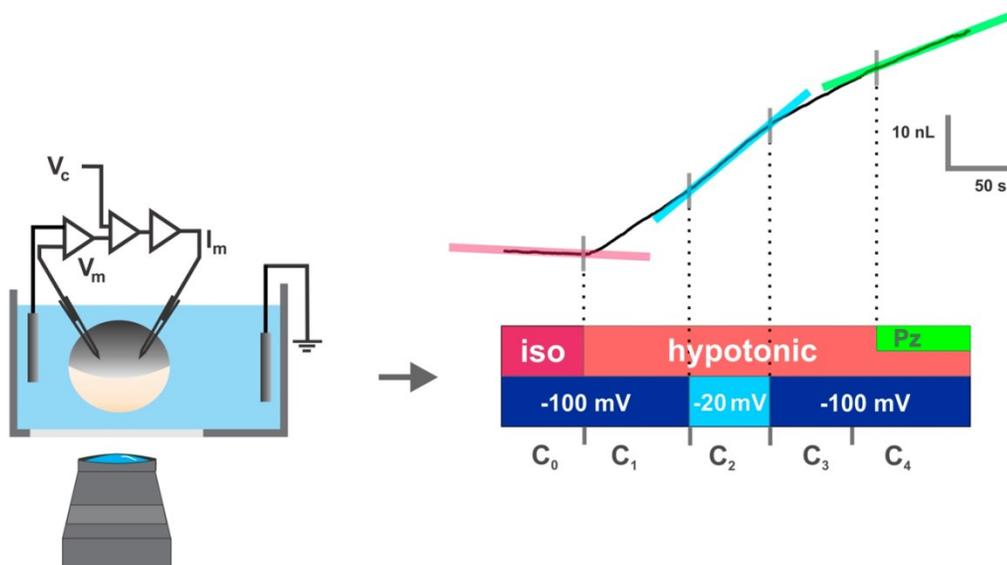


Figure 2-3 Prise de mesure de volumétrie en voltage imposé

Voir description dans le texte ci-haut.

La perméabilité à l'eau P_f de la protéine étudiée peut alors être calculée pour différentes conditions précises selon l'équation suivante:

$$P_f = \frac{1}{S \times v_w \times \Delta\pi} \frac{dV}{dt} \quad (2-4)$$

où S est la surface standard d'un ovocyte, v_w est le volume spécifique de l'eau, $\Delta\pi$ est l'amplitude du choc osmotique et $\frac{dV}{dt}$ est le taux de gonflement.

2.4 Spectroscopie de fluorescence

2.4.1 La fluorescence et le FRET

La fluorescence est un phénomène quantique d'émission de lumière. Une molécule fluorescente a la capacité de recevoir l'énergie d'une longueur d'onde dite d'excitation puis de restituer cette même énergie, moins une perte, sous une autre longueur d'onde plus longue, dite d'émission (voir **Figure 2-4 A**)

La technique du FRET (Förster Resonance Energy Transfert) utilise deux fluorophores. Quand les deux fluorophores sont suffisamment près l'un de l'autre, l'excitation d'un fluorophore peut être transmise à l'autre fluorophore de façon non-radiative, c.-à-d. sans émission de photon. Pour que le phénomène se produise, il faut que le spectre d'émission du premier fluorophore (appelé le donneur) recouvre le spectre d'excitation de l'autre fluorophore (appelé l'accepteur). De plus, il faut que les deux fluorophores soient à une très faible distance « r » l'un de l'autre (voir **Figure 2-4 B**). On peut calculer l'énergie transférée :

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad (2-5)$$

où r est distance accepteur-donneur et R_0 est le rayon de Förster, soit la distance à laquelle, le transfert d'énergie est à la moitié de sa valeur maximale.

L'intérêt de la fluorescence et du FRET réside dans le fait que l'intensité de la fluorescence émise est modulée par l'environnement immédiat des fluorophores, ainsi que par la distance entre les fluorophores dans le cas du FRET. Ainsi, si l'on attache un fluorophore en un endroit connu d'une protéine par mutagenèse dirigée, on peut étudier les changements de conformation des protéines.

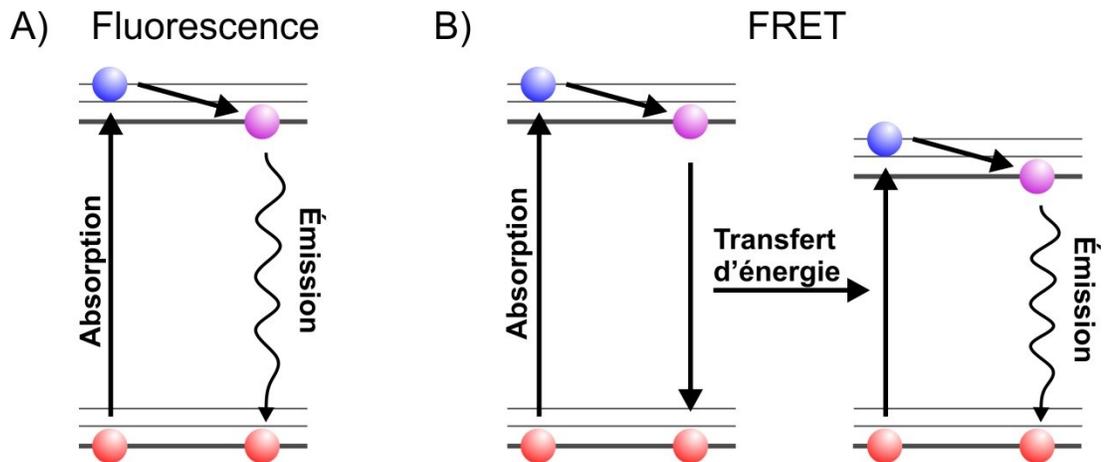


Figure 2-4 Fluorescence et FRET.

A) Fluorescence : La lumière d'excitation amène un électron dans les états excités. Il y a perte d'énergie alors que celui descend dans les orbitales excitées inférieures. Finalement, l'électron émet en retombant dans l'état non excité. **B) FRET :** Lorsque l'électron retombe au niveau non excité, son énergie est transférée vers un électron d'une deuxième molécule.

2.4.2 DPA et extinction de fluorescence

La dipicrylamine (DPA) est une molécule amphiphile chargée négativement et non fluorescente qui à un large spectre d'absorption. Elle peut donc s'insérer dans la membrane et se distribuer en fonction du potentiel électrique très rapidement. Étant amphiphile, chaque molécule sera située à une ou l'autre des interfaces membranaires, bien que la

répartition globale de la DPA dépende du potentiel transmembranaire. Cette répartition est proportionnelle à la courbe Q-V du DPA (voir **Figure 2-5 C**).

Bien qu'elle n'émette pas de fluorescence sa capacité d'absorption lui permet de moduler l'intensité de la fluorescence émise par certains fluorophores, selon le principe du FRET. Ainsi, la DPA absorbe une quantité d'énergie proportionnelle à $1/r^6$, r étant la distance la DPA du fluorophore, diminuant d'autant la fluorescence émise par celui-ci.

Si seul la DPA bouge suite à un changement de voltage, on observera un signal monophasique aussi rapide que le changement de voltage membranaire. Par contre, si le fluorophore bouge suite au changement de voltage, et si ce mouvement est lent par rapport au DPA (ce qui est souvent le cas) alors on verra un signal biphasique.

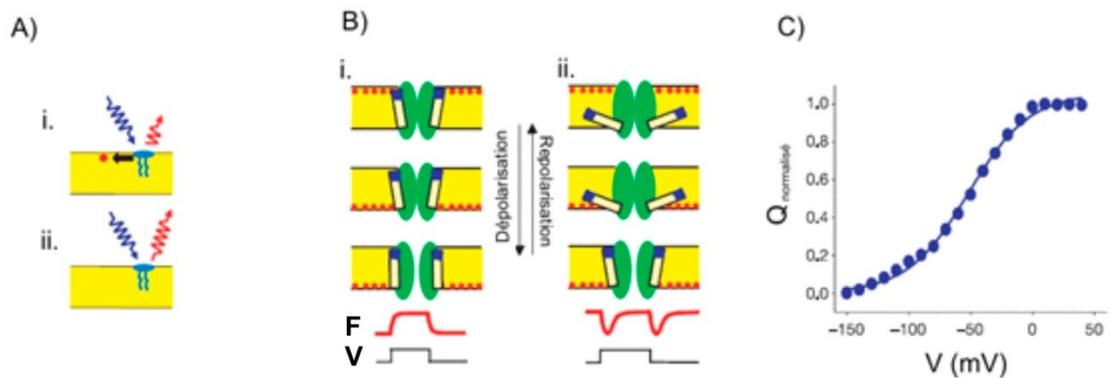


Figure 2-5 Extinction de fluorescence par le DPA

A) Phénomène d'extinction de fluorescence (quenching). **i)** Lorsque la DPA (en rouge) est proche du TMR (en bleu), il y a transfert d'énergie d'un à l'autre, et donc une émission de fluorescence réduite. **ii)** Fluorescence intrinsèque du fluorophore en absence de la DPA. **B)** **i)** Si seul la DPA bouge, le signal (F) sera monophasique. **ii)** Si le TMR et la DPA bougent, le signal sera biphasique. **C)** Courbe Q-V normalisée du DPA en bicouche lipidique. Adapté de (92).

2.4.3 Fluorophores

Les fluorophores employés dans ce travail sont le Alexa Fluor 488 C₅-maléimide (A488) le Tétraméthylrhodamine C₅-maléide (TMR). De par leurs groupes maléimides, ces derniers sont capables de réagir avec un atome de soufre et de s'y lier de façon covalente. Ainsi, ces fluorophores vont pouvoir s'attacher aux cystéines accessibles chez les protéines à marquer.

Il est probable que la protéine à l'étude (dans notre cas hSGLT1) ne possède pas de cystéine endogène accessible. Il est alors nécessaire de se servir d'un mutant. Il a par exemple été démontré que la mutation hSGLT1 C511A brise le pont disulfure présent chez hSGLT1 wt entre C511 et C255, rendant ainsi C255 accessible aux groupes maléimides des fluorophores utilisés (93). Le marquage se résume alors à baigner les ovocytes exprimant le mutant dans une solution contenant le fluorophore. Typiquement, le marquage s'effectuant à 4 °C (pour éviter l'endocytose du fluorophore) et à une concentration de 0.25 µM, une dizaine de minutes suffisent à obtenir un marquage maximal sur les mutants que nous avons utilisés.

2.4.4 Parcours optique

La partie névralgique d'un montage de fluorescence est le «cube optique» composé de 3 parties : 1) le filtre d'excitation, 2) le miroir dichroïque et le 3) filtre d'émission. Ce format tout-en-un est dû à la complémentarité de chacune des composantes.

Le parcours optique est le suivant. Une source de lumière blanche atteint le filtre d'excitation, qui ne laisse passer que la lumière d'excitation. Celle-ci est alors réfléchi par le miroir dichroïque, qui ne réfléchit vers l'objectif que la lumière ayant une longueur inférieure à une valeur donnée. C'est la fréquence de coupure et elle doit se situer entre la longueur d'onde d'excitation et la longueur d'onde d'émission. Cette lumière est dirigée vers un objectif par lequel les protéines marquées seront excitées. La lumière qui est

recaptée par l'objectif est composée de 1) la lumière fluorescente de longueur d'onde supérieure à l'excitation et 2) la réflexion de la lumière d'excitation. La lumière provenant de la sonde fluorescente pourra traverser le dichroïque avant de passer à travers un filtre d'émission. C'est cette lumière qui renvoyée vers l'observateur ou vers le système de mesure de l'intensité lumineuse (photo-multiplicateur, photo-diode ou caméra).

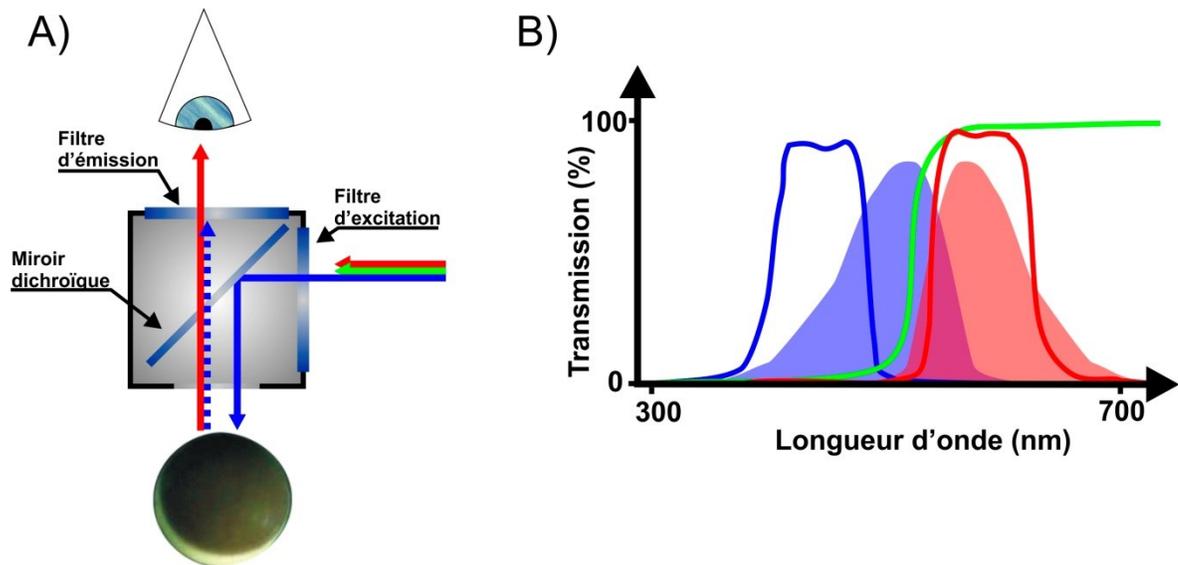


Figure 2-6 Prise de mesure en fluorescence.

A) Parcours optique. B) Spectre de transmission des différentes composantes d'un cube optique. Filtre d'excitation en bleu, miroir dichroïque en vert, filtre d'émission en rouge. La partie ombragée bleu est le spectre d'absorption du fluorophore, la partie ombragée rouge, le spectre d'émission.

2.4.5 Spectroscopie de fluorescence en voltage imposé

La spectroscopie de fluorescence permet de détecter les changements d'environnement des fluorophores. Dans l'étude des SGLTs, ces changements d'environnement sont souvent dus à des changements de conformation de la protéine. Ces changements de conformation peuvent quelques fois être déclenchés par un changement de

potentiel transmembranaire lorsque des transitions entre deux conformations sont dépendantes du voltage.

Ainsi, dans le cadre de ce travail, la technique de spectroscopie de fluorescence ont été conjuguée avec la technique électrophysiologique du cut-open. De plus, le contrôle du potentiel transmembranaire permet de contrôler la répartition aux interfaces de la bicouche de la DPA.

2.4.5.1 Détermination de la position dans le plan de la membrane par extinction de fluorescence

En dépolarisant ou hyperpolarisant la membrane, on accumule la DPA du côté intra- ou extracellulaire, respectivement. Il est alors possible de déterminer sans équivoque la position intra- ou extracellulaire d'un résidu marqué, selon l'effet du potentiel transmembranaire sur le niveau de fluorescence. Par exemple, un fluorophore placé près du feuillet lipidique externe verra sa fluorescence diminuer lors de l'application d'un potentiel transmembranaire hyperpolarisant dû à l'augmentation de la population de DPA à l'interface extracellulaire.

2.4.5.2 Extinction de FRET

Il est possible de mesurer du FRET entre deux fluorophores situés à proximité l'un de l'autre. Par contre, ce signal sera souvent faible par rapport au bruit de fond, car on mesure alors l'intensité totale de l'ovocyte à la longueur d'onde d'émission. De plus, la variabilité intrinsèque des ovocytes complique grandement la tâche. Il est donc nécessaire d'utiliser les statistiques afin de comparer les intensités d'ovocytes exprimant la protéine étudiée et d'ovocytes de contrôles afin de tester la signifiante d'un résultat.

Il est par contre possible de se servir des propriétés de la DPA afin d'augmenter significativement la sensibilité des mesures de fluorescence (92, 94, 95). Par extension, si on se sert de la DPA lors de mesures de FRET, on augmente de beaucoup le rapport signal sur bruit des mesures de FRET. Ainsi, on ne mesure plus l'intensité totale à la longueur

d'onde d'émission, mais la variation de l'intensité à cette longueur d'onde suite au mouvement du DPA suite à des sauts de potentiel transmembranaire (voir **Figure 2-7**). De plus, la DPA ayant un rayon d'action effectif de quelques dizaine d'Angströms, seul les fluorophores à proximité de la membrane sont affectés.

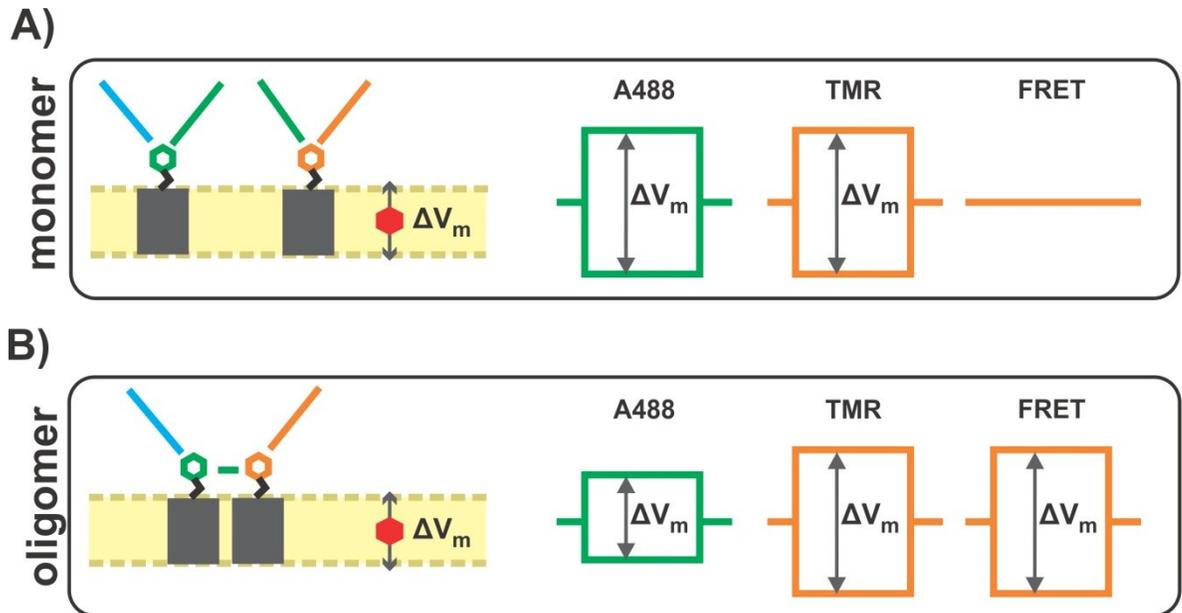


Figure 2-7 Extinction de FRET

Deux possibilités sont envisagées. 1) Seuls des monomères sont présents. L'extinction par la DPA de la fluorescence de A488 et du TMR est observé, mais pas l'extinction du FRET de la paire A488-TMR. 2) Des multimères sont présents. L'extinction par la DPA de la fluorescence de A488 et du TMR est observé, mais aussi du FRET de la paire A488-TMR.

Ainsi, le FRET ne permet que de vérifier si la présence du donneur augmente significativement la fluorescence totale à la longueur d'onde d'émission de l'accepteur. Les résultats obtenus sont typiquement de l'ordre de 1% de variation. Par opposition, la présence de la DPA permet de vérifier si la présence du donneur augmente significativement la variation fluorescence à la longueur d'onde d'émission de l'accepteur près de la membrane suite à des sauts de potentiels. Dans le cadre de ce travail, j'ai obtenu des résultats allant jusqu'à près de 20 % de variation. Ainsi, cette technique a permis des

prises de mesure de type "oui ou non". Au mieux de nos connaissances, c'est la première fois que cette technique conjuguant électrophysiologie, FRET et extinction de fluorescence est utilisée.

2.5 La modélisation cinétique

La modélisation cinétique permet de rationaliser (notamment) les mesures électrophysiologiques en les reproduisant à l'aide d'équations mathématiques. Ainsi, un modèle cinétique de base pour un transporteur membranaire typique doit prendre en compte la liaison des différents substrats, leur translocation au travers de la membrane, et leur relâchement. Il doit pouvoir reproduire les courants associés au cotransporteur, l'effet sur ceux-ci du potentiel et des concentrations de substrats.

La **Figure 2-8** représente un modèle cinétique typique pour hSGLT1. L'état S1 représente un cotransporteur vide ouvert vers l'intérieur de la membrane. Le saut de l'état S1 à S2 peut être vu comme le passage ouvert vers l'intérieur à un état ouvert vers l'extérieur. Ceci permet aux 2 ions Na^+ de se lier, et ainsi d'atteindre l'état S3. Le sucre peut alors se lier, pour atteindre l'état S4. Le passage de l'état S4 à S5 est associé au passage du transporteur avec ses substrats liés d'un état ouvert vers l'extérieur à un état ouvert vers l'intérieur. Finalement, les transitions $\text{S5} \leftrightarrow \text{S6}$ et $\text{S6} \leftrightarrow \text{S1}$ sont associées au relâchement des substrats pour retourner à l'état initial S1. Il est donc facile de voir qu'un parallèle peut être fait avec les étapes du cotransport qui sont proposées dans la **Figure 1-17**. De plus, il est à noter que les structures cristallographiques de vSGLT présentent des conformations assimilables à l'état S1. Il est à noter que la transition $\text{S3} \leftrightarrow \text{S6}$ est ici omise, le courant de fuite associé à SGLT1 ayant été démontré indépendant du cycle de cotransport (96).

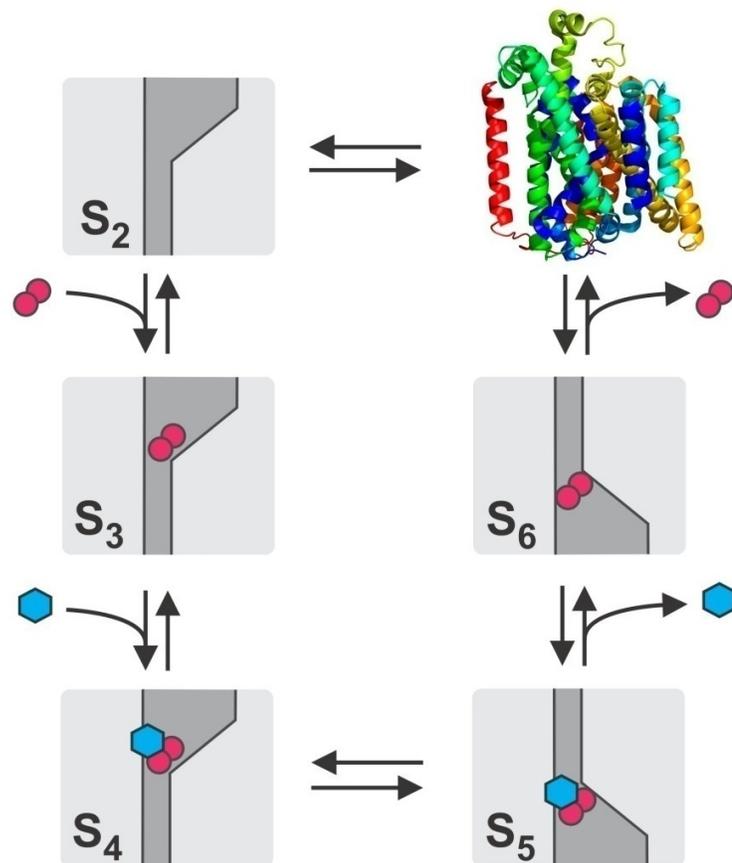


Figure 2-8 Modèle cinétique typique de SGLT1

La protéine est présentée en gris pâle, la voie de perméation des substrats en gris foncé, le glucose par un hexagone bleu, et les ions sodium par des sphères rouges.

2.5.1 L'équation d'Arrhenius

De façon plus technique, la modélisation de ce processus est réalisée à l'aide de la théorie des états de transition d'Eyring (97). Selon cette optique, le mécanisme de cotransport est perçu comme une série stochastique de sauts d'un état à l'autre. Les états sont séparés par des barrières énergétiques qui peuvent dépendre du potentiel membranaire ou non et dont la hauteur est l'énergie d'activation.

Bien que l'équation d'Eyring permette d'exprimer en termes mathématiques la théorie des états de transition en se basant sur la thermodynamique, c'est l'équation empirique d'Arrhenius qui est utilisée dans les modèles cinétiques. Il est à noter que les 2 équations partagent une forme identique et que la différence réside au niveau de la signification des termes.

$$\text{Équation d'Eyring :} \quad k = k_B T / h e^{-\Delta G / RT} \quad (2-6)$$

$$\text{Équation d'Arrhenius :} \quad k = A e^{-E_a / RT} \quad (2-7)$$

Ainsi, l'équation d'Arrhenius appliqué aux transitions entre les états devient:

$$k_{ij} = k_{ij0} [S] e^{z_i \alpha_i V_m F / RT}, \quad k_{ji} = k_{ji0} [S] e^{-z_i (1 - \alpha_i) V_m F / RT} \quad (2-8)$$

où $i=1,2,3 \dots$, nombre total d'états; $j=i+1$, k_{ij0} et k_{ji0} sont les constantes de réactions sens et antisens (par rapport au sens transport en conditions physiologiques), z_i est la charge de valence de la charge équivalente qui se déplace dans le champ électrique, α_i représente l'asymétrie de la barrière d'énergie créée par la modulation du champ électrique par la protéine, V_m est le potentiel transmembranaire, $[S]$ la concentration du substrat impliqué dans la transition en question. F , R et T ont leurs significations habituelles, c.-à-d. la constante de Faraday, la constante des gaz parfaits et la température.

De plus, la microreversibilité et la stœchiométrie sont respectées par l'application de deux égalités mathématiques. La microreversibilité sera respectée par l'égalité :

$$\prod k_{ij0} / \prod k_{ji0} = 1 \quad (2-9)$$

et le nombre de charges transportés par cycle de cotransport par l'égalité:

$$\sum z_i = z_{cycle} \quad (2-10)$$

où z_{cycle} est nombre de charges nettes transportées par cycle de cotransport.

2.5.2 L'estimation des paramètres cinétiques

Une des difficultés majeures de la modélisation cinétique est l'estimation du meilleur seul jeu de paramètres cinétiques (c.-à-d. k_{ij0} , k_{ji0} , z_i et α_i) qui permette de reproduire les courants expérimentaux dans l'ensemble des conditions expérimentales, c.-à-d. à différents V_m et différentes concentrations de substrats. Ainsi, chaque transition rajoute 4 variables à l'équation. Le modèle proposé à la **Figure 2-8** aura donc 24 variables. L'estimation des variables ce modèle cinétique devient alors un problème de minimisation dans un espace à 24 dimensions.

2.5.2.1 Méthode standard d'estimation des paramètres cinétiques

L'approche la plus répandue jusqu'à présent pour la détermination des paramètres cinétiques d'un modèle est la suivante. On commence par caractériser les courants expérimentaux par le courant stationnaire en fonction du potentiel membranaire, la charge transférée lors de sauts de potentiel et les constantes de temps des courants transitoires en fonction du potentiel membranaire ($I(V_m)$, $Q(V_m)$ et $\tau(V_m)$ respectivement). Ceci réduit de façon significative la quantité d'information à reproduire. Il est alors possible de tenter de trouver les paramètres appropriés par essais et erreurs réfléchis (educated trials-and-errors). Bien que ce *modus operandi* a été utilisé par de nombreux groupes au cours des 20 dernières années (82, 84, 98-101), la qualité des modèles produits demeure mitigée et pour chacun de ces modèles la possibilité qu'un meilleur jeu de paramètres puisse exister demeure.

2.5.2.2 Approche du lissage direct des courbes expérimentales par recuit simulé

Dans le cadre de ce travail, nous avons développé une nouvelle façon d'estimer les paramètres d'un modèle cinétique (83). Cette technique est en fait un algorithme

informatique automatisé, basé sur le recuit simulé (102), qui tire parti de la puissance de calcul des grappes de calcul pour déterminer les paramètres cinétiques optimaux permettant de reproduire directement les courants expérimentaux.

Le premier changement se situe donc au niveau des données à reproduire. Notre approche implique tout simplement de tenter de reproduire les courants expérimentaux eux-mêmes, et non pas une caractérisation de ceux-ci. Cette approche est conceptuellement simple, ne nécessite donc pas d'hypothèse a priori de la part de l'utilisateur, et conserve par définition l'entièreté de l'information contenue dans les courants expérimentaux. Ainsi, les courants expérimentaux ($I(t)$) sont recueillis sous différentes conditions. Par exemple, dans notre cas les sauts de potentiel membranaire ont été imposés suivant la technique du voltage imposé à deux électrodes en faisant varier les concentrations des substrats dans la solution extracellulaire.

Le deuxième changement se situe au niveau de la technique d'optimisation des paramètres. Le recuit simulé (102) est en fait une extension logique de l'algorithme de Metropolis (103), qui lui-même est une extension de la méthode Monte-Carlo. Je pense donc que la manière la plus simple d'expliquer le recuit simulé tel qu'appliqué à notre système est en commençant par la base, c.-à-d. la méthode Monte-Carlo, puis en ajoutant successivement la complexité associée à l'algorithme Metropolis puis au recuit simulé.

Ainsi, le modèle cinétique tel que présenté à la figure **Figure 2-8** implique 6 transitions, qui dépendent chacune de 4 paramètres cinétiques. À cela on rajoute un paramètre représentant le nombre de transporteurs à la membrane. Donc, suivant l'algorithme de Monte-Carlo, à chaque étape un de ces 25 paramètres sera choisi et modifié aléatoirement. Les nouveaux courants théoriques résultant de ce nouveau jeu de paramètres seront comparés aux courants expérimentaux que l'on tente de reproduire. L'erreur calculée, selon la méthode des moindres carrés, devient donc notre « fonction objectif » (cost function). Si l'erreur calculée a été réduite par rapport au jeu de paramètres précédent, le nouveau jeu de paramètre sera accepté. Si l'erreur calculée a été augmentée par rapport

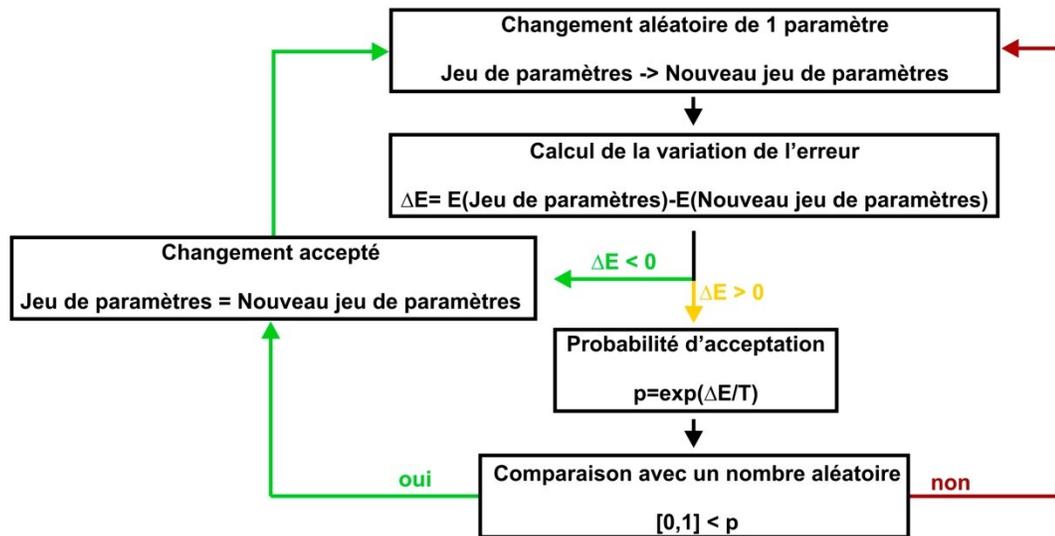
au jeu de paramètres précédent, le nouveau jeu de paramètre sera refusé. Le problème avec la méthode Monte-Carlo est qu'elle permet de trouver le minimum local en fonction du jeu de paramètre initial, mais a une très faible probabilité d'explorer d'autres minimums locaux.

Afin de remédier à cette lacune, l'algorithme introduit un terme analogue au facteur de Boltzmann à la fois au niveau de sa forme et de sa signification : $e^{\Delta E/T}$, où ΔE est la différence entre l'énergie du nouveau jeu de paramètres moins l'énergie de l'ancien jeu de paramètre, et T est la « température » du système. Dans notre cas, cette température est en fait relié à la qualité de notre modèle, c.-à-d. dire l'erreur calculée, et n'a donc pas d'unités. Par contre, prendre en compte que l'algorithme que Metropolis a initialement été conçu pour simuler les conditions à l'équilibre d'un groupe d'atome à une « vraie » température T donnée permet de comprendre le sens conceptuel de cette variable. Ce nouveau facteur est donc pris en compte lorsque vient le temps de choisir de garder ou de rejeter un nouveau jeu de paramètres : si l'erreur calculée a été réduite par rapport au jeu de paramètres précédent, le nouveau jeu de paramètre sera accepté. Par contre, si l'erreur calculée a été augmentée par rapport au jeu de paramètres précédent, le nouveau jeu de paramètre ne sera pas automatiquement refusé : il aura une probabilité $e^{\Delta E/T}$ d'être accepté. Ceci est illustré à la **Figure 2-9.A**. Ainsi, l'algorithme de Metropolis est un outil efficace pour explorer les différents minimums locaux et permet de générer, moyennant un temps de simulation suffisamment long, la population des configurations d'un système donné à une température donnée (102). Ceci est évidemment intéressant quand le but est d'étudier la thermodynamique d'un groupe d'atome, mais ne permet pas d'identifier le minimum global, c.-à-d. le jeu de paramètres cinétiques optimal dans notre cas.

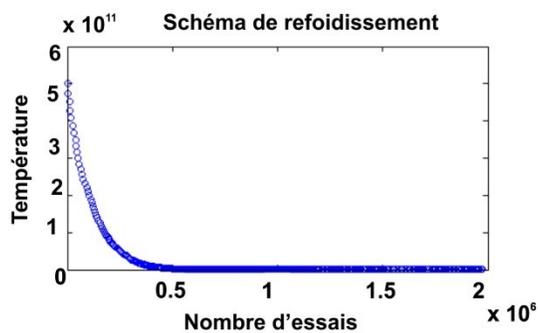
L'idée du recuit simulé est donc d'abaisser progressivement la température de l'algorithme de Metropolis pour ainsi « congeler » le système dans un état qui se veut le minimum global (102). Ainsi, lors du recuit simulé la température initiale est élevée. Les différents jeux de paramètres possibles sont explorés suivant l'algorithme de Metropolis,

jusqu'à ce que le système atteigne l'équilibre thermique. Dans notre cas, l'équilibre thermique est atteint lorsqu'il y a autant de nouveaux jeux de paramètres acceptés qui diminuent l'erreur que de nouveaux jeux acceptés qui augmentent l'erreur (83). La température T est alors diminuée, et le système est équilibré jusqu'à atteindre un nouvel équilibre thermique. L'évolution de la température est illustrée à la **Figure 2-9.B**. Cette procédure peut donc être répétée jusqu'à la convergence du système dans ce qui se veut le minimum global.

A



B



C

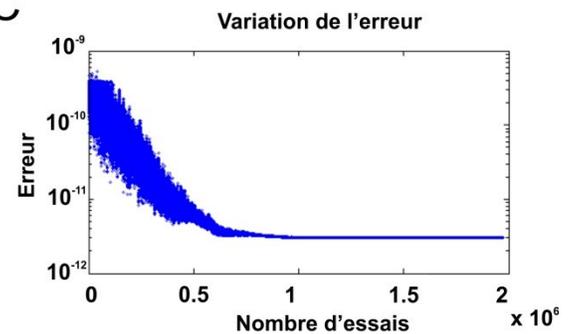


Figure 2-9 Recuit simulé

A. L'algorithme de Metropolis. B. Évolution typique de la température en fonction du nombre d'essais. C. Évolution typique de l'erreur en fonction du nombre d'essais.

2.6 La modélisation moléculaire

La cristallisation de vSGLT a probablement été l'élément le plus significatif dans l'étude des SGLTs au cours des récentes années. En effet, la structure d'un homologue bactérien a permis non seulement un regard nouveau sur la structure des SGLTs, mais aussi

de donner accès à toute une gamme de techniques pouvant être regroupées sous la bannière de la modélisation moléculaire.

2.6.1 Les structures cristallographiques

La cristallographie est un domaine expérimental qui consiste à obtenir un cristal d'une protéine, pour ensuite déterminer la structure de cette protéine à l'aide de la diffraction des rayons X. Chez les protéines membranaires, la cristallisation peut s'avérer extrêmement ardue. Ceci s'explique par le fait que les protéines membranaires sont hydrophobes. Dans un premier temps, les protéines membranaires doivent être purifiées en remplaçant la bicouche lipidique par des molécules de détergent. Ceci rend les protéines instables et possiblement dénaturées et hétérogènes, mais aussi difficiles à cristalliser de par la petite surface de contact disponible pour former les cristaux.

Cette difficulté technique se traduit par une sous-représentation des structures résolues des protéines membrane par rapport aux protéines solubles. Ainsi, le nombre de structures connues de protéines solubles augmente de façon exponentielle depuis la première cristallisation à haute résolution de la structure d'une protéine en 1960 (104). Au moment d'écrire ces lignes, la RCSB Protein Data Bank totalise exactement 85 543 structures protéiques (105). Par contre, la première structure d'une protéine membranaire (donc non soluble) n'a été publiée qu'en 1985 (106). Bien que le nombre de structures de protéines membranaires connaisse lui aussi une croissance exponentielle depuis 1985, la difficulté inhérente à la cristallisation de protéines membranaires fait en sorte que cette croissance est plus faible. Ainsi, seulement 1108 structures de protéines membranaires sont connues à ce jour, nombre d'autant plus petit que ces structures n'appartiennent qu'à 359 protéines distinctes (107). De ce nombre, seulement une cinquantaine appartient à des canaux, des pompes et des transporteurs membranaires. Enfin, une vingtaine seulement appartient à des transporteurs ou des pompes ioniques.

Heureusement pour les non-cristallographes, les structures des différentes protéines peuvent être facilement obtenues via la base de données en ligne RCSB Protein Data Bank

(105). Cette base de données permet de trouver rapidement l'ensemble des structures connues de protéines. Les fichiers sont sous forme .pdb. Ces structures ont été obtenues principalement par diffraction de rayons X ou par résonance magnétique nucléaire, qui représentent respectivement 88 % et 11.2 % des structures répertoriées.

Les fichier .pdb sont en fait des fichiers de texte de plusieurs milliers de lignes comprenant l'ensemble de l'information associé à la structure. Ainsi, on y retrouve les coordonnées de chaque atome, mais aussi la résolution de la structure, les techniques expérimentales utilisées, la séquence d'acides aminés associée, l'article associé, le nom des auteurs, les atomes manquants et bien d'autres informations. Il est donc possible de consulter et de les modifier les fichier .pdb à l'aide de n'importe quel éditeur de texte. Par contre, il est souvent beaucoup plus informatif de se servir de logiciel de visualisation tel que PyMOL (3) ou VMD. Ces logiciels interprète les informations contenues dans les fichiers afin de générer des images tridimensionnelles qu'il est alors possible de bouger, manipuler et modifier.

2.6.2 Modélisation par homologie

La modélisation par homologie permet de bâtir un modèle plausible de la structure tridimensionnelle d'une protéine donnée à partir d'une structure homologue connue. Dans le cas qui nous intéresse, la structure cristallographique de vSGLT a servi de base au modèle par homologie de SGLT1 humain (hSGLT1).

Trois éléments sont essentiels à la réalisation d'un modèle par homologie: 1) la structure d'une protéine homologue, 2) un alignement de séquence entre les deux protéines et 3) les outils informatiques nécessaires pour bâtir le modèle par homologie en respectant les contraintes physiques.

2.6.2.1 L'alignement de séquence

La première étape d'une modélisation par homologie est d'aligner les séquences des 2 protéines. Pour ce faire, nous devons connaître la séquence de la protéine sur laquelle on

se base (vSGLT dans notre cas), et la séquence de la protéine à modéliser (hSGLT1). Ensuite, on fait correspondre à l'aide d'algorithmes informatiques chaque résidu de la première séquence à un résidu de la 2^e séquence ou à un espace vide. Pour ce faire, on prend en compte les acides aminés conservés d'une séquence à l'autre, mais aussi la présence de résidus qui ont des propriétés semblables. Aussi, la nouvelle génération d'algorithmes d'alignement de séquence prend en compte les caractéristiques structurales de la structure cible afin d'obtenir un alignement optimal. Finalement, il est possible de raffiner manuellement et/ou de tester les alignements de séquences obtenus en se basant sur des données expérimentales. On peut ainsi se baser sur des données déjà existantes concernant par exemple la position de résidus précis. On peut aussi valider notre modèle à partir de prédictions de celui-ci, comme par exemple muter les résidus identifiés comme important par l'alignement de séquence pour tester l'effet sur la fonctionnalité (108).

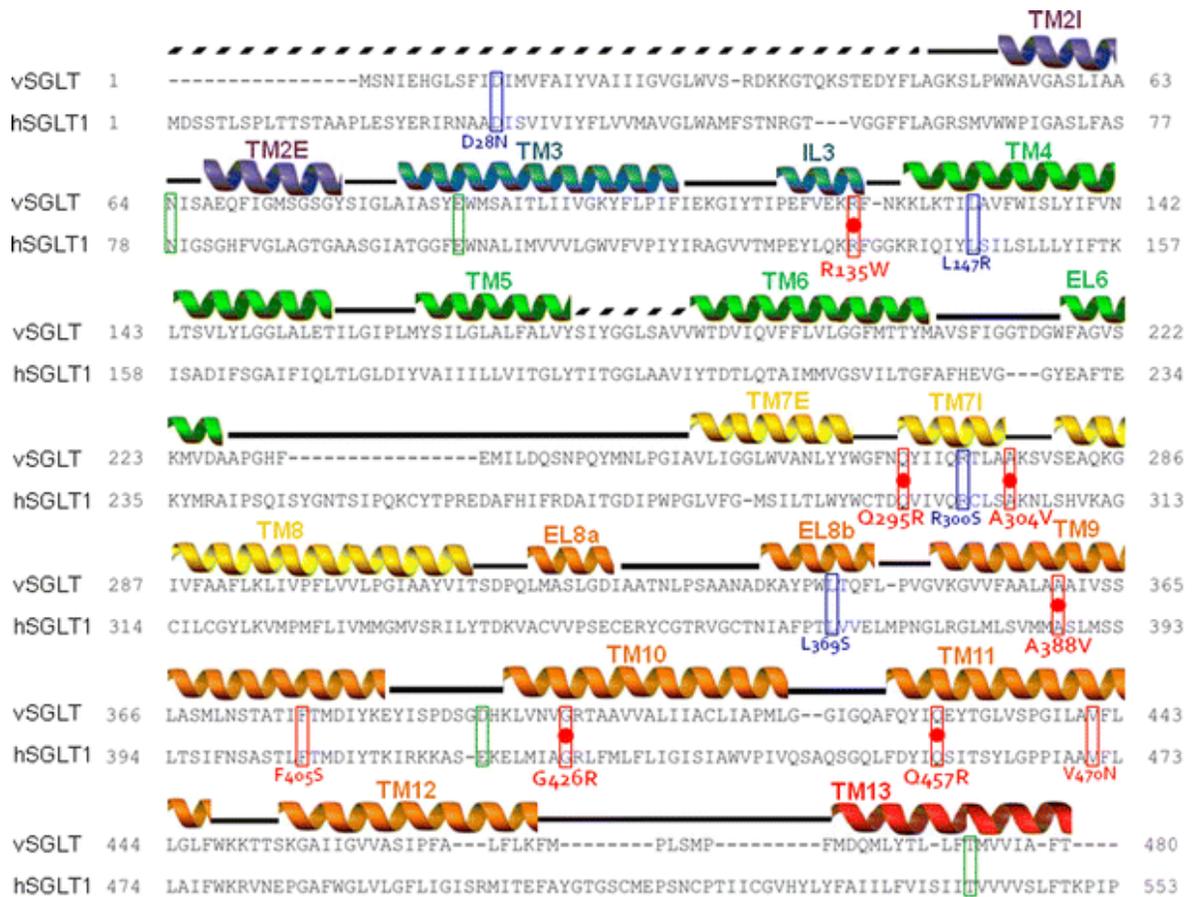


Figure 2-10 Alignement de séquences.

Alignement de séquences entre vSGLT et hSGLT1. Les résidus conservés impliqués dans le syndrome de malabsorption du glucose-galactose (GGM) sont identifiés par des boîtes et des points rouges, les résidus potentiellement important par rapport à des interactions intramoléculaires reliées à des mutations liées au GGM sont identifiés par des boîtes vertes, et les résidus que l'on croit potentiellement liés au GGM sont identifiés par des boîtes bleues. Tiré de (109).

2.6.2.2 Logiciel de modélisation par homologie

Il existe de nombreux logiciels de modélisation par homologie. Leurs algorithmes varient à la fois au niveau de leurs complexités, des méthodes utilisées, et de leurs champs d'application. Par contre, ils partagent tous un mode de fonctionnement général semblable.

Les logiciels de modélisations par homologie superposent les résidus de la protéine à modéliser aux résidus de la protéine cible qui leur sont associés par l'alignement de séquence. Le modèle obtenu est grossier et présente assurément de nombreux conflits stériques et une énergie globale beaucoup trop élevée. Le modèle subit donc une phase d'équilibration, où les conflits stériques sont progressivement éliminés et où l'énergie globale tend vers un minimum global. On obtient alors une structure optimale pour le modèle par homologie, que l'on suppose représentative de la structure réelle.

2.6.3 La dynamique moléculaire

2.6.3.1 Les champs de force

Maintenant que nous disposons d'un ou de plusieurs modèles pour la protéine à l'étude, il est possible « d'animer » ces modèles à l'aide de champs de forces.

Présentement, la majorité des simulations de modélisation moléculaire utilisent des champs de forces empiriques. Ainsi, dans un champ de force typique, l'énergie potentielle totale U_{tot} ressentie par chacun des atomes est décrite par une série de termes additifs décrivant à la fois les interactions liées et non-liées (110) :

$$U_{tot} = U_{liées} + U_{non-liées} \quad (2-11)$$

$$U_{tot} = \{U_{liaisons} + U_{torsions} + U_{dihédraux} + U_{impropre}\}_{liées} \quad (2-12)$$

$$\dots + \{U_{vdw} + U_{electrostatique}\}_{non-liées}$$

$$U_{liaisons} = \sum_{liaisons} K_b (b - b_0)^2 \quad (2-13)$$

$$U_{torsions} = \sum_{torsions} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (2-14)$$

$$U_{dihédraux} = \sum_{dihédraux} K_\varphi (1 + \cos(n\varphi - \delta)) \quad (2-15)$$

$$U_{impropres} = \sum_{impropres} K_\omega (\omega - \omega_0)^2 \quad (2-16)$$

$$U_{LJ} = \sum_{\text{paires non-liées}} \varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{r_{ij}^{min}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{r_{ij}^{min}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (2-17)$$

$$U_{\text{électrostatique}} = \sum_{\text{paires non-liées}} \frac{q_i q_j}{\varepsilon r_{ij}} \quad (2-18)$$

où U_{liaisons} est l'énergie de liaison entre les atomes et b_0 est la distance interatomique optimale ; U_{torsions} est l'énergie des angles de torsions et θ_0 est l'angle optimal formé par 3 atomes; $U_{\text{dihédraux}}$ est l'énergie des angles diédraux, n la périodicité, φ est l'angle et δ est la phase; $U_{\text{impropres}}$ est l'énergie des angles impropres et ω_0 est l'angle optimal entre les différents plans d'un groupe d'atomes; U_{LJ} la force de Van der Waals tel que décrite par un potentiel de Lennard-Jones; $U_{\text{électrostatique}}$ est le potentiel électrostatique.

Bien que de plus en plus raffinés, ces champs de forces empiriques restent souvent imprécis, surtout dans le contexte d'une puissance de calcul informatique grandissante, et donc de simulation de plus en plus longue. Par contre, de nombreux efforts sont déployés actuellement afin de permettre des simulations de dynamique moléculaire dont les champs de force seraient basés en partie ou en totalité sur la mécanique quantique.

2.6.3.2 Calcul des mouvements

Il n'existe pas de solution analytique générale pour l'équation du mouvement d'un système à 3 corps, et donc encore moins pour les systèmes à plusieurs milliers de corps que représentent les simulations de dynamique moléculaire. Il est donc nécessaire de calculer la trajectoire des atomes composant ces systèmes de façon itérative. Encore une fois, quelques algorithmes existent. Ceux-ci diffèrent par leur niveau de complexité, rapidité de calcul et précision. Par contre, la plupart suivent la même procédure générale.

