

2m11.3090.8

Université de Montréal

**Transport d'eau généré par le cotransport Na^+ /glucose :
nouvelle interprétation basée sur les effets distincts des
flux entrants de cations et de glucose.**

par

Marilène Gagnon

Département de Physique
Faculté des Arts et Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise (M. Sc.)
en Physique
option biophysique et physiologie moléculaires

Juin 2003



© Marilène Gagnon, 2003

QC

3

U54

2003

v.021

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Transport d'eau généré par le cotransport Na^+ /glucose : nouvelle interprétation basée sur les effets distincts des flux entrants de cations et de glucose.

présenté par :
Marilène Gagnon

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Raynald Laprade, président-rapporteur
Jean-Yves Lapointe, directeur de recherche
Rémy Sauvé, membre du jury

Résumé

Le transport d'eau à travers les membranes, depuis ses premières descriptions et jusqu'à récemment, avait toujours été considéré comme un phénomène passif. Cependant, depuis une dizaine d'années, cette doctrine des flux d'eau passifs a été remise en question par plusieurs études suggérant l'existence d'un transport d'eau secondairement actif. Cette interprétation découlait en grande partie de l'observation qu'un influx de Na^+ ne peut reproduire le gonflement rapide et important induit par le cotransport Na^+ /glucose. Dans ce projet, le phénomène est analysé plus avant en comparant le flux d'eau généré par le cotransport Na^+ /glucose (hSGLT1) à ceux induits par un courant entrant cationique (avec ROMK2, un canal potassique) ou par un influx de glucose (avec GLUT2, un transporteur facilité de glucose). Ces protéines sont surexprimées dans les ovocytes de *Xenopus laevis*, puis testées avec des mesures volumétriques combinées à des mesures électrophysiologiques (double-électrode) ou à des mesures de transport radioactif. Les gradients osmotiques nécessaires pour engendrer les gonflements observés sont déduits par comparaison avec le gonflement provoqué par un choc osmotique d'amplitude connue. On trouve que, pour des influx équivalents de cations ou de glucose, l'addition des accumulations de substrats observées avec ROMK2 et GLUT2 est suffisante pour fournir le gradient osmotique nécessaire à un flux d'eau entièrement passif à travers SGLT1. On peut en conclure que des processus d'accumulation différents ont lieu pour les solutés neutres et les ions, les solutés neutres s'accumulant sous la membrane plus rapidement que les cations. Comme le flux d'eau rapide associé au cotransport Na^+ /glucose peut être quantitativement reproduit avec des flux de glucose et de cations, la doctrine du transport passif d'eau demeure valide et le recours au cotransport d'eau n'est pas strictement nécessaire.

Mots-clés : biophysique, transport membranaire, SGLT1, ovocytes de *Xenopus laevis*, mesures de volume, transport d'eau, cotransport d'eau, perméabilité osmotique, diffusion intracellulaire

Abstract

Over the last decade, several cotransport studies have led to the proposal of secondary active transport of water, challenging the dogma that all water transport is passive. The major observation leading to this interpretation was that a Na^+ influx failed to reproduce the large and rapid cell swelling induced by Na^+ /solute cotransport. We have investigated this phenomenon by comparing a Na^+ /glucose (hSGLT1) induced water flux to water fluxes triggered either by a cationic inward current (using ROMK2 K channels) or by a glucose influx (using GLUT2, a passive glucose transporter). These proteins were overexpressed in *Xenopus* oocytes and assayed through volumetric measurements combined with double-electrode electrophysiology or radioactive uptake measurements. The osmotic gradients driving the observed water fluxes were estimated by comparison with the swelling induced by osmotic shocks of known amplitude. We found that, for equivalent cation or glucose uptakes, the combination of substrate accumulations observed with ROMK2 and GLUT2 are sufficient to provide the osmotic gradient necessary to account for a passive water flux through SGLT1. Despite the fact that the Na^+ /glucose stoichiometry of SGLT1 is 2:1, glucose accumulation accounts for 2/3 of the osmotic gradient responsible for the water flux observed at $t=30\text{s}$. It is concluded that the different accumulation processes for neutral vs charged solutes can quantitatively account for the fast water flux associated with Na^+ /glucose cotransport activation without having to propose the presence of secondary active water transport.