La dérivée première de l'énergie potentielle totale d'une particule i nous donne la force totale qui agit sur cette particule à un temps t :

$$-\nabla U_{\text{tot } i}(t) = F_i(t) \quad (2-19)$$

Selon la seconde loi de Newton:

$$a_i(t) = \frac{F_i(t)}{m_i} \quad (2-20)$$

Donc, si l'on connaît, la position et la vitesse d'une particule au temps t ($v(t)$ et $x(t)$), il est possible de calculer la position et la vitesse de cette même particule à un temps $t + \Delta t$:

$$v(t + \Delta t) = a(t)\Delta t + v(t) \quad (2-21)$$

$$x(t + \Delta t) = 0.5a(t)\Delta t^2 + v(t)\Delta t + x(t) \quad (2-22)$$

Le pas de temps (Δt) doit être choisi avec soins: plus le pas de temps est petit, plus la précision sera grande, mais plus le temps de calcul sera long. Le pas de temps est typiquement de l'ordre de la femtoseconde et le cap de la milliseconde à récemment été atteint au niveau du temps de simulation total (112).

2.6.4 Applications et algorithmes

La modélisation moléculaire regroupe une foule de techniques variées. Par contre, elles suivent toute une logique relativement semblable.

Dans un premier temps, on bâtit le système que l'on désire étudier. Il importe alors de choisir avec soin le niveau de complexité désiré. Un système physiologique représentant une protéine membranaire avec une membrane et un solvant explicite peut avoir facilement plusieurs dizaines de milliers d'atomes, ce qui implique évidemment une lourdeur de calcul importante. Il est souvent possible de réduire de façon considérable la complexité du système sans réduire la qualité de la description du problème à l'étude. Un exemple patent de cela sont les "toy models" (113) utilisés pour décrire les sélectivités des sites de liaisons tout en ne conservant qu'une centaine d'atomes dans les structures étudiées.

Une fois le modèle choisi, il importe de l'équilibrer, c'est-à-dire s'assurer qu'il est stable sous conditions physiologiques. Plusieurs méthodes permettent d'équilibrer un système. Encore une fois, elles suivent toutes une logique commune: la température du

système est graduellement augmentée, et les contraintes artificielles initialement ajoutées au système pour maintenir sa stabilité sont progressivement enlevées.

Il est alors possible de poser des questions à ce système. Toute étude de dynamique moléculaire passe invariablement par une phase de « production ». Le système, laissé à lui-même ou subissant des contraintes artificielles selon différents algorithmes en fonction du problème à l'étude, est soumis à une unité de calcul. Cette unité peut-être un ordinateur personnel, mais plus souvent une grappe de calcul (cluster) spécialisée. Le temps de calcul peut aller de quelques heures à plusieurs semaines. Le résultat de ces calculs, c.-à-d. la trajectoire des différents atomes, est alors enregistrée systématiquement. Ce sont ces trajectoires qui serviront à l'analyse, au « post-processing », de la phase de production. Il est alors possible de calculer l'ensemble des paramètres physiques d'intérêts.

La description de l'ensemble des techniques de dynamique moléculaires n'étant pas le but ici, je vais me contenter d'explicitier les techniques qui ont été utilisées dans le cadre de ce travail.

2.6.4.1 Bâtir le système

2.6.4.1.1 Insertions dans une membrane

Une des difficultés associées à l'étude des protéines membranaires en dynamique moléculaire est la description adéquate de leur environnement. Contrairement aux protéines solubles, qui baignent dans un milieu relativement homogène, les protéines membranaires sont soumises à un environnement hétérogène. Il importe donc de les insérer correctement dans la membrane, d'autant plus que cette étape influence grandement la suite des calculs.

Je me suis servi du module "Membrane Builder" de CHARMM-GUI (114). CHARMM-GUI est un outil extrêmement puissant, car il propose une interface graphique qui permet de générer un script pour CHARMM couvrant l'ensemble des étapes de l'insertion d'une protéine dans la membrane. Il permet même de rouler une partie de ce script sur des serveurs webs. Par contre, la force de CHARMM-GUI est qu'il permet de

télécharger les scripts générés. Ainsi, il permet à un utilisateur peu expérimenté de se familiariser avec les rouages de la dynamique moléculaire, mais aussi à un utilisateur expérimenté d'apporter des modifications à ces scripts avant de les soumettre à ses propres machines.

Je me suis donc servi de CHARMM-GUI pour insérer soit la structure cristallographique de vSGLT, soit le modèle par homologie de hSGLT1, dans la membrane plasmique.

2.6.4.1.2 Le potentiel à l'interface du solvant généralisé

Les systèmes ainsi générés comportent alors ~40 000 atomes chacun. Bien que raisonnable, il est toujours avantageux de réduire ce nombre. Je me suis servi d'un algorithme connu sous le nom de "potentiel à l'interface du solvant généralisé" (Generalised Solvent Boundary Potential, GSBP). Le GSBP permet de ne traiter explicitement que les atomes dans un volume choisi, soit une sphère de 20Å de diamètre centrée autour du site de liaison des sucres. Le reste du système est traité implicitement en le remplaçant par un champ de force généré pour chaque système. Ce champ de force reproduit la contribution des atomes ainsi exclus. Ceci nous permet de réduire le nombre d'atomes total dans chaque système à ~ 7 000.

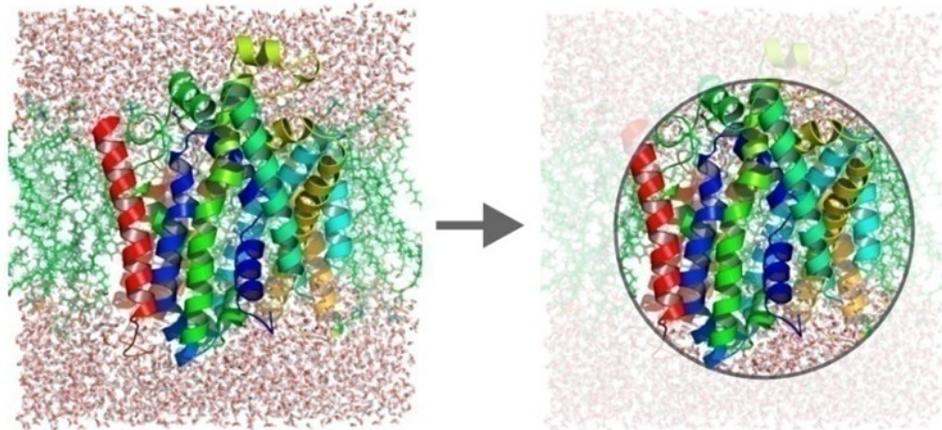


Figure 2-11 GSBP

Seuls les atomes situés à moins de 20 Å du site de liaison des sucres sont explicitement modélisés.

2.6.4.2 Production et analyse des résultats

Deux algorithmes ont été utilisés lors de la phase de production, pour répondre à 2 questions différentes. La simulation Monte-Carlo dans un ensemble grand-canonique (Grand-Canonical Monte-Carlo, MCGC) a permis de répondre à la question « Où est-il possible d'insérer des molécules d'eau dans les structures de vSGLT et hSGLT1? ». Le potentiel de force moyenne (Potential of Mean Force, PFM) a permis de répondre à la question « Avec quelle facilité les molécules d'eau peuvent-elles traverser la structure de vSGLT ? ».

2.6.4.2.1 MCGC

La théorie du MCGC peut être succinctement expliquée ainsi : on se place dans l'ensemble thermodynamique grand-canonique. Cet ensemble thermodynamique permet au nombre de particules présentes dans le système de changer tout en gardant le potentiel chimique constant. Il est alors possible d'insérer/retirer des molécules d'eau du système de façon aléatoire. Une courte simulation de dynamique moléculaire (10 ps) permet alors à la

structure de relaxer autour de la molécule d'eau insérée/retirée. L'algorithme de Metropolis permet alors d'accepter/refuser ce nouvel état du système en se basant sur le changement de l'énergie libre du système. Il a été déterminé par essais et erreurs que 10 000 répétitions de ce processus suffisaient pour obtenir un système saturé en eau.

L'analyse de ces calculs, qui tentaient de répondre à la question « Où est-il possible d'insérer des molécules d'eau dans les structures de vSGLT et hSGLT1 ? » est alors assez triviale: il suffit de visualiser la position des molécules d'eau ainsi insérées.

2.6.4.2.2 PFM

Le MCGC nous a permis de déterminer une voie de perméation plausible de l'eau au travers de vSGLT. Par contre, il nous importait de déterminer la barrière énergétique associée avec ce passage et ainsi la comparer avec les données expérimentales.

Bien qu'une technique déjà existante permettait le calcul du PFM, elle avait pour limitation de ne permettre que de calculer le PFM le long d'une droite qui touche à chacun des réservoirs d'eau (bulk water). La voie de perméation à l'étude ici n'était pas linéaire. Il était donc difficile de se servir de cette méthode sans introduire des artefacts importants. Une nouvelle technique pour calculer le PFM a donc été mise au point dans le cadre de ce travail, principalement par le Dr Javier Cuervo.

Cette technique peut être expliquée comme suit. En partant du système saturé en molécule d'eau généré par le MCGC, une longue (225 ns) simulation de dynamique moléculaire est réalisée. La grande durée de la simulation permet d'avoir un ensemble représentatif. La trajectoire des molécules d'eau au cours de cette simulation est alors analysée afin de calculer la densité des molécules d'eau ($G(x,y,z)$). Les voies de perméation sont alors déterminées en identifiant selon l'axe des Z tous les voxels contigus où la densité d'eau est non nulle. Lorsque toutes les voies de perméation sont identifiées, le PMF peut être calculé en se basant sur la densité moyenne en eau de l'ensemble des voies de perméation selon:

$$PMF(z) = -KT \ln(G(x, y, z)_{moy} / G(x, y, z)_{bulk}) \quad 2-23$$

où $G(x, y, z)_{moy}$ est la densité moyenne dans les voxels considérés et $G(x, y, z)_{bulk}$ est la densité moyenne en eau des réservoirs.

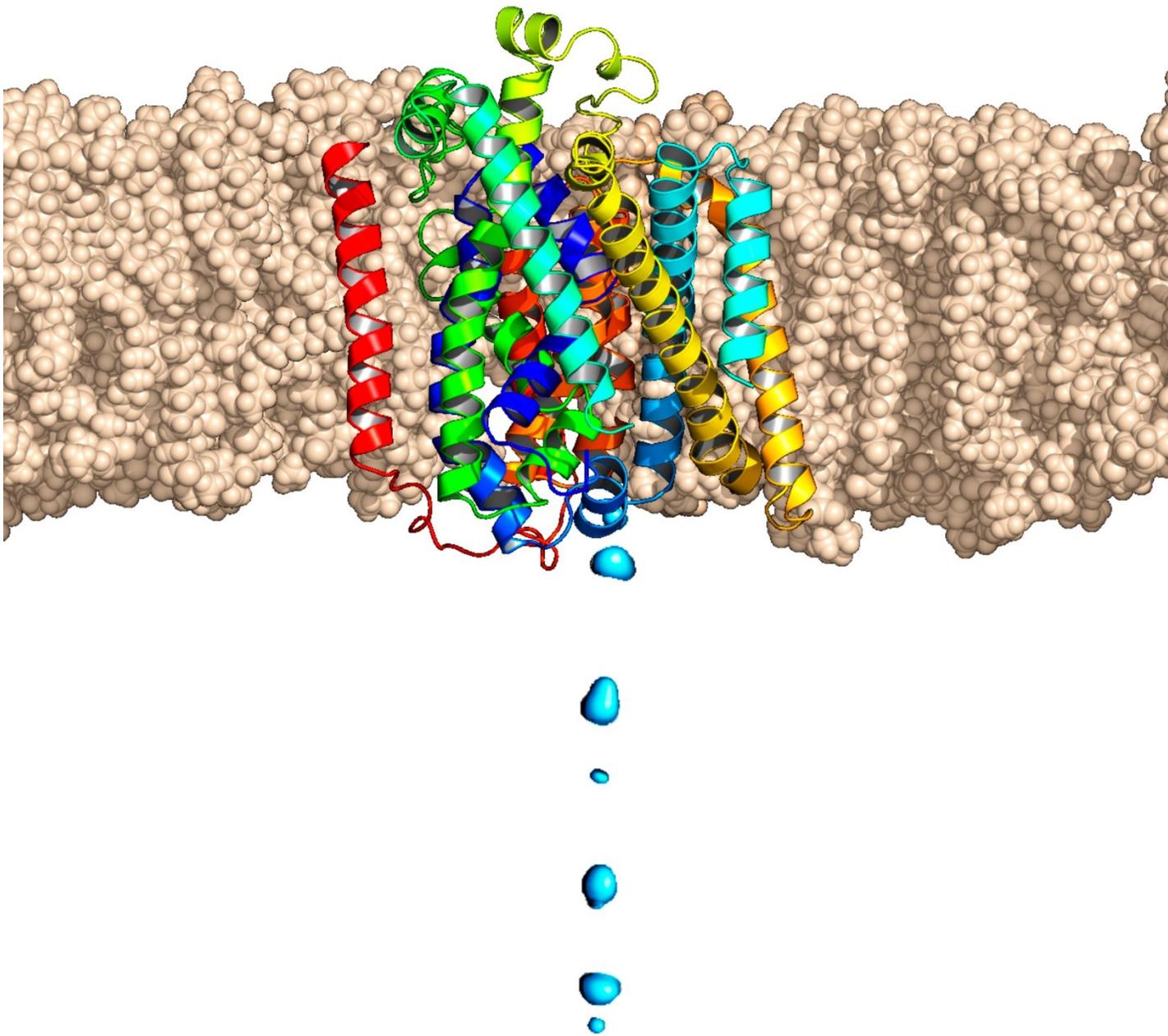
2.7 Références

3. Schrödinger_LLC. The PyMOL Molecular Graphics System.
4. Bruce Alberts, A. J., Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. Garland Science, New York.
82. Gagnon, D. G., C. Frindel, and J. Y. Lapointe. 2007. Effect of substrate on the pre-steady-state kinetics of the Na⁺/glucose cotransporter. *Biophysical journal* 92:461-472.
83. Longpré, J. P., L. J. Sasseville, and J. Y. Lapointe. 2012. Simulated annealing reveals the kinetic activity of SGLT1, a member of the LeuT structural family. *The Journal of general physiology* 140:361-374.
84. Loo, D. D. F., B. A. Hirayama, M. Sala-Rabanal, and E. M. Wright. 2008. How drugs interact with transporters: SGLT1 as a model. *Journal of Membrane Biology* 223:87-106.
86. Dumont, J. N. 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *Journal of Morphology* 136:153-179.
87. Chen, X. Z., M. J. Coady, F. Jackson, A. Berteloot, and J. Y. Lapointe. 1995. Thermodynamic determination of the Na⁺: glucose coupling ratio for the human SGLT1 cotransporter. *Biophysical journal* 69:2405-2414.
88. Geering, K., I. Theulaz, F. Verrey, M. Hauptle, and B. Rossier. 1989. A role for the beta-subunit in the expression of functional Na⁺-K⁺-ATPase in *Xenopus* oocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 257:C851-C858.
89. Taglialatela, M., L. Toro, and E. Stefani. 1992. Novel voltage clamp to record small, fast currents from ion channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Biophysical journal* 61:78-82.
90. Cha, A., and F. Bezanilla. 1997. Characterizing Voltage-Dependent Conformational Changes in the *i> Shaker</i> K⁺ Channel with Fluorescence. *Neuron* 19:1127-1140.*
91. MacAulay, N., and T. Zeuthen. 2010. Water transport between CNS compartments: contributions of aquaporins and cotransporters. *Neuroscience* 168:941-956.
92. Chanda, B., O. K. Asamoah, R. Blunck, B. Roux, and F. Bezanilla. 2005. Gating charge displacement in voltage-gated ion channels involves limited transmembrane movement. *NATURE-LONDON* 7052:852.
93. Gagnon, D. G., C. Frindel, and J. Y. Lapointe. 2007. Voltage-Clamp Fluorometry in the Local Environment of the C255-C511 Disulfide Bridge of the Na⁺/Glucose Cotransporter. *Biophysical journal* 92:2403-2411.
94. Groulx, N., M. Juteau, and R. Blunck. 2010. Rapid topology probing using fluorescence spectroscopy in planar lipid bilayer: the pore-forming mechanism of the toxin Cry1Aa of *Bacillus thuringiensis*. *The Journal of general physiology* 136:497.

95. Wang, D., Z. Zhang, B. Chanda, and M. B. Jackson. 2010. Improved Probes for Hybrid Voltage Sensor Imaging. *Biophysical journal* 99:2355-2365.
96. Longpré, J.-P., Dominique G. Gagnon, Michael J. Coady, and Jean-Yves Lapointe. 2010. The Actual Ionic Nature of the Leak Current through the Na⁺/Glucose Cotransporter SGLT1. *Biophysical journal* 98:1-9.
97. Eyring, H. 1935. The Activated Complex in Chemical Reactions. In *J. Chem. Phys.*
98. Parent, L., S. Supplisson, D. D. Loo, and E. M. Wright. 1992. Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter: II. A transport model under nonrapid equilibrium conditions. *The Journal of membrane biology* 125:63-79.
99. Berteloot, A. 2003. Kinetic mechanism of Na⁺-glucose cotransport through the rabbit intestinal SGLT1 protein. *Journal of Membrane Biology* 192:89-100.
100. Chen, X. Z., M. J. Coady, F. Jalal, B. Wallendorff, and J. Y. Lapointe. 1997. Sodium leak pathway and substrate binding order in the Na⁺-glucose cotransporter. *Biophysical journal* 73:2503-2510.
101. Krofchick, D., S. A. Huntley, and M. Silverman. 2004. Transition states of the high-affinity rabbit Na⁺/glucose cotransporter SGLT1 as determined from measurement and analysis of voltage-dependent charge movements. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 287:C46-C54.
102. Kirkpatrick, S., and M. Vecchi. 1983. Optimization by simulated annealing. *Science (New York, N.Y)* 220:671-680.
103. Metropolis, N., A. W. Rosenbluth, M. N. Rosenbluth, A. H. Teller, and E. Teller. 1953. Equation of state calculations by fast computing machines. *The journal of chemical physics* 21:1087.
104. White, S. H. 2004. The progress of membrane protein structure determination. In *Protein Science*.
105. Berman, H., K. Henrick, and H. Nakamura. 2003. Announcing the worldwide protein data bank. *Nature structural biology* 10:980-980.
106. Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., and Michel, H. 1985. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3Å resolution. In *Nature*.
107. White, S. 2009. Membrane proteins of known 3D structure. URL http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html.
108. Sala-Rabanal, M., B. A. Hirayama, D. D. F. Loo, V. Chaptal, J. Abramson, and E. M. Wright. 2012. Bridging the gap between structure and kinetics of human SGLT1. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 302:C1293-C1305.
109. Raja, M., and R. K. H. Kinne. 2012. Structural Insights into Genetic Variants of Na⁺/Glucose Cotransporter SGLT1 Causing Glucose–Galactose Malabsorption: vSGLT as a Model Structure. *Cell biochemistry and biophysics*:1-8.
110. Brooks, B. R., C. L. Brooks, 3rd, A. D. Mackerell, Jr., L. Nilsson, R. J. Petrella, B. Roux, Y. Won, G. Archontis, C. Bartels, S. Boresch, A. Caflisch, L. Caves, Q. Cui, A. R. Dinner, M. Feig, S. Fischer, J. Gao, M. Hodoscek, W. Im, K. Kuczera, T. Lazaridis, J. Ma, V. Ovchinnikov, E. Paci, R. W. Pastor, C. B. Post, J. Z. Pu, M.

- Schaefer, B. Tidor, R. M. Venable, H. L. Woodcock, X. Wu, W. Yang, D. M. York, and M. Karplus. 2009. CHARMM: the biomolecular simulation program. *J Comput Chem* 30:1545-1614.
111. MD.
 112. Jensen, M. O., V. Jogini, D. W. Borhani, A. E. Leffler, R. O. Dror, and D. E. Shaw. 2012. Mechanism of Voltage Gating in Potassium Channels. *Science Signalling* 336:229.
 113. Noskov, S. Y., and B. Roux. 2007. Importance of hydration and dynamics on the selectivity of the KcsA and NaK channels. *The Journal of general physiology* 129:135-143.
 114. Jo, S., J. B. Lim, J. B. Klauda, and W. Im. 2009. CHARMM-GUI membrane builder for mixed bilayers and its application to yeast membranes. *Biophysical journal* 97:50-58.

Éléments instigateurs



3 Éléments instigateurs

Avant qu'un paradigme scientifique ne soit accepté, il doit bien souvent faire l'objet de nombreuses remises en question. Souvent, un même phénomène est rationalisé de façons différentes et mutuellement exclusives par différents groupes de chercheurs. Il importe alors de tester les différentes hypothèses en les confrontant à la réalité.

C'est ici qu'intervient la science expérimentale. Parfois, des changements subtils aux protocoles expérimentaux permettent d'infirmer ou de confirmer une hypothèse. Souvent, les avancées techniques permettent un regard nouveau sur le phénomène étudié.

L'essentiel de la recherche scientifique tourne autour des controverses, ou du moins la remise en question des idées proposées. C'est pourquoi j'ai décidé d'inclure cette section. Contrairement aux deux sections précédentes qui seront probablement valides pour quelques années encore, cette section est « périssable ». D'ici peu, ou si ce n'est pas déjà fait, les débats dont je ferais état auront soit été résolues, ou plus probablement auront continué à évoluer.

Cette section est donc à la fois un « instantané » de l'état de la recherche dans ces domaines précis, mais aussi une justification pour les différents volets du travail réalisé au cours de mes études doctorales.

3.1 La perméation de l'eau

Au cours des 50 dernières années, plusieurs voies de perméation pour l'eau ont été identifiées. Il a été démontré que l'eau diffuse de façon passive au travers de la bicouche lipidique, mais aussi au travers des canaux à eau, les aquaporines. Leur découverte en 1992 par Peter Agre (115) lui valut le prix Nobel de Chimie de 2003. Par contre, on oublie souvent que la perméation de l'eau au travers de différents transporteurs a été démontrée, notamment chez SGLT1 au début des années 90 (116). Depuis, une dizaine d'articles sur le sujet ont été publiés par différents groupes (117-127).

Tous s'accordent sur 3 observations expérimentales:

1. L'expression de hSGLT1 dans les ovocytes de xénopes augmente la perméabilité à l'eau (121, 128).
2. Cette perméabilité origine directement de hSGLT1, car la perméabilité à l'eau peut être inhibée de façon spécifique par l'inhibiteur classique des SGLTs, la Pz (118, 120, 128).
3. La présence de substrat favorise le passage de l'eau par hSGLT1 (117-119).
4. Il existe une perméabilité passive de SGLT à l'eau car sous l'effet d'un gradient osmotique appliqué, un flux d'eau sensible à la Pz apparaît (118, 120, 124, 125).

3.1.1 La controverse

La controverse tourne autour du mécanisme de la perméation de l'eau au travers de hSGLT1 qui est activée par la présence de glucose. Trois mécanismes distincts ont été proposés pour répondre aux 3 observations expérimentales mentionnées plus haut. Ces mécanismes sont: l'hypothèse du cotransport de l'eau (122, 126, 127), l'hypothèse du compartiment médian (124, 129) et l'hypothèse du gradient osmotique local (117-119).

L'hypothèse du cotransport de l'eau sous sa forme la plus simple suggère que hSGLT1 fait office de cotransporteur actif secondaire d'eau. Cette hypothèse suggère donc que l'eau est transportée au même titre que le sodium et les sucres. Basé sur ceci, des stœchiométries de $2 \text{ Na}^+ : 1 \text{ sucre} : 203 \pm 20 \text{ H}_2\text{O}$ (122) et de $2 \text{ Na}^+ : 1 \text{ sucre} : 269 \pm 12 \text{ H}_2\text{O}$ (127) ont été proposées pour hSGLT1, et de $2 \text{ Na} : 1 \text{ sucre} : 378 \pm 20 \text{ H}_2\text{O}$ (126) et de $2 \text{ Na} : 1 \text{ sucre} : 423 \pm 24$ (127) dans le cas de SGLT1 de lapin.

Les deux autres hypothèses proposent une perméation passive de l'eau stimulée par un gradient osmotique généré par le cotransport des substrats.

La première de ces 2 hypothèses est en fait une adaptation d'une théorie qui fut originalement proposée pour expliquer le transport isosmotique transépithélial de l'eau.

Selon cette hypothèse, les substrats sont accumulés dans un compartiment médian, créant ainsi une hyperosmolarité locale. Cette hyperosmolarité locale stimule un flux d'eau du milieu apical au compartiment médian. L'augmentation du volume d'eau dans le compartiment médian augmente la pression dans celui-ci. Cette pression pousse alors le contenu du compartiment médian vers le côté basolatéral (124, 129).

Le dernier mécanisme proposé est lui aussi passif. Selon l'hypothèse du gradient osmotique local, le cotransport des substrats crée un gradient osmotique local au niveau de la couche non mélangée (unstirred layer) (117-119). Ce gradient local stimule la perméation de l'eau au travers de hSGLT1 via une voie de perméation passive.

3.1.2 Éléments déclencheurs

La pénultième phrase d'une revue de littérature de 2002 traitant de la perméation de l'eau au travers de SGLT1 fut: " Ultimately the question will be resolved when the 3-D structure of SGLT1 is obtained. " (122). La publication de la structure de vSGLT en 2008 (2) permet donc un regard nouveau sur ce problème. À l'automne 2009, j'ai eu la chance de faire un stage en dynamique moléculaire dans le laboratoire de Dr Sergei Noskov, à l'université de Calgary. Cette collaboration a eu pour résultat direct la publication de l'article "The Structural Pathway for Water Permeation through Sodium-Glucose Cotransporters", présenté à la section 4.1.

3.2 L'accessibilité extracellulaire de la boucle 12-13 de SGLT1 et la multimérisation de hSGLT1.

hSGLT1 est un des cotransporteurs les plus étudiés et a été le sujet de nombreuses études structurales (93, 130-136). Ainsi, plusieurs caractéristiques structurelles sont maintenant communément acceptées, d'autre demeurent matière à débat. L'accessibilité extracellulaire de la boucle 12-13 (selon la nomenclature de la famille structurelle de LeuT)

et la multimérisation possible de hSGLT1 sont parmi ces caractéristiques qui sont toujours matière à débat (49).

3.2.1 Le débat

Des études de spectroscopie de fluorescence ont rapporté le marquage extracellulaire de la boucle 12-13 par des réactifs et des fluorophores auxquels la membrane est imperméable (132). Aussi, des études de microscopie à force atomique (MFA) suggèrent elles aussi une accessibilité extracellulaire (135, 137). Ainsi, en sondant la membrane de cellules exprimant SGLT1 avec une pointe à laquelle est lié un anticorps spécifique contre la boucle 12-13 de SGLT1, il est possible de la détecter. Par contre, l'accessibilité extracellulaire de la boucle 12-13 est toujours sujette à une opposition certaine (49).

Pour ce qui est de la multimérisation, des études d'inactivation par radiation suggèrent la présence de tétramères basé sur un poids d'inactivation de ~290 kDa (133). Le cryodécapage (Freeze fracture) suggère un monomère, selon la présence de corpuscule d'environ 50 par 60 Å attribués à hSGLT1 (130). Finalement, bien que la modélisation cinétique est principalement basée sur des modèles monomérique (82, 84), certains modèles suggèrent une coopérativité entre sous-unités (138, 139).

3.2.2 Éléments déclencheurs

L'utilisation d'une molécule peu connue, le DPA, permet l'application de nouvelles techniques de spectroscopie de fluorescence.

Le DPA est une molécule amphiphile chargée qui absorbe (quench) la fluorescence selon un large spectre. Il est donc possible de connaître et de contrôler sa position en fonction du potentiel transmembranaire. Comme l'explique la section 2.4.5.2, il a été permis d'obtenir un ratio signal sur bruit très élevé, rendant les mesures expérimentales beaucoup plus probantes.

3.3 Modélisation cinétique

3.3.1 Les points de vue

Tel que dit à la section 2.5.2, une des difficultés majeures de la modélisation cinétique est l'estimation d'un seul jeu de paramètres cinétiques qui permet de reproduire les courants expérimentaux dans l'ensemble des conditions expérimentales. Jusqu'à présent, l'approche la plus répandue consiste caractériser par les courbes $I(V_m)$, $Q(V_m)$ et $\tau(V_m)$ les courants expérimentaux et tenter de trouver les paramètres appropriés pour reproduire ces courbes.

Pour des raisons historiques et techniques, un certain nombre d'hypothèses ont été intégrées aux modèles cinétiques des SGLTs depuis la parution du modèle séminal par Parent et al. en 1992 (98), au point de devenir de véritables dogmes.

La première de ces hypothèses concerne la valeur des z_i et suppose que le cotransporteur est électriquement neutre lorsque ses sites de liaisons sont occupés par les substrats, c.-à-d. que la charge de +2 des 2 ions Na^+ est parfaitement contrebalancée par la charge intrinsèque du cotransporteur. Il en découle deux contraintes sur le modèle, qui ont pour effet (et initialement pour but (98)) de faciliter les calculs.

1. La contrainte 1 qui stipule que seules les transitions précédant la liaison du sucre (transitions $S1 \leftrightarrow S2$, $S2 \leftrightarrow S3$ selon le modèle la **Figure 2-8**) peuvent être électrogéniques.
2. La contrainte 2 qui stipule que la somme de la valeur absolue des z_i égale +2:

$$\sum |z_i| = 2 \quad 3-1$$

La seconde hypothèse stipule une dépendance au carré à la concentration de Na^+ par la transition dépendante du sodium afin de refléter une liaison coopérative des ions Na^+ , c.-à-d. :

$$k_{Na} \propto [Na_{out}^+]^x, \text{ où } x = 2 \quad 3-2$$

3.3.2 Éléments déclencheurs

Deux facteurs ont stimulés les travaux sur la modélisation cinétique réalisée dans le cadre de ce travail.

D'abord, l'identification d'un nouveau cotransporteur électrogénique de la famille SLC5, le cotransporteur de Na^+ /myo-Inositol SMIT2. Il était alors intéressant de caractériser les courants, et en tirer un modèle cinétique.

De plus, l'augmentation significative de la puissance de calcul informatique à notre disposition, dans un premier temps au niveau des simples ordinateurs personnels et éventuellement au niveau des grappes de calculs, nous permettait de revoir notre approche à la détermination des paramètres cinétiques.

3.4 Références

2. Faham, S., A. Watanabe, G. M. Besserer, D. Cascio, A. Specht, B. A. Hirayama, E. M. Wright, and J. Abramson. 2008. The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na^+ /sugar symport. *Science (New York, N.Y)* 321:810-814.
49. Wright, E. M., D. D. F. Loo, and B. A. Hirayama. 2011. Biology of human sodium glucose transporters. *Physiological Reviews* 91:733.
82. Gagnon, D. G., C. Frindel, and J. Y. Lapointe. 2007. Effect of substrate on the pre-steady-state kinetics of the Na^+ /glucose cotransporter. *Biophysical journal* 92:461-472.
84. Loo, D. D. F., B. A. Hirayama, M. Sala-Rabanal, and E. M. Wright. 2008. How drugs interact with transporters: SGLT1 as a model. *Journal of Membrane Biology* 223:87-106.
93. Gagnon, D. G., C. Frindel, and J. Y. Lapointe. 2007. Voltage-Clamp Fluorometry in the Local Environment of the C255-C511 Disulfide Bridge of the Na^+ /Glucose Cotransporter. *Biophysical journal* 92:2403-2411.
98. Parent, L., S. Supplisson, D. D. Loo, and E. M. Wright. 1992. Electrogenic properties of the cloned Na^+ /glucose cotransporter: II. A transport model under nonrapid equilibrium conditions. *The Journal of membrane biology* 125:63-79.

115. Preston, G. M., T. P. Carroll, W. B. Guggino, and P. Agre. 1992. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* (New York, N.Y) 256:385-387.
116. Fischbarg, J., K. Kuang, J. C. Vera, S. Arant, S. C. Silverstein, J. Loike, and O. M. Rosen. 1990. Glucose transporters serve as water channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87:3244.
117. Charron, F. M., M. G. Blanchard, and J. Y. Lapointe. 2006. Intracellular hypertonicity is responsible for water flux associated with Na⁺/glucose cotransport. *Biophys J* 90:3546-3554.
118. Duquette, P. P., P. Bissonnette, and J. Y. Lapointe. 2001. Local osmotic gradients drive the water flux associated with Na⁽⁺⁾/glucose cotransport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3796-3801.
119. Gagnon, M. P., P. Bissonnette, L. M. Deslandes, B. Wallendorff, and J. Y. Lapointe. 2004. Glucose accumulation can account for the initial water flux triggered by Na⁺/glucose cotransport. *Biophysical journal* 86:125-133.
120. Loo, D., B. Hirayama, A. Meinild, G. Chandy, T. Zeuthen, and E. Wright. 1999. Passive water and ion transport by cotransporters. *The Journal of Physiology* 518:195.
121. Loo, D., T. Zeuthen, G. Chandy, and E. Wright. 1996. Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:13367.
122. Loo, D. D., E. M. Wright, and T. Zeuthen. 2002. Water pumps. *J Physiol* 542:53-60.
123. Meinild, A., D. A. Klaerke, D. D. Loo, E. M. Wright, and T. Zeuthen. 1998. The human Na⁺-glucose cotransporter is a molecular water pump. *J Physiol* 508 (Pt 1):15-21.
124. Naftalin, R. J. 2008. Osmotic water transport with glucose in GLUT2 and SGLT. *Biophysical journal* 94:3912-3923.
125. Zeuthen, T. 2010. Water-transporting proteins. *Journal of Membrane Biology* 234:57-73.
126. Zeuthen, T., B. Belhage, and E. Zeuthen. 2006. Water transport by Na⁺-coupled cotransporters of glucose (SGLT1) and of iodide (NIS). The dependence of substrate size studied at high resolution. *The Journal of Physiology* 570:485.
127. Zeuthen, T., A. K. Meinild, D. D. Loo, E. M. Wright, and D. A. Klaerke. 2001. Isotonic transport by the Na⁺-glucose cotransporter SGLT1 from humans and rabbit. *J Physiol* 531:631-644.

128. Loike, J., S. Hickman, K. Kuang, M. Xu, L. Cao, J. Vera, S. Silverstein, and J. Fischbarg. 1996. Sodium-glucose cotransporters display sodium- and phlorizin-dependent water permeability. *American Journal of Physiology- Cell Physiology* 271:C1774.
129. Naftalin, R. 2010. Reassessment of Models of Facilitated Transport and Cotransport. *Journal of Membrane Biology* 234:75-112.
130. Eskandari, S., E. M. Wright, M. Kreman, D. M. Starace, and G. A. Zampighi. 1998. Structural analysis of cloned plasma membrane proteins by freeze-fracture electron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:11235-11240.
131. Gagnon, D. G., P. Bissonnette, and J. Y. Lapointe. 2006. Identification of a disulfide bridge linking the fourth and the seventh extracellular loops of the Na⁺/glucose cotransporter. *The Journal of general physiology* 127:145.
132. Gagnon, D. G., A. Holt, F. Bourgeois, B. Wallendorff, M. J. Coady, and J. Y. Lapointe. 2005. Membrane topology of loop 13-14 of the Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1): A SCAM and fluorescent labelling study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1712:173-184.
133. Jetté, M., V. Vachon, M. Potier, and R. Béliveau. 1997. Radiation-inactivation analysis of the oligomeric structure of the renal sodium/-glucose symporter. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1327:242-248.
134. Liu, T., P. Speight, and M. Silverman. 2009. Reanalysis of structure/function correlations in the region of transmembrane segments 4 and 5 of the rabbit sodium/glucose cotransporter. *Biochemical and biophysical research communications* 378:133-138.
135. Puntheeranurak, T., L. Wildling, H. J. Gruber, R. K. H. Kinne, and P. Hinterdorfer. 2006. Ligands on the string: single-molecule AFM studies on the interaction of antibodies and substrates with the Na⁺-glucose co-transporter SGLT1 in living cells. *Journal of cell science* 119:2960.
136. Turk, E., C. J. Kerner, M. P. Lostao, and E. M. Wright. 1996. Membrane topology of the human Na/glucose cotransporter SGLT1. *Journal of Biological Chemistry* 271:1925.
137. Tyagi, N. K., T. Puntheeranurak, M. Raja, A. Kumar, B. Wimmer, I. Neundlinger, H. Gruber, P. Hinterdorfer, and R. K. H. Kinne. 2010. A biophysical glance at the outer surface of the membrane transporter SGLT1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*.
138. Chenu, C., and A. Berteloot. 1993. Allosterism and Na⁺⁺-d-glucose cotransport kinetics in rabbit jejunal vesicles: Compatibility with mixed positive and negative cooperativities in a homo-dimeric or tetrameric structure and experimental evidence for only one transport protein involved. *Journal of Membrane Biology* 132:95-113.

139. Koepsell, H., and J. Spangenberg. 1994. Function and presumed molecular structure of Na⁺-D-glucose cotransport systems. *Journal of Membrane Biology* 138:1-11.

4 The Structural Pathway for Water Permeation through Sodium-Glucose Cotransporters

Louis J. Sasseville, Javier E. Cuervo, Jean-Yves Lapointe and Sergei Yu. Noskov
Biophysical Journal, Volume 101, Issue 8, 19 October 2011, Pages 1887–1895

4.1 Contribution personnelle

J'ai réalisé et analysé l'ensemble des simulations MCGC. J'ai aussi effectué et analysé l'ensemble des mesures expérimentales. J'ai rédigé la version finale de l'article avec l'aide du Dr Javier Cuervo, sous la supervision des Drs Jean-Yves Lapointe et Sergei Noskov.

4.2 Résumé

Bien que la perméation de l'eau au travers de la membrane soit médiée par plusieurs types de protéines membranaires, seul le mécanisme de perméation au travers des aquaporines est résolu au niveau atomique. La cristallisation du transporteur sodium/galactose de *Vibrio parahaemolyticus* (vSGLT) permet l'étude d'une voie putative de perméation de l'eau à l'aide de techniques computationnelles à la fois au travers de vSGLT mais aussi au travers de son homologue humain, le cotransporteur sodium/glucose (hSGLT1). Des simulations Monte-Carlo dans l'ensemble grand-canonique permirent l'insertion de molécules d'eau stables chez les deux protéines, démontrant la présence d'une voie de perméation hydratée composée d'une centaine de molécules d'eau. Ceci procure une rationalisation structurelle pour la perméation passive de l'eau, qui n'est pas compatible avec l'hypothèse du cotransport de l'eau. Des calculs de potentiel de force moyenne (PFM) associent une barrière unique de $7.7 \text{ kCal mol}^{-1}$ au passage de l'eau au travers de la structure cristallographique de vSGLT, ce qui concorde avec les valeurs expérimentales publiées précédemment. Des mesures électrophysiologiques et volumétriques sur ovocytes de xénopes ont démontré que la voie de perméation passive existe dans différents états conformationnels chez hSGLT1. Explicitement, les conditions expérimentales visant à émuler la conformation de la structure cristallographique ont

démontrés une perméabilité passive à l'eau. Ces résultats jettent les bases à la compréhension de la perméabilité à l'eau associée aux cotransporteurs.

4.3 Abstract

Although water permeation across cell membranes occurs through several types of membrane proteins, the only permeation mechanism resolved at atomic resolution is that through aquaporins. Crystallization of the *Vibrio parahaemolyticus* sodium-galactose transporter (vSGLT) allows investigation of putative water permeation pathways through both vSGLT and the homologous human Na-glucose cotransporter (hSGLT1) using computational methods. Grand canonical Monte-Carlo and Molecular Dynamics simulations were used to stably insert water molecules in both proteins, showing the presence of a water-filled pathway composed of ~100 water molecules. This provides a structural basis for passive water permeation which is difficult to reconcile with the water cotransport hypothesis. Potential of mean force (PMF) calculations of water going through the crystal structure of vSGLT shows a single barrier of 7.7 kcal mol⁻¹, in agreement with previously published experimental data. Electrophysiological and volumetric experiments performed on hSGLT1-expressing *Xenopus* oocytes showed that the passive permeation pathway exists in different conformational states. In particular, experimental conditions that aim to mimic the conformation of the crystal structure displayed passive water permeability. These results provide groundwork for understanding the structural basis of cotransporter water permeability.

4.4 Introduction

Water transport across biological membranes is one of the most basic physiological processes occurring in living cells. In addition to simple diffusion through the lipid bilayer and facilitated transport through aquaporins, a number of membrane proteins which transport other substrates were shown to also mediate water permeation. One of the first measurements of transporter-related water permeation across glucose facilitated transporters was published in 1989 (140). Later, the Na/glucose co-transporter (SGLT1), which is responsible for Na/glucose cotransport in the intestine and in renal late proximal tubules, was also found to be water-permeable (121, 128). SGLT1 was the first cloned

member of the SLC5 gene family which includes Na-coupled transporters for sugars, myo-inositol, monocarboxylates, iodide, vitamins and choline (141). Several laboratories have reported that expressing SGLT1 in *Xenopus laevis* oocytes produced a two-fold increase in passive water permeability, which returned to the level found in non-injected oocytes upon addition of phlorizin (Pz), specific SGLT1 inhibitor (118, 120, 128). While the passive water permeability of SGLT1 is well accepted, the ability of SGLT1 to mediate secondary active water transport has been debated for a decade (142, 143). Based on the observation that addition of glucose to an oocyte expressing SGLT1 is accompanied, within 5-20 s, by a readily detectable cell swelling, some researchers have proposed the "water cotransport hypothesis" which stipulates that SGLT1 physically couples the transport of 2 Na⁺ ions with 1 glucose molecule and some 250-400 water molecules (122, 127). Alternatively, we have argued that all water transport must in fact be passive because a transport-dependent osmotic gradient of the appropriate amplitude could be detected across the oocyte membrane as soon as 20 s after adding glucose (117-119). The recent crystallization of the SGLT bacterial homologue vSGLT by Faham *et al.* (2) allows investigation of the water pathway across the cotransporter at a molecular level using atomistic simulations helping to resolve long-standing questions regarding the mechanism of transporter-mediated water permeation. In the case of vSGLT, it is worth noticing that no experimental data exists about its water permeability which is probably due to poor expression level in *Xenopus* oocytes (144). In the present paper, we used homology modeling, Grand-Canonical Monte-Carlo (GCMC) simulations, molecular dynamics and potential of mean force calculations to unveil molecular mechanism of water permeation through the transporter. The relevance of the identified passive permeation pathway was then experimentally confirmed for the different conformational states of hSGLT1 that can be reached by changing membrane potential and external Na concentrations.

4.5 Methods

4.5.1 Molecular Dynamic, Grand-Canonical Monte-Carlo and Potential Mean of Force calculations

We have performed Molecular Dynamics (MD), Grand-Canonical Monte-Carlo (GCMC) simulations and potential of mean force (PMF) calculations in order to explore the

existence of water permeation pathways in two models, namely the available open-inwards vSGLT crystal structure and a homology model that we built for human SGLT1 (hSGLT1), which shares 32% identity (60% similarity) with the amino acid sequence of vSGLT (2).

The starting configuration for vSGLT was taken from the X-ray coordinates published by Faham *et al* (2) (PDB ID 3DH4, Chain A) and was re-oriented based on the orientation of membrane proteins (OPM) database (145). An hSGLT1 homology model based on the published sequence alignment (2) was generated using the SCWRL web-server (146). The sequence identity is sufficient for credible homology modeling (147, 148). Furthermore, the identity found in the TM segments that are playing important roles in the water pathway is even higher, whereby ensuring the relevance of the constructed model. The sequence identity between hSGLT1 and vSGLT1 is 34% and 40% for TM2 and TM6, respectively (See also Figure 4-3 C).

Both protein systems were embedded in a lipid membrane using a multi-step membrane building procedure (CHARMM-GUI) described before (149-151). The simulation box contained the transporter, bound sodium ions, one substrate, and ~110 lipid molecules (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, POPC) solvated in an explicit 100 mM NaCl aqueous solution. A snapshot of the full simulation box is shown in **Figure 4-1 A**. All GCMC/MD computations were carried out using CHARMM version c35b1 with the CHARMM27 force-fields for proteins and lipids (110). MD simulation methods were similar to those used in previous studies of membrane systems (149). Briefly, constant temperature/constant pressure algorithms were applied (with pressure at 1 atm and temperature at 315 K). Periodic boundary conditions were used for the rectangular system. Electrostatic interactions were treated with the Particle Mesh Ewald (PME) algorithm with a $96 \text{ \AA} \times 96 \text{ \AA} \times 96 \text{ \AA}$ grid for fast Fourier transform, $\kappa=0.34 \text{ \AA}^{-1}$ and a sixth order spline interpolation. The non-bonded interactions were smoothly switched off at 12-14 \AA . Each simulation system was equilibrated for 3 ns without any configurational constraints. Additionally, to test the stability of the homology model, we performed an equilibrium MD simulation of 15 ns at 345 K. During the length of this simulation the model remained stable, secondary structure domains were preserved and the RMSD of the alpha-carbon atoms plateaued around 4 \AA .

Following the equilibrium MD simulations, GCMC simulations were performed to stably insert water molecules inside the models (152). The general principles of a GCMC simulation can be explained as follows: GCMC allows variation of the number of particles in the system, in this case water, while keeping the chemical potential constant. In our methodology this is done in an area of interest that is explicitly treated while the rest of the system is mapped into a continuous model. In the present case, we focused on the region of the system that is centered on the sugar binding site. Within the GCMC framework, water molecules are randomly inserted or deleted following a Metropolis algorithm. Therefore, based on the change in net free energy following insertion or deletion of a water molecule, the new conformation will be either accepted or rejected.

Only the atoms located within 20 Å of the sugar binding site were treated explicitly. All other atoms in the system were considered implicitly using a generalized solvent boundary potential (GSBP) (153) generated for each system. It has been shown that the use of GSBP significantly decreases the size of the system (in our case from ~40,000 to ~7,000 atoms, **Figure 4-1 B**) while keeping treatment of dynamics in the explicitly treated part of the system reasonably accurate (154). After the GSBP maps were generated, the reduced systems were minimized and equilibrated for 0.5 ns. For GCMC simulations, models of hSGLT1 and vSGLT transporters were set to be ligand-free, i.e. neither sugar nor ions were present for the GCMC cycles. We have used recommended values for acceptance probabilities, translational and rotational moves and excess chemical potential of water molecules (~ 6 kcal/mol in accordance with data on TIP3P water) (152). A short Langevin Dynamics run of 10 ps was used to relax the protein structure around an inserted water molecule, thus accounting for local flexibility and removing steric clashes. Each MC cycle consisted of 100 minimization steps and it was determined by trial and error that at least 100 MC cycles needed to be performed for full saturation to be achieved.

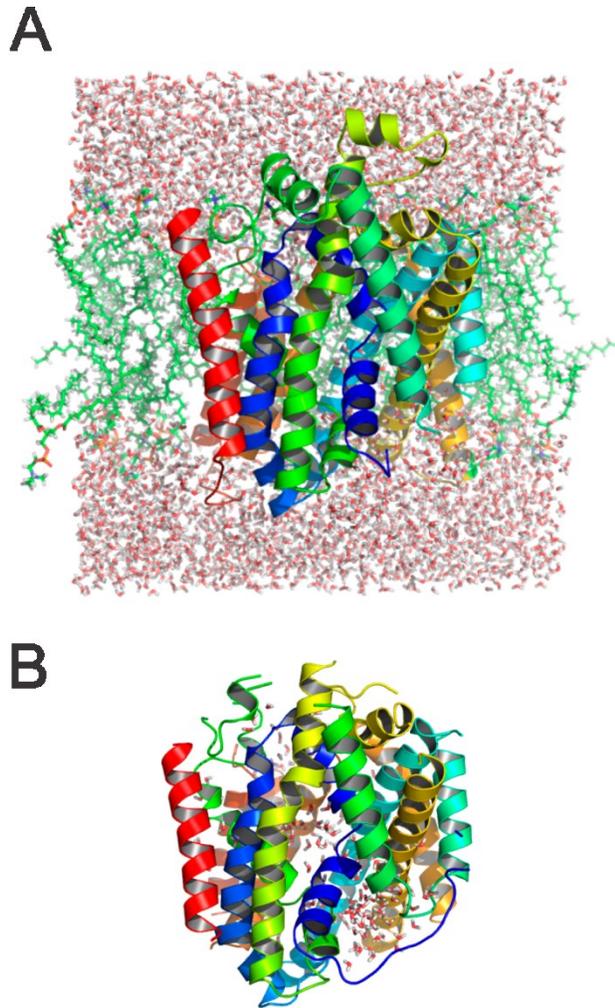


Figure 4-1 Complete MD system

A) Complete equilibrium MD system and B) reduced GCMC/MD system, both for the crystal structure of vSGLT.

To complement the previous studies, we calculated the potential of mean force along the water permeation path of vSGLT. To this end we calculated the spatial water density ($G(x,y,z)$) in the simulation box. A 225 ns MD simulation of the whole system was carried out to sample the position of water. The trajectory was post-processed and the 3D water density was calculated. We used a cubic grid with voxels of 125 \AA^3 . This volume corresponds to roughly 4 times the volume occupied by a single water molecule. The cell unit volume was chosen so that it would be possible to fit two water molecules along the diagonal of a voxel. To calculate the PMF, an algorithm was implemented to find and

follow all possible paths that go from the extracellular side to the intracellular side of the membrane. We define a path as a collection of continuous voxels with a density value >0 that also hold the following conditions: i) the position of each voxel in the path changes by one unit in the Z direction towards the intracellular side, and ii) the difference between the X and Y positions of two contiguous voxels cannot be larger than one unit cell. Once all possible continuous paths were identified the PMF was calculated based on the average density ($G(x, y, z)_{ave}$) over all continuous paths as:

$$PMF(z) = -KT \ln(G(x, y, z)_{ave} / G(x, y, z)_{bulk}) \quad (4-1)$$

where $G(x, y, z)_{bulk}$ is the average density of the bulk water region along the path. Since the position in the Z direction of the path increases monotonically by one unit cell, the calculated PMF is effectively the projection of the 3D PMF along the z axis.

4.5.2 Oocyte preparation and injection

Oocytes were surgically removed from *X. laevis* frogs and were defolliculated as described previously (155). One or two days after defolliculation, healthy oocytes were injected with 46 nL of water containing mRNA coding for myc-tagged human SGLT1 (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). As shown previously (155), this N-terminus epitope-tagged version of SGLT1 displays properties that are indistinguishable from the untagged form.

4.5.3 Solutions

Isotonic solutions for volumetric and electrophysiological experiments contained: 67.5 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.82 mM MgCl_2 , 0.74 mM CaCl_2 , 5 mM Hepes (pH adjusted to 7.6 with 2 M Tris) and 50 mM mannitol (final osmolality of 197 mOsm/kg H_2O). Hypotonic solutions were obtained by removing 50 mM mannitol (final osmolality of 147 mOsm/kg H_2O). 200 μM Pz (Sigma) was directly added to hypotonic solutions from a concentrated stock solution in ethanol (500 mM). Na-free hypotonic solution was obtained by replacing 67.5 mM NaCl with 67.5 mM N-methyl-D-glucamine-Cl (NMDG-Cl) (Sigma). The osmolality of each solution was controlled within 1 mOsm/kg H_2O using a vapor pressure osmometer (Advanced DigiMatic Osmometer, model 3D2, Advanced

Instruments, Norwood, MA). For all experimental protocols, oocytes were equilibrated for at least 20 min in isotonic solution to obtain a stable volume measurement.

4.5.4 Optical and electrophysiological measurement

Water permeability was evaluated by optical measurements on oocytes challenged with hypotonic media. Details of the procedure are given in previous publications dealing with SGLT1 and water transport (96, 118, 127). Briefly, the experimental chamber (volume of 0.07 ml) was specifically designed to enable rapid solution changes (solution flux of 1.2 ml/min) thus allowing measurement of rapid changes in oocyte volume. The oocyte was illuminated from above with a light-emitting diode dipped in the bath solution and high contrast images were captured with a CCD camera attached to an inverted microscope equipped with a 3X objective. Oocyte volume was calculated from its cross-section measured 30 times/s with custom-made pixel counting software. Two-microelectrode voltage-clamp experiments and data acquisition were carried out as described previously (156). Oocytes were equilibrated for at least 20 minutes in isotonic solution before impalement. Once impaled, the appropriate holding potential was imposed and an isotonic solution was superfused. Both measured current and volume were allowed to stabilise before the actual trial was initiated (typically ~5 min). A typical assay is shown in **Figure 4-5 A**. Because trans-membrane water movement decreases the local osmotic gradient, water fluxes decrease with time. In addition to using short time durations for the different experimental conditions (60 s for each), we circumvented this problem by bracketing a given experimental condition by two identical control conditions. For example in **Figure 4-5 A** where the effect of membrane potential on water permeability was tested, the oocyte was held at -100 mV, then at -20 mV, and then at -100 mV (corresponding to experimental conditions "pre", "exp" and "post", respectively). The value for the swelling rate at -100 mV was taken as the mean of the "pre" and "post" conditions and was compared to the swelling rate measured at -20 mV. In trials assessing the effect of Na, "exp" corresponded to a Na-free solution, while "pre" and "post" were in the presence of 67.5 mM Na. At the end of each trial, Pz was added to the bath to assess the oocyte's expression level. Because water permeability of an individual oocyte depends upon the level of expression of hSGLT1, paired measurements were performed. In order to control for possible effects of

external Na or V_m on the endogenous water permeability, the two protocols were also applied to non-injected oocytes.

The water permeability (P_f) of the oocyte was calculated using the swelling rate resulting from a hypotonic shock according to the relation (96, 157):

$$P_f = \frac{1}{S \times v_w \times \Delta\pi} \frac{dV}{dt} \quad (4-2)$$

where S is a standard oocyte surface of 0.4 cm^2 (assuming a membrane infolding factor of 9) (158), v_w is the specific volume of water ($18.2 \text{ cm}^3/\text{mol}$), $\Delta\pi$ represents the size of the hypotonic shock (50 mOsm in the case of this study) and dV/dt is the swelling rate (i.e. the slope of the volume vs time curve).

4.6 Results

Although sequence homology between vSGLT and hSGLT1 is reasonably high, the spatial localization of water insertion regions obtained for the two proteins are slightly different. The GCMC simulations produced a discontinuous water permeation pathway in vSGLT, displaying a 14 \AA gap in the external half of the protein, centered at $\sim 10 \text{ \AA}$ above the ligand binding site (see **Figure 4-2 A**), while a stable, quasi-continuous water pathway was readily identified in the hSGLT1 model (see **Figure 4-2 B**).

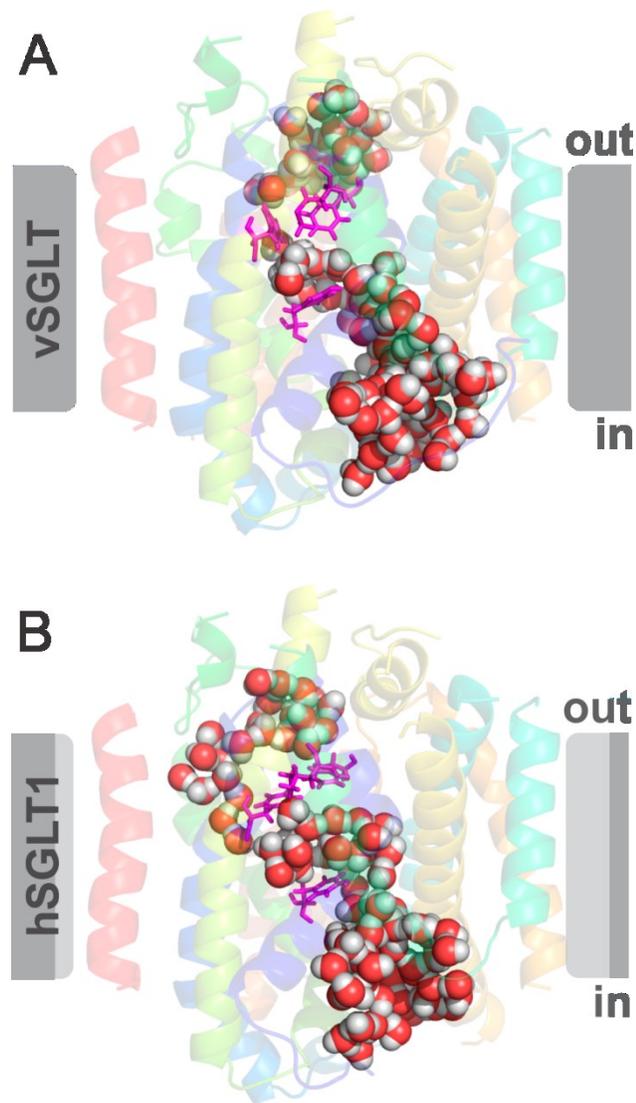


Figure 4-2 Water permeation pathway

The water permeation pathway through vSGLT (A) and hSGLT1 (B). Hydrophobic plug residues are shown in stick representation. Only relevant water molecules are shown.

The hSGLT1 homology model displays a water permeation pathway extending from the intra- to the extracellular side. This pathway goes through the intracellular vestibule and the sugar binding site, but doesn't follow the putative substrate pathway in the region between the sugar binding site and the external face of the cotransporter. If TM segments are numbered according to the LeuT nomenclature (where vSGLT's N-terminal TM segment becomes TM -1, the next becomes TM1, and so forth), the putative substrate pathway is

proposed to go through the extracellular hydrophobic plug formed by TM 1, 2 and 10 (2), while the proposed water permeation pathway found in the present study runs parallel to this and goes through the four-helix bundle formed by TM1, 2, 6 and 7 (See **Figure 4-6**).

In this region of hSGLT1, a structural constriction reduces the permeation pathway to a single-file water chain followed by a 4.3 Å gap of low water density (Figure 4-3 B). This gap may indicate the presence of a structural barrier to the formation of a continuous water permeation pathway across hSGLT1. The barrier is formed by a specific group of residues, namely Phe-101, Ala-105 (TM2), Met-283, Leu-286, Thr-287 (TM6E) and Gln-455 (TM10). Examination of water-insertion zones suggests that this water depleted region is not due to possible steric clashes, as sufficient space to accommodate additional water molecules was found to be available.

Similar to the results of MD and GCMC/MD simulations done on hSGLT1, the equilibrated vSGLT structure exhibits hydration of the intracellular and extracellular vestibules. However, only part of the extracellular-side pathway found in the hSGLT1 system is conserved (**Figure 4-2 A**). The structure of vSGLT cannot accommodate stable water molecules in the general area corresponding to the constriction zone found in hSGLT1. Comparison with the constriction found in hSGLT1 allowed identification of the relevant residues of vSGLT in or around this discontinuity: Tyr-87 (TM2), Ala-259 (TM6E), Gln-425, Gln-428 (TM10), Phe-479 and Met-483 (TM12) (see Figure 4-3 A).

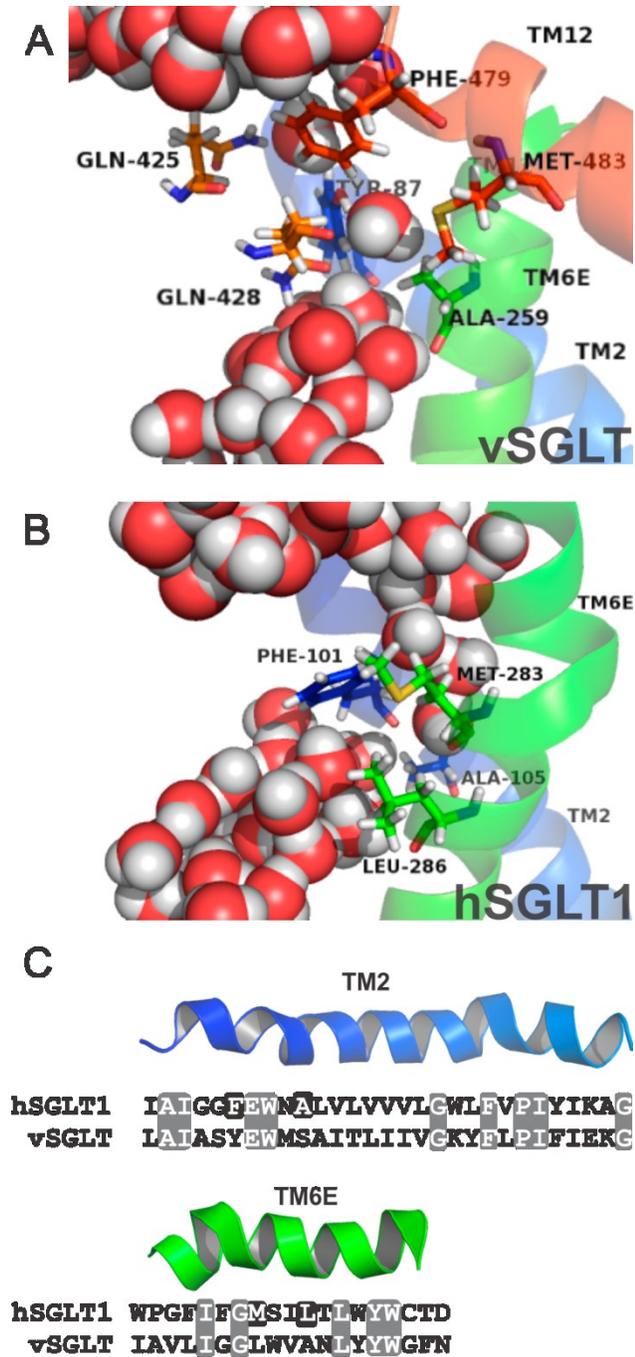


Figure 4-3 Constriction areas

Comparison of the constriction areas in hSGLT1 and vSGLT. A. Relevant residues surrounding discontinuity in vSGLT. B. Hydrophobic residues surrounding the 4.3 Å gap in the hSGLT1 mediated water pathway. C. Sequence alignment of TM2 and TM6E. Conserved residues are in grey, relevant residues for this work are in black. Adapted from Faham *et al.* (2). Transmembrane segments are numbered according to LeuT nomenclature.

To further characterize the proposed water permeation pathway, we calculated the PMF of water going from one side of the membrane to the other. We followed the methodology described in the methods section. The implemented methodology is based on extensive (225 ns) MD sampling of the position of water, to estimate the spatial water density. It is generally accepted that results from rather long MD simulations of homology models are not sufficiently reliable to draw strong conclusions about the structure or function of proteins. Therefore we limited the calculation of PMF to the available crystal structure of vSGLT. The obtained PMF is shown in **Figure 4-4**. A single barrier of $7.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ is observed at approximately the center of the membrane. The position coincides with the dry zone observed in the GCMC calculation. However, more exhaustive sampling shows that the water permeation path can be indeed continuous. The value of the calculated energy barrier is in very good agreement with the activation energies of 9 ± 1 and $5 \pm 1 \text{ kcal mol}^{-1}$ which have been measured in the presence of Na and absence of sugar for rabbit SGLT1 (120, 121).

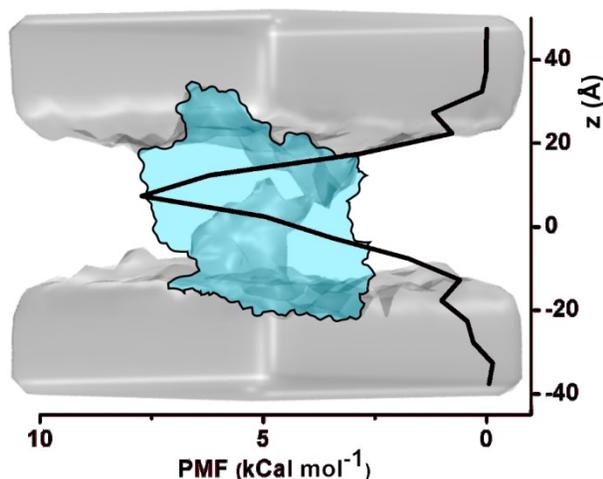


Figure 4-4 Potential of Mean Force profile

Potential of mean force (PMF) profile for vSGLT. Values were projected onto the z-axis, which is defined as being perpendicular to the membrane. Origin of z-axis corresponds roughly to the substrate binding zone. The PMF profile is superimposed onto a surface representation of the water density and a silhouette representation of vSGLT, using the same general orientation as shown in Figure 4-3 A.

The proposed structure for the water pathway of Na/glucose cotransporters was obtained in the single conformational state presently available for vSGLT (inward-facing galactose-

bound configuration). In order to assess the relevance of the identified water pathway during the different conformational states reached during cotransport, we measured hSGLT1 water permeability in the presence or absence of extracellular Na and at different membrane potentials. In the absence of substrate, hSGLT1 cannot go through a full cotransport cycle. Thus, by controlling membrane potential (V_m) and extracellular Na concentration, 3 distinct conformational states can be assessed: inward-facing (IF), outward-facing (OF) and outward-facing Na-bound (OF+Na). Using recent kinetic models proposed for hSGLT1 based on presteady-state currents (156), we can assess the probabilities of occupation for each state during experimental trials.

In the presence of external Na and with a V_m of -50 mV, the transporters are distributed between IF state (24%), OF state (56%) and OF+Na (20%) conformations. When extracellular Na is replaced by NMDG, the Na-bound state redistributes almost equally into the IF state (34%) and the OF state (66%). This is associated with a significant increase in the total P_f of hSGLT1-expressing oocytes ($p < 0.0001$, $n = 10$). However, a significant increase was also seen in non-injected oocytes ($p < 0.01$, $n = 6$) (see **Figure 4-5 B**). Subtracting the P_f measured for non-injected oocytes from the P_f measured for hSGLT1-expressing oocytes, the effect of replacing external Na remains statistically significant for the hSGLT1-specific component (a specific P_f of $1.8 \pm 0.3 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ in the presence of 67.5 mM Na and a specific P_f of $2.2 \pm 0.4 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ in the absence of Na ($p = 0.03$, $n = 10$ paired measurements, see **Figure 4-5 D**). The direction of this change also suggests that the Na-free states (OF and IF) are more permeable than the Na-bound state (OF+Na). At -100 mV in the presence of Na, 74% of the cotransporters are found in the OF+Na state. If V_m is brought to -20 mV, 49% of the cotransporters adopt the IF state while only 5% remains in the OF+Na state. As shown in **Figure 4-5 C**, changing membrane potential from -20 to -100 mV produces a significant reduction in the P_f of hSGLT1-expressing oocytes which is not seen with non-injected oocytes. In order to obtain hSGLT1-specific membrane permeability, it is necessary to subtract the water permeability of control (non-injected) oocytes under the same conditions. **Figure 4-5 D** shows that the P_f specifically associated with hSGLT1 goes from $2.1 \pm 0.2 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ at -100 mV to $3.2 \pm 0.3 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ at -20 mV. The difference is statistically significant ($p < 0.001$, $n = 13$ paired measurements) and suggests that the Na-free configurations (OF and IF) are more water-permeable than the Na-bound configuration (OF+Na). Nevertheless, the fact that a very

significant water permeability is still present when 74% of the transporter are estimated to be in the outward and Na-bound state (when V_m is -100 mV in the presence of Na) suggests that the Na-bound and Na-free conformational states are all water-permeable.

Finally, comparison of the swelling rates measured in the presence and absence of Pz, i.e. "pz" and "post" periods in **Figure 4-5 A**, shows that hSGLT1-mediated water permeability accounts for $34 \pm 2\%$ (mean \pm SEM, $n=23$) of total water permeability, in agreement with previously published results (118, 120, 128). Also, non-injected oocytes showed no Pz-sensitive water permeability, as expected.

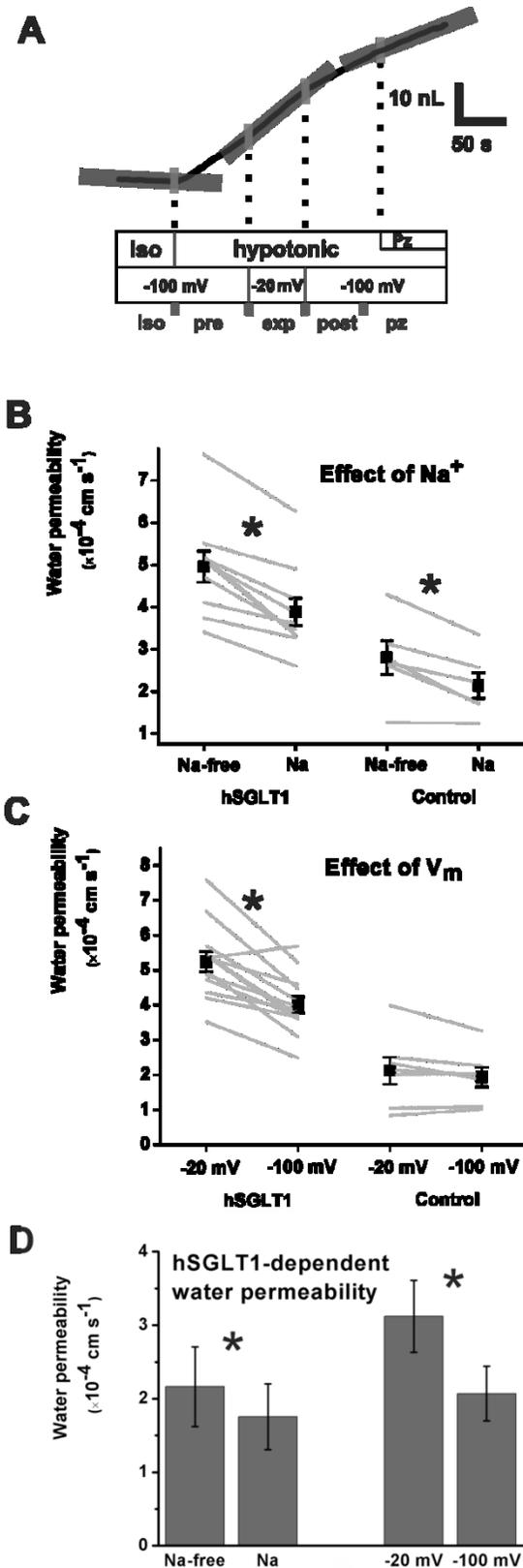


Figure 4-5 Volumetric and electrophysiological assays

Volumetric and electrophysiological assays. A) Typical assay for the effect of membrane potential. The oocyte was first stabilised in hypotonic solution (experimental condition "iso"). Hypotonic media was then superfused, while the V_m was held at -100 mV, then at -20 mV, and then at -100 mV (experimental conditions "pre", "exp" and "post", respectively). Finally, the oocyte was exposed to Pz to assess the level of hSGLT1 expression (experimental condition "pz"). Fitting of the different swelling rates (superimposed light gray lines) allowed calculation of the water permeability. A similar protocol was used to study the effect of the presence or absence of external Na. B) Effect of presence of sodium on measured water permeability. Mean of measured water permeabilities for hSGLT1-injected oocytes ($n=10$) and non-injected oocytes ($n=6$) (black squares, mean \pm SEM) superimposed on paired measurements for individual oocytes (light gray lines). C) Effect of membrane potential on measured water permeability. Mean of measured water permeability for hSGLT1-injected oocytes ($n=13$) and non-injected oocytes ($n=7$) (black squares, mean \pm SEM) superimposed on paired measurements for individual oocytes (light gray lines). D) hSGLT1-dependent water permeability (mean \pm SEM). The effects of both V_m and of Na are statistically significant ($p < 0.001$, $n=13$ paired measurements and $p=0.03$, $n=10$ paired measurements, respectively). * denotes statistical significance. See text for full details.

4.7 Discussion

We have used the crystal structure of vSGLT to build a homology model for hSGLT1 and we have identified, in both structures, a pathway through which water molecules could diffuse and account for the passive water permeability that is recognised for human and rabbit SGLT1 as well as for several other Na/coupled cotransporters (117, 127).

Using GCMC, we have found that up to 208 water molecules could be stably inserted into each structure. Half of these water molecules were found to form a single pathway that extends for 40 Å and connects the intracellular and extracellular milieu. Interestingly, for both vSGLT and hSGLT1, this pathway is interrupted between the sugar binding site and the extracellular solution. For vSGLT and hSGLT1, the interruptions extend for 14 Å and 4 Å, respectively. PMF calculations confirm the presence of an energy barrier that corresponds exactly to the positions where GCMC could not insert energetically stable water molecules.

Experimentally, it is not known if vSGLT has a measurable water permeability because of its poor expression level in oocytes (144). In contrast, the water permeability of human and rabbit SGLT1 is easy to measure since a large fraction of the total water permeability is inhibited by Pz in oocytes expressing these proteins(118, 120). What is not known is whether the state that corresponds to the crystal structure of vSGLT (inward-facing galactose-bound) is water-permeable. The passive water permeability was shown to be constant in the presence or absence of substrate (118, 123) but there is no consensus on what is the most populated conformational state of the cotransporter in the presence of a large sugar concentration. Recent MD articles have shown that the vSGLT crystal structure is somewhat unstable as both Na and galactose are found to leave their respective binding sites within 9 ns of simulation for Na (48, 159-161) and 110 ns for galactose (48, 159). In a recent paper from Choe *et al.* (159), the release of galactose is accompanied by a ~3.5 fold increase of unidirectional water fluxes in both directions, suggesting that the inward-facing substrate-free configuration is significantly more water-permeable than the original crystal structure of vSGLT. It is thus possible that a modest change in the structure of the water pathway between the sugar binding site and the extracellular solution could decrease the calculated energy barrier quite significantly. For example, reorientation of residues Tyr-87 (TM2), Ala-259 (TM6E), Gln-425, Gln-428 (TM10), Phe-479 or Met-483 (TM12) for

vSGLT and Phe-101, Ala-105 (TM2), Met-283, Leu-286, Thr-287 (TM6E) or Gln-455 (TM10) for hSGLT1 could produce significant changes to the pathway.

In an effort to see if the passive water permeation pathway identified for the inward-facing configuration could apply to different conformational states, we assessed hSGLT1-dependent water permeability under different experimental conditions. We found that replacing Na by NMDG led to a small increase in water permeability, suggesting that the Na-free conformations (IF and OF) were more water-permeable than the Na-bound (OF+Na) configuration. This was pursued by changing membrane potential in the presence of Na. Based on Gagnon *et al.* (156), at a membrane potential of -100 mV, the pre-steady state charge translocation indicates that 74% of the cotransporters are in the OF+Na configuration. The fact that hSGLT1-dependent P_f is only decreased by 34% (with respect to a V_m of -20 mV) confirms that the OF+Na configuration exhibits a significant P_f , though it is smaller than that of the Na-free configurations. A different conclusion regarding the effect of Na has previously been reported by Loike *et al.* (128), who found that removal of extracellular Na abolished the water permeability mediated by rabbit SGLT1. In contrast to our experiments, their oocytes were pre-incubated in sodium-free solution for a much longer time period (30 min) than in the present study (1 min). In addition, as the swelling rate was measured for 45 min, the difference in the average swelling rates between Na-containing and Na-free solutions becomes visible only after 10 min. We interpret these results as indicating that Na has only a minor influence on hSGLT1 water permeability (no measurable initial effects) but that prolonged exposure of oocytes to Na-free conditions produces secondary effects that affect water permeability in some other manner. In summary, although Na-free configurations are slightly more water-permeable than the outward-facing Na-bound configuration, both states are permeable and the identified water pathway seems to maintain some of its function in the different conformations of the transporter.

Over the past several years, different mechanisms have been proposed concerning the means by which SGLT1-mediated glucose cotransport can stimulate water flux. Three different views have been proposed to explain the apparent coupling between glucose and water transport: the water cotransport hypothesis (122, 126, 127), the middle compartment hypothesis (124, 129) and the local osmotic gradient hypothesis (117-119). Although

glucose was not involved in the numerical simulations presented above, the localisation of stable water molecules in the cotransporter can shed new light on this issue.

The first view suggests that water is physically cotransported (i.e. active pumping) with Na and glucose, with reported stoichiometries of >200 and >380 water molecules per glucose molecule for hSGLT1 and rabbit SGLT1, respectively (122, 126, 127). According to this hypothesis, when hSGLT1 is expressed in an oocyte, the initial water flux observed (in the first 2 min) is due to water cotransport and, as an osmotic gradient progressively builds, the steady-state water movement becomes mediated (in equal parts) by water cotransport, passive water transport through the hSGLT1 water permeability and passive water transport through the oocyte endogenous water permeability. Explaining the putative water cotransport with the alternating access mechanism would require the presence of an intramolecular cavity capable of accommodating 2 Na, 1 glucose and at least 380 water molecules. This cavity would first need to be open to the extracellular side to fill up with water molecules. Following conformational change, the filled cavity would pinch off from the extracellular side and open to the intracellular side. Then the cavity would need to reduce its volume in order to expel 380 water molecules to the intracellular side. Finally, it would need to somehow return to its initial state with minimal backward water movement. Our observation that hSGLT1 can accommodate only 98 water molecules in the entire pathway (as shown in **Figure 4-2 B**) makes it very unlikely that a cavity at least 4 times larger could exist in any of the configurations adopted by this cotransporter.

In a recent article, Choe *et al.* (159) reported that, during a 200 ns molecular dynamics simulation based on the vSGLT crystal structure, galactose spontaneously exits its binding site and forces a net flux of 70-80 water molecules toward the intracellular milieu. The authors suggest that the galactose molecule would play the role of a “Brownian piston”. Although this tends to support the water cotransport hypothesis, the interpretation given by the authors should be taken with caution. First, it would be difficult to scale up this efflux of 70-80 water molecules per glucose in vSGLT to account for the net movement of more than 380 water molecules per glucose in the case of rabbit SGLT1. Second, examination of the net count of transported water molecules during the 200 ns simulation (Fig 2 of ref (30)) shows that the net flux is only transient. The 70-80 water molecules entering the intracellular space within 60 ns after galactose release are compensated for by a net flux in

the opposite direction during the following 50 ns. Thus, we disagree that this observation can be used to support or disprove the secondary active water transport hypothesis.

The two other theoretical frameworks propose passive water permeation mechanisms that are driven by transport-dependent osmotic gradients. One passive mechanism is based on a three-compartment model that was originally proposed to explain isosmotic trans-epithelial water transport. In this model, solutes are transported into a middle compartment (possibly the intercellular space in the original context) where some local hypertonicity develops and drives water flux from the apical milieu to the middle compartment. The water displacement produces an increase in the middle compartment pressure, which drives the solution toward the basolateral side of the epithelium. This model has been proposed to apply to the cotransporter-mediated water flux (124, 129), which raises significant difficulties. The original three compartment model needs to be downscaled by 4 orders of magnitude, and it is unclear how any significant osmotic gradient could be maintained within distances on the order of 20 Å. Also, no “middle compartment” could be observed inside the available crystal structure of vSGLT or in the homology model for hSGLT1.

A second passive mechanism suggests that an osmotic gradient is created by cotransport flux into the intracellular unstirred layer (117-119). This hypothesis is the simplest "default hypothesis", assuming only that the cotransporter molecule exhibits a passive permeation pathway for water. This hypothesis is supported by the fact that a transmembrane osmotic gradient of the adequate amplitude was experimentally detected as soon as 20 s after initiating the cotransport mechanism. Once the osmotic gradient is set up, water flow occurs through all available water permeation pathways including the passive pathway through the cotransporter itself. The water distribution within the cotransporter molecule that was revealed in this study is consistent with this view of glucose-driven water transport. The pathways observed through the vSGLT crystal structure and the hSGLT1 homology model displayed constriction zones characterized to different extents by both GCMC and PMF calculations. PMF calculations along the identified water permeation pathway displayed a reasonable energy barrier that would allow the passive transport of water and is fully consistent with the experimental data obtained on rabbit SGLT1(120, 121).

4.8 Conclusion

The recent crystallisation of vSGLT allowed investigation of the structural basis for water permeation through both vSGLT and the homologous hSGLT1 using GCMC/MD simulations and PMF calculations. Insertion of stable water molecules in both vSGLT and hSGLT1 identified water permeation pathways from the intracellular to extracellular milieu. These pathways comprise ~100 water molecules in the protein interior and display constriction zones between the sugar binding site and the extracellular space. This provides a structural basis for the passive water permeability associated with SGLT1, and makes the water cotransport hypothesis very difficult to rationalise. PMF calculations for water permeation through the crystal structure of vSGLT reveal the presence of a ~8 kcal mol⁻¹ energy barrier, in good agreement with previous measurements on rabbit SGLT1. Volumetric and electrophysiological measurements performed on hSGLT1 show that the conformational state in which vSGLT was crystallised is water-permeable, and suggests that the identified water permeation pathway is also present in other conformations.

4.8.1 Acknowledgements

The authors are grateful to Drs. Chunfeng Zhao and Yulia Subbotina for their help with GCMC and MD simulations and Dr. Benoit Roux for helpful comments on the manuscript. This work was funded by grants from the National Sciences and Engineering Council (NSERC) Discovery Grant (RGPIN-315019 and RGPIN-380738) to SN and JYL, respectively. SN is Alberta Innovates Technology Futures (AITF) New Faculty and Canadian Institute for Health Research (CIHR) New Investigator.

4.9 Supporting Material

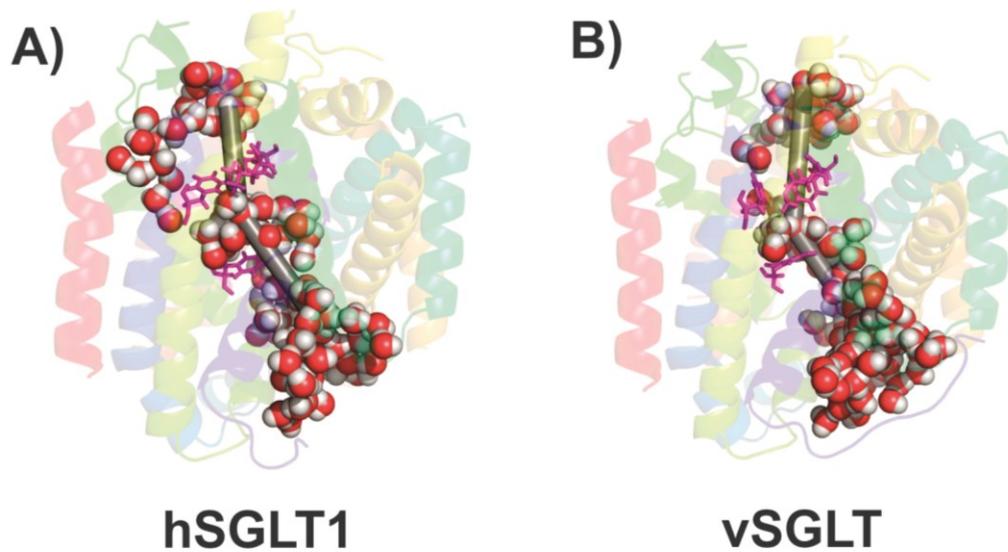


Figure 4-6 Putative substrate permeation pathways

In the upper part of the membrane, the putative substrate permeation pathways (grey cylinders) for hSGLT1 (A) and vSGLT (B) are believed to go through the extracellular hydrophobic plug formed by TM 1, 2 and 10 (2). In the lower part of the membrane, it has been shown to go through the intracellular vestibule (48, 160). Extracellular and intracellular hydrophobic plugs are in magenta.

4.10 References

2. Faham, S., A. Watanabe, G. M. Besserer, D. Cascio, A. Specht, B. A. Hirayama, E. M. Wright, and J. Abramson. 2008. The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na⁺/sugar symport. *Science (New York, N.Y)* 321:810-814.
48. Watanabe, A., S. Choe, V. Chaptal, J. M. Rosenberg, E. M. Wright, M. Grabe, and J. Abramson. 2010. The mechanism of sodium and substrate release from the binding pocket of vSGLT. *Nature* 468:988-991.
96. Longpré, J.-P., Dominique G. Gagnon, Michael J. Coady, and Jean-Yves Lapointe. 2010. The Actual Ionic Nature of the Leak Current through the Na⁺/Glucose Cotransporter SGLT1. *Biophysical journal* 98:1-9.
110. Brooks, B. R., C. L. Brooks, 3rd, A. D. Mackerell, Jr., L. Nilsson, R. J. Petrella, B. Roux, Y. Won, G. Archontis, C. Bartels, S. Boresch, A. Caflisch, L. Caves, Q. Cui, A. R. Dinner, M. Feig, S. Fischer, J. Gao, M. Hodoscek, W. Im, K. Kuczera, T. Lazaridis, J. Ma, V. Ovchinnikov, E. Paci, R. W. Pastor, C. B. Post, J. Z. Pu, M. Schaefer, B. Tidor, R. M. Venable, H. L. Woodcock, X. Wu, W. Yang, D. M. York, and M. Karplus. 2009. CHARMM: the biomolecular simulation program. *J Comput Chem* 30:1545-1614.
117. Charron, F. M., M. G. Blanchard, and J. Y. Lapointe. 2006. Intracellular hypertonicity is responsible for water flux associated with Na⁺/glucose cotransport. *Biophys J* 90:3546-3554.
118. Duquette, P. P., P. Bissonnette, and J. Y. Lapointe. 2001. Local osmotic gradients drive the water flux associated with Na⁽⁺⁾/glucose cotransport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3796-3801.
119. Gagnon, M. P., P. Bissonnette, L. M. Deslandes, B. Wallendorff, and J. Y. Lapointe. 2004. Glucose accumulation can account for the initial water flux triggered by Na⁺/glucose cotransport. *Biophysical journal* 86:125-133.
120. Loo, D., B. Hirayama, A. Meinild, G. Chandy, T. Zeuthen, and E. Wright. 1999. Passive water and ion transport by cotransporters. *The Journal of Physiology* 518:195.
121. Loo, D., T. Zeuthen, G. Chandy, and E. Wright. 1996. Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:13367.
122. Loo, D. D., E. M. Wright, and T. Zeuthen. 2002. Water pumps. *J Physiol* 542:53-60.
123. Meinild, A., D. A. Klaerke, D. D. Loo, E. M. Wright, and T. Zeuthen. 1998. The human Na⁺-glucose cotransporter is a molecular water pump. *J Physiol* 508 (Pt 1):15-21.
124. Naftalin, R. J. 2008. Osmotic water transport with glucose in GLUT2 and SGLT. *Biophysical journal* 94:3912-3923.

126. Zeuthen, T., B. Belhage, and E. Zeuthen. 2006. Water transport by Na⁺-coupled cotransporters of glucose (SGLT1) and of iodide (NIS). The dependence of substrate size studied at high resolution. *The Journal of Physiology* 570:485.
127. Zeuthen, T., A. K. Meinild, D. D. Loo, E. M. Wright, and D. A. Klaerke. 2001. Isotonic transport by the Na⁺-glucose cotransporter SGLT1 from humans and rabbit. *J Physiol* 531:631-644.
128. Loike, J., S. Hickman, K. Kuang, M. Xu, L. Cao, J. Vera, S. Silverstein, and J. Fischbarg. 1996. Sodium-glucose cotransporters display sodium- and phlorizin-dependent water permeability. *American Journal of Physiology- Cell Physiology* 271:C1774.
129. Naftalin, R. 2010. Reassessment of Models of Facilitated Transport and Cotransport. *Journal of Membrane Biology* 234:75-112.
140. Fischbarg, J., K. Kuang, J. Hirsch, S. Lecuona, L. Rogozinski, S. Silverstein, and J. Loike. 1989. Evidence that the glucose transporter serves as a water channel in J774 macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86:8397.
141. Wright, E. M., B. A. Hirayama, and D. F. Loo. 2007. Active sugar transport in health and disease. *J Intern Med* 261:32-43.
142. Reuss, L., and B. H. Hirst. 2002. Water transport controversies—an overview. *The Journal of Physiology* 542:1.
143. Schultz, S. G. 2001. Epithelial water absorption: osmosis or cotransport? *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3628-3630.
144. Leung, D. W., E. Turk, O. Kim, and E. M. Wright. 2002. Functional Expression of the *Vibrio parahaemolyticus* Na⁺/Galactose (vSGLT) Cotransporter in *Xenopus laevis* Oocytes. *Journal of Membrane Biology* 187:65-70.
145. Lomize, M. A., A. L. Lomize, I. D. Pogozheva, and H. I. Mosberg. 2006. OPM: orientations of proteins in membranes database. *Bioinformatics* 22:623-625.
146. Canutescu, A. A., A. A. Shelenkov, and R. L. Dunbrack, Jr. 2003. A graph-theory algorithm for rapid protein side-chain prediction. *Protein Sci* 12:2001-2014.
147. Baker, D., and A. Sali. 2001. Protein structure prediction and structural genomics. *Science's STKE* 294:93.
148. Ginalski, K. 2006. Comparative modeling for protein structure prediction. *Current opinion in structural biology* 16:172-177.
149. Noskov, S. Y. 2008. Molecular mechanism of substrate specificity in the bacterial neutral amino acid transporter LeuT. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* 73:851-863.
150. Klauda, J. B., S. Jo, J. B. Lim, and W. Im. 2009. CHARMM-GUI Membrane Builder for Mixed Bilayers and Its Application to Yeast Membranes. *Biophysical journal* 97:50-58.

151. Im, W., S. Jo, T. Kim, and V. G. Iyer. 2008. Software news and updates - CHARNIM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *J Comput Chem* 29:1859-1865.
152. Woo, H. J., A. R. Dinner, and B. Roux. 2004. Grand canonical Monte Carlo simulations of water in protein environments. *J Chem Phys* 121:6392-6400.
153. Im, W., S. Berneche, and B. Roux. 2001. Generalized solvent boundary potential for computer simulations. *Journal of Chemical Physics* 114:2924-2937.
154. Wang, J. Y., Y. Q. Deng, and B. Roux. 2006. Absolute binding free energy calculations using molecular dynamics simulations with restraining potentials. *Biophysical journal* 91:2798-2814.
155. Bissonnette, P., J. Noel, M. J. Coady, and J. Y. Lapointe. 1999. Functional expression of tagged human Na⁺-glucose cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J Physiol* 520 Pt 2:359-371.
156. Gagnon, D., C. Frindel, and J. Lapointe. 2007. Effect of substrate on the pre-steady-state kinetics of the Na⁺/glucose cotransporter. *Biophysical journal* 92:461-472.
157. Bourgeois, F., M. Coady, and J. Lapointe. 2005. Determination of transport stoichiometry for two cation-coupled myo-inositol cotransporters: SMIT2 and HMIT. *The Journal of Physiology* 563:333.
158. Zampighi, G., M. Kreman, K. Boorer, D. Loo, F. Bezanilla, G. Chandy, J. Hall, and E. Wright. 1995. A method for determining the unitary functional capacity of cloned channels and transporters expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Journal of Membrane Biology* 148:65-78.
159. Choe, S., J. Rosenberg, J. Abramson, E. Wright, and M. Grabe. 2010. Water Permeation through the Sodium-Dependent Galactose Cotransporter vSGLT. *Biophysical journal* 99:L56-L58.
160. Li, J., and E. Tajkhorshid. 2009. Ion-releasing state of a secondary membrane transporter. *Biophysical journal* 97:L29.
161. Zomot, E., and I. Bahar. 2010. The sodium/galactose symporter crystal structure is a dynamic, not so occluded state. *Molecular BioSystems* 6:1040.

5 The Human Sodium-Glucose Cotransporter (hSGLT1) is a Disulfide-Bridged Homodimer with a Re-entrant Loop Between Transmembrane Segments 12 and 13

Louis J Sasseville, Michael J Coady, Rikard Blunck & Jean-Yves Lapointe

Article en préparation pour soumission au Journal of Biological Chemistry

5.1 Contribution personnelle

J'ai conçu, réalisé et analysé l'ensemble des mesures en fluorescence. J'ai réalisé la majorité des immunobuvardages de type Western. J'ai conçu et analysé la simulation explicite du FRET. J'ai rédigé la version finale de l'article sous la supervision du Dr Jean-Yves Lapointe.

5.2 Résumé

Déterminer les caractéristiques structurales des transporteurs membranaires est essentiel à la compréhension de leurs fonctions. Par contre, malgré de nombreuses études le débat entourant certaines caractéristiques structurales essentielles du cotransporteur sodium/glucose humain (hSGLT1), c.-à-d. la structure quaternaire et la possibilité d'une boucle 12-13 réentrante, perdure. La cristallisation récente d'un homologue bactérien appartenant à la famille structurale de LeuT rend ces points encore plus litigieux de par la possibilité nouvelle d'études computationnelles via la modélisation par homologie. Dans le cadre de cette étude, la dipicrylamine (DPA), un anion amphiphilique dont la distribution de part et d'autre de la membrane peut être modulé via le potentiel membranaire, est utilisée comme accepteur selon le principe de transfert d'énergie par résonance. Conjugué à des sondes fluorescentes avec groupes maléimides, la DPA permet l'utilisation d'une combinaison de techniques de spectroscopie de fluorescence (fluorescence avec sondes sensibles au potentiel (hVoS), transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET), fluorométrie en voltage imposé (VCF)). Aussi, la mutation systématique des cystéines endogènes présentes chez hSGLT1 permet la réalisation d'immunobuvardages de type Western. Nous avons démontré que 1) hSGLT1 est exprimé sous la forme d'un

homodimère de par la présence d'un pont disulfure entre les C355 des protomères et que 2) la boucle intracellulaire 12-13 est réentrante étant donné qu'elle est partiellement localisée significativement au-dessus du plan de la membrane du côté extracellulaire.

5.3 Abstract

Determination of the structural characteristics of membrane transporters is essential to comprehending their mechanism of activity. Despite numerous studies, some essential structural characteristics of the human sodium-glucose cotransporter 1 (hSGLT1), namely its quaternary structure and the possibility of a re-entrant 12-13 loop, are still debated. The crystallisation of a bacterial homologue to SGLT1 and the determination of its structure, which makes it part of the LeuT structural family, have made these issues more pressing due to the emerging possibilities of computational studies through homology modeling. In this study, dipicrylamine (DPA), an amphiphilic anion whose distribution to either side of the lipid bilayer can be controlled via membrane potential, is used as a resonance-energy-transfer acceptor. Coupled with the use of fluorescent cysteine labels, it enables utilization of a number of different fluorescence techniques (Hybrid voltage sensors (hVoS), FRET, Voltage Clamp Fluorometry (VCF)). Also, systematic mutation of endogenous cysteines of hSGLT1 allowed further investigation through Western blotting. We show that 1) hSGLT1 is expressed as a disulfide-bridged homodimer via C355 and that 2) the intracellular 12-13 loop is re-entrant as it is located, in part, significantly above the plane of the membrane on the extracellular side.

5.4 Introduction

Membrane cotransporters are molecular machines that transduce the energy from the electrochemical gradient of one solute to transport another solute across the membrane, often against its gradient. While the general concept of alternating-access has been put forward as a general mechanism for a large number of cotransporters and has been validated by a body of experimental data (38), the understanding of this process at the atomic level is still debated.

One of the best studied cotransporters, the high-affinity sodium glucose cotransporter (SGLT1), has been the subject of extensive structural studies using various experimental techniques (93, 130-136). While some physical aspects of this protein have

been accepted, some of the most relevant are still debated. Specifically, the possibilities of 1) multimerisation of the physiological unit and the 2) extracellular accessibility of the 12-13 loop (49) (numbering according to the new LeuT nomenclature, where the first N-terminal transmembrane segment (TM) become TM-1, the one after is TM1, etc.) remain to be determined.

Regarding the possibility of multimerisation, radiation inactivation suggested the presence of tetramers for the renal Na/glucose cotransporter, on the basis of a radiation inactivation size of ~290 kDa (133). Freeze fracture analysis of *Xenopus* oocyte membranes suggested a monomer, due to the presence of particles of ~50 by 60 Å diameter attributed to hSGLT1 (130). While kinetic modeling has generally been performed using monomeric models (82, 84), a number of models suggest cooperativity between sub-units (138, 139).

As for the extracellular accessibility of the 12-13 loop, fluorescence studies have shown accessibility from the extracellular solution for membrane-impermeant reagents and for thiol-reactive fluorophores (132). Also, atomic force microscopy (AFM) studies suggested extracellular accessibility (135, 137). Nevertheless, the transmembrane location of the 12-13 loop remains a matter of debate (49).

While the recent availability of crystal structures of a bacterial homologue (48, 162), the *Vibrio parahaemolyticus* sodium-galactose transporter (vSGLT), might have been expected to put an end to these debates, this is not the case. By enabling computational studies of membrane transport activity (48, 162-166), the crystal structures actually make these issues more pressing. In addition, crystal structures of membrane proteins are notorious for the presence of significant structural artifacts. It is well known, and has specifically been shown in the case of vSGLT (165), that such artifacts can account for significant changes in the behaviour of a computational model. Specifically, as a monodisperse solution containing a single oligomeric state is required for crystallization (74), in many cases this one does not reflect the true multimeric structure of the protein (167).

The first vSGLT crystal structure (3DH4) was reported as a head-to-head dimer of dimers, while the second crystal structure was a dimer (2XQ2). While a head-to-head dimer of dimers arrangement is physiologically impossible for a membrane protein whose height is comparable to the membrane width, a dimer is plausible. In fact, the Orientations of Proteins in Membranes database (OPM) (168) shows both vSGLT crystal structures in the

membrane as dimers. Despite this, to our knowledge, all structural studies of vSGLT to date have used monomeric models, with one notable exception (169). We believe this is because the evidence for dimerization is not strong enough to justify the added complexity in the computational models. Nevertheless, the intramembrane orientation of the monomers in computational models was, to our knowledge, always based on the orientation of the crystallographic dimer following insertion into the membrane, thus assuming that the crystallographic quaternary structure of vSGLT is conserved. For example, submitting a monomer from the 3DH4 crystal structure to the OPM web server (170) produced a tilt of $\sim 23.5^\circ$ relative to the membrane plane when compared to the putative orientation.

The crystal structures of vSGLT are also of little help in determining the extracellular accessibility of the 12-13 loop of hSGLT1. As expected, the C-terminal end of TM12 and the N-terminal end of TM13 are both found intracellularly in the crystal. This orientation should be respected in hSGLT1. Nevertheless, a low level of homology between vSGLT and hSGLT1 is found in this region, and sequence alignment suggests that the loop is about 3 times longer in hSGLT1 than in vSGLT, effectively allowing re-entrant access to the extracellular side.

In this study, we use several novel techniques to re-examine the issues of possible multimerisation of the functional unit and the extracellular localisation of the 12-13 loop.

5.5 Experimental procedures

5.5.1 hVoS FRET quenching

A fluorescent study from our group (93) showed that the C225A hSGLT1 mutant allowed labeling of C511 by tetramethylrhodamine-C5-maleimide (TMR) and Alexa 488-C5-maleimide (A488). The calculated R_0 of this fluorophore pair is 59 Å, which is appropriate for detecting the presence of multimers.

The present study builds on this knowledge and extends it by combining VCF with the use of a membrane bound donor, DPA. DPA is an amphiphilic anionic compound whose distribution within the lipid bilayer depends on the transmembrane potential. It is used here as a resonance-energy-transfer acceptor from donor molecules. Coupled with fluorescent molecules (TMR and A488, in our case) this system, sometimes dubbed hybrid Voltage Sensor (hVoS), has been shown to greatly increase the sensitivity of fluorescence

studies (92, 94, 95). By using DPA to quench FRET between TMR and A488, we attained "hVoS FRET quenching". Specifically, in our case, this method abolishes the need for an extensive number of measurements to satisfy statistical significance.

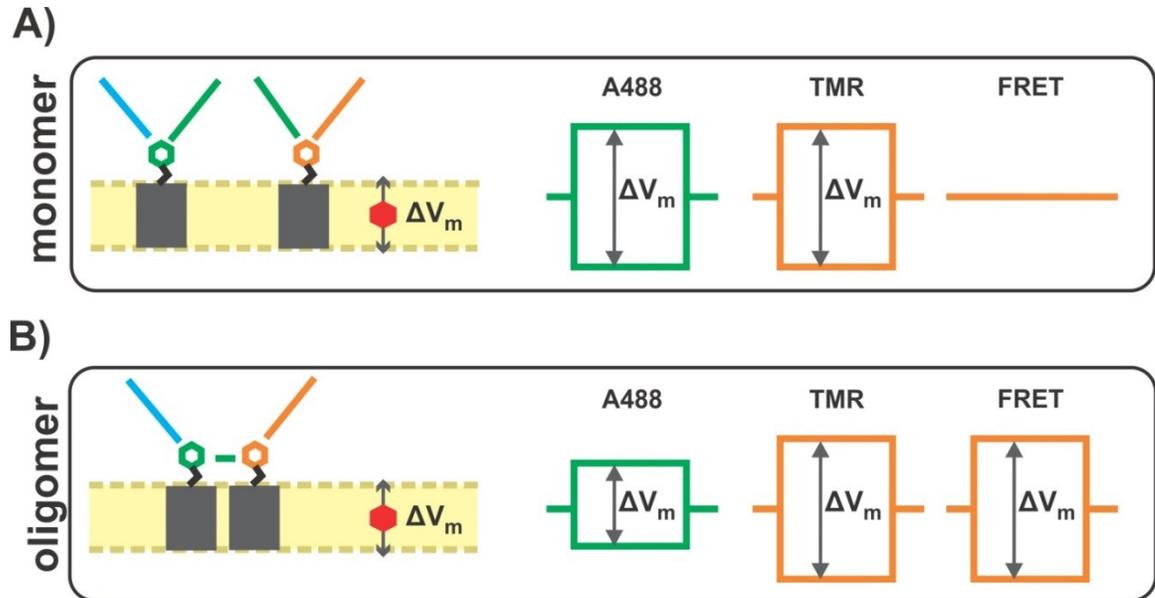


Figure 5-1 Principle of hVoS FRET quenching

Principle of hVoS FRET quenching. The DPA (red hexagon) distribution at either side of the membrane is modulated via the transmembrane potential (V_m). Changes in V_m (ΔV_m) thus reduce/increase the mean distance between DPA and a fluorescent probe (A488 as green hexagon, TMR as orange hexagon). Two possibilities are considered. 1) If only monomers are present, FRET between A488 and TMR does not occur. Thus, only DPA quenching for A488 and TMR is observed, but not from A488-TMR FRET. 2) Multimeric states are present, thus FRET between A488 and TMR does occur. DPA quenching for A488, TMR and A488-TMR FRET is observed.

5.5.2 Possibility of inter-monomer disulfide bridges

β -Mercaptoethanol (β -ME) is specifically used during Western blotting to break disulfide bridges. By performing Western blots with or without β -ME, we are able to show the presence of a disulfide bridge in hSGLT1 and to assess the level of multimerisation of hSGLT1. Also, mutants where cysteines were replaced by alanines were tested with/without β -ME to identify the residue(s) involved in the intermolecular disulfide bridge.

5.5.3 Spatially determined quenching of 12-13 loop

As an amphiphilic anion, DPA repartition in the membrane is voltage-dependent (92, 94). By depolarising or hyperpolarising the membrane, we can accumulate DPA at the intra- or extracellular interface of the membrane, respectively. Thus, compared to previous fluorescence studies, we can unambiguously show intra- or extracellular distribution of labeled residues, judging by the effect of the membrane potential on measured fluorescence levels.

5.5.4 Oocyte Preparation and Injection

Oocytes were surgically removed from *Xenopus laevis* frogs, dissected, and defolliculated as described previously (171). 1 day after defolliculation, oocytes were injected with 46 nl of mRNA solution (0.1 and 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ for wild-type (wt) hSGLT1 and mutants, respectively) in order to obtain maximal protein expression. Oocytes were maintained in Barth's solution (in mM: 90 NaCl, 3 KCl, 0.82 MgSO₄, 0.41 CaCl₂, 0.33 Ca(NO₃)₂, 5 HEPES, pH 7.6) supplemented with 5% horse serum, 2.5 mM Na⁺-pyruvate, 100 U/ml penicillin, and 0.1 mg/ml streptomycin for 4–5 d before being used in an experiment.

5.5.5 Voltage-clamp fluorometry

Oocytes were preincubated 10 min on ice before the fluorescent probe was added to slow internalization. A 10 min fluorescent labeling was performed on ice in a saline solution containing either 0.25 μM TMR, 2 μM A488, or both. Oocytes were washed twice and kept on ice until use.

Measurements were performed with the cut-open voltage-clamp fluorometry technique for spatial voltage homogeneity and fast temporal resolution (172). Fluorescence was measured at the animal pole. Macroscopic currents were recorded using GPatch acquisition software (Department of Anesthesiology, University of California, Los Angeles, Los Angeles, CA). Oocytes were placed in a three-part chamber, (top, middle, and bottom), each containing an “external” solution (90 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.82 mM MgCl₂, 0.74 mM CaCl₂, 10 mM Hepes, adjusted to pH 7.6 using TRIS) and then permeabilized by exchanging the external solution in the bottom chamber with external solution containing 0.2% saponin so that current could be injected directly into the oocyte. The saponin-

containing solution was then replaced by an “intracellular” solution (5 mM NaCl, 25 mM KCl, 65 mM K-gluconate, 10 mM Hepes, 1 mM EGTA, adjusted to pH 7.6 using TRIS). The voltage electrode was filled with 3 M KCl. DPA was applied directly to the top chamber. As wt hSGLT1 is not significantly labeled by maleimide-based fluorophores (131), wt hSGLT1-expressing oocytes were used as controls (CTL), effectively allowing characterisation of the nonspecific fluorescence labeling.

Briefly, the oocytes were clamped to a resting membrane potential (V_m) of -50 mV, and 5 repetitions of V_m steps to +50 and -150 mV of 300 ms duration were applied with an interval of 1.7 s between each step. The 5 repetitions were averaged for each experiment. For all experiments, fluorescence levels during voltage steps were first monitored without DPA using the appropriate filter set, DPA was added to the top bath, and fluorescence was again monitored through voltage steps. Three filter sets were used: A488 (Ex: HQ470/40x; Di: Q495LP, Em: HQ525/50m, Chroma Technologies), TMR (Ex.: 540/20; Di: 550; Em: 605/70, Chroma Technologies) and FRET (Ex: HQ470/40x; Di: Q495LP; Em: D605/55m, Chroma Technologies) filter sets. The possibility of filter leaks during hVoS FRET quenching measurements using the FRET filter set was examined and discredited as application of either TMR at 10x the used concentration or A488 at a normal concentration generated no significant signal.

5.5.6 Plasma membrane preparation of oocytes and Western blot detection

Western blots were performed as described previously (173) using total membranes. Samples representing between 1 and 4 oocytes were run on a 7.5 or 10% polyacrylamide gel and transferred onto a nitrocellulose membrane. The efficiency of the overall procedure was monitored by Ponceau red staining. To prevent non-specific binding of antibodies, the membranes were first blocked with 5% non-fat milk in TBS-T (TBS + 0.1 % Tween 20) and then probed with the specific antibody (α -c-myc 1:500, Enzo Life Science, ON, CA or α -AQP2 (N-20) 1:500, Santa Cruz Biotech, CA, USA) followed by incubation with secondary antibody (HRP-linked chicken anti-mouse 1:25,000, Santa Cruz Biotech or HRP-linked chicken anti-goat 1:25,000, Santa Cruz Biotech). Blots were revealed using enhanced chemiluminescence detection (Phototope-HRP, New England Biolabs, Pickering,

ON). When indicated, samples were prepared without β -ME, which is used specifically to break disulfide bridges.

5.5.7 hVoS explicit simulation

A simple explicit computational simulation was used to reproduce experimental results associated with the spatially determined quenching of the 12-13 loop (see **Figure 5-5 A**). In a simulation area of 200 Å x 200 Å (length x width), one fluorophore is represented by a pair of two "virtual" particles (one for each of the two voltage steps), DPAs molecules are represented by 625 pairs of virtual DPA particles uniformly distributed on 2 planes separated by 40 Å (height of the membrane). The protein is represented by a DPA-free area. The interaction (i.e. quenching) of all particle pairs (2 fluorophore positions x 2 DPA interfaces x 625 virtual DPA pairs = 2500 interactions per voltage step) are first calculated. The contribution of each individual interaction is then taken into account by using the probability of occupation of each "virtual" particle.

Explicitly, the 2 virtual particles for the fluorophore represent the initial position (Fluo_i , black diamond) and final position (Fluo_f , blue diamond for $V_m = +50$ mV, red diamond for $V_m = -150$ mV) following a voltage pulse. DPA is known to be located at the lipid/bulk interface. Repartition between the two sides of the membrane is dependent on transmembrane potential. Thus, a DPA particle can be located at either the intracellular or extracellular interface. The 2 virtual particles of each DPA pair are located at each interface (different z) but are in the same lateral position (same x and y). The occupation probability for each interface at equilibrium at a given membrane potential is based on the results of Chanda *et al.* (92), but with a small shift of 5 mV toward negative potential. Thus, DPA_i represents the repartition of DPA at equilibrium at initial V_m , and DPA_f represents the repartition of DPA at equilibrium at final V_m . The probability of occupation of each state Fluo_i and Fluo_f following a V_m step is calculated as follows:

$$\text{Équation 5-1 } \text{Prob}(t) = \text{Prob}(t = t_0) \times e^{kt}$$

where the rate constant k is manually fitted. The movement of DPA is approximated as instantaneous. This general approach greatly reduces computational time. Instead of having

to calculate interaction pairs at each time step (2500 pairs x 10 iteration/ms), we just need to calculate each interaction once, and then the contributions of each state at each time step (4 x 10 iterations/ms). The size of the protein, effective DPA concentration, initial and final positions of the fluorophores, the hydrophobic depth of the membrane (i.e. range of movement of DPA) and transition rate of the fluorophore are all adjustable. The experimental fluorescence time course was obtained by subtracting the total fluorescence time course of a CTL oocyte from the total fluorescence time course of an E624C (SGLT1 mutant) expressing oocyte. In order to compare F_n/F_0 (%), the experimental time course signal (in pA) was divided by the base fluorescence level at -50 mV of the same oocyte before addition of DPA to obtain proper amplitude. Hydrophobic depth was 30 Å, based on insertion of the 3DH4 crystal structure in a membrane OPM (168). Based on theoretical calculations, the TMR-DPA R_0 was 35 Å.

As the rate of transition of DPA was effectively instantaneous and the rate of transition of the fluorophore is arbitrarily determined, experimental traces were fitted using 4 values (see **Figure 5-5 B**): F_n/F_0 in the presence of DPA at holding potential, F_n/F_0 after the instantaneous movement of the DPA at the beginning of the voltage pulse, F_n/F_0 at the end of the pulse, and F_n/F_0 after the instantaneous return of the DPA and the end of the voltage pulse.

5.5.8 Modeling of loop 12-13

As *de novo* modeling of the 12-13 is beyond the scope of this work, we wanted to propose a simple but structurally sound cartoon model of the 12-13 loop. The amino acid sequence of the 12-13 loop was submitted to the I-TASSER web server (174). The resulting structure was modified using PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3 Schrödinger, LLC.), conserving the predicted secondary structure but not the tertiary structure.

5.6 Results

5.6.1 hVoS FRET quenching

hVoS FRET quenching experiments were performed to determine whether the C255A functional unit in the membrane was a monomer or a multimer, following the

principles described in **Figure 5-1**. Both CTL and C255A expressing oocytes were labeled using a solution containing both A488 and TMR.

Fluorescence levels for CTL and C255A hSGLT1-expressing oocytes before and after addition of DPA to the top bath solution were measured to assess the effect of DPA on the overall fluorescence level. At holding potential (-50 mV), the presence of DPA reduces the overall fluorescence by $40\pm 8\%$ and $47\pm 6\%$ for CTL (n=5) and C255A (n=5) for A488; $13\pm 3\%$ and $37\pm 4\%$ for CTL (n=5) and C255A (n=5) for TMR. This shows that a significant amount of the overall fluorescence is situated within the effective radius of DPA (R_0), which can be calculated as 55 \AA for the A488-DPA and as 35 \AA for TMR-DPA pairs.

Following addition of DPA to the top bath solution, the effects of V_m steps from a holding potential of -50 mV to +50 mV and -150 mV were assessed. Examination of typical traces shown in **Figure 5-2** A), B), D) and E) reveal that both TMR and A488 attached to C255A and were quenched by DPA, as the difference between CTL and C255A-injected oocytes is easily seen. V_m steps produced changes in total fluorescence of $2.8\pm 0.7\%$ and $14\pm 4\%$ for CTL (n=5) and C255A (n=5) for A488; $3\pm 1\%$ and $22\pm 4\%$ for CTL (n=5) and C255A (n=5) for TMR. This conclusively shows that our particular hVoS FRET quenching system can detect the labeling of C255A by both A488 ($p<0.03$) and TMR ($p<0.04$) with great sensitivity.

The next step was to establish whether we were able to measure FRET between A488 and TMR, which would indicate the presence of multimers (calculated R_0 for A488 and TMR of 59 \AA). Addition of DPA to the top bath reduced the measured fluorescence by $19\pm 5\%$ (n=5) and $25\pm 6\%$ (n=5) for CTL and C255A for FRET. **Figure 5-2** C and F clearly show that in the presence of DPA and following V_m steps, CTL oocytes show little to no change in overall fluorescence ($0.7\pm 0.2\%$, n=5), as predicted in **Figure 5-1**. In sharp contrast, C255A expressing oocyte show significant ($p<0.05$) change ($5\pm 1\%$, n=5) in overall fluorescence. As shown in **Figure 5-1**, this is consistent with the presence of oligomers.

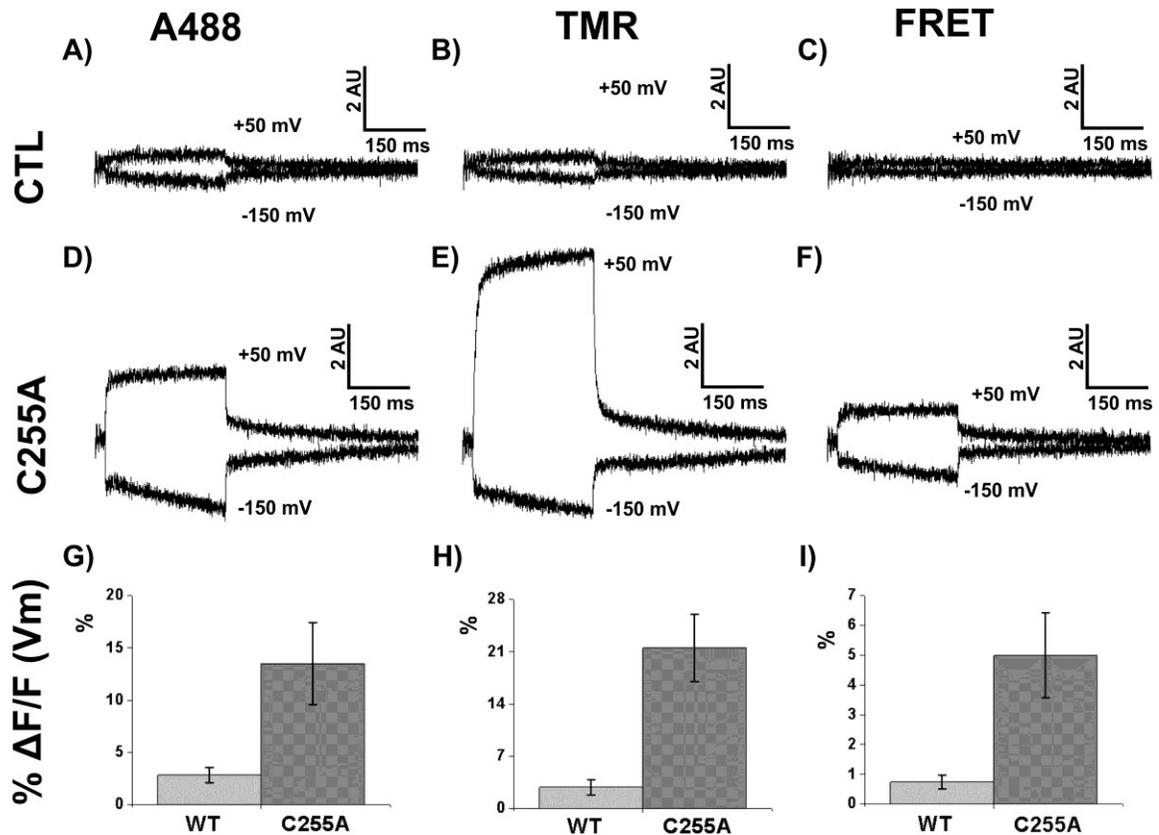


Figure 5-2 hVoS FRET quenching results

Typical traces for either CTL oocytes (A through C) or C255A hSGLT1-expressing oocytes (D through F), simultaneously labeled with A488 and TMR and in the presence of DPA. Total fluorescence during voltage steps is shown when monitoring A488 fluorescence (A and D), TMR fluorescence (B and E) and FRET (C and F). The change in fluorescence following voltage steps (+50 mV and -150 mV) as a proportion of the overall fluorescence level at the holding potential (-50 mV) for CTL and C255A-expressing oocytes when monitoring A488 fluorescence (G) ($n=5$, $p<0.03$), TMR fluorescence (H) ($n=5$, $p<0.04$) and FRET (I) ($n=5$, $p<0.02$).

Finally, significant information can be deduced from the directionality of the change in overall fluorescence following a voltage step (94). The presence of a disulfide bridge between C255 and C511 has been established (93, 131). Thus, the C255A mutation is believed to allow access by extracellular thiol-reactive fluorophores to C511. Furthermore, sequence alignment between hSGLT1 and vSGLT indicates that C255 would be on (following the LeuT structural family nomenclature) the 5-6 extracellular loop (162, 175) and C511 would be on the 11-12 extracellular loop (175). As DPA is negatively charged, negative V_m shift its distribution toward the extracellular side of the membrane, while

positive V_m shifts its distribution towards the intracellular side of the membrane. As hyperpolarisation (-150 mV) and depolarisation (+50 mV) produce a net decrease and increase of the overall fluorescence, respectively, this confirms that, as expected, the C511 is located at the extracellular side of the membrane.

5.6.2 Dimer detection by Western blotting

Western blots were performed for 3 reasons: 1) to assess whether the state of SGLT1 multimerisation detected above was an artefact due to C255A mutation, 2) to determine the degree of multimerisation of hSGLT1, and 3) to identify the cysteine responsible for the inter-monomer disulfide bridge.

To determine the level of multimerisation of hSGLT1, and the effect of the C255A mutation on it, Western blots of C255A, WT, C511A and C255/511A myc-tagged hSGLT1 were performed involving electrophoresis of samples in the presence and absence of β -ME (see **Figure 5-3 A**). Aquaporin 2 (AQP2) was used as a control, as it has been shown to be expressed as a tetramer which lacks inter-monomer disulfide bridges. As expected, AQP2 was only detected as a single band at 25 kDa both with and without β -ME, thus validating our assay.

wt hSGLT1, as expected, is detected at ~75 kDa in presence of β -ME. In the absence of β -ME, wt is detected at ~150 kDa. This is consistent with a dimeric state.

As a disulfide bridge was previously shown to exist between C255 and C511 (93, 131), it was plausible that this disulfide bridge linked different monomers and/or that the C255A mutation enabled a disulfide bridge between residues of different monomers. However, the three mutants (C255A, C511A and C255/511A) tested all displayed the same migration pattern on Western blots as did wt hSGLT1. Thus these hypotheses can be discarded.

The next step was to try to identify the cysteine residue responsible for the inter-monomer disulfide bridge. The effect of individually mutating each of the endogenous cysteines to alanine (i.e. C314A, C317A, C345A, C351A, C355A, C361A, C517A, C522A, C560A C610A and C659A) was assessed via Western blotting in the absence of β -ME (see **Figure 5-3 C**). C292 and C301 were not tested as they are situated in the core of the cotransporter, and thus are highly unlikely to interact with a separate hSGLT1 monomer. Subsequent findings proved our assertions to be correct.

Also, it had previously been reported that 1) the C351A and C361A mutations prevented expression at the membrane, but that the double mutant C351/361A restored cell-surface expression (176), 2) C351A, C355A and C361A were nonfunctional (131), 3) C355A was not trafficked to the plasma membrane (131) and 4) C355S produces the hereditary disease glucose-galactose malabsorption syndrome because of trafficking defects (177). Taken together, these allowed us to identify the 7-8 loop as a tentative “hot spot” for cysteine residues. Thus, a quadruple (4xCys: C345/351/355/361A), a triple (3xCys: 345/351/361A) and a double mutant (C351/361A) were tested.

All mutants were detected primarily in a dimeric state by Western blotting in the absence of β -ME, except 4xCys and C355A (see **Figure 5-3 C** and **D**). Because both C355A and 4xCys were detected in the monomeric state only in both the presence and absence of β -ME (see **Figure 5-3 E**), this strongly suggests that C355 is responsible for the inter-monomer disulfide bridge.

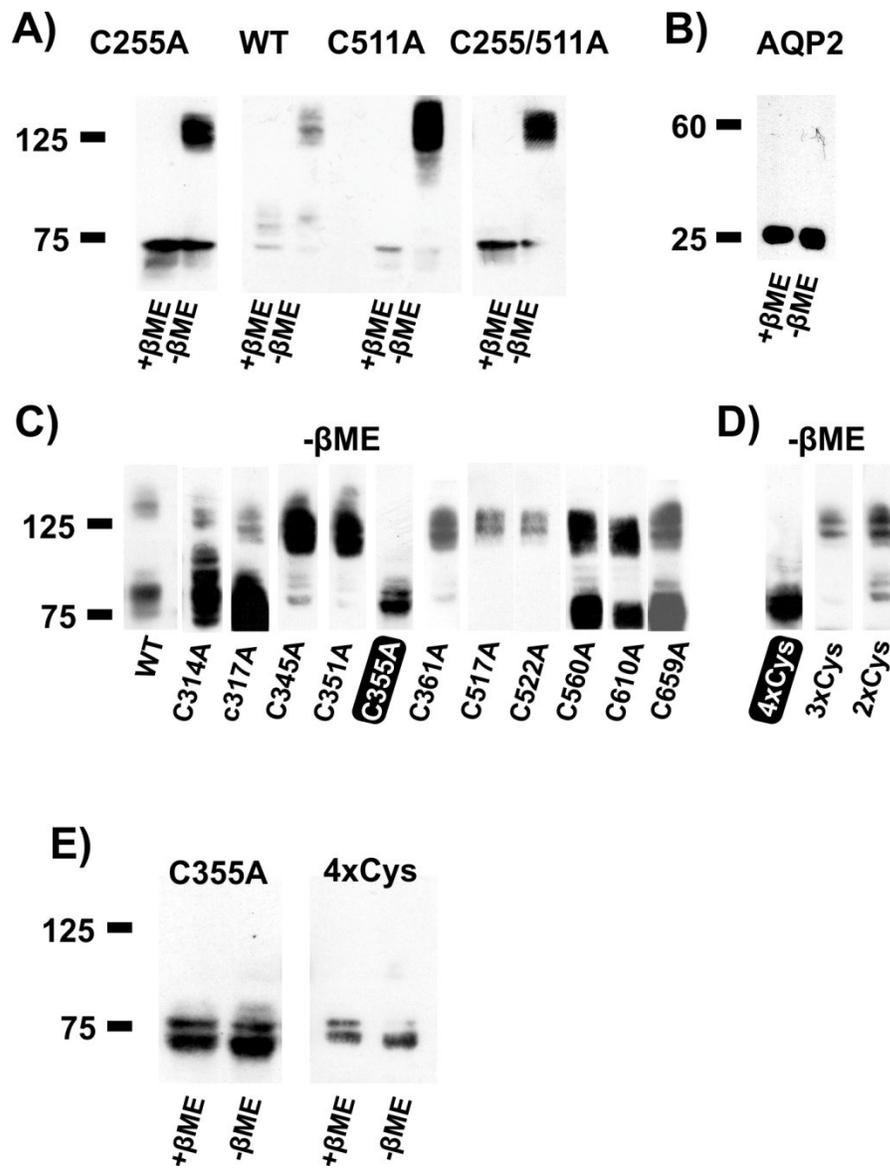


Figure 5-3 Western blot of wt and mutant myc-tagged hSGLT1

A) Effect of presence/absence of β -ME on C255A, wt, C511A and C255/511A hSGLT1 (n=3). B) Effect of presence/absence of β -ME on AQP2 (n=3). C) Single mutants in absence of β -ME. Presence of a homodimeric state in the absence of β -ME for wt and all tested single mutant, except C355A (n=3). D) Multiple mutants in absence of β -ME. Presence of a homodimeric state in absence of β -ME for 3xCys and 2xCys, but not for 4xCys (n=3). E) Effect of presence/absence of β -ME on C355A and 4xCys (n=3).

5.6.3 hVoS quenching on E624C

Because DPA is a fluorescence quencher whose distribution across the bilayer can be controlled through V_m , it allows unique insight regarding the intra- or extracellular localisation of the fluorophore which is quenched. As shown earlier with C511, whose extracellular position is well established, hyper/depolarisation caused a decrease/increase of the effective distance between the fluorophore-quencher pair, resulting in a decrease/increase of the overall fluorescence level. Thus, using this technique, we can not only test the extracellular accessibility of E624C by TMR, but also unambiguously determine the E624 location in a physiological environment.

The effect of adding DPA to the top bath was first measured to ascertain the accessibility of E624C to TMR. This was confirmed as DPA caused a decrease of $7\pm 1\%$ ($n=9$) and of $12\pm 2\%$ ($n=8$) for CTL and for E624C expressing oocytes, respectively (data not shown).

The next step was to assess the effect of DPA translocation following a voltage step. Comparing **Figure 5-4** A and B shows a significant difference in the effects of voltage steps on TMR-labeled E624C hSGLT1-expressing oocytes ($p<0.0001$). Once again, the directionality of this increase is consistent with an extracellular localisation of the fluorophore. As shown in **Figure 5-4** C, voltage steps resulted in variations of the total fluorescence of $2.8\pm 0.3\%$ ($n=9$) and of $6.6\pm 0.8\%$ ($n=8$) for CTL and E624C expressing oocytes, respectively.

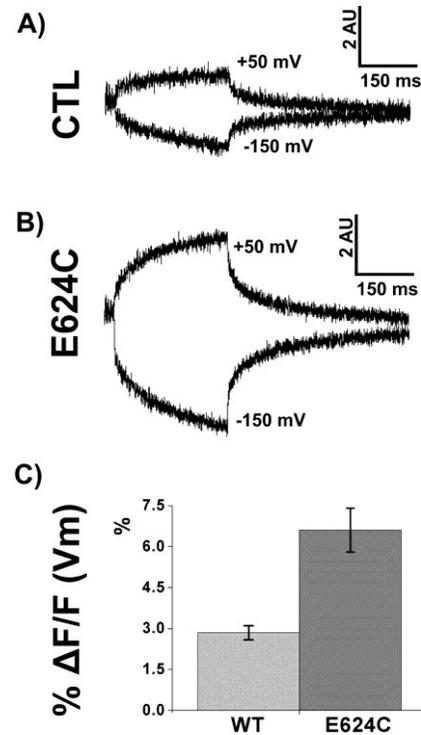


Figure 5-4 hVoS quenching of E624C

A) Typical trace of an CTL oocyte, labeled with TMR. B) Typical trace of an E624C-expressing oocyte, labeled with TMR. C) Statistically significant difference ($p < 0.0001$) between $\Delta F_n/F_0$ caused by voltage pulses on TMR-labeled CTL and on hSGLT1 E624C-expressing oocytes in the presence of DPA.

5.6.4 hVoS FRET quenching explicit simulation

A crude simulation of the energy transfer between TMR and DPA was made to rationalise fluorescent experimental measurement time course.

Parameters were determined by educated trials-and-errors. It was found that the only robust way of adequately reproducing the experimental results was by having the TMR $> 20 \text{ \AA}$ above the membrane plane at holding potential (-50 mV) (see **Figure 5-5 A**).

Explicitly, in our simulation, TMR is 37.5 \AA above the center of the membrane. During depolarisation, TMR moves away from the membrane by 10 \AA . During hyperpolarisation, TMR moves closer to the membrane by 20 \AA . hSGLT1 is represented by a $47 \text{ \AA} \times 104 \text{ \AA}$ (i.e. a homodimer) DPA-free area centered under TMR. The apparent DPA concentration in the membrane was 28 mM , in good agreement with a previous estimate (94). The TMR movement time constant was 15 s^{-1} .

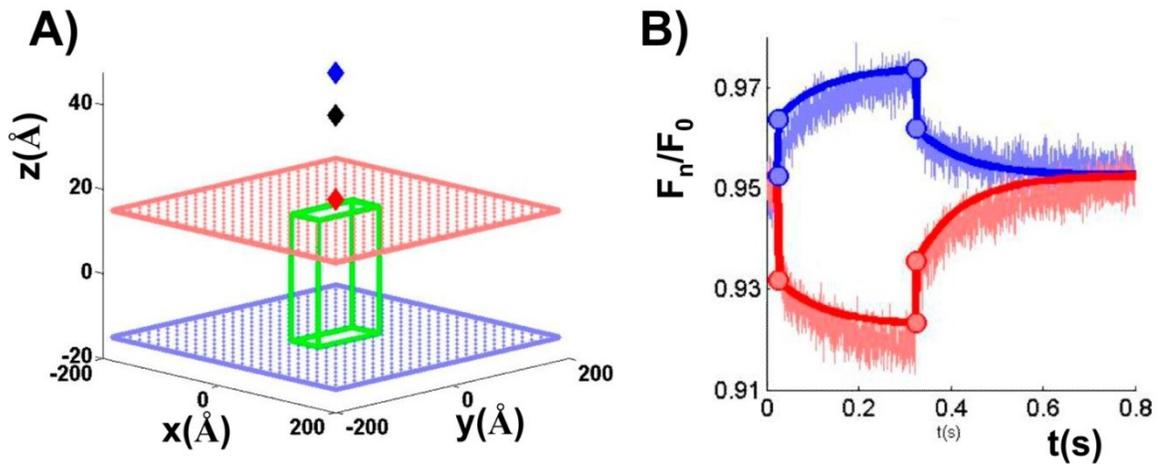


Figure 5-5 Explicit simulation of hVoS quenching on E624C

A) Explicit model hVoS quenching on E624C. TMR is initially positioned at 40 Å above the middle of the membrane (black diamond). TMR will move to alternate positions following hyperpolarisation or depolarisation (red diamond and blue diamond, respectively). hSGLT1 (green box) encompasses a DPA-free zone. Virtual DPA molecules are represented as red and blue dots, consistent with their distribution during voltage pulses. Z axis is not at scale for reasons of clarity. B) Fluorescence time courses. Theoretical fluorescence time courses superimposed on experimental time courses for hyperpolarising and depolarising voltage pulses (blue and red, respectively). Blue and red circles effectively represent the data used for fitting: F_n/F_0 in the presence of DPA at holding potential, F_n/F_0 after the instantaneous movement of the DPA at the beginning of the voltage pulse, F_n/F_0 at the end of the pulse, and F_n/F_0 after the instantaneous return of the DPA and the end of the voltage pulse.

5.7 Discussion

5.7.1 hSGLT1 is expressed as a disulfide-bridged dimer

The initial goal of this study was to determine the level of multimerisation of hSGLT1 when expressed in the membrane. While most of the literature so far has assumed a monomeric cotransporter, efforts to specifically address this question have yielded different results: freeze-fracture studies (130) suggest a monomer, crystallization (48, 162) and some kinetic models (138, 139) infer a dimer, and radiation inactivation studies are consistent with a homotetramer (133).

Nevertheless, each of these approaches has significant drawbacks. During freeze-fracture, particles present in the membrane following injection of hSGLT1 RNA were assigned as hSGLT1 on the basis of comparison with non-injected oocytes (130), leading to some ambiguity due to lack of specificity. While crystallisation of a bacterial homologue

produced a crystallographic dimer (48, 162), it is difficult to judge the relevance of this finding for the human protein under physiological conditions. Also, some kinetic models introduce cooperativity between monomers (138, 139), but recent development have shown that hSGLT1 electrogenic currents can be reproduced almost exactly without the need for cooperativity (83). Radiation inactivation studies results are hard to interpret as the apparent weight fluctuated, depending on the tissue and on the experimental conditions, from ~80 to 490 kDa (133), which would (roughly) correspond to one to 7 monomers in the case of homomultimers.

Here, we used two parallel procedures to unambiguously determine the hSGLT1 multimerisation level. First, hVoS FRET quenching was used to show the close vicinity of hSGLT1 monomers. Then, Western blotting was used to show the presence of a homodimeric state caused by a disulfide bridge involving C355.

The donor-acceptor pair used during hVoS FRET quenching yields a R_0 of 59 Å. Based on the vSGLT crystal structure, this roughly corresponds to the distance between the centers of 2 adjacent molecules, regardless of the quaternary structure. This makes this donor-acceptor pair perfectly suited for the task at hand. Normally hSGLT1 does not have any endogenously accessible cysteines, while the C255A mutations allowed accessibility to C511 by fluorescent cysteine labels A488 and TMR (93). Labeling concentrations were adjusted empirically to obtain similar fluorescence levels from A488 and TMR following labeling. Taking into account varying quantum yields, filters and illumination performance and FRET transfer from A488 to TMR, this roughly indicates that half the monomers are labeled by A488, and half by TMR. Thus, homodimers would have a 50% probability of producing a FRET signal (1/4 with 2 A488, 1/4 with 2 TMR, 1/2 with 1 A488 and 1 TMR). This probability rises to 87.5% in the case of a homotetramer (1/16 with only A488, 1/16 with only TMR and 7/8 with at least one of each label).

While it was theoretically and technically feasible to only compare the FRET levels of CTL and C255A-expressing oocytes to determine the presence of FRET, the use of DPA presents a number of advantages: 1) due to DPA's wide absorption spectra, it was possible to individually confirm and characterise the labeling of C255A by A488 and TMR. Thus, this assay was designed to yield conclusive results for the presence or absence of a multimer, 2) during hVoS FRET quenching measurements, the change in fluorescence following voltage steps is only related to acceptor-donor pairs within the A488-TMR R_0

and close to the membrane (i.e. within the A488-DPA and TMR-DPA R_0 s of 56 and 35 Å, respectively), thus yielding a large signal-to-noise ratio, 3) as an amphiphilic anionic absorber, DPA can be used to report the location of fluorescence relative to the plane of the membrane without any other assumptions.

As shown in **Figure 5-2**, hVoS FRET quenching measurements unambiguously showed that labeling of C511 by A488 and TMR produced FRET located at the extracellular side of the membrane, consistent with the presence of hSGLT1 as a multimer. The next logical step was to try to identify the degree of homo-oligomerization (i.e. dimer, trimer, tetramer) of hSGLT1.

Promising results were obtained by performing Western blotting in the presence and absence of β -ME. β -ME is a reducing agent used during standard Western blotting to break disulfide bonds. As shown in **Figure 5-3 A**, in the presence of β -ME, wt hSGLT1 is detected as a ~ 75 kDa monomer, consistent with previous findings. In sharp contrast to this, wt hSGLT1 is detected as a ~ 150 kDa dimer in the absence of β -ME.

Mutants C255A, C511A and C255/511A were simultaneously tested. As with wt hSGLT1, the mutants were present in a monomeric state with β -ME but in a dimeric state without β -ME. This confirms the finding for wt hSGLT1 and eliminates the possibility of an artifactual multimerisation state caused by the C255A mutation being responsible for the hVoS FRET quenching measurements.

hSGLT1 contains a total of 15 endogenous cysteines. Of those, C292 and C301 are situated in the core of the cotransporter, and thus are highly unlikely to be interacting with the vicinity of hSGLT1. Systematic Western blot analysis using mutations of each remaining single cysteine found in hSGLT1 (i.e. C255, C314, C317, C345, C351, C355, C361, C511, C517, C522, C560 C610 and C659) and of multiple mutants (4xCys, 3xCys, 2xCys) allowed us to identify C355 as being responsible for the inter-monomer disulfide bridge.

C355 is part of the extracellular loop 7-8 which is composed, in part, of alpha helices. Its position, assuming that the vSGLT crystal tertiary and quaternary structure are respected, would prohibit the presence of inter-monomer disulfide bridges through this residue. While these results are not definitive proof that the quaternary structure found in the vSGLT crystal structure does not apply to hSGLT1 in a physiological environment (and

with the added constraint of an inter-monomer disulfide bridge), it does strongly suggest that such assumptions should be considered with great care.

To date, 8 members of the LeuT structural family have been crystallised. The published coordinates for Mhp1 (2JLN), ApcT (3GIA) and GadC (4DJK) correspond to monomeric structures. LeuT (2A65), vSGLT (3DH4) and AdiC (3HQK) are presented as dimeric, showing similar but different relative orientations. Some experimental data on SERT are consistent with the dimeric interface found in LeuT (69). BetP (2WIT) and CaiT (3HFX) structures have been reported as trimeric, showing similar relative orientations. Experimental observations strongly corroborate the trimeric arrangement found for both BetP (72) and CaiT (74).

A number of roles can be attributed to the oligomeric states found in transporters and channels. In some case, oligomerisation is essential because the transport pathway is formed by the interface between protomers (178). In some cases where protomers are believed to be the basic functional unit, like hSGLT1 (179), oligomerisation has been shown to be required for stability under stress conditions (180), trafficking to the plasma membrane (181) and/or cooperativity/crosstalk during transport (182). Nevertheless, the only oligomer of the LeuT structural family for which this role has been investigated is BetP. In the BetP trimer, the first helix of each structural repeat of one protomer is linked via ionic interaction to the C-terminal domain of the adjacent monomer, which acts as an osmosensor. Thus, trimerisation allows modulation of transport, as a function of osmolarity, via modulatory crosstalk (182).

In this context it is thus difficult to speculate on the implications of hSGLT1's homodimeric state. It may be helpful to consider the different forms of experimental evidence regarding cysteines found in the TM 7-8 loop. hSGLT1 C351A and hSGLT1 C361A have previously been shown to be present at the plasma membrane but to be nonfunctional in oocytes (131), and to not be properly trafficked to the cell membrane in HEK-293 cells (183). However, the double mutant C351/361A is properly trafficked to the cell membrane in HEK-293 cells (183). When reconstituted in liposomes, C351A and C361A demonstrated significantly higher k_m values compared to the wt, but exhibited k_m values comparable to the wt after being exposed to the disulfide-bridge breaking reducing agent dithiothreitol (DTT) (183). In the present study C351A, C361A and C351/361A are shown to be present in a homodimeric state in oocytes. C355A has been shown to be non-

functional and to be not properly trafficked to the cell membrane cell in oocytes (131); this residue is responsible for a disulfide bridge between monomers since the absence of C355 eliminated the presence of a dimeric state in both the C355A and the 4xCys mutant (C345/351/355/361A).

Taking all these results into account, it would appear that C355 is responsible for dimerization and that C351 and C361 form an intramonomeric disulfide bridge, as previously suggested (183). Deletion of either C351 or C361 causes exposure of the reciprocal cysteine, permitting reorganisation of the disulfide bonds of SGLT1, which can be rescued by DTT. Recovery of k_m by DTT for C351A and C361A reconstituted in liposomes suggests that dimerization is not essential for function, even though electrostatic interactions would be enough to maintain a homodimeric state. In contrast, the lack of dimerization following deletion of C355 prohibits proper trafficking in oocytes (131), suggesting this is the main role of the homodimeric state.

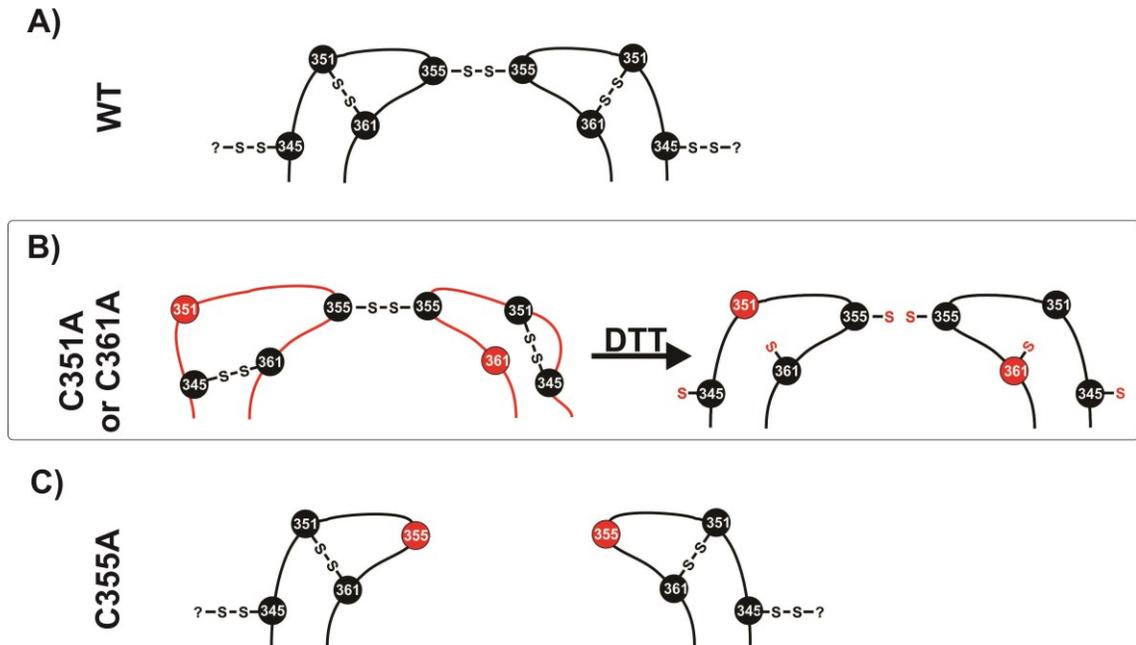


Figure 5-6 Cartoon of loop 7-8

A) wt hSGLT1. A intermonomer disulfide bridge is present between C355 residues of two monomers, while disulfide bridges are present between C351 and C361 (as previously suggested by (183)), and C345 and a unidentified cysteine. B) Mutation of either C351 or C361 cause a reorganisation of the disulfide bonds of hSGLT1, possibly by allowing the remaining cysteine to form a disulfide bridge with C345. In the presence of DTT, disulfide bridges are broken, allowing rescue of the proper conformation of the 7-8 loop. C) Mutation of C355 to alanine prevents a disulfide bond between monomers, but otherwise preserves hSGLT1's disulfide bond organisation.

5.7.2 E624C is located on the extracellular side of the membrane

Accessibility and labeling of E624C by TMR, a rhodamine-based membrane-impermeant fluorescent probe, from the extracellular side has already been reported by our group (132). We wanted to confirm these results and to use DPA to unambiguously determine the intra- or extracellular localisation of the fluorescent probe following labeling.

As expected, the E624C mutation yielded a significantly higher fluorescent labeling than what was obtained with CTL oocytes ($p < 0.0001$). More interestingly, hyperpolarisation/depolarisation produced quenching/unquenching of TMR, respectively. This tells us that TMR is located at least in the upper half of the lipid bilayer, i.e. on the extracellular side.

While fluorescent traces associated with the labeling of C511 showed the expected characteristics of a fluorophore situated just above the membrane, i.e. large instantaneous quenching by DPA resulting from voltage steps followed by little to no variation, labeling of E624C by TMR showed a small instantaneous quenching by DPA resulting from the voltage step followed by significant variation. While exact quantitative reproduction of the experimental traces is beyond the scope of this work, a crude simulation was performed. This simulation indicates that, in order to reproduce the instantaneous/slow quenching ratio, E624C needed to be located about 30 Å external to the membrane.

We thus suggest that 12-13 is re-entrant since part of it is situated significantly above the membrane. This hypothesis is structurally possible. The 12-13 loop is putatively composed of around 88 amino acid (132). Fully extended, such a chain would be 440 Å in length assuming an average of 5 Å per amino acid. If both the TM 12 C-terminus and TM 13 N-terminus are facing the cytosol, the loop could reach up to 180 Å above the membrane. Still based on the same sequence alignment (132), L640 would be the first residue of TM 13; it is 24 residues downstream from E624C, and this span could account for up to 120 Å. This is sufficient to cross the membrane (40 Å) and permit the proposed localisation of E624C above the membrane (30 Å).

The intracellular localisation of the C-terminal of TM 12 is well accepted (132, 184), and in agreement with the extracellular localisation of C511 as reported in this work. In contrast, the position of the N-terminal of TM 13 is still a matter of debate. A SCAM accessibility study showed extracellular accessibility of A664C based on labeling by both MTSES and MTSET (132), but other methods suggest an intracellular location (185, 186). While the crystal structure of vSGLT shows an extracellular C-terminus (48, 162), lack of both sequence homology between hSGLT1 and vSGLT and of structural homology between the different members of the LeuT structural family in this specific region prohibit definitive conclusions. Nevertheless, both orientations can be reconciled with the proposed position of E624C.

Similarly, despite numerous studies showing extracellular accessibility for at least part of the 12-13 loop (6, 132, 185, 187), it is still a matter of debate (49) as a number of those studies requires careful interpretation of the results. In the present work, DPA allowed unambiguous extracellular localisation of E624C.

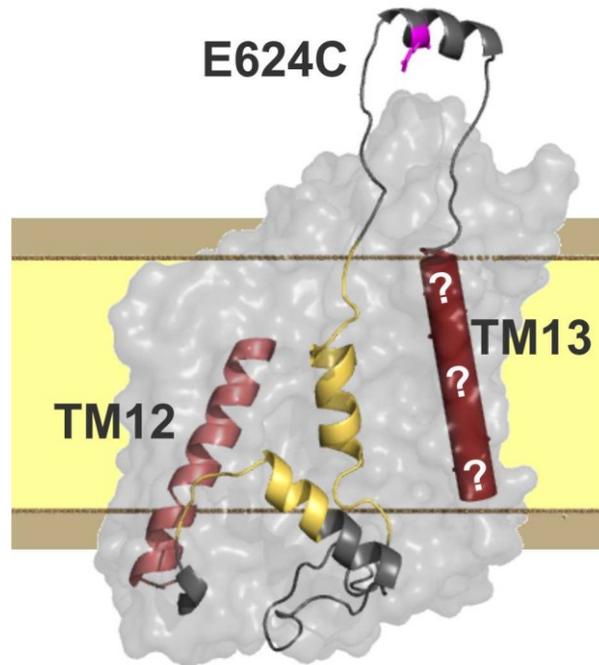


Figure 5-7 Cartoon of loop 12-13

The position of the 12-13 loop residues were based on the results of hVoS quenching of E624C (magenta), secondary structure and solvent accessibility (buried residues in yellow, accessible residues in gray) as predicted by the I-TASSER web server(174), and critical assessment of reported studies. The surface representation of the hSGLT1 monomer is in light gray, the hydrophobic depth in light yellow, the hydrophilic head region of phospholipids in tan, vSGLT TM12 and 13 in pink and red, respectively. Note that the TM13 orientation remains to be determined, even though we suggest an intracellular C-terminal.

A number of roles have been suggested for the 12-13 loop. It has been proposed to act as an extracellular binding site for sugar (188, 189) and inhibitor (183, 189, 190), to be part of an extracellular vestibule (187), and to act as a intracellular binding site for sugars (191). These roles are not mutually exclusive.

Finally, comparison with other studies can give some insight as to possible conformations of loop 12-13. Wimmer *et al.* recently suggested that the early part of the 12-13 loop contained a non-stereospecific intracellular sugar binding site, while the later part contained a stereospecific extracellular glucose interaction site (191). A study of the *E. coli* β -Glucoside Transporter BglF suggests that part of a cytoplasmic loop can alternate between faced-in and faced-out states (192). Recent crystallisation of the glutamate-GABA antiporter GadC (66) show that the intracellular C-terminal fragment forms a folded

domain, dubbed the C-plug. The C-plug completely blocks the path to the substrate binding site by inserting itself deep into the intracellular-facing putative substrate pathway.

Based on critical assessment of reported studies and the results of this work, we propose a speculative model, as shown in **Figure 5-7**.

5.8 Conclusion

Combined use of hVoS, FRET and VCF allowed us, without the need of extensive assumptions, to unambiguously show that C255A hSGLT1 is expressed as an oligomer at the oocyte membrane and that at least part of both the 11-12 loop (C511) and the 12-13 loop (E624C) are localised above the membrane plane.

Western blotting further confirmed the oligomeric state, as removal of β -ME showed that wt hSGLT1 is expressed as a disulfide-bridged dimer. Further investigation showed that C355 is responsible for the disulfide bridge.

Taken together, these results suggest that the assumption that the quaternary crystallographic structure of vSGLT reflects the physiological quaternary structure of hSGLT1 should be taken with great care. Furthermore, fluorescent and topological considerations allowed us to propose a model for the 12-13 loop which reconciles a number of different observations.

5.8.1 Acknowledgments

We thank Nicolas Groulx, Georges Haddad, Hugo McGuire for helpful discussion regarding fluorescence measurements. We thank Sandra DaCal and Pierre Bissonette for technical help and helpful discussions regarding Western blotting.

5.9 References

6. Kumar, A., N. K. Tyagi, E. Arevalo, K. W. Miller, and R. K. H. Kinne. 2007. A proteomic study of sodium/D-glucose cotransporter 1 (SGLT1): topology of loop 13 and coverage of other functionally important domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics* 1774:968-974.
38. Forrest, L. R., R. Krämer, and C. Ziegler. 2010. The structural basis of secondary active transport mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*.
48. Watanabe, A., S. Choe, V. Chaptal, J. M. Rosenberg, E. M. Wright, M. Grabe, and J. Abramson. 2010. The mechanism of sodium and substrate release from the binding pocket of vSGLT. *Nature* 468:988-991.
49. Wright, E. M., D. D. F. Loo, and B. A. Hirayama. 2011. Biology of human sodium glucose transporters. *Physiological Reviews* 91:733.
66. Ma, D., P. Lu, C. Yan, C. Fan, P. Yin, J. Wang, and Y. Shi. 2012. Structure and mechanism of a glutamate-GABA antiporter. *Nature* 483:632-636.
69. Yamashita, A., S. K. Singh, T. Kawate, Y. Jin, and E. Gouaux. 2005. Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. *Nature* 437:215-223.
72. Perez, C., K. Khafizov, L. R. Forrest, R. Krämer, and C. Ziegler. 2011. The role of trimerization in the osmoregulated betaine transporter BetP. *EMBO reports* 12:804-810.
74. Vinothkumar, K. R., S. Raunser, H. Jung, and W. Kühlbrandt. 2006. Oligomeric structure of the carnitine transporter CaiT from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 281:4795-4801.
82. Gagnon, D. G., C. Frindel, and J. Y. Lapointe. 2007. Effect of substrate on the pre-steady-state kinetics of the Na⁺/glucose cotransporter. *Biophysical journal* 92:461-472.
83. Longpré, J. P., L. J. Sasseville, and J. Y. Lapointe. 2012. Simulated annealing reveals the kinetic activity of SGLT1, a member of the LeuT structural family. *The Journal of general physiology* 140:361-374.
84. Loo, D. D. F., B. A. Hirayama, M. Sala-Rabanal, and E. M. Wright. 2008. How drugs interact with transporters: SGLT1 as a model. *Journal of Membrane Biology* 223:87-106.
92. Chanda, B., O. K. Asamoah, R. Blunck, B. Roux, and F. Bezanilla. 2005. Gating charge displacement in voltage-gated ion channels involves limited transmembrane movement. *NATURE-LONDON* 7052:852.
93. Gagnon, D. G., C. Frindel, and J. Y. Lapointe. 2007. Voltage-Clamp Fluorometry in the Local Environment of the C255-C511 Disulfide Bridge of the Na⁺/Glucose Cotransporter. *Biophysical journal* 92:2403-2411.
94. Groulx, N., M. Juteau, and R. Blunck. 2010. Rapid topology probing using fluorescence spectroscopy in planar lipid bilayer: the pore-forming mechanism of the toxin Cry1Aa of *Bacillus thuringiensis*. *The Journal of general physiology* 136:497.
95. Wang, D., Z. Zhang, B. Chanda, and M. B. Jackson. 2010. Improved Probes for Hybrid Voltage Sensor Imaging. *Biophysical journal* 99:2355-2365.

130. Eskandari, S., E. M. Wright, M. Kreman, D. M. Starace, and G. A. Zampighi. 1998. Structural analysis of cloned plasma membrane proteins by freeze-fracture electron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:11235-11240.
131. Gagnon, D. G., P. Bissonnette, and J. Y. Lapointe. 2006. Identification of a disulfide bridge linking the fourth and the seventh extracellular loops of the Na⁺/glucose cotransporter. *The Journal of general physiology* 127:145.
132. Gagnon, D. G., A. Holt, F. Bourgeois, B. Wallendorff, M. J. Coady, and J. Y. Lapointe. 2005. Membrane topology of loop 13-14 of the Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1): A SCAM and fluorescent labelling study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1712:173-184.
133. Jetté, M., V. Vachon, M. Potier, and R. Béliveau. 1997. Radiation-inactivation analysis of the oligomeric structure of the renal sodium/-glucose symporter. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1327:242-248.
134. Liu, T., P. Speight, and M. Silverman. 2009. Reanalysis of structure/function correlations in the region of transmembrane segments 4 and 5 of the rabbit sodium/glucose cotransporter. *Biochemical and biophysical research communications* 378:133-138.
135. Puntheeranurak, T., L. Wildling, H. J. Gruber, R. K. H. Kinne, and P. Hinterdorfer. 2006. Ligands on the string: single-molecule AFM studies on the interaction of antibodies and substrates with the Na⁺-glucose co-transporter SGLT1 in living cells. *Journal of cell science* 119:2960.
136. Turk, E., C. J. Kerner, M. P. Lostao, and E. M. Wright. 1996. Membrane topology of the human Na⁺/glucose cotransporter SGLT1. *Journal of Biological Chemistry* 271:1925.
137. Tyagi, N. K., T. Puntheeranurak, M. Raja, A. Kumar, B. Wimmer, I. Neundlinger, H. Gruber, P. Hinterdorfer, and R. K. H. Kinne. 2010. A biophysical glance at the outer surface of the membrane transporter SGLT1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*.
138. Chenu, C., and A. Berteloot. 1993. Allosterism and Na⁺⁺-d-glucose cotransport kinetics in rabbit jejunal vesicles: Compatibility with mixed positive and negative cooperativities in a homo-dimeric or tetrameric structure and experimental evidence for only one transport protein involved. *Journal of Membrane Biology* 132:95-113.
139. Koepsell, H., and J. Spangenberg. 1994. Function and presumed molecular structure of Na⁺-D-glucose cotransport systems. *Journal of Membrane Biology* 138:1-11.
162. Faham, S., A. Watanabe, G. M. Besserer, D. Cascio, A. Specht, B. A. Hirayama, E. M. Wright, and J. Abramson. 2008. The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na⁺/sugar symport. *Science* 321:810.
163. Choe, S., J. M. Rosenberg, J. Abramson, E. M. Wright, and M. Grabe. 2010. Water permeation through the sodium-dependent galactose cotransporter vSGLT. *Biophysical journal* 99:L56-L58.
164. Li, J., and E. Tajkhorshid. 2009. Ion-releasing state of a secondary membrane transporter. *Biophysical journal* 97:L29-L31.
165. Mazier, S., M. Quick, and L. Shi. 2011. A conserved Tyr in the first transmembrane segment of Solute: Sodium Symporters is involved in Na⁺-coupled substrate co-transport. *Journal of Biological Chemistry*.

166. Sasseville, L. J., J. E. Cuervo, J. Y. Lapointe, and S. Y. Noskov. 2011. The Structural Pathway for Water Permeation through Sodium-Glucose Cotransporters. *Biophysical journal* 101:1887-1895.
167. Henry, L. K., L. J. DeFelice, and R. D. Blakely. 2006. Getting the message across: a recent transporter structure shows the way. *Neuron* 49:791-796.
168. Lomize, M. A., A. L. Lomize, I. D. Pogozheva, and H. I. Mosberg. 2006. OPM: orientations of proteins in membranes database. *Bioinformatics* 22:623.
169. Zomot, E., and I. Bahar. 2010. The sodium/galactose symporter crystal structure is a dynamic, not so occluded state. *Mol. BioSyst.* 6:1040-1046.
170. Lomize, M. A., I. D. Pogozheva, H. Joo, H. I. Mosberg, and A. L. Lomize. 2012. OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic acids research* 40:D370-D376.
171. Longpré, J. P., D. G. Gagnon, M. J. Coady, and J. Y. Lapointe. 2010. The Actual Ionic Nature of the Leak Current through the Na⁺/Glucose Cotransporter SGLT1. *Biophysical journal* 98:231.
172. Batulan, Z., G. A. Haddad, and R. Blunck. 2010. An intersubunit interaction between S4-S5 linker and S6 is responsible for the slow off-gating component in Shaker K⁺ channels. *Journal of Biological Chemistry* 285:14005.
173. Bissonnette, P., J. Noël, M. J. Coady, and J. Y. Lapointe. 1999. Functional expression of tagged human Na⁺—glucose cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *The Journal of physiology* 520:359-371.
174. Roy, A., A. Kucukural, and Y. Zhang. 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols* 5:725-738.
175. Raja, M., and R. K. H. Kinne. Structural Insights into Genetic Variants of Na⁺/Glucose Cotransporter SGLT1 Causing Glucose–Galactose Malabsorption: vSGLT as a Model Structure. *Cell Biochemistry and Biophysics*:1-8.
176. Xia, X., G. Wang, Y. Peng, and J. Jen. 2005. Cys351 and Cys361 of the Na⁺/glucose cotransporter are important for both function and cell-surface expression. *Archives of biochemistry and biophysics* 438:63-69.
177. Martin, M., M. Lostao, E. Turk, J. Lam, M. Kreman, and E. Wright. 1997. Compound missense mutations in the sodium/D-glucose cotransporter result in trafficking defects. *Gastroenterology* 112:1206-1212.
178. Jensen, M. Ø., V. Jogini, D. W. Borhani, A. E. Leffler, R. O. Dror, and D. E. Shaw. 2012. Mechanism of Voltage Gating in Potassium Channels. *Science (New York, N.Y)* 336:229-233.
179. Kanner, B. I. 2008. Structural biology: It's not all in the family. *Nature* 454:593-594.
180. Herz, K., A. Rimon, G. Jeschke, and E. Padan. 2009. β-Sheet-dependent dimerization is essential for the stability of NhaA Na⁺/H⁺ antiporter. *Journal of Biological Chemistry* 284:6337-6347.
181. Farhan, H., M. Freissmuth, and H. Sitte. 2006. Oligomerization of neurotransmitter transporters: a ticket from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane. *Neurotransmitter Transporters*:233-249.
182. Gärtner, R. M., C. Perez, C. Koshy, and C. Ziegler. 2011. Role of bundle helices in a regulatory crosstalk in the trimeric betaine transporter BetP. *Journal of Molecular Biology*.

183. Xia, X., J. T. Lin, and R. K. H. Kinne. 2003. Binding of phlorizin to the isolated C-terminal extramembranous loop of the Na⁺/glucose cotransporter assessed by intrinsic tryptophan fluorescence. *Biochemistry* 42:6115-6120.
184. Tyagi, N. K., T. Puntheeranurak, M. Raja, A. Kumar, B. Wimmer, I. Neundlinger, H. Gruber, P. Hinterdorfer, and R. K. H. Kinne. 2011. A biophysical glance at the outer surface of the membrane transporter SGLT1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1808:1-18.
185. Lin, J. T., J. Kormanec, D. Homerova, and R. K. H. Kinne. 1999. Probing transmembrane topology of the high-affinity sodium/glucose cotransporter (SGLT1) with histidine-tagged mutants. *Journal of Membrane Biology* 170:243-252.
186. Turner, J. R., W. I. Lencer, S. Carlson, and J. L. Madara. 1996. Carboxyl-terminal Vesicular Stomatitis Virus G Protein-tagged Intestinal Na-dependent Glucose Cotransporter (SGLT1). *Journal of Biological Chemistry* 271:7738-7744.
187. Puntheeranurak, T., M. Kasch, X. Xia, P. Hinterdorfer, and R. K. H. Kinne. 2007. Three surface subdomains form the vestibule of the Na⁺/glucose cotransporter SGLT1. *Journal of Biological Chemistry* 282:25222.
188. Raja, M. M., H. Kipp, and R. K. H. Kinne. 2004. C-terminus loop 13 of Na⁺ glucose cotransporter SGLT1 contains a binding site for alkyl glucosides. *Biochemistry* 43:10944-10951.
189. Tyagi, N. K., A. Kumar, P. Goyal, D. Pandey, W. Siess, and R. K. H. Kinne. 2007. D-Glucose-recognition and phlorizin-binding sites in human sodium/D-glucose cotransporter 1 (hSGLT1): a tryptophan scanning study. *Biochemistry* 46:13616-13628.
190. Raja, M. M., N. K. Tyagi, and R. K. H. Kinne. 2003. Phlorizin recognition in a C-terminal fragment of SGLT1 studied by tryptophan scanning and affinity labeling. *Journal of Biological Chemistry* 278:49154-49163.
191. Wimmer, B., M. Raja, P. Hinterdorfer, H. J. Gruber, and R. K. H. Kinne. 2009. C-terminal loop 13 of Na⁺/glucose cotransporter 1 contains both stereospecific and non-stereospecific sugar interaction sites. *Journal of Biological Chemistry* 284:983-991.
192. Yagur-Kroll, S., and O. Amster-Choder. 2005. Dynamic membrane topology of the *Escherichia coli* β -glucoside transporter BglF. *Journal of Biological Chemistry* 280:19306-19318.

6 The Transport Mechanism of the Human Sodium/myo-Inositol 2 (SMIT2/SGLT6), a member of LeuT structural family.

Louis J. Sasseville, Jean-Philippe Longpré, Bernadette Wallendorff & Jean-Yves Lapointe
Article en préparation pour soumission au American Journal of Physiology

6.1 Contribution personnelle

J'ai réalisé le premier des deux jeux de données expérimentales. J'ai analysé l'ensemble des données expérimentales. J'ai aidé le Dr Jean-Philippe Longpré dans la mise au point de l'algorithme de recuit simulé, que j'ai par la suite modifié pour répondre à mes besoins. J'ai rédigé la version finale de l'article sous la supervision du Dr Jean-Yves Lapointe.

6.2 Résumé

Le cotransporteur de sodium/*myo*-Inositol SMIT2 est un membre à la fois de la famille génomique SLC5 et de la famille structurale de LeuT. La technique du voltage imposé à deux électrodes a été utilisée afin de caractériser les propriétés électrogéniques de SMIT2 humain lorsqu'exprimé dans les ovocytes de xénopes. Nous démontrons que la phlorizine est un inhibiteur médiocre des courants préstationnaires. De par une différence d'un facteur 3 entre les charges transférées apparentes On et Off, nous démontrons que les courants qui varient dans le temps ne sont pas tous des courants préstationnaires associés au cotransport. Nous démontrons aussi la présence de courants de fuite dépendant du temps, du potentiel transmembranaire et de la concentration des substrats. Ceci suggère la présence d'une voie de perméation passive des courants de fuite et une base structurale pour les courants de fuite observés chez plusieurs autres cotransporteurs. Un modèle cinétique a été

élaboré à l'aide d'un algorithme de recuit simulé. Cet algorithme a permis la comparaison de 19 connectivités différentes, et donc la détermination objective de la connectivité optimale et des paramètres associés. Le modèle à 5 états proposé comporte une liaison coopérative des ions Na^+ , une forte asymétrie apparente des barrières d'énergie, une étape limitante qui peut être associée avec la translocation du cotransporteur vide, et une fréquence du cycle de cotransport de 21 s^{-1} . Le modèle proposé est une preuve de concept pour une nouvelle approche à la modélisation cinétique de cotransporteurs électrogénique et permet un aperçu du mécanisme des membres de la famille structurale de LeuT à une résolution de l'ordre de la milliseconde.

6.3 Abstract

The Sodium/*myo*-Inositol Cotransporter 2 (SMIT2) is part of both the SLC5 gene family and the LeuT structural family. The two-electrode voltage-clamp technique was used to characterize human SMIT2's electrogenic properties after expression in *Xenopus* oocytes. Phlorizin is shown to be a poor inhibitor of pre-steady currents. From an up to 3-fold difference between the apparent On and Off transferred charges, we show that not all time-dependant currents are pre-steady-state currents associated with cotransport. We also show presence of a time, membrane voltage and substrate dependent leak current, suggesting a channel-like passive pathway and a rationale for the leak current exhibited by various other cotransporters. A kinetic model was generated through a simulated annealing algorithm. This algorithm allowed systematic comparison between 19 possible connectivities, thus permitting objective determination of the optimal connectivity and associated parameters. The proposed 5-states model includes cooperative binding of Na ions, strong apparent asymmetry of the energy barriers, a rate limiting step which is believed to be associated with the translocation of the empty transporter, and a turn-over rate of 21 s^{-1} . The proposed model is a proof of concept for a novel approach to kinetic modeling of electrogenic transporters and allows insight into the mechanism of members of the LeuT structural family at the millisecond time-scale.

6.4 Introduction

Cotransporters are interesting machines that use the electrochemical gradient of one substrate to energize the transport another substrate. In the case of the human Sodium/*myo*-Inositol Cotransporter 2 (hSMIT2), the energy of 2 Na⁺ ions is harnessed to pump one *myo*-Inositol (MI) across the plasma membrane (193).

Cotransporters such as the Na/glucose transporters (SGLTs) are involved in epithelial transport in the intestine and in the kidney (1), while other are involved neurotransmitter recapture (69), amino acids (76) and osmolyte (70) transport, nucleobases and metabolites recycling (62), for example.

The concept of cotransport was proposed in 1960 and soon after Jardetzky proposed a kinetic scheme which has led to the current alternating access mechanism (194). Recently, this mechanism has been experimentally supported by a series of crystallographic structures of different transporters in different configurations. This new structural information has shown that transporters with no sequence homology can share very similar architecture (36, 38).

The alternating access mechanism require the existence of 2 major conformations, inward-facing and outward-facing, in whose the substrate binding sites are either accessible from the intracellular or the extracellular side of the plasma membrane. Taking into the account the different steps required to achieve cotransport (binding of the substrates, translocation of the substrates across the membrane, release of the substrates and translocation of the empty transporter across the membrane), anywhere between 4 and 10 kinetic states can be required for proper description of the kinetics of the process. Determining the rate constants associated with the transition between the different states is a difficult task.

Recently, we have applied the simulated annealing algorithm to the case of the sodium/glucose cotransporter SGLT1 (83). We now apply it to a second member of the

SLC5 family: the sodium/myo-inositol cotransporter 2 (SMIT2). SMIT2 is 49 % identical to SGLT1 but present distinct behavior as it is responsible for the transport of myo-inositol in the kidney, small intestine and in the brain (195, 196).

6.5 Methods

6.5.1 Oocytes preparation and injection

Oocytes were surgically removed from *Xenopus laevis* frogs, dissected, and defolliculated as described previously (18). One to three days after defolliculation, oocytes were injected with 46 nl of water containing human SMIT2 mRNA (0.1 mg/ml) to obtain maximal protein expression. Oocytes were maintained in Barth's solution (in mM: 90 NaCl, 3 KCl, 0.82 MgSO₄, 0.41 CaCl₂, 0.33 Ca(NO₃)₂, 5 HEPES, pH 7.6) supplemented with 5% horse serum, 2.5 mM Na⁺ pyruvate, 100 units/ml penicillin, and 0.1 mg/ml streptomycin for 3-5 days before electrophysiological experimentation.

6.5.2 Electrophysiology

The saline solution used in our electrophysiological experiments was composed of (in mM): 90 NaCl, 3 KCl, 0.82 MgCl₂, 0.74 CaCl₂, and 10 HEPES and the pH was adjusted to 7.6 with NaOH. NMDG(-Cl) was used to adjust to molarity of solutions when [Na⁺] < 90 mM. MI and Phlorizin (Pz) were directly added to saline solution to desired concentrations (0 to 1 mM and 500 μM, respectively). Two-electrode voltage-clamp experiments were performed using an Oocyte Clamp OC-725 (Warner Instruments, Hamden, CT) and a data acquisition system (Digidata 1322A and Clampex 8.2, Axon Instruments, Union City, CA). Current and voltage microelectrodes were filled with 1 M KCl and had a resistance of 1–3 MΩ.

The bath current electrode and the reference electrode were Ag-AgCl pellets. The oocytes were clamped to a resting membrane potential (V_m) of -50 mV, and three repetitions of V_m steps between +55 and -155 mV, by increments of -15 mV, 300 ms

duration and no series resistance compensation used, were applied with an interval of 1.7 s between each step. Ninety-five percent of the command voltage step was reached in 3–4 ms. Data were obtained with a sampling frequency of 10 kHz, without filtering, and the three repetitions were averaged for each experiment. Two sets of experimental data were made. The first set of experimental data used control runs in presence of saturating Pz and the associated Na concentration. Because Pz was shown to be a poor inhibitor (see Results and Discussion section), a second set of experimental data was realised with current in absence of Na as control between each different runs in presence of substrate. The two sets of experimental data were perfectly consistent.

6.5.3 Kinetic modeling

6.5.3.1 Transition state theory

Transporter's kinetic models are based on the transition state theory. The cotransport cycle is viewed as a series of stochastic transitions between states. States are separated by voltage-dependent energy barriers, whose heights are the activation energy (E_a) values. In our case, the transitions rates are expressed as Arrhenius equations as follows (for $i=1,2, \dots, n$; $j= i+1$):

$$k_{ij} = k_{ij0} [S] e^{z_i \alpha_i V_m F / RT}, \quad k_{ji} = k_{ji0} [S] e^{-z_i (1-\alpha_i) V_m F / RT} \quad (6-1)$$

Where k_{ij0} and k_{ji0} are the forward and reverse rate constants, z_i is the valence of the equivalent moving charge, α_i represents the asymmetry of the energy barrier, V_m is the membrane potential, $[S]$ is the concentration of relevant substrate, and F , R and T have their usual meanings.

Kinetic parameters were evaluated followings a slightly modified version of the SA algorithm that we recently described (83). Briefly, connectivities are tested by directly fitting the complete current traces (including pre-steady-state and steady-state currents)

using randomly generated sets of kinetic parameters. The simulated annealing scheme allows exploration of multiple set of kinetic parameters in order to converge to what is possibly the global minimum. The SA algorithm was written in the MATLAB language (MathWorks, Natick, MA), compiled and executed on the Cottos computing server provided by the Réseau québécois de calcul haute performance (RQCHP). In the current version, the microreversibility and the number of charges by cycle of cotransport are respected using a weighted redistribution approach. This means that for the microreversibility the errors on $\prod k_{ij0}/\prod k_{ji0} = 1$ is proportionally redistributed by simultaneously modifying the value of all k_{ij0} , k_{ji0} , and that for the number of charges by cycle of cotransport the error on $\sum z_i = -2$ is proportionally redistributed by simultaneously modifying the value of all z_i . The rates constants (i.e., k_{ij0} , k_{ji0}) space is explored following a logarithmic scheme in order to allow sampling of the different orders of magnitude, from 0 to 10^4 s^{-1} for substrate independent steps, and up to $10^9 \text{ M}^{-3} \text{ s}^{-1}$ for substrate dependant steps. No bias was given toward a value of 2 for the value of the sum of the equivalent moving charges ($\sum \text{abs}(z_i) = 2$), i.e. toward an electroneutral fully-charged cotransporter, and individual z_i were allowed to vary between -1.5 and +1 e. The cost function used took into account the means of the experimental currents and the Q_{off} from each experimental conditions ($n=6$, 3 different donors).

6.5.3.2 Systematic approach to determine optimal connectivity

Based on the success of our previous kinetic modelling study (83), a more systematic approach was used to determine the optimal connectivity and associated parameters. The connectivity defines the number of states and the way they are connected to each other.

Taking full advantage of the computational resources available through cluster computing, a number of overdefined models with different connectivities were first generated and then fitted to all experimental conditions at once (see **Figure 6-4**). For practical reason, as the computer server used had an 8 CPU per node architecture with a

168 hours per submission time limit, each models were optimised through simulated annealing a minimum of 8 times for 168 hours of calculation each time. Careful analysis of the resulting kinetic parameters and of the quality of the fits allowed the removal of non-essential states and transitions. Models which did not achieve satisfactory fit within this time limit were discarded. Models which achieved satisfactory fit were run for another 168 hours, to achieve convergence, and then re-evaluated. Models which achieved particularly good fit and/or rapid convergence were run for another 168 hours. Furthermore, in order to obtain the simplest connectivity possible, states and transitions were removed from those promising models until they could no longer adequately account for our experimental data set. Following this scheme, a total of 19 different connectivities were asserted. As it was shown that SGLT1 could be properly modeled using a 7 states model without allowing the α_i to varies (83), each connectivities were asserted both with and without fixed α_i . Thus, a total of 38 “models” were tested.

Our goal was to find the simplest model that can satisfactorily fit our data. Previous approaches normally start from a simple model to which new steps are added until a good fit is reached. The significant computer power available to us and the excellent performance of the simulated annealing algorithm allowed us to use the opposite strategy. We started with more complicated models that we progressively simplified until we reached a situation where a good fit could no longer be achieved. The advantages of this approach are that it allows objectives comparison between different connectivities and objective assessment of the effect of the presence of the absence of each state.

6.6 Results

6.6.1 Poor inhibition of pre-steady-current by Pz

Pz is the classical inhibitor for the members of the SGLT family (197) which includes SMIT2 (193, 198). In the case of SGLT1, it is well known that Pz inhibition requires the presence of Na^+ (199) and is improved by the presence of a negative V_m . Because of the

high sensitivity of the SA algorithm used to determine our kinetic model, experimental currents were carefully analysed to evaluate to what extent Pz inhibition was efficient as a function of external Na^+ concentration and through the accessible V_m domain.

Figure 6-1.A shows typical OFF currents for an hSMIT2 expressing oocyte. Currents are shown as V_m is coming back to a holding potential of -50 mV following a 300 ms pulse to +40 or -155 mV. Currents are shown in the presence of 90 mM Na (blue line), 90 mM Na with 500 μM Pz (red line), and 0 Na (gray line).

When coming back from -155 mV, in the presence of 90 mM Na^+ a clear transient current can be observed for 40 ms and this component disappears when Pz is present in the external solution. In the presence of Pz, the only charge movement detectable occurs during the settling time of V_m (1-2 ms) and represent the capacitive current of the membrane (the charge displacement being simply proportional to the voltage step amplitude). This is consistent with a pre steady-state current originating from SMIT2. Interestingly, in the absence of external Na, the current recorded can be superimposed to the current recorded in Pz. This suggests that the charge movement associated with SMIT2 is completely dependent on the presence of external Na^+ .

When coming back from +55 mV, the current behaviour in presence of Pz is completely different. In the absence of Na^+ , the current transient is fast and the charge displacement has the amplitude of what is expected from the membrane capacitance. In the presence of 90 mM Na, there is a long lasting transient current. But, in sharp contrast to the observation presented above when coming back from -155 mV, adding Pz does not inhibit the transient current as the Pz current trace almost superimposes to the 90mM Na^+ current trace.

This shows that Pz is a good inhibitor of SMIT2 at hyperpolarising V_m but completely fails to inhibit SMIT2 related currents at positive V_m . Nevertheless, the transferred charge associated with the OFF currents at 0 Na are shown to follow a strictly linear dependence to V_m (see Figure 6-1 B), strongly suggesting a pure capacitive current. This allows the use of the 0 Na trace to subtract the capacitive current from the transient

current measured in a variety of different conditions. As shown in Figure 6-1 B, the charge transferred in 0 Na⁺ is identical with the charge transferred in the presence of 90 mM Na⁺ Pz for negative membrane potential, suggesting that all Na⁺-dependent current originates from the presence of SMIT2. This is confirmed by the observation that in non-injected oocytes, no Na-dependent transient current can be detected (data not shown). This validated the use of the 0 Na⁺ condition to eliminate the capacitive current and obtain a true estimation of the SMIT2-dependent transient current. This strategy was used during kinetic modeling.

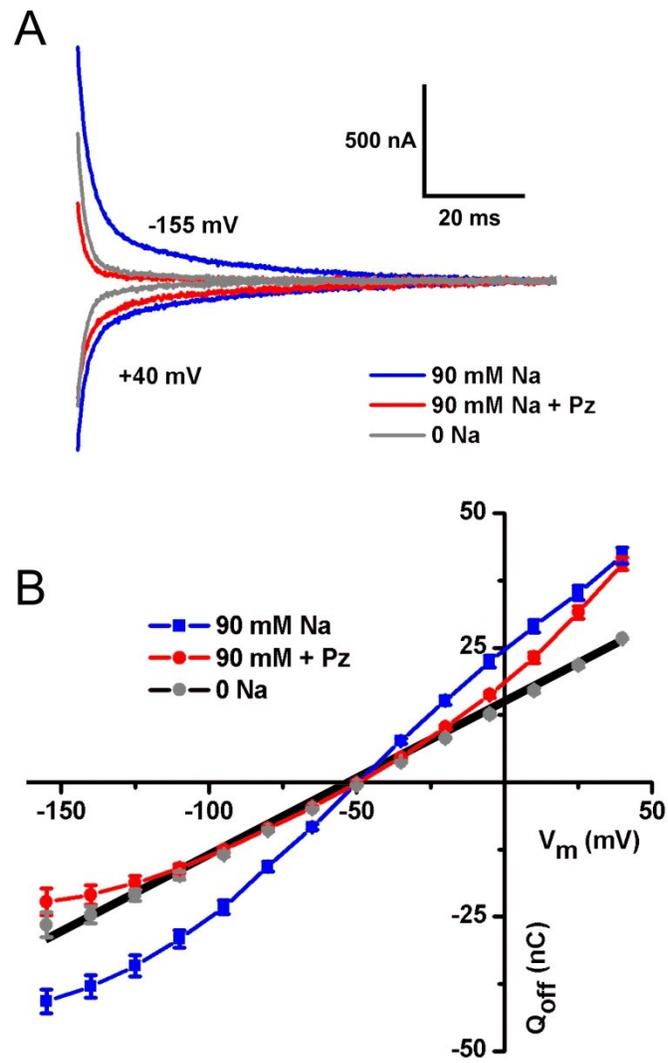


Figure 6-1 Poor inhibition by Pz

A. Typical OFF currents for a hSMIT2 expressing oocyte. Currents returning to the holding potential of -50 mV following a 300 ms pulse of +40 or -155 mV are shown for 90 mM Na (blue line), 90 mM Na with 500 μ M Pz (red line), and 0 Na (gray line). B. Transferred charge associated with the OFF currents at 0 Na (gray dots) are shown to follow a strictly linear dependence to V_m .

6.6.2 Discrepancy between Q_{on} and Q_{off}

Even if Pz is inefficient at positive V_m , it can be used at negative V_m to illustrate the presence of an extremely slow transient current component ($\tau = 98 \pm 1$ ms, mean \pm SEM, $n=4$) at strongly hyperpolarising potential (see Figure 6-2 A). Exploring V_m from -5 to -155 mV, the area under the Pz-sensitive current curve reveals a large charge displacement (Q_{on}) which is not seen when V_m is brought back to -50 mV (Q_{off}) (see Figure 6-2 B). This slow component of the transient current is not observed in the presence of Pz or when external Na is replaced by N-methyl-D-glucamine. The large discrepancy between Q_{on} and Q_{off} indicates that the slow component of the transient current cannot be considered as a true SMIT2-dependent charge displacement current. The steady-state value of this Pz-sensitive current is a so-called leak current associated with SMIT2 in the absence of its substrate. At -155 mV, it averages to -350 ± 40 nA (mean \pm SEM, $n=4$) which corresponds to 22.5 % of the maximal Na/myo-inositol cotransport current. At this point, we are considering the slow transient current as a slowly relaxing leak current mediated by SMIT2.

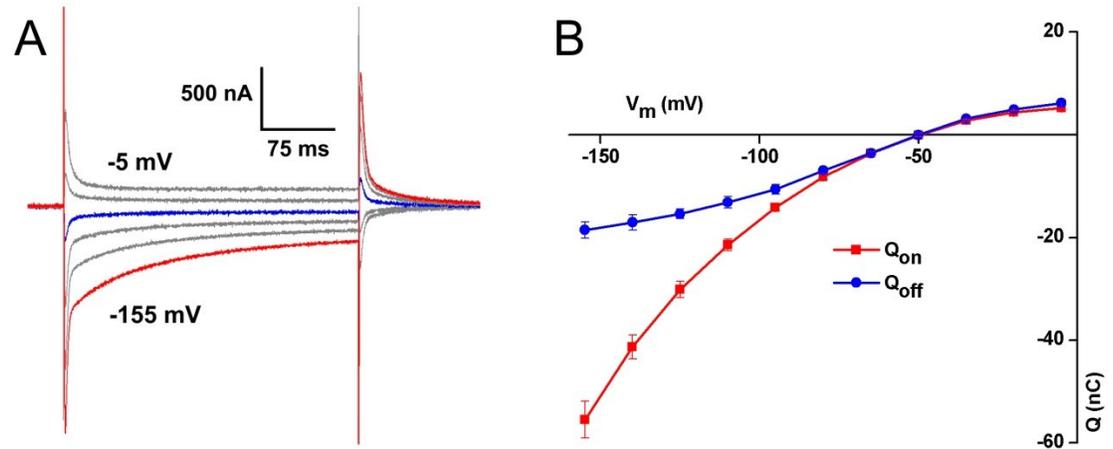


Figure 6-2 Apparent transferred charges

A. Typical Pz-sensitive currents of SMIT2 expressing oocytes in presence of 90 mM Na⁺.
 B. Apparent Q_{on} and Q_{off} associated with Pz-sensitive currents of hSMIT2 expressing oocytes.

6.6.3 Leak current characterisation

Measured as the Pz-sensitive currents in the absence of myo-inositol, the leak current associated to SMIT2 is relatively large. To our great surprise, the leak current was observed to increase as the external Na⁺ concentration was decreased (see Figure 6-3 A). This is in sharp contrast with leak current found in SGLT1, where the leak current is simply cationic selective and increases when the external cationic concentration is increased (96, 100). Remarkably, this is not incoherent with previously reported characterisation of SMIT2's leak current (198), as the Na⁺ concentration dependency was not explicitly examined.

Figure 6-3.B shows typical traces for total experimental current in presence of 90 mM Na⁺ (red line), 90 mM Na + Pz, 0 Na, and 90 mM Na + 1 mM MI. For clarity, all total traces in absence of MI (i.e., 90 mM Na, 90 mM Na + Pz, 0 Na) were normalised so that the leak currents at holding potential (i.e., before the V_m pulse) are equal. In this particular figure, the maximum shift was of 219 nA on the 90 mM Na + Pz time trace, which amounted for 19.5% of the steady-state value of the leak current. Also for clarity, the total

trace in presence of MI was arbitrarily normalised so that the apex following the beginning of the V_m pulse superimpose on 90 mM Na and 0 Na traces.

A number of conclusions can be interfered from **Figure 6-3.B**. First, comparison of 0 Na and 90 mM Na + Pz show presence of a significant leak even in absence Na, as was expected from **Figure 6-3.A**. More interestingly, comparison of 90 mM Na and 0 Na shows that following normalisation all leaks current have similar leak current amplitude at the beginning of the V_m pulse. From this, comparison of 90 mM Na with 0 Na and of 1 mM MI show that this leak currents decrease during an hyperpolarisation in presence of Na but absence of MI, but increase following hyperpolarisation in presence of 1 mM MI + 90 Na. This suggests that the different in the amplitude of the leak at the end of the pulse is due to relaxation of the current in presence of 90 Na, which does not happen in absence of Na. This will be further discussed in the Discussion section.

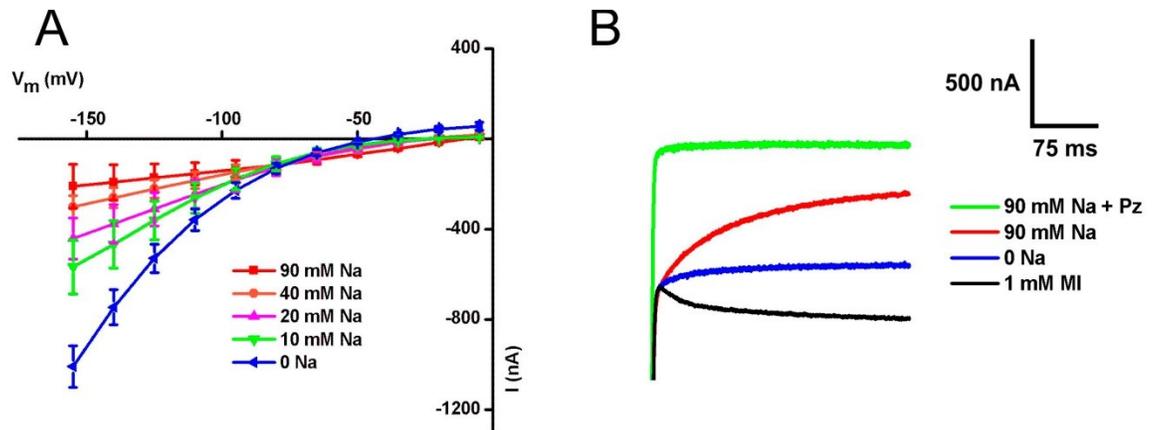


Figure 6-3 Apparent leak current

A. Apparent leak currents resulting from Pz-sensitive currents of hSMIT2. B. Typical traces for total experimental current at during an hyperpolarising V_m pulse (-155 mV) in presence of 90 mM Na (red line), 90 mM Na + Pz, 0Na, and 90 mM Na + 1 mM MI. All total traces in absence of MI (i.e., 90 mM Na, 90 mM Na and Pz, 0Na) were normalised so that the leak currents at holding potential (i.e., before the V_m pulse) are equal. The total trace in presence of MI was normalised so that the apex following the beginning of the V_m pulse superimpose on 90 mM Na and 0 Na traces.

6.6.4 Determination of the optimal kinetic model using SA algorithm

In order to obtain the most reliable set of experimental hSMIT2's cotransport related currents possible, the following strategies were used.

6.6.4.1 Pz was not used.

As poor inhibition of pre-steady-current by Pz following a depolarising voltage pulse was showed earlier, Pz was not used.

To obtain On and Off pre-steady state currents, we instead subtracted pre-steady state current in absence of Na^+ to pre-steady state current in presence of various concentration of substrate. This is appropriate as the $Q_{\text{off}}(V_m)$ curve in absence of Na have been shown to be linear (see Figure 6-1 B), i.e., due to the membrane capacitive current.

To obtain the steady state currents, we assumed that the leak current associated with SMIT2 is of the same nature than the leak of SGLT1, i.e., a channel-like phenomenon generating a current independent from the cotransport mechanism (96). In presence of Na but absence of MI, a baseline was applied by taking the value of the current at the end of the voltage pulse ($t = t_0 + 300 \text{ ms}$ during V_m pulse, $t = t_0 + 800 \text{ ms}$ at holding potential) effectively subtracting the associated leak current. In presence of 90 Na and various MI concentrations, we subtracted the leak current associated with the presence of 90 Na. Effectively, a baseline was applied by subtracting the current at the end of the voltage pulse in presence of 90 Na but absence of MI to the whole currents in presence of 90 Na and various MI concentrations.

6.6.4.2 V_m under 110 mV were not used.

As shown above, the leak current becomes very significant at low Na^+ concentration and at very negative V_m . As our goal is to describe hSMIT2's cotransport cycle, it is preferable to avoid the conditions where the leak current is large. This is why we choose not to use the currents recorded for V_m more negative than -110 mV.

6.6.4.3 Start fitting after the first few ms.

As the rise time of V_m vary with time and as a function of the external solution composition, the exact time course of the SMIT2-dependent current cannot be measured before V_m has reach its steady-state value. Subtraction of two different time traces accentuates this property, making the shape of the first few ms unreliable. For this reason, the first few ms of current recording after a voltage step were not used in the fitting procedure. The cut-off time was determined by manual inspection of the time course, and was typically of 1 to 10 ms. On the other hand, when the current are integrated to obtain the charge displacement (Q_{off}), the full current traces is used as the charge transfer is independent of the time-course of the currents (see the Discussion section). Thus, the first few seconds of ON and OFF voltage steps were discarded, but the associated OFF transferred charges were calculated and used in the fitting algorithm.

6.6.4.4 Finding the optimal connectivity

The optimal connectivity for reproducing our data set was determined following the general process described in the Methods section.

Explicitly, we first wanted to start with an over-defined model. We knew that hSGLT1 electrogenic currents could be successfully described using a 7-states model whose kinetic parameter were obtained using a previous version of the SA. We also knew that small tweaks made on the algorithm, such as the logarithmic exploration of the kinetic rates space, the weighted and the simultaneous fitting of all experimental conditions significantly increased the algorithm ability to fit a large number of conditions with a limited amount of states. Thus, four 8-states connectivities were initially tested (see **Figure 6-4**). The 4 connectivities differ in the way external Na binding is done (2 Na^+ in a single reaction, 2 consecutive step for Na^+ binding, 2 non-consecutive Na^+ binding steps, and the binding of a single Na^+ ion for connectivities a, b, c and d, respectively).

After a first round of fitting, connectivities with cooperative binding of Na^+ ions (i.e., $k_{Na} \propto [Na_{out}^+]^x$, where $x = 2$, see **Figure 6-4.b** and c) were found to readily fit

experimental data. In comparison, a connectivity with sequential binding of Na^+ ions (i.e., $k_{Na} \propto [\text{Na}_{out}^+]^x$, where $x = 1$, **Figure 6-4.a**) would converge much slower, while a connectivity with a single Na-dependant forward transition (see **Figure 6-4.d**) would fail to adequately reproduce the experimental data set. This tells us that while the sequential binding of the Na^+ ions can reproduce the experimental data set, the cooperative binding of the Na^+ ions is a good approximation within the time scale of our experimental results. Explicitly, sequential connectivities need to incorporate a very fast kinetic rate associated with the binding of one of the two Na^+ , which is effectively done per default in cooperative binding connectivities. As we want to generate the simplest possible connectivities, model incorporating cooperative binding were further investigated.

We thus generated five 7-states connectivities. Two of them (**Figure 6-4.e** and **f**) incorporated sequential binding Na^+ ions, and confirmed the previous findings. The remaining 3 cooperative model (**Figure 6-4.g, h** and **i**) all readily yielded good fit, each with various clusters of kinetic parameters sets. Clusters of kinetic parameters sets are defined as groups of kinetic parameters sets who are near each other in the kinetic parameters space. In layman terms, they are groups of kinetic parameters sets who are similar. This tells us that our connectivity is still over defined.

Thus, four 6-states connectivities were generated (see **Figure 6-4.j, k, l** and **m**), each incorporating characteristic of different members of the previous generation. They each generated adequate results, but were found to be less robust than the 7-states model. We define robustness by the overall quality of the fits, but also by if the connectivity can account for all the characteristic of experimental time traces. Explicitly, while some 7-states models whose different kinetic parameters clusters could adequately reproduce the experimental data set, 6-states connectivity would yield kinetic parameters set clusters that could reproduce most of the experimental data set characteristics, but not all. This tells us that the connectivity is under-defined.

Up to now, and during the following trials, all connectivities were tested both in presence and absence of asymmetry of the energy barrier. Explicitly, for all connectivities

two different sets of fits were made: one in which α_i were set at 0.5, thus representing a symmetric barrier, and one where α_i were allowed to vary from 0 to 1. For 7- and 8-states model with varying α_i , resulting parameters set were examined but discarded. This is because usage of α_i yielded patent overdefinition of the connectivity, and thus those kinetic models (i.e., a connectivity with an associated kinetic parameters set) failed to generate significant information. Thus, only kinetic models with $\alpha_i \equiv 0.5$ were considered. As 6-states models without the use of α_i fail to properly the experimental data set, 6-states models with α_i were considered and found informative. In this optic, with $\alpha_i \equiv 0.5$ connectivities j, l and m failed to adequately reproduce experimental data while connectivity k yielded ambiguous results. In sharp contrast, usage of asymmetric energy barriers yielded adequate fitting of the experimental data set from connectivities j, l and m, and good fitting by connectivity k.

Once again, a set of new connectivities with one fewer state was generated, but which were meant to be considered with varying α_i . Four 5-states connectivities were generated. Of those, connectivity p consistently yielded the most robust results. Finally, 4 and 3-states connectivities were tested, both failing to adequately reproduce experimental data. Thus, connectivity p was identified as the optimal connectivity regarding the reproduction of our experimental data set.

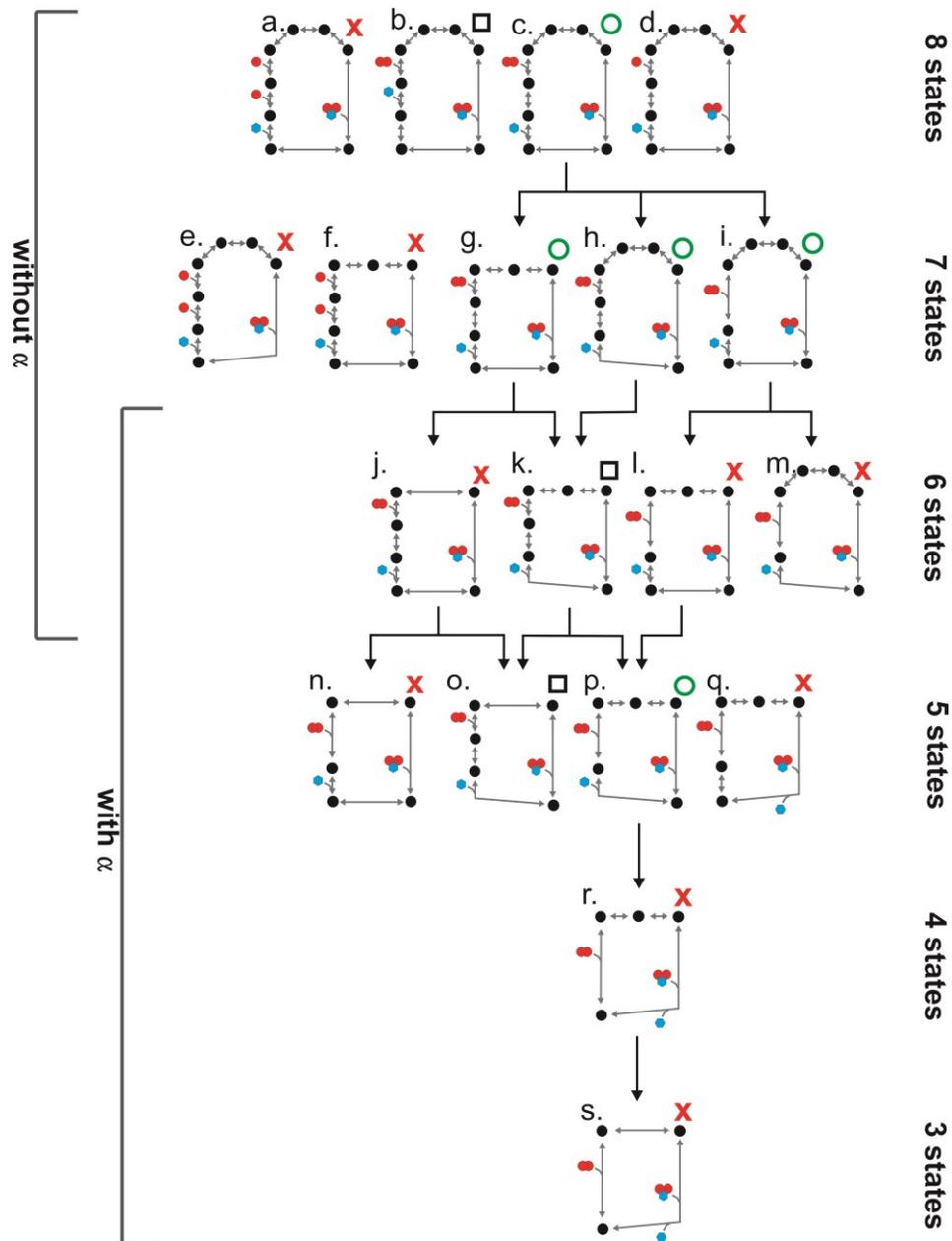


Figure 6-4 Assessed connectivities

19 different connectivities were assessed. Substrate-dependant transitions are identified with the binding of Na^+ ions (red circles) or MI (cyan hexagons). Not satisfactory, satisfactory and promising models are identified using red cross, black squares and green circles, respectively.

6.6.4.5 Optimal kinetic model

Close up of connectivity p is shown in **Figure 6-5.A**. This connectivity yielded four distinct clusters of kinetic parameters which are presented **Figure 6-5 B**. In this representation, the error of the fit is shown on the z axis as a function of two arbitrarily chosen parameters corresponding to the expression level (i.e., the number of SMIT2 protein per oocyte) and the sum of the absolute value of the different z_i , i.e., $\sum abs(z_i)$. The blue cluster, which contained 12 sets of parameters out of 32, was selected as it had the lowest error of the fit and is likely the global minimum.

Table 1 shows the associated kinetic parameters, while Figure 6-6 and Figure 6-7 show the fit of the experimental currents and the fit of the Q_{off} , respectively.

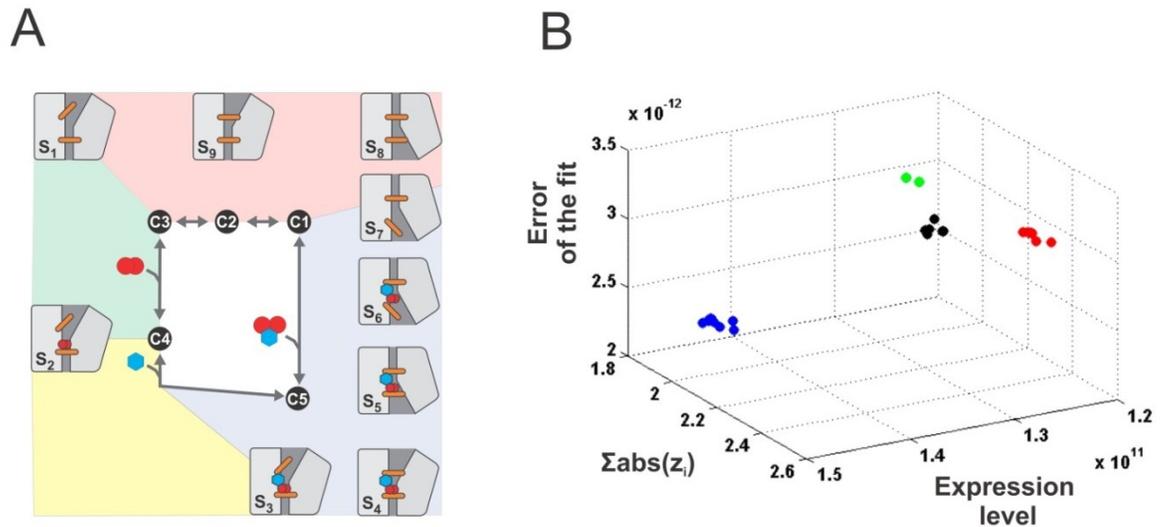


Figure 6-5 Optimal connectivity

A. Identified optimal 5-states connectivity with associated structural states. Na^+ ions and MI are represented as red circles and cyan hexagons, respectively. Extra- and intracellular gates are shown as orange sticks. Parallelism between kinetic states and structural states (colored shadowing) is discussed in the Discussion section. B. Clusters of kinetic parameters sets obtained for the optimal 5-states model. The blue cluster was selected as it has the lowest error of the fit and is likely the global minimum. All 32 sets of kinetic parameters sets are shown, but are sometime superimposed.

Table 1 Kinetic parameters

	$k_{forward}$	$k_{backward}$	α_i	z_i
C1↔C2	$4.58 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$	$13.83 \pm 0.05 \text{ s}^{-1}$	0.998 ± 0.001	-0.304 ± 0.003
C2↔C3	$220 \pm 3 \text{ s}^{-1}$	$231 \pm 4 \text{ s}^{-1}$	0.51 ± 0.08	0.006 ± 0.006
C3↔C4	$(2.29 \pm 0.04) \times 10^4 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$	$141.9 \pm 0.8 \text{ s}^{-1}$	0.8990 ± 0.0007	-0.851 ± 0.004
C4↔C5	$(1.83 \pm 0.02) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$8.5 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$	0.989 ± 0.008	-0.195 ± 0.003
C5↔C1	$3.25 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$	$(3.59 \pm 0.04) \times 10^6 \text{ M}^{-3} \text{ s}^{-1}$	0.996 ± 0.002	-0.656 ± 0.003
N	$(1.464 \pm 0.002) \times 10^{11}$			

All values are mean \pm SEM, n=12, based on the blue cluster presented in Figure 6-5 B.

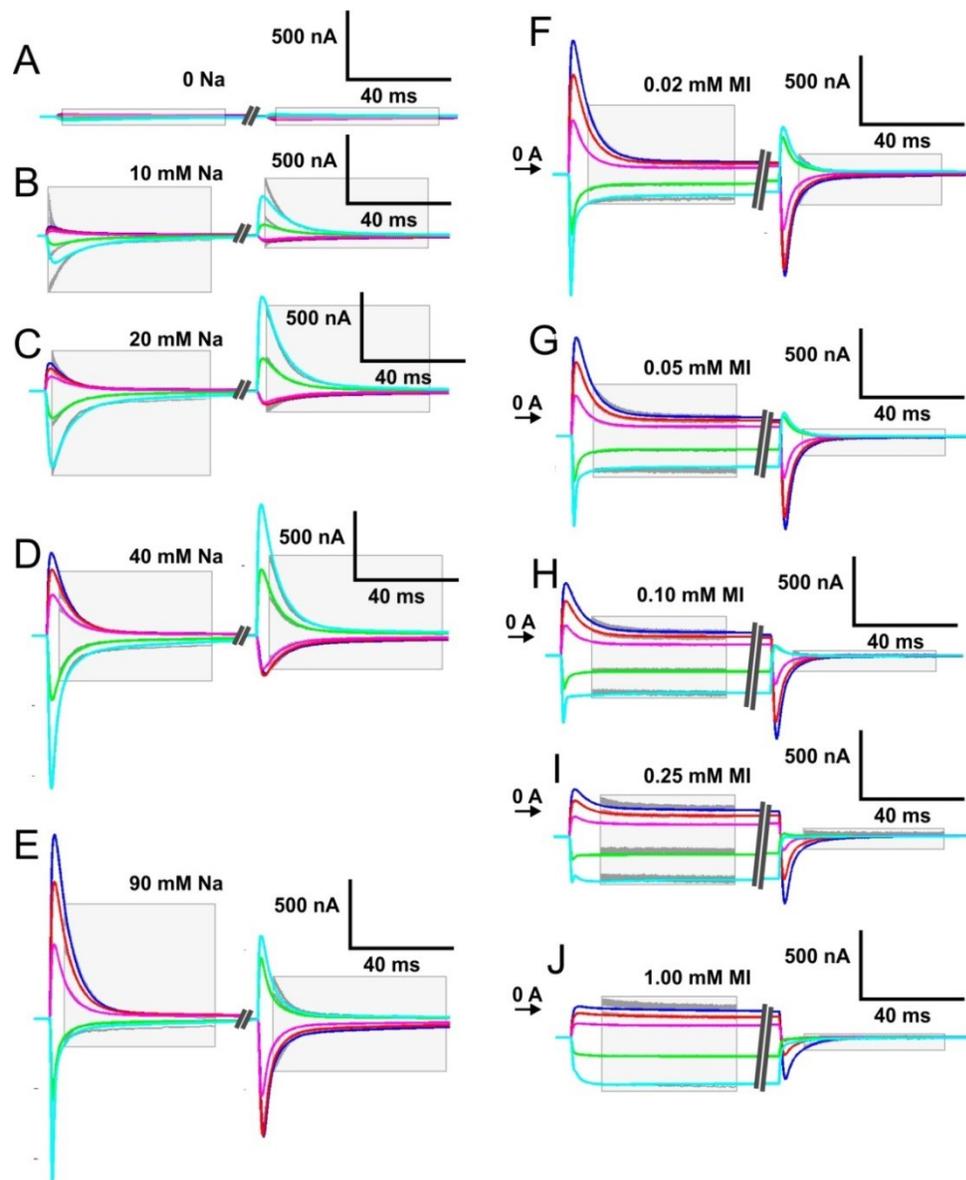


Figure 6-6 Fit of the experimental data

Theoretical current in presence of various concentration of Na^+ (A through E) and various concentration of MI (F to J). Voltage pulse of -110, -80, -20, 10 and +40 mV are shown as cyan, green, magenta, red, blue respectively. Mean of experimental data are shown as gray lines whose width is the SEM, with $n=6$ and 3 donors. As theoretical traces are often directly superimposed on experimental data, gray boxes indicate ranges of fitted experimental data.

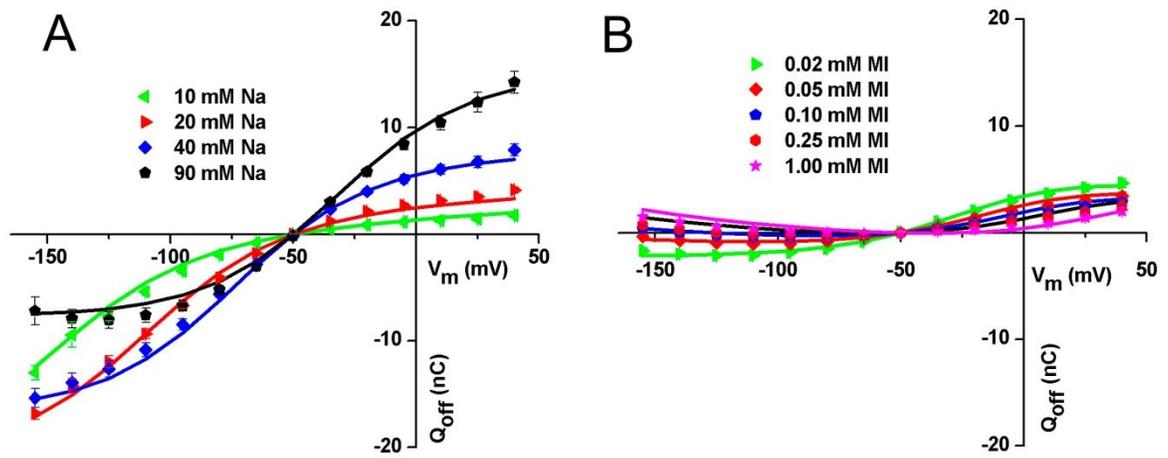


Figure 6-7 Fit of Q_{off}

Experimental (symbols represent mean \pm SEM, $n=6$ and 3 donors) and theoretical (lines) Q_{off} in presence of various Na (A) and MI (B) concentrations.

6.7 Discussion

6.7.1 Voltage-dependence of Pz inhibition

Pz was shown to be a poor inhibitor of pre-steady-state current following a depolarising pulse. As it is well known that Na^+ is required for Pz-binding, this can be easily rationalised. At non-depolarising V_m , Na can easily access its binding site as the electrochemical gradient strongly favors it. As the backward rates constant ($k_{backward}$) is non-zero, Pz and Na can both spontaneously unbind. At non-depolarising V_m , the forward rate constant ($k_{forward}$) resulting from the effect of the favorable electrochemical gradient on Na^+ will allow quick rebinding of Na^+ followed by Pz. At depolarising potential, k_{back} probably remains the same, but $k_{forward}$ is lowered as the binding of Na^+ is strongly affected by V_m . Thus, following spontaneous unbinding of Na^+ and Pz, quick rebinding is

prohibited. Therefore, following a voltage step to depolarising potential, most of the Pz have unbinded and SMIT2 is effectively un-inhibited.

6.7.2 Passive channel-like leak currents

6.7.2.1 3-fold difference between apparent Q_{on} and Q_{off} reveals time-dependent leak currents

Transporter-associated transferred charges are defined as the movement of charges through the membrane potential associated with the transition of a population of transporters from one equilibrium state to another equilibrium state following a change in the electrochemical gradient. This means that at equilibrium, even though an individual transporter can continuously cycle through the transport cycle, the occupancy level of each state by the total transporter population is stable. From this, it is easy to see that if a population of transporters goes from one equilibrium (E_1) to another (E_2) or vice-versa, the associated transferred charge must be the same ($Q = \int_{E_1}^{E_2} I(E) dE \equiv \int_{E_2}^{E_1} I(E) dE$), where $I(E)$ is the current associated with the transition. However, $I(E)$ does not need to be the same, i.e., the actual current time course doesn't need to, and will most probably not, be the same. From this, we know that the difference between Q_{on} and Q_{off} (ΔQ) is not associated with the transferred charges.

While to the best of our knowledge the difference between Q_{on} and Q_{off} have never been explicitly stated nor studied, OFF current are almost systematically chosen as more reliable than ON currents in numerous electrophysiological study of SGLTs (82, 83, 131, 171). One rare example of the difference between ON and OFF currents being explicitly studied is figure 7 of reference (200). Careful examination of panel B clearly shows a significant difference between Q_{on} and Q_{off} , but in panel C only the apparent transferred charge associated with ON currents is calculated. The authors propose that the “slow recovery of charge from a depolarizing voltage [...] represent the rate-limiting step(s) in the transport cycle”. While this hypothesis is consistent with experimental data shown in this

paper if we assume that the transferred charges would eventually come back, it is irreconcilable with the case of SMIT2. This is simply because the length of our pulses is sufficient to see the whole time course of the OFF currents, during which not all transferred charges come back.

Leak currents are the results of uncoupled passage of ions through the plasma membrane via transporters. They have been studied in a variety of transporters, including member of the SLC5 family (201, 202) such as SGLT1 (100) and SMIT2 (198), members of the SLC6 family (200, 203-205) such as SERT (200) (an eukaryote homologue of LeuT_{Aa}) and in members of the SLC1 (206, 207) and of the SLC34 (208) gene families. Notably, SGLT1's leak current, which can account for up to 10% of the maximal cotransport current, initially have been entirely attributed to the uncoupled transport of Na ions (209). Subsequent studies showed that this view was inconsistent with the leak current reversal potential (171, 210) and presence of leak current in absence of Na (65, 171, 211, 212), and suggest that the leak current follows a pathway similar to the water permeation pathway which is different from the cotransport pathway (171).

Based on our finding, the most straightforward explanation for the 3-fold difference between Q_{on} and Q_{off} is the presence of time-dependant leak currents associated with SMIT2.

6.7.2.2 A slow time constant associated with leak currents reveals the presence of a channel-like passive leak pathway

At a V_m of -155 mV and 90 mM Na⁺, a time constant of $\tau = 98 \pm 1$ ms (mean \pm SEM, n=4) is associated with the leak current. These would correspond to turn-over rate (TOR) of 10 s⁻¹. Based on the kinetic model proposed here but also on previously published kinetic models of SGLTs (82, 83, 213, 214), those slow time constant are difficult to reconcile with the expected TOR at hyperpolarising potential and saturating substrate concentration. This suggests that the leak is not directly associated with the transport cycle

and strongly suggests a passive nature for the leak. We thus stipulate the existence of a channel-like leak permeation pathway.

Presence of passive water permeation in SGLTs have been first reported in 1989 (215). Recent work from our group showed a relationship between the leak current of cation and the passive water permeability of SGLT1, suggesting a common pathway through the transporter (171). Following the crystallisation of the bacterial homologue vSGLT (2), water filled pathways composed of ~100 water molecules were identified in both the vSGLT crystal structure and a hSGLT1 homology model (166).

Interestingly, presence in transporter of channel-like pathway for leak currents have notably been explicitly suggested for members of the SLC6 gene family/LeuT structural family (LeuT (216) and DAT (217)) and in EAAT1 (206), a member of the SLC1 gene family. At the same time, presence of passive water permeation have been notably shown in member of the SLC5 gene family (SGLT1) and the SLC6 gene family (GAT-1 and LeuT) (218) and in EAAT1 (91). It is thus easy to imagine the ions associated with the leak current going through a similar, if the not the same, passive permeation pathway in SGLT1 but also in members of the LeuT structural family and in EAAT1.

6.7.2.3 Substrate and membrane potential dependency of the leak current

As shown in Figure 6-3 B, during a hyperpolarising pulse, the leak current decrease in presence of saturating Na^+ but absence of MI, and increase in presence of saturation concentration of both Na^+ and MI. While it is hard to speculate of the actual structural basis of the time dependency of the leak current, tentative hypothesis can be postulated.

We have previously identified a passive water permeation pathway through SGLTs. This pathway, which could arguably be responsible for leaks current, feature a single constriction zone (166). In K^+ channels C-type inactivation, slow perturbation of the selectivity filter geometry lead to significant change in the filter ability to conduct ions (219). It is thus possible to imagine a similar inactivation process occurring at the

constriction zone found in the passive water permeation pathway, which would be inactive in the presence of Na^+ .

6.7.3 Proposed kinetic model

6.7.3.1 5 states connectivities

Using a systematic approach to determine optimal connectivity, we were able to identify the simplest possible connectivity to properly reproduce the experimental data at hand, as shown in Figure 6-5.A. A number of conclusions can be drawn from this result, but also from the process leading to it.

First, we were able to properly describe steady and pre-steady state currents, for voltage pulse covering physiological range, and in presence of various Na^+ concentrations in absence of MI, and various MI concentration in presence of saturating Na^+ . In comparison with previous model, we cover a larger set of experimental conditions (82-84, 213, 214, 220), with less states (82-84, 214, 220), and with more accurate reproduction of the actual experimental currents (82, 84, 213, 214, 220). Simply put, this tells that our fitting scheme, i.e., directing fitting of the electrogenic current through SA while comparing multiple connectivities, works.

Also, careful examination of the rejected connectivities is quite informative. From rejected 8 state models a, b, d and 7-states model e and f, we show that the cooperative binding is an accurate description of the binding of Na ions at our time-scale. This is coherent with previously published kinetic models (82-84, 214, 220), but also with reported Hill coefficient for hSMIT2 of 1.4 (198), of 1.6 to 1.9 for SGLT1 (87) and of 1.7 for CaIT (73).

From rejected 6 states models j and 5 state model n, o and q, we show at least three transitions are needed between the binding of MI of one transport cycle and the binding of the Na ions of the subsequent cycle. This is also coherent with recent models which found that using 5 (83), 6 (220), and 3 (82) transitions was necessary to properly model the

translocation of the substrate to the intracellular side, unbinding of the substrate, and exposure of the binding site to the extracellular side. Please note that for all those models, the microreversibility was respected by constraining the value of one of the backward kinetic rate of this part of the models. As we used a weighted redistribution approach, were all kinetic rate are adjusted in a proportional manner, no backward kinetic rate is effectively “sacrificed” in order to respect microreversibility.

6.7.3.2 Parallels between kinetic and structural states

While states that are required in a kinetic model may not be the states that are the most likely to crystallise, a certain parallel must exist between the crystal structures obtained up to know and the states in which a transporter is most likely to be found. Thus, based on how the transition and states of the kinetic model are defined, i.e., binding of substrate during kinetic transitions, a portion of the kinetic scheme can be associated with portion of the structural mechanism.

Based on structural study of members of the LeuT structural family, hSMIT2 cotransport cycle should work as follows. Based on the alternate-access mechanism, the binding sites are first accessible from the extracellular side only (see Figure 6-5.A, state S1). Na^+ ions first bind to the cotransporter, producing an increase in sugar affinity (transition S1→S2). Binding of MI induces closing of the extracellular gates, leading the closing of the extracellular vestibule and opening of the intracellular vestibule (transitions S2→S3→S4→S5). This is followed by the opening of the intracellular gate, allowing intracellular release of substrate (S5→S6→S7). The empty transporter is then believed to experience a similar process in order to return to its initial state, re-exposing the substrate binding sites to the extracellular side (S7→S8→S9→S1) (1).

Thus, as the forward kinetic transition C3→C4 is defined by the binding of Na^+ ions, it can be associated with the forward structural transition S1→S2. In the same fashion, the forward kinetic transition C4→C5 can be associated with the forward structural transition S2→S3, and the backward kinetic transition C1→C5 to the backward structural

transition $S7 \rightarrow S6$. Based on this, forward kinetic transition $C1 \rightarrow C2 \rightarrow C3$ should be related to structural transition $S7 \rightarrow S8 \rightarrow S9 \rightarrow S1$, while forward kinetic transition $C4 \rightarrow C5 \rightarrow C1$ should be related to forward kinetic transition $S3 \rightarrow S4 \rightarrow S5 \rightarrow S6 \rightarrow S7$.

Figure 6-5.A illustrates this. Nevertheless, this should be considered with caution as it is at best a simplified outline of the structural meaning of the kinetic rates.

6.7.3.3 Kinetic parameters

6.7.3.3.1 Highly asymmetric energy barriers

The most prominent feature of our model is the strong asymmetry of its energy barriers, i.e. some α_i are close to 1. Such strong and systematic asymmetry of energy barriers can seem difficult to reconcile with possible structural processes. Naively, to do so would require a charged residue or an ion to see a strong membrane potential gradient in one conformational state (S1) and not the following (S2). Various processes can be devised to obtain this result, such as aqueous crevices (221), helical screws (222), or shielding by residue or whole domain of the protein. Nevertheless, while we cannot disprove such possibilities, neither do we require them.

While there is a strong correlation between the kinetics of cotransport and the underlying mechanistic process, they are not the same. Explicitly, a kinetic model's forward and backward transitions between two given state C1 and C2 do not need to be related to the same conformational transition. This is because the structural mechanism of the rate limiting part of the forward and backward transition might be different. Furthermore, a slow kinetic transition will mask the presence of a subsequent fast transition (223). Based on this, an optimised model (i.e. the simplest connectivity possible) would and should condense multiple forward and backward structural transitions into one kinetic transition, effectively only keeping the rate limiting one. Thus if transition from structural conformation S1 to structural conformation S2 is slow, while transition from S2 to S3 is fast, while transition from S3 to S2 is slow and transition S2 to S1 is fast, a single kinetic transition $C1 \leftrightarrow C2$ can reproduce the time course. The forward kinetic transition $C1 \rightarrow C2$

will be associated with the slow forward structural transition $S1 \rightarrow S2$, while the backward kinetic transition $C1 \leftarrow C2$ will be associated with the slow structural transition $S2 \leftarrow S3$.

In our case, this tells us that forward cotransport is strongly dependent on the transmembrane potential, and that the rate limiting structural transition can be accelerated via hyperpolarisation. At the same time, this tells us that the rate limiting step for reverse cotransport cannot be influenced significantly through depolarisation, at least within the physiological range. This is coherent with the reported $I(V_m)$ curve for hSMIT2 (195) and SGLT1 (224). Particularly, for SGLT1 it is well known that it is difficult to generate reverse cotransport in physiological or near physiological conditions (225), while we were unable to reverse hSMIT2 cotransport currents (unpublished data).

Finally, while not being a direct corroboration of the present finding, careful examination of the kinetic models generated for hSGLT1 using the previous iteration of the SA algorithm (83) is interesting. This version did not allow asymmetry of the energy barriers. Nevertheless, the resulting 7 state model incorporates 3 transitions with little to no sensitivity to membrane potential ($z_i \leq -0.03 e$), which would effectively become rate limiting during reverse cotransport. It is thus easy to argue that the use of asymmetric energy barriers would have allowed those transitions to be integrated to adjacent ones, effectively reducing the number of kinetic states.

Another example is the 8+1 state model (additional state being for the binding of Pz) proposed by Loo and al. (220). While not explicitly stated, this model incorporated complete asymmetry of two transitions: equivalent charges are associated to the forward transitions but not to the backward ones.

6.7.3.3.2 $\sum abs(z_i) \sim 2$, charged fully loaded transporter and the ion well effect

Contrary to previous kinetic models, no constraints were added toward an electroneutral fully-charged cotransporter, i.e. no charges associated with transition following substrate binding (82, 214, 220), nor toward exclusive presence of negative current-generating forward transitions (83), i.e. $\sum abs(z_i) = 2$. Instead, only weighted

redistribution of the error was used to respect the number of charges by cycle of cotransport, i.e., $\sum z_i = -2$.

This yielded interesting results. In presence of asymmetric energy barriers ($0 \leq \alpha_i \leq 1$), the value of the sum of the absolute values of z_i ($\sum abs(z_i)$) would strongly tend toward 2. In absence of asymmetric energy barriers, $\sum abs(z_i)$ varied between 2 and 3.5 e with a median value around 2.8 e. This confirms that the SA algorithm is not biased toward $\sum abs(z_i) \equiv 2$. We can thus treat the result that $\sum abs(z_i) \sim 2$ in presence of asymmetric energy barriers as significant.

Another interesting result is that the kinetic transitions associated with the translocation of the empty transporter accounts for only ~15% of the overall 2 e charge displacement. This is of course in sharp contrast with the assumption of an electroneutral fully-charged cotransporter. It is worth reminding that the electroneutral fully-charged cotransporter assumption was used for simplification purpose (Lucie Parent, personal communication) by the authors of the first SGLT1 model (214). Nevertheless, this assumption was kept in all subsequent papers of this group featuring SGLTs kinetic models (84, 211, 220, 225).

Taken together, our results suggest an ion-well effect. Following this view, it is the crossing of the Na^+ ions through the membrane electric field that is responsible for most of electrogenic currents. This is coherent with the fact that, to the best of our knowledge, no voltage sensing domain has been identified in SGLTs or member of the LeuT structural family.

6.7.3.3.3 *TOR and slow translocations between open-to-inside and open-to-outside states*

The forward rate-limiting step of the proposed model is the C1→C2 transition, with an effective turn-over rate (TOR) of $\sim 21 \text{ s}^{-1}$ at -155 mV and with saturating substrate concentration. The other slow forward transition of the model is C5→C1. This is coherent with large conformational change, and the symmetry in the kinetic rates suggests an underlying symmetry in the structural transitions. Based on Figure 6-5 A, it can be easily

argued that those kinetic transitions are associated with the structural transition between open-to-inside and open-to-outside states. This is coherent with previous kinetic models for SGLTs (82-84, 213, 214, 220).

6.8 Conclusion

In this study, we used the TEVC technique to characterise hSMIT2's electrogenic properties. Pz was shown to be a poor inhibitor of pre-steady currents. From an up to 3-fold difference between Q_{on} and Q_{off} , we show that not all time-dependant currents are pre-steady-state currents associated with cotransport. We also show presence of a time, membrane voltage and substrate dependent leak current, suggesting a channel-like passive pathway and a rationale for the leak current exhibited by various other transporters. Using a novel approach to kinetic modeling based on a SA algorithm, we proposed a 5-states model which accounts for SMIT2 electrogenic properties for various substrate concentration and V_m . This model include cooperative binding of Na^+ ions, strong apparent asymmetry of the energy barriers, a rate limiting step which is believed to be associated with the translocation of the empty transporter, a turn-over rate of 21 s^{-1} , and demonstrate the efficiency of our novel approach to kinetic modeling,

6.9 Acknowledgement

We thank Dr Sergei Noskov for access to computer resources during initial development of the SA algorithm.

6.10 References

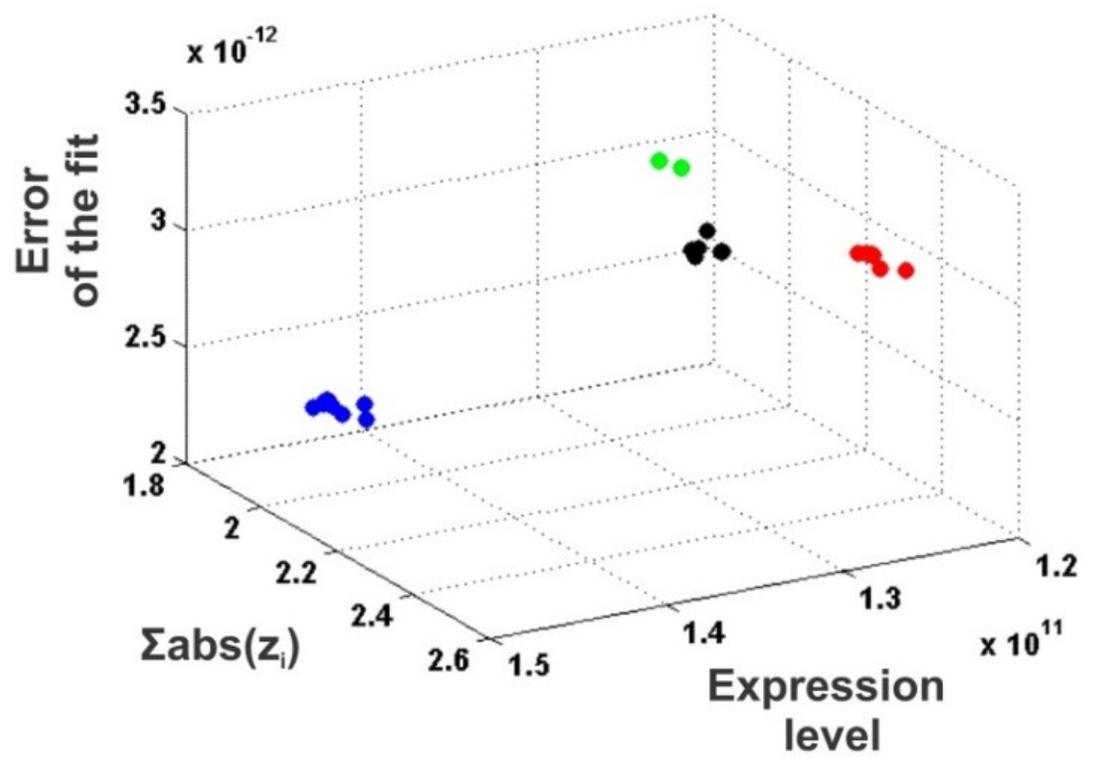
1. Sasseville, L. J., and J. Y. Lapointe. 2012. Structure and Function of Na⁺/Glucose Cotransporters. In Encyclopedia of metalloproteins. V. N. U. a. E. A. P. Robert H. Kretsinger, editor. Springer-Verlag New York Inc., New York.
2. Faham, S., A. Watanabe, G. M. Besserer, D. Cascio, A. Specht, B. A. Hirayama, E. M. Wright, and J. Abramson. 2008. The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na⁺/sugar symport. *Science* (New York, N.Y 321:810-814.
36. Abramson, J., and E. M. Wright. 2009. Structure and function of Na⁺-symporters with inverted repeats. *Current opinion in structural biology* 19:425-432.
38. Forrest, L. R., R. Krämer, and C. Ziegler. 2010. The structural basis of secondary active transport mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*.
62. Weyand, S., T. Shimamura, S. Yajima, S. Suzuki, O. Mirza, K. Krusong, E. P. Carpenter, N. G. Rutherford, J. M. Hadden, and J. O'Reilly. 2008. Structure and molecular mechanism of a nucleobase-cation-symport-1 family transporter. *Science Signalling* 322:709.
65. Shaffer, P. L., A. Goehring, A. Shankaranarayanan, and E. Gouaux. 2009. Structure and mechanism of a Na⁺-independent amino acid transporter. *Science* (New York, N.Y 325:1010-1014.
69. Yamashita, A., S. K. Singh, T. Kawate, Y. Jin, and E. Gouaux. 2005. Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. *Nature* 437:215-223.
70. Ziegler, C., S. Morbach, D. Schiller, R. Krämer, C. Tziatzios, D. Schubert, and W. Kühlbrandt. 2004. Projection Structure and Oligomeric State of the Osmoregulated Sodium/Glycine Betaine Symporter BetP of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Molecular Biology* 337:1137-1147.
73. Schulze, S., S. Köster, U. Geldmacher, A. C. T. van Scheltinga, and W. Kühlbrandt. 2010. Structural basis of Na⁺-independent and cooperative substrate/product antiport in CaiT. *Nature* 467:233-236.
76. Kowalczyk, L., M. Ratera, A. Paladino, P. Bartoccioni, E. Errasti-Murugarren, E. Valencia, G. Portella, S. Bial, A. Zorzano, and I. Fita. 2011. Molecular basis of substrate-induced permeation by an amino acid antiporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:3935-3940.

82. Gagnon, D. G., C. Frindel, and J. Y. Lapointe. 2007. Effect of substrate on the pre-steady-state kinetics of the Na⁺/glucose cotransporter. *Biophysical journal* 92:461-472.
83. Longpré, J. P., L. J. Sasseville, and J. Y. Lapointe. 2012. Simulated annealing reveals the kinetic activity of SGLT1, a member of the LeuT structural family. *The Journal of general physiology* 140:361-374.
84. Loo, D. D. F., B. A. Hirayama, M. Sala-Rabanal, and E. M. Wright. 2008. How drugs interact with transporters: SGLT1 as a model. *Journal of Membrane Biology* 223:87-106.
87. Chen, X. Z., M. J. Coady, F. Jackson, A. Berteloot, and J. Y. Lapointe. 1995. Thermodynamic determination of the Na⁺: glucose coupling ratio for the human SGLT1 cotransporter. *Biophysical journal* 69:2405-2414.
91. MacAulay, N., and T. Zeuthen. 2010. Water transport between CNS compartments: contributions of aquaporins and cotransporters. *Neuroscience* 168:941-956.
96. Longpré, J.-P., Dominique G. Gagnon, Michael J. Coady, and Jean-Yves Lapointe. 2010. The Actual Ionic Nature of the Leak Current through the Na⁺/Glucose Cotransporter SGLT1. *Biophysical journal* 98:1-9.
100. Chen, X. Z., M. J. Coady, F. Jalal, B. Wallendorff, and J. Y. Lapointe. 1997. Sodium leak pathway and substrate binding order in the Na⁺-glucose cotransporter. *Biophysical journal* 73:2503-2510.
131. Gagnon, D. G., P. Bissonnette, and J. Y. Lapointe. 2006. Identification of a disulfide bridge linking the fourth and the seventh extracellular loops of the Na⁺/glucose cotransporter. *The Journal of general physiology* 127:145.
166. Sasseville, L. J., J. E. Cuervo, J. Y. Lapointe, and S. Y. Noskov. 2011. The Structural Pathway for Water Permeation through Sodium-Glucose Cotransporters. *Biophysical journal* 101:1887-1895.
171. Longpré, J. P., D. G. Gagnon, M. J. Coady, and J. Y. Lapointe. 2010. The Actual Ionic Nature of the Leak Current through the Na⁺/Glucose Cotransporter SGLT1. *Biophysical journal* 98:231.
193. Bourgeois, F., M. J. Coady, and J. Y. Lapointe. 2005. Determination of transport stoichiometry for two cation-coupled myo-inositol cotransporters: SMIT2 and HMIT. *The Journal of physiology* 563:333-343.
194. Jardetzky, O. 1966. Simple allosteric model for membrane pumps.
195. Aouameur, R., S. Da Cal, P. Bissonnette, M. J. Coady, and J. Y. Lapointe. 2007. SMIT2 mediates all myo-inositol uptake in apical membranes of rat small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293:G1300-1307.

196. Lahjouji, K., R. Aouameur, P. Bissonnette, M. J. Coady, D. G. Bichet, and J. Y. Lapointe. 2007. Expression and functionality of the Na⁺/myo-inositol cotransporter SMIT2 in rabbit kidney. *Biochim Biophys Acta* 1768:1154-1159.
197. Ehrenkranz, J. R. L., N. G. Lewis, C. Ronald Kahn, and J. Roth. 2005. Phlorizin: a review. *Diabetes/metabolism research and reviews* 21:31-38.
198. Coady, M. J., B. Wallendorff, D. G. Gagnon, and J. Y. Lapointe. 2002. Identification of a novel Na⁺/myo-inositol cotransporter. *The Journal of biological chemistry* 277:35219-35224.
199. Semenza, G., M. Kessler, M. Hosang, J. Weber, and U. Schmidt. 1984. Biochemistry of the Na⁺, D-glucose cotransporter of the small-intestinal brush-border membrane. The state of the art in 1984. *Biochimica et biophysica acta* 779:343.
200. Karakossian, M., S. Spencer, A. Gomez, O. Padilla, A. Sacher, D. Loo, N. Nelson, and S. Eskandari. 2005. Novel properties of a mouse γ -aminobutyric acid transporter (GAT4). *Journal of Membrane Biology* 203:65-82.
201. Eskandari, S., D. D. F. Loo, G. Dai, O. Levy, E. M. Wright, and N. Carrasco. 1997. Thyroid Na⁺/I⁻ symporter. *Journal of Biological Chemistry* 272:27230.
202. Coady, M. J., B. Wallendorff, F. Bourgeois, F. Charron, and J. Y. Lapointe. 2007. Establishing a definitive stoichiometry for the Na⁺/monocarboxylate cotransporter SMCT1. *Biophysical journal* 93:2325-2331.
203. Meinild, A. K., D. D. F. Loo, S. Skovstrup, U. Gether, and N. MacAulay. 2009. Elucidating Conformational Changes in the γ -Aminobutyric Acid Transporter-1. *Journal of Biological Chemistry* 284:16226-16235.
204. Erreger, K., C. Grewer, J. A. Javitch, and A. Galli. 2008. Currents in response to rapid concentration jumps of amphetamine uncover novel aspects of human dopamine transporter function. *The Journal of Neuroscience* 28:976-989.
205. Galli, A., L. J. DeFELICE, B. J. Duke, K. R. Moore, and R. D. Blakely. 1995. Sodium-dependent norepinephrine-induced currents in norepinephrine-transporter-transfected HEK-293 cells blocked by cocaine and antidepressants. *Journal of experimental biology* 198:2197-2212.
206. Ryan, R. M., A. D. Mitrovic, and R. J. Vandenberg. 2004. The chloride permeation pathway of a glutamate transporter and its proximity to the glutamate translocation pathway. *Journal of Biological Chemistry* 279:20742.
207. Wadiche, J. I., and M. P. Kavanaugh. 1998. Macroscopic and microscopic properties of a cloned glutamate transporter/chloride channel. *The Journal of Neuroscience* 18:7650-7661.

208. Andrini, O., C. Ghezzi, H. Murer, and I. C. Forster. 2008. The leak mode of type II Na⁺-P. *Channels* 2:346-357.
209. Hediger, M. A., M. J. Coady, T. S. Ikeda, and E. M. Wright. 1987. Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter. *Nature* 330:379-381.
210. Umbach, J., M. Coady, and E. Wright. 1990. Intestinal Na⁺/glucose cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes is electrogenic. *Biophysical journal* 57:1217-1224.
211. Hirayama, B. A., D. Loo, and E. M. Wright. 1994. Protons drive sugar transport through the Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1). *Journal of Biological Chemistry* 269:21407-21410.
212. Panayotova-Heiermann, M., D. D. F. Loo, and E. M. Wright. 1995. Kinetics of steady-state currents and charge movements associated with the rat Na⁺/glucose cotransporter. *Journal of Biological Chemistry* 270:27099-27105.
213. Chen, X. Z., M. J. Coady, and J. Y. Lapointe. 1996. Fast voltage clamp discloses a new component of presteady-state currents from the Na (+)-glucose cotransporter. *Biophysical journal* 71:2544-2552.
214. Parent, L., S. Supplisson, D. D. F. Loo, and E. M. Wright. 1992. Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter: II. A transport model under nonrapid equilibrium conditions. *Journal of Membrane Biology* 125:63-79.
215. Fischbarg, J., K. Kuang, J. Hirsch, S. Lecuona, L. Rogozinski, S. C. Silverstein, and J. Loike. 1989. Evidence that the glucose transporter serves as a water channel in J774 macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86:8397.
216. Schicker, K., Z. Uzelac, J. Gesmonde, S. Bulling, T. Stockner, M. Freissmuth, S. Boehm, G. Rudnick, H. H. Sitte, and W. Sandtner. 2012. Unifying Concept of Serotonin Transporter-associated Currents. *Journal of Biological Chemistry* 287:438-445.
217. Kahlig, K. M., F. Binda, H. Khoshbouei, R. D. Blakely, D. G. McMahon, J. A. Javitch, and A. Galli. 2005. Amphetamine induces dopamine efflux through a dopamine transporter channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:3495.
218. Santacroce, M., M. Castagna, and V. F. Sacchi. 2010. Passive water permeability of some wild type and mutagenized amino acid cotransporters of the SLC6/NSS family expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology* 156:509-517.
219. Cuello, L. G., V. Jogini, D. M. Cortes, and E. Perozo. 2010. Structural mechanism of C-type inactivation in K⁺ channels. *Nature* 466:203-208.

220. Loo, D. D. F., B. A. Hirayama, M. H. Karakossian, A. K. Meinild, and E. M. Wright. 2006. Conformational dynamics of hSGLT1 during Na⁺/glucose cotransport. *The Journal of general physiology* 128:701-720.
221. Chanda, B., O. K. Asamoah, R. Blunck, B. Roux, and F. Bezanilla. 2005. Gating charge displacement in voltage-gated ion channels involves limited transmembrane movement. *Nature* 436:852-856.
222. Guy, H. R., and P. Seetharamulu. 1986. Molecular model of the action potential sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83:508-512.
223. Krofchick, D. 2012. A Study of Electrogenic Transient and Steady-state Cotransporter Kinetics: Investigations with the Na⁺/Glucose Transporter SGLT1.
224. Bissonnette, P., J. Noël, M. J. Coady, and J. Y. Lapointe. 2004. Functional expression of tagged human Na⁺—glucose cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *The Journal of physiology* 520:359-371.
225. Eskandari, S., E. Wright, and D. Loo. 2005. Kinetics of the reverse mode of the Na⁺/glucose cotransporter. *Journal of Membrane Biology* 204:23-32.



Discussion

7 Discussion

La biophysique peut se résumer succinctement par l'utilisation de techniques tirées de la physique moderne à la compréhension de phénomènes biologiques. Je crois que les travaux réalisés au cours de mes études doctorales illustrent bien ce propos. En effet, j'ai étudié le fonctionnement des cotransporteurs Na^+ /glucose à l'aide de techniques déjà existantes, mais qui de par leur application se sont révélées, je crois, novatrices.

Ainsi, l'ensemble de ces travaux peut se caractériser, de façon très naïve, par 3 techniques : la dynamique moléculaire a permis d'investiguer les bases structurelles de la perméation de l'eau au travers de vSGLT et hSGLT1, la spectroscopie de fluorescence conjuguée à des sondes fluorescentes sensibles au potentiel a permis d'investiguer certaines caractéristiques structurelles de hSGLT1, et le recuit simulé conjugué à l'utilisation de grappes de calcul a permis l'élaboration de modèles cinétiques du cycle de cotransport des SGLTs d'une qualité remarquable.

Dans la présente section, je ferai tour à tour un survol rapide de chacune de ces démarches et des résultats engendrés, pour ensuite poser un regard critique et proposer une suite logique à chacune de ces démarches. Finalement, je discuterai de la signification de ces travaux pris dans leur ensemble et dans le cadre de l'état actuel des connaissances en biophysique.

7.1 Identification d'une voie de perméation de l'eau au travers des SGLTs par dynamique moléculaire

7.1.1 Survol de la démarche et des résultats

7.1.1.1 Mise en contexte

Certainement une des avancées qui a le plus influencé les paradigmes de recherche portant sur les SGLTs est la cristallisation d'un homologue bactérien (2, 48) et

l'identification de la famille structurale de LeuT (36-38). Non seulement cela a-t-il permis de confirmer plusieurs concepts établis ou débattus, consolider les connaissances portant sur les différents membres de la famille structurale de LeuT, et de faire émerger des idées nouvelles, mais aussi d'ouvrir la porte aux études basées sur la dynamique moléculaire.

Comme mentionné précédemment dans cette thèse, l'utilisation d'une éventuelle structure dans la compréhension de la perméation de l'eau au travers des SGLTs avait été prophétisée par Loo et al en 2002: « Ultimately the question will be resolved when the 3-D structure of SGLT1 is obtained. » (122).

D'entrée de jeu, deux théories pouvaient expliquer la perméation de l'eau au travers des SGLTs de façon crédible: l'hypothèse du cotransport de l'eau (water cotransport hypothesis) (122, 127) et l'hypothèse du gradient osmotique local (local osmotic gradient hypothesis) (117-119).

L'hypothèse du cotransport de l'eau, dans sa forme « précristallisation », pouvait d'emblée être réfutée une fois que la structure cristallographique soit devenue disponible. Intrinsèque à cette hypothèse, le cotransporteur devait être capable, au cours d'un cycle de cotransport, d'accueillir dans une cavité ouverte du côté extracellulaire de 200 à 380 molécules et les substrats (122, 127). Cette cavité devait par la suite se fermer du côté extracellulaire, s'ouvrir du côté intracellulaire, et expulser l'ensemble de son contenu. Elle devait ensuite, sans se remplir, et donc transporter de l'eau dans le sens inverse, se rouvrir du côté extracellulaire. Un examen de la structure cristallographique de vSGLT démontre clairement qu'une telle cavité n'existe pas. Premièrement, il n'est possible que d'insérer ~200 molécules d'eau dans l'ensemble de la protéine, incluant les molécules d'eau réparties dans les vestibules intra- et extracellulaire, dans la voie de perméation et de façon discontinue entre les différents segments transmembranaires de la protéine. Deuxièmement, il est difficile d'imaginer comment le cotransporteur pourrait accomplir le mécanisme complexe explicité ci-haut, requis pour le cotransport de l'eau.

L'hypothèse du gradient osmotique ne pouvait pas être réfutée par un examen de la structure cristallographique. Par contre la présence d'un pore continu, qui aurait pu faire office de voie de perméation, brillait par son absence. Évidemment, les molécules d'eau résolues dans les structures cristallographiques publiées ne peuvent difficilement nous éclairer sur la question. Ainsi, aux résolutions atteintes par les structures publiées pour vSGLT, 3DH4 (résolution de 2.70 Å) n'en contient aucune, alors que 2XQ2 (résolution de 2.73 Å) en contient 4.

Avec ces différents éléments en mains, l'étude de cette question à l'aide de techniques de dynamique moléculaire était tout indiquée. La rencontre avec le Dr Sergei Noskov de l'Université de Calgary en Alberta, qui avait accepté d'être mon invité dans le cadre du cours de séminaire organisé à l'Université de Montréal par notre groupe de recherche, le GÉPROM, fut en quelque sort l'élément déclencheur de cette démarche.

Il fut alors possible d'évaluer la faisabilité de notre projet et de dresser les grandes lignes des techniques à utiliser. Par la suite, j'ai eu la chance de faire un stage de 4 mois sous la supervision du Dr Noskov, à l'université de Calgary. Ceci me permit notamment d'acquérir et de mettre en pratique les méthodologies computationnelles utilisées dans ce projet.

7.1.1.2 Méthodologie et résultat

En dynamique moléculaire, deux grandes façons de faire existent. Une première, qui pourrait être qualifiée de « force brute », consiste à bâtir un système complet pour ensuite le laisser évoluer dans le temps par lui-même dans le but de simplement voir ce qui se passe. Cette façon de faire a pour mérites d'être simple et de ne pas nécessiter de théories ou d'approximations *a priori*. Par contre, elle nécessite souvent de longues simulations de l'ordre de la centaine de nanosecondes. La puissance de calcul étant à la disposition de la communauté scientifique est constamment en augmentation, à la fois au niveau des machines personnelles, mais aussi au niveau des grappes de calcul. Ceci rend de telles

simulations plus accessibles en réduisant le temps-machine nécessaire. Ainsi, la barrière de la milliseconde de simulation a récemment été franchie (226). Par contre, il est facile d'oublier que toutes ces simulations sont basées à la fois sur des structures cristallographiques et les champs de forces empiriques. Ainsi, il est bon de se questionner sur la cohérence d'un système après un tel laps de temps. Une seconde façon de faire consiste à utiliser des algorithmes parfois complexes afin de résoudre des questions précises. Cette façon de faire est souvent élégante et informative, mais peut se révéler difficile à mettre en place et à interpréter. Évidemment, la plupart des méthodologies de la dynamique expérimentales se situent le long d'un spectre continu entre ces deux extrêmes. Par contre, les approches que nous avons utilisées dans le cadre de l'identification d'une voie de perméation de l'eau au travers des SGLTs se rapprochent plus de cette deuxième façon de faire.

Tout d'abord, nous avons créé un modèle par homologie de hSGLT1 basé sur la structure cristallographique de vSGLT à l'aide de l'algorithme SCWRL (146). Ensuite, chaque protéine (c.-à-d. la structure cristallographique de vSGLT et le modèle par homologie de hSGLT1) a été insérée à l'aide de CHARMM-GUI (114) dans des systèmes composés d'une bicouche lipidique et de 2 réservoirs d'eau explicites. Ces systèmes ont ensuite été équilibrés dans CHARMM avec le champ de force CHARMM27 (110). Cette façon de faire est des plus communes.

7.1.1.2.1 Insertion des molécules d'eau

Nous devons alors hydrater les protéines, c.-à-d. insérer de façon stable des molécules d'eau dans le modèle. Il aurait été possible de simplement laisser les systèmes évoluer pour plusieurs centaines de nanosecondes et voir ce qui se passe. Ceci étant d'ailleurs l'approche utilisée par un autre groupe (159). Par contre, nous avons à notre disposition un algorithme permettant de faire des simulations Monte-Carlo dans l'ensemble grand-canonique (MCGC) (152) dont l'utilisation était tout indiquée pour ce que nous voulions faire.

L'algorithme MCGC peut être expliqué comme suit : l'ensemble grand canonique permet de faire varier le nombre de particules dans le système, dans notre cas les molécules d'eau, tout en conservant le potentiel chimique constant. On peut ainsi insérer ou retirer des molécules d'eau du système. Suivant l'algorithme de Monte-Carlo, à chaque essai une molécule d'eau est insérée ou retirée du système. Cet essai est alors accepté ou refusé, selon qu'il a provoqué un changement favorable ou défavorable de l'énergie libre.

Les résultats ainsi obtenus se révélèrent des plus intéressants, mais pas parfaitement concluant : hSGLT1 présentait une voie de perméation sous la forme de molécules se suivant à la file indienne de façon quasi continue au travers de hSGLT1, mais qui est interrompue par une discontinuité de 4.3 Å dans la moitié supérieure (c.-à-d. vers le côté extracellulaire) de la molécule. vSGLT présente une chaîne homologue de molécules d'eau traversant la protéine mais cette fois-ci interrompue par une discontinuité de près de 14 Å.

Nous avons par la suite voulu étayer ces résultats par 2 approches complémentaires. Premièrement, nous voulions calculer de potentiel de la force moyenne (PFM) associé au passage d'une molécule d'eau au travers des discontinuités présentes dans les chaînes d'eau. Deuxièmement, il était utile de réaliser une série de mesures expérimentales afin de vérifier certaines particularités de la voie de perméation de l'eau à travers hSGLT1.

7.1.1.2.2 Calcul de la barrière énergétique associée aux discontinuités

Les mesures de PFM se révélèrent plus ardues que prévu. L'idée initiale était de se servir d'un algorithme déjà existant qui permet de calculer le PFM à l'aide de l'échantillonnage parapluie (umbrella sampling) (227) et de la méthode de l'algorithme à histogramme balancé (WHAM, weighted histogram algorithm method), et ce à la fois pour la structure cristallographique de vSGLT et le modèle par homologie de hSGLT1. Par contre, cette façon de faire particulière présentait deux contraintes incompatibles avec notre système. Premièrement, le mouvement des molécules d'eau devait obligatoirement se faire le long d'une droite. Deuxièmement, cette droite devait être en contact avec au moins un

des deux réservoirs d'eau, et préférablement les deux. Bien que réalisable, le choix d'une droite remplissant ces deux conditions et passant par les discontinuités respectives des deux systèmes était pour le moins bancal et donnait lieu à une barrière d'énergie anormalement élevée suite au choix d'un parcours rectiligne qui n'était pas idéal.

Il fut donc nécessaire de recourir à une autre façon de faire. Notre collègue, Dr Javier Cuervo, mit au point un algorithme élégant. De façon succincte, on calcule la densité moyenne en molécule d'eau ($G(x, y, z)_{moy}$) dans chaque voxel qui fait partie de la voie de perméation de l'eau et, ce, pour une longue simulation (225 ns dans notre cas). De par la thermodynamique, la densité d'eau est directement reliée au PFM selon l'équation :

$$PFM(z) = -KT \ln(G(x, y, z)_{moy}/G(x, y, z)_{res}) \quad (7-1)$$

où $G(x, y, z)_{res}$ est la densité d'eau moyenne dans les réservoirs, K et T ont les significations habituelles. On obtient ainsi un profil du PFM selon « z » (un axe perpendiculaire au plan de la membrane) en choisissant un chemin selon les voxels contigus en x et y qui minimisent la grandeur du PFM. Une longue simulation doit être réalisée afin d'obtenir des données représentatives. Bien qu'une telle simulation soit envisageable pour la structure cristallographique de vSGLT, un modèle par homologie tel que celui réalisé pour hSGLT1 n'est pas crédible sur un aussi long laps de temps.

Cette méthode permet de mettre en évidence, pour vSGLT, une barrière énergétique de 7.7 kCal/mol associée au passage de molécules d'eau au travers de la discontinuité. Ceci est en très bon accord avec les valeurs de 9 ± 1 et 5 ± 1 kCal/mol, publiées pour le SGLT1 de lapin (120, 121).

7.1.1.2.3 Mesures de volumétrie en voltage imposé

Afin d'appuyer nos résultats computationnels, il était important de démontrer expérimentalement que la conformation dans laquelle vSGLT était cristallisé et dans laquelle la voie de perméation passive à l'eau avait été identifiée était effectivement perméable expérimentalement. Il était aussi pertinent de déterminer si cette voie de perméation passive s'appliquait à d'autres conformations. À l'aide de la technique de volumétrie en voltage imposé, il fut possible de tester la perméabilité à l'eau sous différentes conditions expérimentales en faisant varier la $[Na^+]$ et le V_m .

De par la simple présence, en absence de glucose, de perméabilité associée à SGLT1, il était facile de démontrer que la perméabilité à l'eau était passive. De plus, une corrélation directe entre la probabilité que la protéine se retrouve dans la même conformation que la structure cristallographique (selon la concentration en ion sodium et selon le potentiel transmembranaire) et une augmentation de la perméabilité mesurée appuyait fortement nos hypothèses. Finalement, bien que la comparaison des perméabilités associées aux différentes conditions expérimentales suggère que les configurations en absence de Na^+ soient légèrement plus perméables que les conformations en présence de Na^+ lié, toutes ces conformations sont perméables à l'eau. Ceci suggère donc que la voie de perméation identifiée dans la conformation cristallographique est en partie retrouvée dans d'autres conformations du transporteur.

7.1.2 Critique

La critique la plus facile de cette étude est l'écart évident entre la partie théorique et la partie expérimentale : nous avons accès à la structure cristallographique de vSGLT, mais pas à celle de hSGLT1, alors que nous avons accès à des données expérimentales pour hSGLT1 mais pas pour vSGLT à cause de sa très faible expression chez les ovocytes. De plus, le fait que le niveau d'homologie étant à la limite de ce qui permet d'obtenir un modèle par homologie crédible (147, 148) commande une certaine prudence quant à

l'analyse des résultats. Heureusement, non seulement l'énergie d'activation pour la perméation de l'eau au travers de vSGLT est-elle remarquablement en accord avec des données expérimentales pertinentes (7.7 kCal/mol pour vSGLT comparativement à 9 ± 1 et 5 ± 1 kCal/mol pour SGLT1 de lapin), mais aussi la prise de données expérimentales en volumétrie par voltage imposé nous permet de confirmer nos conclusions.

Aussi, au moment de ces travaux, seule la structure 3DH4 était disponible. Celle-ci est décrite comme ouverte vers l'intérieur, occluse et avec 1 galactose et 1 Na⁺ liés (2). En comparaison, la seconde structure (2XQ2) est présentée comme étant ouverte vers l'intérieur, non occluse et sans substrats liés (48). Les 2 systèmes étudiés (structure cristallographique de vSGLT et modèle par homologie de hSGLT1) ne comprenaient ni sodium ni sucre. Il aurait donc été plus approprié, fussent-elle disponible, d'utiliser la seconde structure cristallographique.

Il est aussi intéressant de noter que nous n'avons pas été les seuls à s'attaquer au problème de la perméation de l'eau au travers des cotransporteurs suite à la publication de la première structure cristallographique de vSGLT.

Une première étude rapporte les résultats d'une simulation de dynamique moléculaire de 200 ns basée sur la structure cristallographique de vSGLT (159). L'essentiel de l'argumentation repose sur la figure suivante :

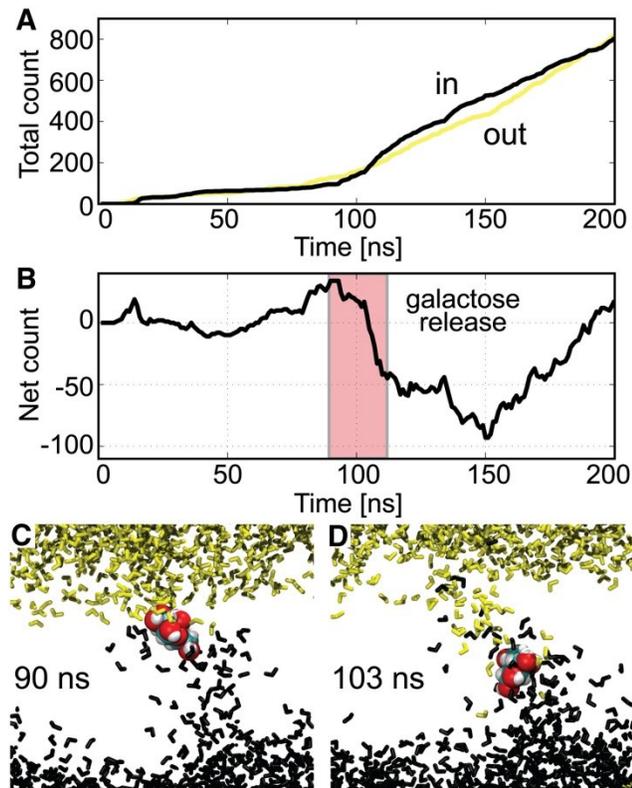


Figure 7-1 Piston brownien

A) Les mouvements cumulatifs entrant (jaune) et sortant (noir) des molécules d'eau au travers du transporteur. B) Mouvement net d'eau au travers du transporteur. Les événements entrants passent du haut vers le bas et sont négatifs. C) et D) Instantanés à 90 ns juste avant le relâchement du galactose (C) et à 103 ns juste avant la sortie de la cavité hydrophile (D). L'eau qui part au-dessus du galactose est jaune et l'eau en dessous est noire. Tiré et traduit de (159).

Plus précisément, à la Figure 7-1.B, l'ombragé rose correspond à la sortie du glucose de son site de liaison. Simultanément, de 70 à 80 molécules traversent la coordonnée arbitraire qui délimite la frontière entre les réservoirs d'eau intérieurs et extérieurs. Basés sur cette unique simulation, les auteurs suggèrent une relation de cause à effet entre le déplacement du glucose et la perméation de molécules d'eau, selon un mécanisme dit de « piston brownien ». Ce mécanisme de piston brownien est vu par les

auteurs comme la version « postcristallisation » de l'hypothèse du cotransport de l'eau, car il nécessite le transport de substrat pour avoir lieu.

Bien que ce phénomène de piston brownien ne soit pas mutuellement exclusif avec la voie de perméation passive telle que nous l'avons proposée, il est nécessaire de mettre en lumière certains points épineux. Premièrement, cette observation n'est basée que sur un événement au cours d'une simulation de 200 ns. De plus, un examen attentif de la Figure 7-1 révèle que le flux vers l'intérieur qui survient en 20 ms (entre $t=90$ et $t=110$ ms) est suivi, et entièrement compensé, par un flux vers l'extérieur qui arrive en 50 ms entre $t=150$ et $t=200$ ms. Finalement, un transport de 70-80 molécules d'eau tel que rapporté est bien en deçà de l'estimer expérimental de 250-400 (122, 127).

Une seconde étude, présentée en congrès (228) mais qui, au mieux de mes connaissances, n'a pas encore été publiée, portait sur la présence de voie de perméation dans les structures cristallographiques de vSGLT, mais aussi de LeuT et Mhp1. Cette étude est particulièrement intéressante pour nous car elle arrivait à des voies de perméation remarquablement semblable à la nôtre, allant jusqu'à identifier une discontinuité au même endroit dans le cas de vSGLT, mais utilisant une technique différente de la nôtre. Explicitement, l'hydratation des structures cristallographiques était réalisée en insérant les protéines dans un système composé d'une bicouche lipidique et de deux réservoirs d'eau, puis équilibré pendant plusieurs centaines de nanosecondes.

7.1.3 Perspectives

La perspective la plus évidente par rapport à ce sujet est évidemment de réaliser des études semblables sur les différents cotransporteurs appartenant à la famille structurelle de LeuT dont, par définition, on connaît la structure cristallographique. Il serait aussi informatif de s'intéresser à d'autres transporteurs pour lesquels une perméabilité à l'eau a été identifiée expérimentalement tel que GAT1, EAAT1, NKCC1 et NKCC2, NIS, GLUT1, GLUT2 (125), KAAT1 et CAATCH1 (218). Par contre, au mieux de mes connaissances, la

seule protéine qui présente à la fois une perméabilité à l'eau mesurable expérimentalement dans les ovocytes de xénopes et dont la structure est connue est LeuT (218).

Une étude récemment publiée (229) rapporte la formation de voie de perméation à l'eau lors de longues simulations de dynamique moléculaire chez des transporteurs appartenant à diverses familles (SSS (vSGLT), SLC1 (Glt_{ph}), MFS (GlpT), NCS1 (Mhp1), ABC (Maltose transporter)). Basé sur ceci, on propose que la perméabilité à l'eau des transporteurs soit un phénomène universel qui découle de la grande amplitude des changements de conformations nécessaires au cotransport. Par contre, on y mentionne aussi rapidement que d'autres simulations sur d'autres transporteurs n'ont pas permis d'observer un tel phénomène. Il est donc intéressant de se demander si cette perméabilité est tout simplement tolérée par la nature ou bien si elle ne joue pas un rôle physiologique utile en assurant une osmolarité stable malgré un fort transport de substrat.

Une autre piste de réflexion des plus intéressantes est d'étudier la relation entre la perméabilité passive à l'eau et les courants de fuite chez SGLT1. Les courants de fuite peuvent être définis comme les courants sensibles aux inhibiteurs générés par le mouvement d'ions au travers des transporteurs en absence de substrat. Les courants de fuites et la perméabilité à l'eau sont donc tous deux observés chez de nombreux cotransporteurs (230), ont lieu en absence de substrats et sont sensibles aux inhibiteurs. De manière spécifique, il a été démontré chez hSGLT1 que les courants de fuite étaient médiés par la diffusion d'ions le long d'une voie de perméation aqueuse sélective aux cations et sensible à la phlorizine. Ceci amena les auteurs à suggérer que les courants de fuite et la perméabilité passive à l'eau partagent la même voie de perméation dans le cotransporteur (96). Il serait donc des plus intéressant, à la lumière des travaux rapportés ici, d'étudier par dynamique moléculaire la perméation possible d'ions le long de la voie de perméation passive à l'eau rapportée.

7.2 Étude de SGLT1 par spectroscopie de fluorescence

7.2.1 Survol de la démarche et des résultats

7.2.1.1 Mise en contexte

La spectroscopie est un outil des plus intéressants pour l'étude des protéines en milieu physiologique. Par contre, son rapport signal sur bruit est souvent faible et contient peu d'information directement interprétable. Des essais préalables nous avaient convaincus des possibilités qu'offrait la DPA. Non seulement augmentait-elle considérablement le rapport signal sur bruit, mais aussi la forme du signal récolté pouvait être très informative de par sa sensibilité au potentiel membranaire.

La cristallisation de vSGLT et de différents membres de la famille structurelle de LeuT a permis de répondre à plusieurs questions quant à la structure de hSGLT1. Par contre, notamment en ouvrant la voie aux études de dynamique moléculaire, qui demandent des systèmes de départ fiables, la cristallographie remettait d'actualité d'autres points épineux.

L'utilisation de la DPA nous permet de nous attaquer à deux de ces problématiques. Tout d'abord le niveau de multimérisation de hSGLT1 : la structure cristallographique pdb 3DH4 de vSGLT est un dimère de dimère, alors que la structure pdb 2XQ2 de vSGLT est un dimère (2, 48). Ceci suggère que vSGLT pourrait être un dimère dans la membrane, alors que d'autres techniques expérimentales ont proposé des formes monomériques ou des formes multimériques regroupant 2 à 4 sous-unités (84, 93, 130, 138, 139, 231). De plus, les différents membres de la famille structurelle de LeuT sont présentés dans différents niveaux de multimérisation : les coordonnées pour Mhp1 (62), ApcT (65) et GadC (66) correspondent à des structures monomériques, les coordonnées pour LeuT (69), vSGLT (2) et AdiC (61) correspondent à des dimères, et les structures de BetP (63) et CaiT (64) à des trimères.

Ceci est d'autant plus important que des changements mineurs à la structure du cotransporteur peuvent avoir des répercussions majeures sur le comportement des dynamiques moléculaires. Par exemple, l'insertion de vSGLT dans la membrane selon un protocole standard (170) sous la forme d'un monomère produit une rotation de $\sim 23.5^\circ$ par rapport à l'insertion sous la forme d'un dimère. Aussi, il a été démontré que le TM-1 (selon la nomenclature de LeuT) de vSGLT, qui se trouve en périphérie du noyau structural conservé chez les membres de la famille structurale de LeuT, affecte le site de liaison du sodium (165). Par contre, l'essentiel des études computationnelles basées sur la structure de vSGLT sont réalisées sur des systèmes monomériques par souci de simplicité. On comprend donc facilement l'intérêt de tirer la question du niveau de la multimérisation de hSGLT1 au clair.

La seconde problématique à laquelle nous nous sommes attaqués est l'accessibilité extracellulaire de la boucle 12-13. Bien que différentes approches expérimentales aient conclu à une accessibilité extracellulaire (132, 135, 137), un doute sérieux subsiste (49). Ce doute est d'autant plus grand que la structure de vSGLT montre une boucle 12-13 intracellulaire. Par contre, cette donnée expérimentale sur la structure des membres de la famille de SGLT1 est considérablement affaiblie par le fait que l'homologie de cette section entre vSGLT et hSGLT1 est pratiquement inexistante.

7.2.1.2 Méthodologie et résultat

7.2.1.2.1 Extinction du transfert d'énergie entre fluorophores à l'aide de sondes sensibles au potentiel

Il avait déjà été démontré que les résidus C255 et C511 formaient un point disulfure dans hSGLT1 (131). Ainsi, la mutation C255A chez hSGLT1 libérait la C511 et permettait son marquage avec des sondes fluorescentes réactives aux groupements thiols (thiol-reactive fluorophores), notamment par l'Alexa Fluor 488 C5-maléimide (A488) et le tétraméthylrhodamine C5-maleimide (TMR) (93). L'examen de la structure de vSGLT

suggérait qu'il était possible que ce pont disulfure ait lieu entre les résidus des différents monomères. De plus, la structure nous permettait de croire que les C511 respectifs de chacun des monomères se trouveraient à une distance permettant des mesures de FRET entre sous-unités (le R_0 de la paire A488-TMR étant de 59 Å) et ce même si la structure quaternaire du cristal n'était pas respectée. Par contre, on rapportait une variation de 1% de la fluorescence associé au marquage de C511 par A488 par rapport à la fluorescence totale ($\Delta F/F$) suite à un variation maximale du potentiel membranaire (de +75 à -175 mV), ainsi qu'une $\Delta F/F$ atteignant les 10% lors du marquage de C511 par le TMR suite à une variation de 150 mV du potentiel membranaire (93). Il était donc possible de marquer la C511 avec ces deux fluorophores ce qui permettait de croire que des mesures de FRET seraient possibles si hSGLT1 adoptait une conformation multimérique.

La technique d'extinction du transfert d'énergie entre fluorophores par sonde sensible au potentiel (hybrid voltage sensor (hVoS) FRET quenching)) est un amalgame inédit, au mieux de mes connaissances, entre différentes techniques déjà utilisées pour l'étude de protéines membranaires : la fluorescence en voltage imposé (voltage-clamp fluorometry) (93), le FRET, et l'utilisation de sondes sensibles au potentiel (hVoS) (232).

La fluorescence en voltage imposé consiste essentiellement à mesurer les changements de fluorescence dus au marquage de protéines membranaires suite à des changements contrôlés du V_m . Le FRET quant à lui permet entre autres de déterminer si 2 positions marquées par des fluorophores sont proches l'une de l'autre. Ces 2 techniques sont relativement répandues. Le hVoS a initialement été défini comme consistant en une molécule synthétique sensible au potentiel, la DPA, et un fluorophore génétiquement encodé dans des neurones. Ce système permettait alors la détection avec un grand rapport signal sur bruit du potentiel d'action dans les neurones, celui-ci causant le mouvement de la DPA dans la membrane des neurones, faisant varier la fluorescence du fluorophore génétiquement encodé (232). Jusqu'à présent, peu d'études ont tiré parti du hVoS tel que décrit initialement (c.-à-d. avec fluorophore génétiquement encodé) (95, 232) ou de façon

plus large des propriétés du DPA dans l'étude des protéines membranaires (92, 94, 95). Aussi, bien que des applications concrètes ont donné lieu à des résultats intéressants (92, 94, 233), une partie de ces études se concentrent sur l'optimisation du rapport signal sur bruit (95, 234).

Le hVoS FRET Quenching combine donc ces différentes techniques en mesurant la variation du FRET causé par le mouvement de la DPA dans la membrane suivant le potentiel membranaire qui est contrôlé par TEVC. La force de cette approche vient de son grand rapport signal sur bruit. Ce grand rapport signal sur bruit s'explique par le fait que la variation de fluorescence mesurée lors de saut de V_m n'est due qu'aux paires donneur-accepteur situés à l'intérieur du R_0 de la paire A488-TMR et proches de la membrane (c.-à-d. à l'intérieur des R_0 pour les paires A488-DPA et TMR-DPA de 56 et 35 Å, respectivement). Ainsi, en marquant simultanément la C511 avec A488 et TMR et en effectuant des variations de potentiel membranaire de 200 mV en présence de DPA, nous avons obtenu une $\Delta F/F$ de $14 \pm 4\%$ et $22 \pm 4\%$ pour la fluorescence associée à A488 et TMR, respectivement. Ceci nous permet d'obtenir une $\Delta F/F$ de $5 \pm 1\%$ pour le signal de FRET suite à une variation de 200 mV sur des ovocytes injectés avec le mutant C255A. En comparant avec la variation de $0.7 \pm 0.2\%$ obtenue dans les mêmes conditions sur des ovocytes contrôles, ceci est significativement différent ($p < 0.05$, $n=5$). La présence d'un signal significatif de FRET suggérerait l'existence d'une proximité entre des molécules de hSGLT1 marquée au TMR et d'autres marquées à l'A488 et démontrait la présence d'oligomères. Par contre, nous n'avons aucune information concernant le niveau d'oligomérisation (dimère, trimère, etc.), et encore moins concernant les bases structurelles de cette oligomérisation.

7.2.1.2.2 Immunobuvardage de type Western

Une voie prometteuse, permettant de démontrer que la multimérisation observée en hVoS FRET quenching n'était pas un artefact de la mutation C255A, était l'immunobuvardage de type Western. Cette approche était d'autant plus intéressante pour

deux raisons. Premièrement, notre groupe avait démontré qu'une étiquette (un tag myc dans notre cas) insérée à la position N-terminale de hSGLT1 n'affectait ni la fonctionnalité ni l'acheminement de la protéine à la membrane (155). Il était alors possible de détecter cette étiquette par immunobuvardage en se servant d'anticorps anti-myc. Deuxièmement, le β -mercaptoéthanol (β -ME) est spécifiquement utilisé durant l'immunobuvardage de type Western comme agent réducteur afin de briser les ponts disulfures présents dans les protéines. Étant donné que nous soupçonnions la présence d'un pont disulfure intermonomère, possiblement entre les C511s, cette avenue offrait la possibilité de répondre à la fois à la question du niveau d'oligomérisation, mais aussi des bases structurelles de cette oligomérisation.

Une première ronde d'immunobuvardage réalisée en présence et en absence de β -ME se révéla instructive, mais pas définitive au niveau des conclusions. Ainsi, wt hSGLT1, les simples mutants C255A et C511A et le double mutant C255/511A étaient tous détectés sous la forme monomérique en présence de β -ME, mais aussi sous la forme dimérique en absence de β -ME. Ceci nous indiquait que 1) la mutation C255A n'était pas responsable d'une multimérisation particulière de hSGLT1, que 2) hSGLT1 est présent sous la forme d'un dimère, que 3) un pont disulfure est à l'origine de ce dimère, mais que 4) ni C255A et ni C511A n'étaient impliqués.

Une seconde ronde plus exhaustive fut donc nécessaire. hSGLT1 comprend 15 cystéines endogènes. De ce nombre, deux avaient déjà été testées (C255A et C511A) et la possibilité que C292 et/ou C301 soient impliquées dans le pont disulfure fut jugée improbable de par leur position au cœur de la protéine. De plus, plusieurs études faisaient état d'effets notables lors de mutation des cystéines de la boucle 7-8. Ainsi, il a été démontré que les mutations C351A et C361A empêchent l'acheminement de la protéine à la membrane mais que la double mutation C351/C361A permet de retrouver cet acheminement normal (176), que les mutants C351A, C355A et C361A étaient non-fonctionnels (131), que la mutation C355A n'est pas acheminée à la membrane plasmique

(131) et que C355S cause le syndrome de malabsorption du glucose-galactose (glucose-galactose malabsorption syndrome) via des déficiences de l'acheminement (177). Ainsi, les 11 cystéines restantes furent testées par immunobuvardage, mais aussi une attention particulière fut donnée à la boucle 7-8.

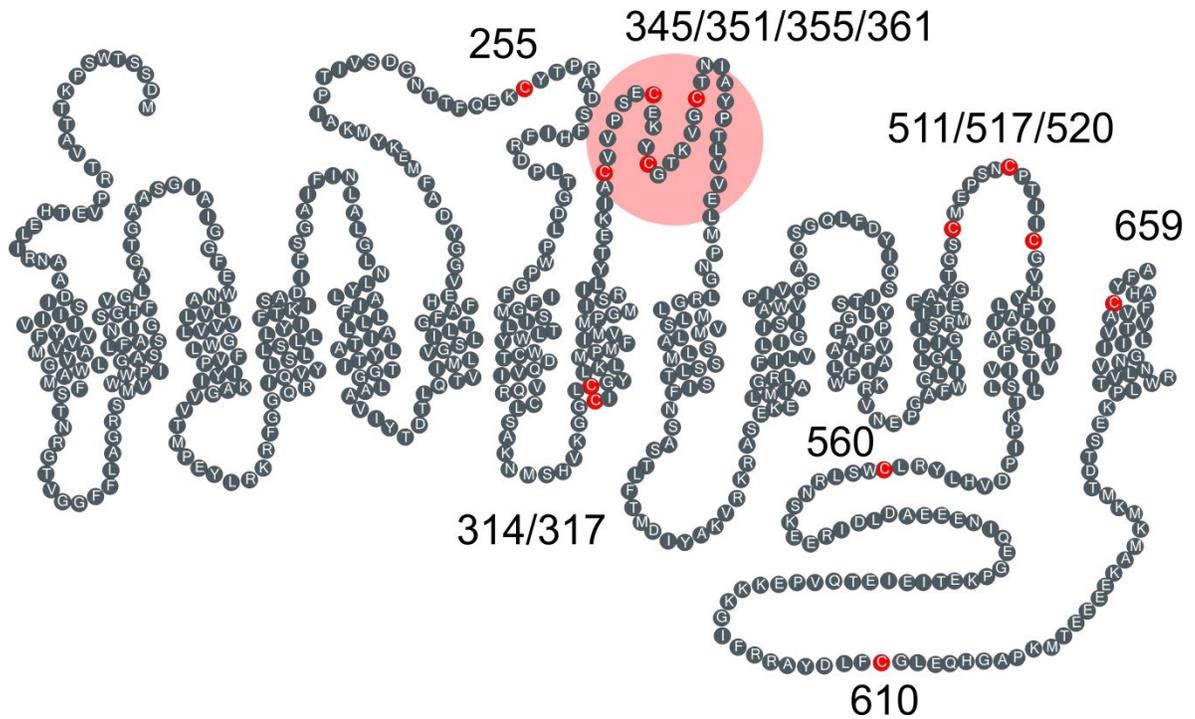


Figure 7-2 Cystéines mutées lors de l'immunobuvardage de type Western

Les cystéines mutées sont mises en évidence en rouge et identifiées par leur position. La boucle 7-8 est elle aussi mise en évidence par un ombragé rouge. Adapté d'une figure fournie par Michael Coady et basé sur (109).

Explicitement, les simples mutants C314A, C317A, C345A, C351A, C355A, C361A, C517A, C522A, C560A, C610A et C659A, et les mutants multiples C345/351/355/361A (4xCys), C345/351/361A (3xCys) et C351/361A (2xCys) furent testés. En absence de β -ME, tous ces mutants furent facilement détectés sous une forme dimérique, à l'exception du mutant simple C355A et du quadruple mutant C345/351/355/361A. Étant donné que ces deux mutants furent détectés dans leur forme

monomérique exclusivement, ceci démontre que la cystéine 355 est directement impliquée dans le pont disulfure.

Tableau 7-1 Liste des mutations de hSGLT1 pour l'immunobuvardage de type Western

Mutants simples	Mutants multiples
C314A	2xCys: C351/361A
C345A	3xCys: C345/351/361A
C351A	4xCys: C345/351/355/361A†
C355A†	
C361A	
C517A	
C522A	
C560A	
C610A	
C659A	

† détecté sous forme monomérique seulement.

7.2.1.2.3 E624C : extinction de fluorescence par sondes sensibles au potentiel, simulation explicite et structure possible

Il a été démontré que la mutation E624C permet de marquer la cystéine ainsi introduite par l'ajout de TMR à la solution extracellulaire. Cette cystéine est particulièrement intéressante parce qu'elle est située dans la boucle 12-13 dont l'orientation par rapport à la membrane est contestée.

De par les mesures réalisées suite au marquage de C511 par l'A488 et le TMR, nous étions confiants de pouvoir confirmer ces résultats de manière statistiquement significative relativement facilement. Par contre, l'intérêt de marquer E624C avec un fluorophore en présence de DPA se situait surtout dans la capacité du DPA à nous informer sur la position de E624C.

Ainsi, en marquant E624C avec du TMR et en réalisant des sauts de potentiel de 200 mV, nous avons pu observer une variation de fluorescence statistiquement significative lorsque comparée avec des ovocytes contrôles ($p < 0.0001$). Plus informatif encore, l'hyperpolarisation de la membrane réduit la fluorescence totale, alors que la dépolarisation l'augmente. Étant donné que la DPA est un accepteur chargé négativement dont la répartition aux interfaces de la membrane lipidique est dépendante du potentiel membranaire, ceci indique le E624C est situé au moins au-dessus de la moitié de la membrane.

Par contre, il était possible de pousser l'analyse plus loin. Ainsi, il est facile de calculer le R_0 théorique de la paire TMR-DPA 35 Å, des évaluations expérimentales de la répartition du DPA aux interfaces de la bicouche lipidique en fonction du potentiel (92) et de la concentration approximative de DPA à la membrane dans des conditions semblables aux nôtres ont été publiées (232), l'épaisseur hydrophobique (hydrophobic depth) dans l'entourage immédiat prédit est de 30 Å (145), et la vitesse de translocation du DPA d'une interface à l'autre se rapproche de la vitesse à laquelle le potentiel membranaire peut être changé.

Il a donc été possible de modéliser de façon explicite, bien que grossière, l'interaction entre la DPA et le TMR. En posant que le fluorophore se trouve à une position initiale donnée (x_0) au potentiel de repos et que l'hyperpolarisation/dépolarisation induit un mouvement d'amplitude égale, mais de direction opposé ($x_0 \pm \Delta x$) sur celui-ci, il est possible de tenter de recréer le tracé du $\Delta F/F$ observé expérimentalement.

Plusieurs combinaisons de x_0 et Δx ont été testé par essais et erreurs. Il en ressort que le fluorophore attaché à E624C doit se situer à $>25 \text{ \AA}$ au-dessus de la membrane.

Nous voulions tester la plausibilité structurelle d'une telle affirmation. Par contre, il n'existe pratiquement pas d'homologie de séquence entre la boucle 12-13 de vSGLT et celle de hSGLT1. De plus, la boucle 12-13 de hSGLT1 est prédite beaucoup plus longue que la boucle 12-13 retrouvée dans la structure cristallographique de vSGLT (2, 48). Finalement, le but n'était de présenter une structure pouvant être utilisée dans des études de dynamique moléculaire, mais tout simplement d'illustrer le plus rigoureusement possible une conformation possible de la boucle 12-13.

Ainsi, nous avons soumis la séquence de la boucle 12-13 de hSGLT1 au serveur en ligne I-TASSER (174), permet la prédiction de structures à partir d'une séquence donnée. Il produit évidemment un ensemble de structures possibles pour la séquence soumise, mais aussi une évaluation de la structure secondaire possible et du niveau d'accessibilité au solvant pour chacun des résidus. Ainsi, la structure prédite pour la boucle 12-13 ne sert que de point de départ, en respectant les structures secondaires et l'accessibilité au solvant, mais pas la structure tertiaire, qui permet de créer manuellement une topologie plausible pour la boucle 12-13. Ce « cartoon » nous démontre qu'une position significativement au-dessus de la membrane pour E624C est tout à fait plausible.

7.2.2 Critique

7.2.2.1 Structure quaternaire

Un des buts avoués de cette étude était de remettre en question l'hypothèse qui présume que la structure quaternaire de la structure cristallographique de vSGLT s'appliquait à hSGLT1 en milieu physiologique. Nous avons pu démontrer dans un premier temps qu'en condition physiologique ceux-ci étaient présents sous la forme de multimères, de par la présence de FRET entre monomères. L'immunobuvardage en absence de β -ME

nous démontra la présence de dimères en raison d'un pont disulfure entre les C355 des 2 protomères.

C355 est présent dans la boucle 7-8. Cette boucle est composée d'environ 40 acides aminés chez vSGLT et hSGLT1 (109). Elle contient 4 cystéines chez hSGLT1 (C345, C351, C355 et C361), mais aucune chez vSGLT. Selon les structures cristallographiques 3DH4 et 2XQ2 de vSGLT, les boucles 7-8 se situeraient à ~ 70 Å l'une de l'autre. Ainsi, ces structures prises telles quelles sont incompatibles avec la présence d'un pont disulfure entre les cystéines C355.

Deux options permettent de réconcilier observations expérimentales et structures cristallographiques : soit que la structure tertiaire de la boucle 7-8 de vSGLT n'est pas respectée dans hSGLT1, soit que c'est la structure quaternaire qui n'est pas respectée. La structure des boucles sont rarement conservée et très difficile à modéliser. Par contre, selon la structure cristallographique de vSGLT, de courtes hélices alpha sont présentes dans la boucle 7-8 et une grande distance sépare les C355 de sous-unités voisines. Ceci suggère que c'est la structure quaternaire observée dans le cristal de vSGLT qui n'est pas conservée chez hSGLT1.

Aussi, les données présentées ici ne peuvent exclure la présence de niveau d'oligomérisation plus élevé, comme de dimères de dimères par exemple. On pourrait ainsi imaginer des dimères formés par le pont disulfure identifié ici, qui eux-mêmes forment des dimères de dimères suivant l'interface observée dans la structure cristallographique.

7.2.2.2 Position de la boucle 12-13

Les données présentées ici démontrent sans équivoque que la mutation E624C peut être marquée en exposant les ovocytes à une solution extracellulaire contenant du TMR, et que le fluorophore se situe alors au-dessus du milieu de la membrane. Une simulation grossière a permis de proposer que ce fluorophore est significativement au-dessus de la

membrane, et une sommaire modélisation structurelle appuie la plausibilité d'une telle affirmation.

La principale lacune de cette approche est qu'elle ne repose que sur une position (position 624) dans la boucle 12-13. Ainsi, il a été démontré les mutations E586C et I588C étaient accessibles par une solution de marquage extracellulaire contenant du TMR (132). Situés à ~40 acides aminés de E624C, l'étude de ces positions aurait à la fois pu confirmer leur accessibilité extracellulaire, mais la forme de la $\Delta F/F$ en fonction du V_m en présence de DPA aurait pu être des plus informatives. Ainsi, plus de contraintes structurelles auraient pu être intégrées pas la topologie suggérée de la boucle 12-13.

7.2.3 Perspectives

7.2.3.1 Caractérisation de hSGLT1 C355A

La suite logique est évidemment de tenter de caractériser hSGLT1 C355A à la fois à l'aide de la technique du hVoS FRET quenching et de l'électrophysiologie. Par contre, il a été rapporté que cette mutation empêche l'acheminement à la membrane lors de l'injection d'ARN dans le cytoplasme de l'ovocyte (131, 177). Une technique permettant possiblement de pallier à ce problème est l'injection de protéoliposomes dans les ovocytes de xénopes. Les protéoliposomes sont formés de protéines membranaires purifiées, extraites de façon non dénaturante, puis reconstituées dans des liposomes (235). Ainsi, injecter à même le cytosol des protéoliposomes auxquels ont été incorporés hSGLT1 C355A pourrait possiblement permettre la présence de cette mutation à la membrane. Par contre, au mieux de nos connaissances, bien que des études utilisant des techniques semblables ont porté fruit (236-238), aucune étude utilisant spécifiquement des protéoliposomes injectés dans des oocytes n'a été publiée depuis.

Il serait alors possible de tenter d'observer la présence de dimère selon la technique du hVoS FRET quenching. Ainsi, l'absence de FRET entre monomères suite à la mutation C355A confirmerait hors de tout doute l'implication de C355 dans le pont disulfure inter-

monomère. Par contre, la présence de FRET malgré l'absence de C355 n'irait pas nécessairement à l'encontre du rôle proposé pour C355, mais refléterait que les forces électrostatiques à l'interface du dimère sont suffisantes pour obtenir des dimères en milieu physiologique et ce, même en absence d'un pont disulfure.

De la même façon, une caractérisation électrophysiologique de hSGLT1 C355A serait informative. On ne sait pas encore si le fait que SGLT1 fonctionne en dimère a des effets fonctionnels mesurables. Une étude précédente a déjà caractérisé l'effet du DTT sur les courants associés à wt hSGLT1, et a démontré que les mutations C255A, C511A et C255/511A avaient toutes un effet semblable, c.-à-d. une augmentation de l'affinité au α MG (131). Une partie des effets du DTT pourrait être due au bris du pont disulfure qui unit les deux monomères. Ainsi, une comparaison de wt hSGLT1, wt hSGLT1 + DTT, C255A, C511A, C255/511A avec C355A, mais aussi C355/255A, C355/511A et C355/255/511A serait intéressante et permettrait de mesurer les effets possiblement cumulatif du retrait de 2 ponts disulfures. Bien entendu, il faudrait encore une fois tenir en compte les forces électrostatiques à l'interface des dimères lors de l'interprétation des résultats.

7.2.3.2 Topologie de la boucle 12-13

Une caractérisation plus exhaustive de la topologie de la boucle 12-13 pourrait être accomplie en se basant sur les présents travaux. Nous avons estimé que la position 624 était située à environ 30 Å au-dessus de la membrane. Ceci suggère que le N-terminal du TM13 soit extracellulaire, bien que la possibilité d'une boucle 12-13 réentrante et d'un N-terminal du TM13 intracellulaire soit structurellement possible. Il est à noter qu'à la fois une localisation extra- (185, 186) et intracellulaire (132) du N-terminal du TM13 ont été suggérées. Face à ce problème, il serait intéressant de marquer d'autres segments de la boucle 12-13 afin de confirmer qu'elle est en effet réentrante. Ainsi, l'étude de E586C et I588C à l'aide de la technique de hVoS serait relativement triviale si les cystéines introduites sont accessibles comme il l'a été rapporté (132). Aussi, il serait logique de tenter

de marquer le segment C-terminal par un fluorophore afin de déterminer sa localisation intra- ou extracellulaire. Par contre, il serait intéressant de tenter de pousser la chose plus loin.

Une des lacunes du hVoS dans sa forme actuelle est que seules les positions qui sont accessibles du côté extracellulaire sont utilisées. Il est donc théoriquement possible qu'une position donnée (par exemple la position 624) soit accessible de l'extérieur chez une faible proportion des transporteurs seulement, mais que cette faible proportion soit responsable de l'ensemble du signal mesuré. Il serait utile pouvoir tester des position intracellulaires. Ainsi, on peut imaginer qu'il serait possible de marquer une cystéine accessible au milieu intracellulaire en injectant des fluorophores à même le cytosol. Comme la paire TMR-DPA possède un R_0 théorique de 35 Å et comme l'efficacité du FRET varie selon $E = 1/[1 + (r/R_0)^6]$, seuls les fluorophores à proximité de la membrane contribueraient significativement à la $\Delta F/F$ associée à des changements de potentiel membranaire. Donc, moyennant une concentration intracellulaire de fluorophore appropriée et un marquage efficace de la cystéine a étudiée, il est raisonnable de penser que le rapport signal sur bruit ainsi obtenu pourrait mener à des mesures statistiquement significatives. Il serait alors possible de marquer et démontrer la position de résidus intracellulaires. Une tentative de marquer C624 à partir du côté intracellulaire permettrait de contraster l'effet mesurer à partir d'un marquage extracellulaire et de confirmer dans quelle proportion la position 624 est extracellulaire. Par contre, plusieurs questions seraient à résoudre avant d'envisager un tel procédé. Notamment quel est le marquage intracellulaire associé à un ovocyte non injecté, si SGLT1 présente des cystéines endogènes marquable du côté extracellulaire, ou encore tout simplement si les conditions redox à l'intérieur des ovocytes permettent le marquage de cystéines intracellulaires par des sondes fluorescentes réactives aux groupements.

Évidemment, la technique du décompte des sous-unités par fluorescence de réflexion totale interne (TIRF subunit counting) (239) permettrait de corroborer la présence de dimères, mais aussi de tester la présence possible de multimères de dimères.

Aussi, la technique de hVoS Fret quenching développée ici est directement applicable à d'autres protéines. Elle pourrait ainsi permettre des prises de mesures plus faciles, ou encore carrément permettre d'obtenir un rapport signal sur bruit permettant des mesures statistiquement significatives. De la même façon, le hVoS augmente le rapport signal sur bruit, mais surtout contient de l'information concernant la localisation du fluorophore étudié.

7.3 Caractérisation fonctionnelle de hSMIT2

7.3.1 Survol de la démarche et des résultats

7.3.1.1 Mise en contexte

7.3.1.1.1 SMIT2

Le cotransporteur Na/myo-Inositol SMIT2 a été identifié par notre groupe en 2002 (240) suite à son expression dans les ovocytes de xénopes. Il a été déterminé lors de ces travaux initiaux que SMIT2 cotransporte de façon électrogénique le MI et le Na avec des K_m de 120 μ M et 13 mM respectivement, et est inhibé par la Pz suivant un K_i de 76 μ M (240). Des travaux subséquents ont permis une détermination plus précise de la stœchiométrie qui s'établit à 2 Na : 1 MI (157). De plus, il a été déterminé que SMIT2 est le principal transporteur de MI à la membrane apicale de l'intestin (241) et est impliqué dans le transport apical du MI dans les tubules proximaux du rein (55). Finalement, un poids apparent lors d'immunobuvardage de type Western de 75 kDa lui a été assigné (55).

Conjuguer à son appartenance à la fois à la famille génomique des SLC5 et la famille structurale de LeuT, ces éléments faisaient de SMIT2 un candidat intéressant pour l'étude de ses propriétés électrogéniques à l'aide de la modélisation cinétique.

7.3.1.1.2 Modélisation cinétique des cotransporteurs électrogéniques

La modélisation cinétique des cotransporteurs électrogéniques que l'on exprime dans les ovocytes permet l'étude de leur cycle de cotransport à l'échelle de la milliseconde en reproduisant ce cycle à l'aide d'équations mathématique basées sur la théorie d'Eyring (242).

Au mieux de nos connaissances, le modèle cinétique présenté ici est le premier pour SMIT2. Par contre, de multiples modèles existent pour SGLT1 (82-84, 213, 214, 220, 243), mais aussi pour d'autres cotransporteurs électrogéniques : NIS (201), SERT (216, 243, 244), GAT1 (243, 245), GAT4 (200), DAT (204), EAAC1 (246), EAAT1(207) et NaPi-5 (208, 247). Le niveau de précision de ces modèles varie d'une description qualitative des phénomènes observés à des descriptions quantitatives des signaux électrogéniques. Dans les cas quantitatifs, tous ces modèles cinétiques ont été déterminés d'une façon similaire. On mesure d'abord les courants provenant du cotransporteur à l'étude. Premièrement, on détermine l'aire sous la courbe des courants préstationnaires pour obtenir la courbe $Q(V_m)$. Deuxièmement, on lisse (fit) les courants préstationnaires avec de 1 à 3 composantes exponentielles desquelles on tire des constantes de temps τ . Les constantes de temps τ variant en fonction du V_m , on obtient alors de 1 à 3 courbes $\tau(V_m)$. Finalement, si applicable, on mesure le courant de cotransport en fonction du potentiel membranaire selon différentes conditions expérimentales, pour obtenir des courbes $I(V_m)$. Par la suite, on essaie de reproduire ces 3 groupes de courbes dérivés des courants expérimentaux ($Q(V_m)$, $\tau(V_m)$ et $I(V_m)$) à l'aide d'un modèle cinétique dont on varie la connectivité et les paramètres cinétiques par essais et erreurs.

Ce *modus operandi*, dans ses applications précédentes et lorsqu'appliqué à hSMIT2, présentait plusieurs lacunes. Premièrement, en lissant (fit) une caractérisation des données à reproduire et non les données elles-mêmes, on introduit un degré d'imprécision qui peut avoir des conséquences importantes. Par exemple, lors du lissage d'un courant transitoire par une série de termes exponentiels, les paramètres obtenus dépendent de façon significative de certains choix arbitraires de l'utilisateur quant à la plage de temps à lisser. De plus, ces mêmes paramètres deviennent de moins en moins contraints (tight) à mesure que le nombre d'exponentielles augmente. Ainsi, on peut difficilement obtenir plus que 4 termes exponentiels. Étant donnée qu'un modèle cinétique simple comporte 6 états, et qu'un terme exponentiel est théoriquement associé à chacun, il découle que cette façon de faire est une approximation de la réalité. Ainsi, une reproduction exacte des courbes $I(V_m)$, $Q(V_m)$ et $\tau(V_m)$ ne garantit pas toujours une reproduction adéquate des courants expérimentaux.

Aussi, la détermination de la connectivité et des paramètres associés par essai et erreur demande un temps considérable et ne permet pas de déterminer de façon objective le modèle optimal pour les données à reproduire. Comme il s'agit d'une tâche assez complexe, on aura tendance à poser dès le départ des hypothèses simplificatrices qui limiteront grandement la généralité de la solution trouvée. Dans ce contexte, j'ai donc voulu tirer profit de l'augmentation exponentielle de la puissance informatique disponible depuis la publication du premier modèle cinétique pour SGLT1 en 1992 (98) pour tenter de pallier à ces lacunes.

7.3.1.2 Méthodologie et résultat

7.3.1.2.1 Données expérimentales

Un premier jeu de données expérimentales fut d'abord réalisé. En présence de différentes concentrations de Na et MI, des ovocytes exprimant hSMIT2 furent soumis à des sauts de potentiel couvrant un domaine s'étendant de -155 à + 55 mV. À chaque condition

expérimentale, une condition identique, mais en présence de Pz devait servir à obtenir les courants dus à hSMIT2 en les soustrayant des courants totaux obtenus en absence de Pz ($I_{SMIT2} = I_{totaux} - I_{totaux+Pz}$).

Par contre, ce jeu de données produisit deux conclusions inattendues. Tout d'abord, la Pz se révéla un inhibiteur médiocre suite à un saut de potentiel dépolarisant. Ceci est évident à la Figure 6-1. On y voit clairement que suite à un saut de potentiel hyperpolarisant, tel qu'attendu les courants en présence de 90 mM Na sont fortement affectés par la Pz. En fait, les courants mesurés en présence de Pz sont équivalents aux courants mesurés lorsque les changements de conformation du cotransporteur sont limités par l'absence de Na extracellulaire. Par opposition, suite à un saut de potentiel dépolarisant il n'y a pas de différence significative entre les courants en présence de 90 mM Na et les courants en présence de 90 mM Na + Pz ce qui indique que la Pz n'arrive plus à bloquer le cotransporteur. Heureusement, les courants en absence de Na se révèlent une approximation valide des courants en absence de SMIT2. Premièrement, tel que présenté à la Figure 6-1.A, dans des conditions permettant l'inhibition par la Pz (c.-à-d. suite à un saut de potentiel hyperpolarisant) les courants en présence de Pz et en absence de Na se superposent. Deuxièmement, tel que présenté à la Figure 6-1.B, la courbe $Q_{off}(V_m)$ en absence de Na est linéaire par rapport à l'amplitude du saut de potentiel, ce qui est attendu d'un courant membranaire strictement capacitif. À la lumière de ceci, un second jeu de données expérimentales, cette fois en intercalant une mesure en absence de Na entre chaque condition expérimentale, fut donc réalisé. C'est ce jeu qui servit à l'élaboration d'un modèle cinétique pour SMIT2.

La seconde observation inattendue est la présence d'une différence importante en les Q_{on} et Q_{off} apparents (voir Figure 6-2). Les charges transférées Q sont définies comme les quantités de charge qui traversent la membrane (plus précisément le champ électrique membranaire) suite à la transition de la population des transporteurs d'une distribution d'équilibre à une autre suite à un changement du potentiel transmembranaire. Une

différence entre les Q_{on} et les Q_{off} nous indique donc qu'au moins une partie du courant transitoire n'est pas due à un déplacement de charges associées à SMIT2. L'explication la plus simple pour cette observation est la présence d'un courant de fuite qui varie dans le temps.

Une étude attentive des courants lors de sauts de potentiel hyperpolarisants sous différentes conditions expérimentales nous confirme cette explication. Premièrement, une constante de temps de 98 ± 1 ms est mesurée en présence de 90 mM Na. Ceci correspond à une fréquence du cycle de cotransport de ~ 10 Hz, ce qui est très lent pour être associé à un cycle de cotransport. Il est clair cependant que cette constante lente est directement reliée à SMIT2, puisque les courants en présence de Pz ou en absence de Na ne présentent pas cette longue composante (voir Figure 6-3.B). Aussi, cette constante lente disparaît progressivement lorsque les sauts de potentiels sont moins hyperpolarisants (voir Figure 6-2.A). Finalement, en présence de MI une composante lente est aussi observée, mais dans le sens contraire : suite à une hyperpolarisation l'amplitude du courant de SMIT2 se met à augmenter avec le temps alors que l'inverse était vu en absence de MI (voir Figure 6-3.B).

Ceci nous amène à postuler l'existence du courant de fuite passif et dépendant du temps, du potentiel et des concentrations de substrats. Comme dans le cas du courant de fuite de SGLT1 (171), nous suggérons que le courant de fuite de SMIT2 est un courant de type « canal » dont la conductance peut changer pour chaque état adopté par le cotransporteur. Il est ainsi possible d'expliquer comment le courant de fuite peut varier en fonction du potentiel membranaire et de la concentration de substrats sans que ce courant de fuite ne fasse partie du courant de cotransport.

7.3.1.2.2 *Modélisation cinétique*

Plusieurs approches ont été explorées afin d'obtenir un modèle cinétique des courants de SMIT2.

J'ai tout d'abord utilisé l'approche que l'on pourrait qualifier de « standard », c.-à-d. reproduire une caractérisation selon $I(V_m)$, $Q(V_m)$ et $\tau(V_m)$ des courants en testant diverses

connectivités et jeux de paramètres cinétiques par essais et erreurs. Cette approche impliquait beaucoup d'hypothèses à la fois au niveau du choix de caractérisations à reproduire, du choix des connectivités à tester et des plages des jeux de paramètres à tester. Malgré des efforts certains, les modèles produits étaient inmanquablement des adaptations de modèles précédents (eux-mêmes explicitement basés sur des modèles précédents), reproduisant de façon correcte la caractérisation des données expérimentales et de façon mitigée les données expérimentales elles-mêmes. De plus, les différents modèles produits variaient au niveau des paramètres associés, souvent par plusieurs ordres de grandeur, et au niveau du nombre d'états du modèle. N'ayant pas de façon de comparer objectivement les modèles entre eux, le choix du modèle « optimal » était basé sur son niveau de similarité avec les modèles déjà publiés et son accord avec les idées reçues quant au cycle de cotransport des SGLTs.

Le premier changement apporté à notre approche fut de tenter de lisser les courants directement, et non plus une caractérisation de ceux-ci. Évidemment, ceci permit une bien meilleure reproduction des données expérimentales, tout en permettant d'aussi bien reproduire la caractérisation de ceux-ci. Par contre, les modèles produits restaient des adaptations de modèles précédents, et le choix d'un modèle optimal restait toujours aussi subjectif.

Le second changement fut de tenter d'automatiser la détermination des paramètres cinétiques. Des approches computationnelles basées sur la méthode Monte-Carlo et l'algorithme de Metropolis furent tentées. Bien que conceptuellement correctes, toutes ces approches étaient limitées par la puissance computationnelle utilisée : les rondes d'optimisation étant réalisées sur des ordinateurs personnels. Ainsi, le temps nécessaire à l'obtention d'un seul modèle satisfaisant rendait cette approche tout simplement impraticable, ne fût qu'au niveau du développement d'un algorithme.

Deux changements simultanés de notre approche permirent de faire des progrès significatifs. Premièrement, le Dr Jean-Philippe Longpré eut l'idée d'adapter le recuit simulé, une technique avec laquelle il était déjà familier (248), à la recherche des

paramètres de modèles cinétiques des cotransporteurs électrogéniques. Aussi, je revenais d'un stage en dynamique moléculaire dans le laboratoire du Dr Sergei Noskov de l'University of Calgary, où je m'étais notamment familiarisé avec l'utilisation de grappes de calculs (cluster computing).

C'est ainsi qu'une première version de notre approche de lissage direct des courants des cotransporteurs électrogéniques par recuit simulé sur grappe de calcul permit la publication du premier modèle permettant de reproduire quantitativement les courants de SGLT1 avec une résolution temporelle de 2 ms (83). Bien que permettant une reproduction des courants de SGLTs d'une qualité remarquable, cette approche pouvait encore être améliorée.

Dans ce premier article tirant profit de la puissance de l'algorithme de recuit simulé, les courants en présence de Na, mais en absence de sucre (α -méthyl-D-glucose (α MG)) étaient d'abord lissés en se servant d'un modèle partiel, c.-à-d ne comprenant que les étapes avant la liaison du sucre. Un premier modèle partiel à 4 états fut d'abord testé, auquel il fut jugé nécessaire de rajouter une cinquième étape. Le modèle partiel optimal fut alors choisi par sa capacité à reproduire les données expérimentales, mais aussi par sa capacité à converger vers une solution unique. Le modèle complet fut ensuite déterminé en ajoutant les étapes appropriées au modèle cinétique, puis en demandant à l'algorithme de reproduire les données expérimentales en présence d' α MG en ne faisant varier que les paramètres associés à ces nouvelles étapes.

Fort de la démonstration que l'algorithme de recuit simulé fonctionnait, des changements techniques et conceptuels furent de nouveau apportés. D'un point de vue technique, la variation des k_{ij0} et k_{ji0} lors de l'optimisation passa d'une échelle linéaire à une échelle logarithmique. Ceci reflète le fait que la variation d'un paramètre de 1 à 2 est beaucoup plus significative que la variation d'un paramètre de 10001 à 10002, par exemple. Aussi, la microreversibilité (c.-à-d. $\prod k_{ij0} / \prod k_{ji0} = 1$) et la stœchiométrie (c.-à-d. $\sum z_i = -2$) étaient auparavant respectées en ajustant le k_{ji0} et les z_i , respectivement, de la dernière étape du cycle de cotransport. Ceci avait pour effet de « sacrifier » cette étape. Une routine

fut donc implémentée, permettant de répartir de façon proportionnelle les effets de choisir un nouveau paramètre (k_{ij0} , k_{ji0} et z_i) sur les autres paramètres du même type. Finalement, la fonction cible (cost function) fut modifiée afin de prendre en compte explicitement les Q_{off} .

Prises ensemble, ces modifications techniques permirent d'augmenter significativement les performances de l'algorithme. Par contre, c'est d'un point de vue conceptuel que les changements sont les plus importants. Le but de ces modifications conceptuelles est de rendre systématique le processus de détermination d'un modèle optimal. Tout d'abord, l'ensemble des données expérimentales est considéré en un seul bloc. Ainsi, nous ne travaillerons plus en 2 étapes comme avant, c.-à-d. d'abord les données en absence de substrat, puis les données en présence de substrat. De plus, nous commençons par soumettre des connectivités surdéfinies, c.-à-d. comportant plus d'états que nécessaire, à l'algorithme de recuit simulé. Ces différentes connectivités surdéfinies sont optimisées de façon simultanée. La ou les connectivités les plus intéressantes sont identifiées selon leur rapidité à converger (par rapport aux autres connectivités ayant un même nombre d'états) vers des reproductions adéquates des données expérimentales. Ces connectivités, comportant n états, servent de base à la génération suivante de connectivités, comportant alors $n-1$ états (voir Figure 6-4). On réduit ainsi le nombre d'états jusqu'à obtenir des connectivités à $n-x$ états, qui ne sont plus capables de reproduire adéquatement les données expérimentales. Les connectivités de l'avant-dernière génération ($n-x+1$ états) sont alors examinées. La connectivité optimale est alors choisie en fonction de sa robustesse, c'est-à-dire sa propension à trouver des ensembles de paramètres similaires suite à plusieurs expériences de recuit simulé. Ainsi, on évite de choisir une connectivité qui ne fonctionnerait que dans un cas extrême. Le jeu de paramètres optimal associé à la connectivité optimale est quant à lui généré en regroupant les différents jeux de paramètres en grappes (clusters), basés sur leur similarité (voir Figure 6-5.B). Dans notre cas, la grappe choisie regroupait 12 des 32 essais et avait la plus faible erreur sur le lissage. Un jeu de paramètre optimal est alors généré en faisant la moyenne sur tous les jeux de paramètres faisant partie de la grappe.

Nous avons ainsi pu proposer un modèle à 5 états pour les courants de SMIT2 (voir Figure 6-5.A et **Table 1**). Plusieurs conclusions peuvent être tirées d'un examen attentif de la connectivité et du jeu de paramètres identifiés.

Tout d'abord, parce qu'il réussit à reproduire avec précision un large jeu de conditions expérimentales avec un modèle à peu d'états, nous savons que notre protocole fonctionne. De plus, une comparaison objective avec d'autres connectivités nous démontre que la liaison simultanée des ions Na est une simplification adéquate à notre résolution temporelle, et qu'au moins 3 transitions cinétiques sont nécessaires entre la liaison du MI et le retour à un cotransporteur vide ouvert vers le côté extracellulaire lors du transport des substrats vers l'intérieur de la cellule. Les paramètres cinétiques correspondent à une translocation du transporteur vide qui est l'étape limitante lors du cotransport, pour une fréquence du cycle de cotransport de $\sim 21 \text{ s}^{-1}$. Aussi, une forte asymétrie de la dépendance au potentiel (c.-à-d. des α_i ayant des valeurs près de 1) reflète l'absence de cotransport inverse en condition physiologique. En effet, dans le but de mesurer avec précision le potentiel d'inversion de SMIT2, nous avons tenté sans succès d'augmenter l'amplitude de ses courants sortants. Ainsi, alors que SGLT1 génère de grands courants sortants aux potentiels positifs suite à une augmentation des concentrations intracellulaires de Na^+ et de aMG, ces manœuvres se sont avérées complètement inefficaces dans le cas de SMIT2 (résultats non publiés).

7.3.2 Critique

7.3.2.1 Prise en main de l'algorithme

Tel que dit précédemment, un des objectifs de ce travail était de rendre systématique et jusqu'à un certain point trivial l'élaboration d'un modèle cinétique. Bien que l'approche conceptuelle générale telle que décrite dans la section précédente est très systématique, les difficultés techniques inhérentes font que le processus demeure rébarbatif. Ainsi, le code dans son ensemble comporte 16 fonctions et totalise environ 1500 lignes de code.

L'algorithme de recuit simulé est donc relativement complexe. Aussi, la nécessité d'effectuer les calculs sur grappe et que ces calculs requièrent quelques jours avant de produire des résultats instructifs rajoute à la lourdeur du processus.

Ceci a été illustré lors du passage dans notre laboratoire d'une stagiaire d'été travaillante et douée. Ainsi, une bonne partie de son stage d'été s'est résumé à comprendre l'algorithme, modifier le code afin de pouvoir lui soumettre des données expérimentales associées à SGLT2, soumettre le tout aux grappes de calcul, puis résoudre les fautes (bugs) qui ont été générées. Ainsi, il aura fallu investir quatre mois avant d'obtenir les premiers résultats intéressants. Ceci illustre que l'adaptation de cette méthode à un nouveau cotransporteur requiert encore une attention minutieuse et un œil averti. Ce n'est cependant pas un cas unique dans notre domaine de recherche : les méthodes et techniques que nous mettons au point nécessitent régulièrement des mois d'apprentissage avant de donner des résultats utiles et crédibles. C'est notamment le cas pour des techniques comme le FRET, « l'ion-trap technique » ou encore diverses approches de dynamique moléculaire, et ce pour n'en nommer que quelques-unes.

Dans ce contexte, il est difficile de suggérer des améliorations pouvant faciliter significativement la prise en main de l'algorithme. Ainsi, un nouvel utilisateur voulant appliquer notre algorithme à un nouveau jeu de données expérimentales doit posséder des connaissances en programmation : il devra entre autres formater les données expérimentales dans un format compatible avec l'algorithme, mais aussi coder les équations reliées à la modélisation cinétique et ce pour chaque connectivité testée. Bien qu'il soit concevable d'automatiser ces 2 tâches, cela rendrait inmanquablement le code encore plus complexe, et donc encore plus difficile à modifier pour d'éventuelles applications qui non pas encore été considérées. Un autre point important à considérer est la nécessité d'un choix judicieux des données expérimentales à reproduire par rapport aux connectivités testées. Ainsi, il faut un équilibre entre la richesse des données expérimentales que l'on cherche à reproduire et la complexité des modèles l'on génère.

7.3.2.2 Parallèle entre le modèle cinétique et le cycle de cotransport

Le but premier d'un modèle cinétique est de permettre de comprendre le fonctionnement du transporteur. Par conséquent, il peut paraître contre-productif de tenter d'obtenir le modèle cinétique le plus simple (c.-à-d. avec le moins d'états possibles) et ainsi amalgamé le plus de processus structurels dans une seule transition cinétique. Notamment, l'utilisation de α_i ayant des valeurs près de 1, et donc représentant des barrières d'énergie apparentes très asymétriques, fait en sorte qu'une transition cinétique dans le sens du cotransport $C1 \rightarrow C2$ peut ne pas être associée à la même transition structurelle que la transition cinétique inverse $C2 \rightarrow C1$ (voir section 6.7.3.3.1 pour une discussion plus élaborée).

Notre but était de déterminer objectivement le meilleur modèle cinétique possible en fonction des données expérimentales choisies. Ainsi, utiliser des modèles cinétiques dont la connectivité serait basée sur notre vision des processus associés au cycle de cotransport aurait invariablement pour effet de biaiser le résultat. Notamment, des processus qui sont conceptuellement très importants, par exemple le relâchement intracellulaire des substrats, sont peut-être beaucoup trop rapides pour être vu en électrophysiologie. Ainsi, leur assigner une transition cinétique *a priori* résulterait invariablement à leur assigner une vitesse de transition supérieure à la résolution des données expérimentales.

De plus, plus le nombre de paramètres associé à un modèle augmente, plus celui-ci devient *sloppy* (249), c.-à-d. que la qualité du lissage est de moins en moins sensible à la valeur des paramètres individuels, mais aussi à la connectivité elle-même. En termes imagés, il a été dit que « With 4 parameters I can fit an elephant, and with 5 I can make him wiggle his trunk » (attribué à Enrico Fermi et démontré par Mayer *et al.* (250)). C'est pourquoi nous jugeons un modèle à 5 états avec des barrières énergétiques apparentes très asymétriques plus informatif qu'un modèle, par exemple, à 7 états avec des barrières énergétiques symétriques (c.-à-d. $\alpha_i \equiv 1$).

Par contre, il est intéressant de s'attarder à la comparaison de ces 2 types de modèles. Afin de faciliter cette comparaison, nous ne considérerons que les états accessibles en absence de MI. Ainsi nous comparerons 3 modèles cinétiques : le modèle à 5 états avec $\alpha_i \approx 1$ qui fut choisi dans le cas de hSMIT2, un second modèle à 7 états avec $\alpha_i \equiv 0.5$ mais où seulement 3 états sont accessible en absence de sodium et de MI, et finalement le modèle à 7 états avec $\alpha_i \equiv 0.5$ qui est analogue au modèle choisi pour la description de hSGLT1 (83) et où 4 états sont accessibles en absence de sodium et de MI.

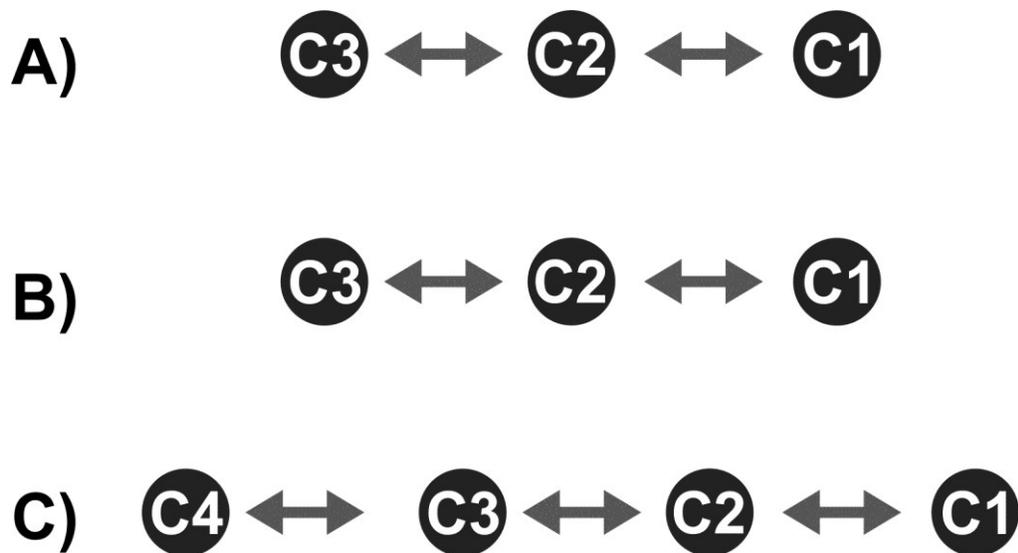


Figure 7-3 Comparaison entre différents modèles cinétiques

États accessibles en absence de substrats. A) Connectivité du modèle cinétique à 5 états avec α_i variable choisi pour description de hSMIT2, B) connectivité pour un modèle à 7 états avec $\alpha_i \equiv 0.5$, et C) connectivité pour le modèle à 7 états avec $\alpha_i \equiv 0.5$ analogue au modèle choisi pour la description de SGLT1 (83).

Tableau 7-2 Paramètres associés aux différents modèles cinétiques

		k_{ij0}	k_{ji0}	α_i	z_i
A	C1↔C2	$4.58 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$	$13.83 \pm 0.05 \text{ s}^{-1}$	0.998 ± 0.001	-0.304 ± 0.003
	C2↔C3	$220 \pm 3 \text{ s}^{-1}$	$231 \pm 4 \text{ s}^{-1}$	0.51 ± 0.08	$+0.006 \pm 0.006$
B	C1↔C2	$18.6 \pm 0.8 \text{ s}^{-1}$	$740 \pm 20 \text{ s}^{-1}$	0.5	-0.448 ± 0.008
	C2↔C3	$290 \pm 10 \text{ s}^{-1}$	$11.7 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$	0.5	$+0.202 \pm 0.003$
C	C1↔C2	$27 \pm 4 \text{ s}^{-1}$	$990 \pm 10 \text{ s}^{-1}$	0.5	-0.516 ± 0.006
	C2↔C3	$2200 \pm 400 \text{ s}^{-1}$	$12.6 \pm 0.4 \text{ s}^{-1}$	0.5	$+0.308 \pm 0.007$
	C3↔C4	$181.3 \pm 0.3 \text{ s}^{-1}$	$4280 \pm 10 \text{ s}^{-1}$	0.5	-0.3777 ± 0.0003

Une première constatation est que la charge totale associée à ces transitions est semblable ($\sum z_i \approx -0.3 e$). De plus, la dépendance effective au potentiel de la transition

limitante (C1→C2 dans tous les cas) demeure semblable ($-0.52 e \cdot 0.5$, $-0.3 e \cdot 0.99$, $-0.45 e \cdot 0.5$) tandis que le k_{ij0} associé conserve le même ordre de grandeur (27 s^{-1} , 4.5 s^{-1} , 18 s^{-1}).

Par contre, les modèles avec $\alpha_i \equiv 0.5$ doivent alors introduire des charges positives. Dans le cas du modèle B la dépendance effective au potentiel est relativement faible ($+0.2 e \cdot 0.5$), ceci qui permet un parallèle direct avec l'étape indépendante du potentiel C2↔C3 présente chez le modèle A.

Dans le cas du modèle C, la situation est plus complexe. Par contre, le calcul explicite des constantes de temps effectives (K_{ij0}) nous indique que les transitions C2→C3 et C3←C4 ne seront jamais les étapes limitantes dans la plage de potentiel considéré (de +40 mV à -155 mV) et ce malgré la présence de charges « dans le mauvais sens ». La comparaison de ces 3 transitions avec celles conservées dans le modèle à 2 transitions démontre bien que l'algorithme est ici porté à se débarrasser des étapes non limitantes, tel que prévu.

La comparaison de ces différents modèles démontre donc que 1) la sensibilité effective au potentiel de l'étape limitante reste semblable, 2) charge totale associée à ces transitions reste semblable et 3) ce sont les étapes non limitantes qui sont éliminées par l'algorithme de recuit simulé.

7.3.3 Perspectives

Un grand champ d'intérêt où l'algorithme de recuit simulé pourrait être immédiatement utile est son application à la modélisation cinétique d'autres protéines de transport. Ainsi, l'ensemble des transporteurs électrogéniques pour lesquels des modèles ont déjà été élaborés (c.-à-d. SGLT1 (82-84, 213, 214, 220, 243), NIS (201), SERT (216, 243, 244), GAT1 (243, 245), GAT4 (200), DAT (204), EAAC1 (246), EAAT1(207) and NaPi-5 (208, 247)) pourraient être revisités en tirant profit de notre approche à la modélisation cinétique. De plus, la modélisation cinétique est basée sur la théorie des états de transitions, qui est exprimée mathématiquement par l'équation d'Eyring (242). Il est

donc facile de voir que de légères modifications permettraient l'étude de réactions enzymatiques ou encore de systèmes biologiques plus complexes. À plus long terme, il serait intéressant d'étudier la cinétique de transporteurs dont la structure cristallographique est connue. Par contre, il est difficile de suggérer un système d'expression adapté aux protéines d'origine bactérienne qui permettrait de faire des mesures cinétiques précises. Néanmoins, il serait alors possible d'introduire un aspect temporel aux différentes conformations cristallisées.

Aussi, en restant centré sur l'étude de SMIT2 et des SGLTs, il serait approprié de générer des modèles basés sur des jeux de données expérimentales plus complets pour ainsi tirer pleinement parti de la puissance de l'algorithme. Explicitement, la norme est présentement de recueillir des mesures en présence de différentes concentrations Na^+ mais en absence de sucre, pour ensuite recueillir des mesures en présence d'une concentration saturante de Na^+ et de différentes concentrations de sucre. Il serait donc intéressant de rajouter à ces mesures des mesures complémentaires en faisant varier simultanément les concentrations de Na^+ et de sucre. Il serait aussi intéressant de modifier les concentrations intracellulaires de substrats ou encore améliorer la résolution temporelle des données expérimentales à l'aide de techniques tel que le « Cut-Open Oocyte ». Dans ce sens, des données reliées à la présence d'un courant sortant saturable dépendant du Na^+ et αMG et sensible à la Pz chez SGLT1 existent déjà (données non publiées). Nous avons déjà proposé un modèle cinétique pour SGLT1 tirant profit de l'algorithme de recuit simulé (83). La modélisation des composantes transitoires et stationnaires de ce courant sortant avec un modèle basé sur ce modèle serait un test très fort de ce modèle, mais aussi de la pertinence de l'algorithme de recuit simulé. Ainsi, il est à savoir si nous n'aurions qu'à rajouter quelques des étapes du côté intracellulaire ou bien nous aurions à revoir le modèle dans son ensemble. On peut aussi se demander si certaines caractéristiques du courant sortant font partie des constantes de vitesse déjà trouvées. Dans le même ordre d'idée, tenter de reproduire les courants associés à SGLT1 et 2, mais aussi SMIT1 et 2, à l'aide d'un modèle « unifié » serait informatif. De plus, on pourrait aussi tenter d'identifier avec précision les

effets de certaines mutations sur la cinétique. Il serait par exemple intéressant de savoir si la mutation de résidus impliqués dans la liaison du substrat au faisant parti des clapets (gates) aurait des effets cinétiques précis sur certaines réactions particulières.

7.4 Références

2. Faham, S., A. Watanabe, G. M. Besserer, D. Cascio, A. Specht, B. A. Hirayama, E. M. Wright, and J. Abramson. 2008. The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na⁺/sugar symport. *Science (New York, N.Y)* 321:810-814.
36. Abramson, J., and E. M. Wright. 2009. Structure and function of Na⁺-symporters with inverted repeats. *Current opinion in structural biology* 19:425-432.
37. Boudker, O., and G. Verdon. 2010. Structural perspectives on secondary active transporters. *Trends in pharmacological sciences*.
38. Forrest, L. R., R. Krämer, and C. Ziegler. 2010. The structural basis of secondary active transport mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*.
48. Watanabe, A., S. Choe, V. Chaptal, J. M. Rosenberg, E. M. Wright, M. Grabe, and J. Abramson. 2010. The mechanism of sodium and substrate release from the binding pocket of vSGLT. *Nature* 468:988-991.
49. Wright, E. M., D. D. F. Loo, and B. A. Hirayama. 2011. Biology of human sodium glucose transporters. *Physiological Reviews* 91:733.
55. Lahjouji, K., R. Aouameur, P. Bissonnette, M. J. Coady, D. G. Bichet, and J. Y. Lapointe. 2007. Expression and functionality of the Na⁺/myo-inositol cotransporter SMIT2 in rabbit kidney. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1768:1154-1159.
61. Fang, Y., H. Jayaram, T. Shane, L. Kolmakova-Partensky, F. Wu, C. Williams, Y. Xiong, and C. Miller. 2009. Structure of a prokaryotic virtual proton pump at 3.2 Å resolution. *Nature* 460:1040-1043.
62. Weyand, S., T. Shimamura, S. Yajima, S. Suzuki, O. Mirza, K. Krusong, E. P. Carpenter, N. G. Rutherford, J. M. Hadden, and J. O'Reilly. 2008. Structure and molecular mechanism of a nucleobase-cation-symport-1 family transporter. *Science Signalling* 322:709.
63. Ressler, S., A. C. T. van Scheltinga, C. Vornrhein, V. Ott, and C. Ziegler. 2009. Molecular basis of transport and regulation in the Na⁺/betaine symporter BetP. *Nature* 458:47-52.
64. Tang, L., L. Bai, W. Wang, and T. Jiang. 2010. Crystal structure of the carnitine transporter and insights into the antiport mechanism. *Nature structural & molecular biology* 17:492-496.
65. Shaffer, P. L., A. Goehring, A. Shankaranarayanan, and E. Gouaux. 2009. Structure and mechanism of a Na⁺-independent amino acid transporter. *Science (New York, N.Y)* 325:1010-1014.
66. Ma, D., P. Lu, C. Yan, C. Fan, P. Yin, J. Wang, and Y. Shi. 2012. Structure and mechanism of a glutamate-GABA antiporter. *Nature* 483:632-636.

69. Yamashita, A., S. K. Singh, T. Kawate, Y. Jin, and E. Gouaux. 2005. Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. *Nature* 437:215-223.
82. Gagnon, D. G., C. Frindel, and J. Y. Lapointe. 2007. Effect of substrate on the pre-steady-state kinetics of the Na⁺/glucose cotransporter. *Biophysical journal* 92:461-472.
83. Longpré, J. P., L. J. Sasseville, and J. Y. Lapointe. 2012. Simulated annealing reveals the kinetic activity of SGLT1, a member of the LeuT structural family. *The Journal of general physiology* 140:361-374.
84. Loo, D. D. F., B. A. Hirayama, M. Sala-Rabanal, and E. M. Wright. 2008. How drugs interact with transporters: SGLT1 as a model. *Journal of Membrane Biology* 223:87-106.
92. Chanda, B., O. K. Asamoah, R. Blunck, B. Roux, and F. Bezanilla. 2005. Gating charge displacement in voltage-gated ion channels involves limited transmembrane movement. *NATURE-LONDON* 7052:852.
93. Gagnon, D. G., C. Frindel, and J. Y. Lapointe. 2007. Voltage-Clamp Fluorometry in the Local Environment of the C255-C511 Disulfide Bridge of the Na⁺/Glucose Cotransporter. *Biophysical journal* 92:2403-2411.
94. Groulx, N., M. Juteau, and R. Blunck. 2010. Rapid topology probing using fluorescence spectroscopy in planar lipid bilayer: the pore-forming mechanism of the toxin Cry1Aa of *Bacillus thuringiensis*. *The Journal of general physiology* 136:497.
95. Wang, D., Z. Zhang, B. Chanda, and M. B. Jackson. 2010. Improved Probes for Hybrid Voltage Sensor Imaging. *Biophysical journal* 99:2355-2365.
96. Longpré, J.-P., Dominique G. Gagnon, Michael J. Coady, and Jean-Yves Lapointe. 2010. The Actual Ionic Nature of the Leak Current through the Na⁺/Glucose Cotransporter SGLT1. *Biophysical journal* 98:1-9.
98. Parent, L., S. Supplisson, D. D. Loo, and E. M. Wright. 1992. Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter: II. A transport model under nonrapid equilibrium conditions. *The Journal of membrane biology* 125:63-79.
109. Raja, M., and R. K. H. Kinne. 2012. Structural Insights into Genetic Variants of Na⁺/Glucose Cotransporter SGLT1 Causing Glucose-Galactose Malabsorption: vSGLT as a Model Structure. *Cell biochemistry and biophysics*:1-8.
110. Brooks, B. R., C. L. Brooks, 3rd, A. D. Mackerell, Jr., L. Nilsson, R. J. Petrella, B. Roux, Y. Won, G. Archontis, C. Bartels, S. Boresch, A. Caflisch, L. Caves, Q. Cui, A. R. Dinner, M. Feig, S. Fischer, J. Gao, M. Hodoscek, W. Im, K. Kuczera, T. Lazaridis, J. Ma, V. Ovchinnikov, E. Paci, R. W. Pastor, C. B. Post, J. Z. Pu, M. Schaefer, B. Tidor, R. M. Venable, H. L. Woodcock, X. Wu, W. Yang, D. M. York, and M. Karplus. 2009. CHARMM: the biomolecular simulation program. *J Comput Chem* 30:1545-1614.

114. Jo, S., J. B. Lim, J. B. Klauda, and W. Im. 2009. CHARMM-GUI membrane builder for mixed bilayers and its application to yeast membranes. *Biophysical journal* 97:50-58.
117. Charron, F. M., M. G. Blanchard, and J. Y. Lapointe. 2006. Intracellular hypertonicity is responsible for water flux associated with Na⁺/glucose cotransport. *Biophys J* 90:3546-3554.
118. Duquette, P. P., P. Bissonnette, and J. Y. Lapointe. 2001. Local osmotic gradients drive the water flux associated with Na⁽⁺⁾/glucose cotransport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3796-3801.
119. Gagnon, M. P., P. Bissonnette, L. M. Deslandes, B. Wallendorff, and J. Y. Lapointe. 2004. Glucose accumulation can account for the initial water flux triggered by Na⁺/glucose cotransport. *Biophysical journal* 86:125-133.
120. Loo, D., B. Hirayama, A. Meinild, G. Chandy, T. Zeuthen, and E. Wright. 1999. Passive water and ion transport by cotransporters. *The Journal of Physiology* 518:195.
121. Loo, D., T. Zeuthen, G. Chandy, and E. Wright. 1996. Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:13367.
122. Loo, D. D., E. M. Wright, and T. Zeuthen. 2002. Water pumps. *J Physiol* 542:53-60.
125. Zeuthen, T. 2010. Water-transporting proteins. *Journal of Membrane Biology* 234:57-73.
127. Zeuthen, T., A. K. Meinild, D. D. Loo, E. M. Wright, and D. A. Klaerke. 2001. Isotonic transport by the Na⁺-glucose cotransporter SGLT1 from humans and rabbit. *J Physiol* 531:631-644.
130. Eskandari, S., E. M. Wright, M. Kreman, D. M. Starace, and G. A. Zampighi. 1998. Structural analysis of cloned plasma membrane proteins by freeze-fracture electron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:11235-11240.
131. Gagnon, D. G., P. Bissonnette, and J. Y. Lapointe. 2006. Identification of a disulfide bridge linking the fourth and the seventh extracellular loops of the Na⁺/glucose cotransporter. *The Journal of general physiology* 127:145.
132. Gagnon, D. G., A. Holt, F. Bourgeois, B. Wallendorff, M. J. Coady, and J. Y. Lapointe. 2005. Membrane topology of loop 13-14 of the Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1): A SCAM and fluorescent labelling study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1712:173-184.
135. Puntheeranurak, T., L. Wildling, H. J. Gruber, R. K. H. Kinne, and P. Hinterdorfer. 2006. Ligands on the string: single-molecule AFM studies on the interaction of antibodies and substrates with the Na⁺-glucose co-transporter SGLT1 in living cells. *Journal of cell science* 119:2960.
137. Tyagi, N. K., T. Puntheeranurak, M. Raja, A. Kumar, B. Wimmer, I. Neundlinger, H. Gruber, P. Hinterdorfer, and R. K. H. Kinne. 2010. A biophysical glance at the

- outer surface of the membrane transporter SGLT1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*.
138. Chenu, C., and A. Berteloot. 1993. Allosterism and Na⁺⁺-d-glucose cotransport kinetics in rabbit jejunal vesicles: Compatibility with mixed positive and negative cooperativities in a homo-dimeric or tetrameric structure and experimental evidence for only one transport protein involved. *Journal of Membrane Biology* 132:95-113.
 139. Koepsell, H., and J. Spangenberg. 1994. Function and presumed molecular structure of Na⁺-D-glucose cotransport systems. *Journal of Membrane Biology* 138:1-11.
 145. Lomize, M. A., A. L. Lomize, I. D. Pogozheva, and H. I. Mosberg. 2006. OPM: orientations of proteins in membranes database. *Bioinformatics* 22:623-625.
 146. Canutescu, A. A., A. A. Shelenkov, and R. L. Dunbrack, Jr. 2003. A graph-theory algorithm for rapid protein side-chain prediction. *Protein Sci* 12:2001-2014.
 147. Baker, D., and A. Sali. 2001. Protein structure prediction and structural genomics. *Science's STKE* 294:93.
 148. Ginalski, K. 2006. Comparative modeling for protein structure prediction. *Current opinion in structural biology* 16:172-177.
 152. Woo, H. J., A. R. Dinner, and B. Roux. 2004. Grand canonical Monte Carlo simulations of water in protein environments. *J Chem Phys* 121:6392-6400.
 155. Bissonnette, P., J. Noel, M. J. Coady, and J. Y. Lapointe. 1999. Functional expression of tagged human Na⁺-glucose cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J Physiol* 520 Pt 2:359-371.
 157. Bourgeois, F., M. Coady, and J. Lapointe. 2005. Determination of transport stoichiometry for two cation-coupled myo-inositol cotransporters: SMIT2 and HMIT. *The Journal of Physiology* 563:333.
 159. Choe, S., J. Rosenberg, J. Abramson, E. Wright, and M. Grabe. 2010. Water Permeation through the Sodium-Dependent Galactose Cotransporter vSGLT. *Biophysical journal* 99:L56-L58.
 165. Mazier, S., M. Quick, and L. Shi. 2011. A conserved Tyr in the first transmembrane segment of Solute: Sodium Symporters is involved in Na⁺-coupled substrate co-transport. *Journal of Biological Chemistry*.
 170. Lomize, M. A., I. D. Pogozheva, H. Joo, H. I. Mosberg, and A. L. Lomize. 2012. OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic acids research* 40:D370-D376.
 171. Longpré, J. P., D. G. Gagnon, M. J. Coady, and J. Y. Lapointe. 2010. The Actual Ionic Nature of the Leak Current through the Na⁺/Glucose Cotransporter SGLT1. *Biophysical journal* 98:231.
 174. Roy, A., A. Kucukural, and Y. Zhang. 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols* 5:725-738.
 176. Xia, X., G. Wang, Y. Peng, and J. Jen. 2005. Cys351 and Cys361 of the Na⁺/glucose cotransporter are important for both function and cell-surface expression. *Archives of biochemistry and biophysics* 438:63-69.

177. Martin, M., M. Lostao, E. Turk, J. Lam, M. Kreman, and E. Wright. 1997. Compound missense mutations in the sodium/D-glucose cotransporter result in trafficking defects. *Gastroenterology* 112:1206-1212.
185. Lin, J. T., J. Kormanec, D. Homeroova, and R. K. H. Kinne. 1999. Probing transmembrane topology of the high-affinity sodium/glucose cotransporter (SGLT1) with histidine-tagged mutants. *Journal of Membrane Biology* 170:243-252.
186. Turner, J. R., W. I. Lencer, S. Carlson, and J. L. Madara. 1996. Carboxyl-terminal Vesicular Stomatitis Virus G Protein-tagged Intestinal Na-dependent Glucose Cotransporter (SGLT1). *Journal of Biological Chemistry* 271:7738-7744.
200. Karakossian, M., S. Spencer, A. Gomez, O. Padilla, A. Sacher, D. Loo, N. Nelson, and S. Eskandari. 2005. Novel properties of a mouse γ -aminobutyric acid transporter (GAT4). *Journal of Membrane Biology* 203:65-82.
201. Eskandari, S., D. D. F. Loo, G. Dai, O. Levy, E. M. Wright, and N. Carrasco. 1997. Thyroid Na⁺/I⁻ symporter. *Journal of Biological Chemistry* 272:27230.
204. Erreger, K., C. Grewer, J. A. Javitch, and A. Galli. 2008. Currents in response to rapid concentration jumps of amphetamine uncover novel aspects of human dopamine transporter function. *The Journal of Neuroscience* 28:976-989.
207. Wadiche, J. I., and M. P. Kavanaugh. 1998. Macroscopic and microscopic properties of a cloned glutamate transporter/chloride channel. *The Journal of Neuroscience* 18:7650-7661.
208. Andrini, O., C. Ghezzi, H. Murer, and I. C. Forster. 2008. The leak mode of type II Na⁺-P. *Channels* 2:346-357.
213. Chen, X. Z., M. J. Coady, and J. Y. Lapointe. 1996. Fast voltage clamp discloses a new component of presteady-state currents from the Na⁺(+)-glucose cotransporter. *Biophysical journal* 71:2544-2552.
214. Parent, L., S. Supplisson, D. D. F. Loo, and E. M. Wright. 1992. Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter: II. A transport model under nonrapid equilibrium conditions. *Journal of Membrane Biology* 125:63-79.
216. Schicker, K., Z. Uzelac, J. Gesmonde, S. Bulling, T. Stockner, M. Freissmuth, S. Boehm, G. Rudnick, H. H. Sitte, and W. Sandtner. 2012. Unifying Concept of Serotonin Transporter-associated Currents. *Journal of Biological Chemistry* 287:438-445.
218. Santacroce, M., M. Castagna, and V. F. Sacchi. 2010. Passive water permeability of some wild type and mutagenized amino acid cotransporters of the SLC6/NSS family expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology* 156:509-517.
220. Loo, D. D. F., B. A. Hirayama, M. H. Karakossian, A. K. Meinild, and E. M. Wright. 2006. Conformational dynamics of hSGLT1 during Na⁺/glucose cotransport. *The Journal of general physiology* 128:701-720.
226. Shaw, D. E., P. Maragakis, K. Lindorff-Larsen, S. Piana, R. O. Dror, M. P. Eastwood, J. A. Bank, J. M. Jumper, J. K. Salmon, and Y. Shan. 2010. Atomic-level

- characterization of the structural dynamics of proteins. *Science (New York, N.Y)* 330:341-346.
227. Torrie, G. M., and J. P. Valleau. 1977. Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling. *Journal of Computational Physics* 23:187-199.
 228. Li, J., and E. Tajkhorshid. 2011. Formation of a Leaky State and Molecular Mechanism of Water Co-Transport in Secondary Transporters. *Biophysical journal* 100:248.
 229. Li, J., S. A. Shaikh, G. Enkavi, P.-C. Wen, Z. Huang, and E. Tajkhorshid. 2013. Transient formation of water-conducting states in membrane transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
 230. Andrini, O., C. Ghezzi, H. Murer, and I. C. Forster. 2008. The leak mode of type II Na⁺-Pi cotransporters. *Channels* 2:346-357.
 231. Jetté, M., V. Vachon, M. Potier, and R. Béliveau. 1997. Radiation-inactivation analysis of the oligomeric structure of the renal sodium/d-glucose symporter. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1327:242-248.
 232. Chanda, B., R. Blunck, L. C. Faria, F. E. Schweizer, I. Mody, and F. Bezanilla. 2005. A hybrid approach to measuring electrical activity in genetically specified neurons. *Nature neuroscience* 8:1619-1626.
 233. DiFranco, M., J. Capote, M. Quiñonez, and J. L. Vergara. 2007. Voltage-dependent dynamic FRET signals from the transverse tubules in mammalian skeletal muscle fibers. *The Journal of general physiology* 130:581-600.
 234. Sjulson, L., and G. Miesenböck. 2008. Rational optimization and imaging in vivo of a genetically encoded optical voltage reporter. *The Journal of Neuroscience* 28:5582-5593.
 235. Le Caherec, F., P. Bron, J. Verbavatz, A. Garret, G. Morel, A. Cavalier, G. Bonnac, D. Thomas, J. Gouranton, and J. Hubert. 1996. Incorporation of proteins into (*Xenopus*) oocytes by proteoliposome microinjection: functional characterization of a novel aquaporin. *Journal of cell science* 109:1285-1295.
 236. Lagrée, V., I. Pellerin, J. F. Hubert, F. Tacnet, F. Le Cahérec, N. Roudier, D. Thomas, J. Gouranton, and S. Deschamps. 1998. A yeast recombinant aquaporin mutant that is not expressed or mistargeted in *Xenopus* oocyte can be functionally analyzed in reconstituted proteoliposomes. *Journal of Biological Chemistry* 273:12422-12426.
 237. Morales, A., J. Aleu, I. Ivorra, J. Ferragut, J. Gonzalez-Ros, and R. Miledi. 1995. Incorporation of reconstituted acetylcholine receptors from *Torpedo* into the *Xenopus* oocyte membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:8468-8472.
 238. Ivorra, I., M. Henriquez, P. Lax, G. Riquelme, and A. Morales. 2002. Functional transplantation of chloride channels from the human syncytiotrophoblast microvillous membrane to *Xenopus* oocytes. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 444:685-691.

239. Ulbrich, M. H., and E. Y. Isacoff. 2007. Subunit counting in membrane-bound proteins. *Nature methods* 4:319-321.
240. Coady, M. J., B. Wallendorff, D. G. Gagnon, and J. Y. Lapointe. 2002. Identification of a novel Na⁺/myo-inositol cotransporter. *Journal of Biological Chemistry* 277:35219-35224.
241. Aouameur, R., S. Da Cal, P. Bissonnette, M. J. Coady, and J. Y. Lapointe. 2007. SMIT2 mediates all myo-inositol uptake in apical membranes of rat small intestine. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 293:G1300-G1307.
242. Eyring, H. 1935. The activated complex and the absolute rate of chemical reactions. *Chemical Reviews* 17:65-77.
243. Su, A., S. Mager, S. L. Mayo, and H. A. Lester. 1996. A multi-substrate single-file model for ion-coupled transporters. *Biophysical journal* 70:762-777.
244. Bulling, S., K. Schicker, Y. W. Zhang, T. Steinkellner, T. Stockner, C. Gruber, S. Boehm, M. Freissmuth, G. Rudnick, and H. H. Sitte. 2012. The mechanistic basis for non-competitive ibogaine inhibition of serotonin and dopamine transporters. *Journal of Biological Chemistry*.
245. Hilgemann, D. W., and C. C. Lu. 1999. Gat1 (Gaba: Na⁺: Cl⁻) Cotransport Function. *The Journal of general physiology* 114:459-476.
246. Grewer, C., N. Watzke, M. Wiessner, and T. Rauen. 2000. Glutamate translocation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 occurs within milliseconds. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:9706.
247. Forster, I., C. Wagner, A. Busch, F. Lang, J. Biber, N. Hernando, H. Murer, and A. Werner. 1997. Electrophysiological characterization of the flounder type II Na⁺/Pⁱ cotransporter (NaPi-5) expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Journal of Membrane Biology* 160:9-25.
248. Longpré, J. P., and L. Marleau. 2005. Simulated annealing for generalized Skyrme models. *Physical Review D* 71:095006.
249. Gutenkunst, R. N., J. J. Waterfall, F. P. Casey, K. S. Brown, C. R. Myers, and J. P. Sethna. 2007. Universally sloppy parameter sensitivities in systems biology models. *PLoS computational biology* 3:e189.
250. Mayer, J., K. Khairy, and J. Howard. 2010. Drawing an elephant with four complex parameters. *American Journal of Physics* 78:648.

8 Conclusions

Au cours de mes études doctorales, j'ai étudié la structure et la fonction des SGLTs dans le cadre de 3 projets distincts.

Tout d'abord, j'ai étudié les bases structurelles de la perméation de l'eau au travers de vSGLT et hSGLT1. Des calculs MCGC ont permis l'insertion de molécules d'eau stables formant une voie de perméation reliant les côtés intra- et extracellulaires. Chacune de ses voies de perméation est composée d'une centaine de molécules d'eau et présente une zone de constriction entre le site de liaison du sucre et le côté extracellulaire. Ceci représente une rationalisation structurelle pour la perméabilité passive observée chez hSGLT1, et rend l'hypothèse du cotransport de l'eau difficilement soutenable. De plus, des calculs de PFM ont associé une barrière énergétique de $\sim 8 \text{ kCal mol}^{-1}$ à la perméation de l'eau au travers de la structure cristallographique de vSGLT, ce qui est en accord avec les valeurs expérimentales rapportées. Finalement, des mesures de volumétrie en voltage imposé sur hSGLT1 ont démontré que l'état conformationnel dans lequel vSGLT a été cristallisé est perméable à l'eau, et suggèrent que la voie de perméation identifiée est aussi présente dans d'autres conformations.

Deuxièmement, l'utilisation concomitante de hVoS, de FRET et de fluorescence en voltage imposé a démontré que le mutant hSGLT1 C255A est présent sous forme oligomérique à la membrane lorsqu'exprimé dans les ovocytes de xénopes, et que les boucles 11-12 et 12-13 était au moins en partie localisées au-dessus de la membrane. L'absence de β -ME durant l'immunobuvardage de type Western permis de confirmer ce résultat en démontrant que hSGLT1 sauvage est exprimé comme un dimère lié par un pont disulfure, et d'identifier la cystéine C355 comme en étant responsable. Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que l'hypothèse selon laquelle la structure quaternaire retrouvée dans la structure cristallographique de vSGLT reflète la structure quaternaire physiologique de hSGLT1 se doit d'être considérée avec prudence. De plus, un modèle

pour la boucle 12-13 est proposé suivant des arguments basés sur les mesures de fluorescence et des considérations topologiques.

Finalement, la technique du voltage-imposé à deux électrodes fut utilisée pour caractériser les propriétés électrogéniques de hSMIT2. Il fut démontré que la Pz est un inhibiteur médiocre, et une différence d'un facteur 3 entre les Q_{on} et Q_{off} apparents menèrent à l'identification d'une voie de perméation passive s'apparentant à un canal pour le courant de fuite. L'utilisation d'une nouvelle approche à la modélisation cinétique basé sur le recuit simulé nous permis de proposer un modèle à 5 états reproduisant les propriétés électrogéniques de hSMIT2 en présence de différents de V_m et différentes concentrations de substrats. Ce modèle présente une liaison coopérative des ions Na, de fortes asymétrie apparentes au niveau des barrières énergétiques, une étape limitante probablement associée avec la translocation du transporteur vide, et une fréquence de cycle de cotransport de 21 s^{-1} .

Pris dans leur ensemble, ces travaux ont permis d'améliorer la compréhension de la relation structure/fonction chez les SGLTs.