Keywords : SGLT1, *Xenopus laevis* oocytes, volume measurement, water transport, water cotransport, osmotic permeability.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations et symboles.....	viii
Remerciements.....	x
Chapitre I Introduction.....	1
1 Évolution de l'interprétation du transport de l'eau.....	2
1.1 Observations macroscopiques et osmose.....	2
1.2 Digression sur les unités.....	3
1.3 Prédiction de pores perméables à l'eau dans les membranes plasmiques.....	5
1.4 Observations moléculaires et canaux à eau.....	7
1.5 L'épineuse question des flux d'eau dans les épithélia.....	11
2 L'hypothèse du cotransport d'eau.....	12
3 Contexte du projet de recherche.....	16
3.1 Travaux précédents.....	16
3.2 But du présent travail.....	19
3.3 Protéines à l'étude.....	20
Chapitre II L'accumulation de glucose peut expliquer les flux d'eau initiaux générés par le cotransport Na ⁺ /glucose.....	32
Chapitre III Discussion.....	63
1 Limites de notre approche.....	63
2 Réponse aux arguments appuyant le cotransport d'eau.....	66
3 GLUT2, une autre pompe à eau?.....	68
4 Exigences structurelles pour faire une pompe à eau.....	70
Conclusion et perspectives.....	76
Bibliographie.....	79

Annexe 1 Article complémentaire : L'hypothèse controversée du transport d'eau
secondairement actif97

Liste des figures

Figure I.1 Topologie de l'aquaporine 1 : modèle du sablier.....	9
Figure I.2 Structure du pore aqueux de l'aquaporine 1.....	10
Figure I.3 Comparaison des flux de volumes provoqués par l'activation de SGLT1 ou d'influx de cations	14
Figure I.4 Effet sur le volume d'une réduction rapide du courant de cotransport.....	16
Figure I.5 Modèle de diffusion intracellulaire	18
Figure I.6 La famille SLC5	21
Figure I.7 Topologie prédite de hSGLT1.....	22
Figure I.8 Classification des transporteurs de glucose GLUT.....	26
Figure I.9 Topologie des GLUT de la classe 1, dont GLUT2 fait partie.....	27
Figure I.10 Modèle proposé pour l'empaquetage des hélices transmembranaires de GLUT1.....	28
Figure I.11 Modèle tri-dimensionnel proposé par Zuniga et al.....	29
Figure III.1 Calcul d'une pseudo stoechiométrie de cotransport d'eau pour GLUT2.....	68
Figure III.2 Les modes de transport d'eau envisagés pour SGLT1.....	71
Figure III.3 États ouvert et fermé du canal potassique.....	73
Figure III.4 Ca ²⁺ ATPase : changement de conformation relié à la liaison du Ca ²⁺	74

Liste des abbréviations et symboles

C_s	Concentration de solutés imperméables
C_w	Concentration de l'eau
D	Coefficient de diffusion
J	Flux d'eau (J_v flux de volume, J_w flux de molécules d'eau)
L_p	Conductivité hydraulique
osm	Osmolarité
P	Pression hydrostatique
P_f	Perméabilité osmotique

*** À noter : le symbole L_p est toutefois utilisé pour désigner la perméabilité osmotique dans l'article (Chap. II), pour assurer la continuité avec les publications précédentes sur ce sujet. ***

P_d	Perméabilité de l'eau par diffusion
\bar{v}_w	Volume spécifique de l'eau
Π	Pression osmotique
$\Delta\pi$	Gradient osmotique en mOsm
SGLT	Cotransporteur Na^+ /glucose
GLUT	Transporteur facilité de glucose
ROMK	Canal potassique (renal outer medullary K channel)

AQP	Aquaporine
α MG	α -Methylglucose
2DG	2-deoxyglucose

Remerciements

Merci tout d'abord à Jean-Yves Lapointe, mon directeur de recherche. Toujours très généreux de son temps et de ses conseils, il m'a impeccablement guidée dans ce cheminement scientifique. Et par-dessus tout, son optimisme inébranlable et sa sagace vue d'ensemble m'ont apporté le support nécessaire dans les moments d'incertitude.

L'équipe du laboratoire a créé avec les années une atmosphère complice et détendue où je me suis sentie bien accueillie. Je remercie particulièrement Bernadette et Pierre pour leur sens de l'humour et leur aide technique. Je suis extrêmement reconnaissante à Louis-Martin Deslandes pour l'été passé à m'aider dans mon projet. La présence de mes collègues étudiants, Dominique et Francis, a aussi été très enrichissante pour toutes les conversations qu'elle a occasionnées, scientifiques ou pas!

Thérèse et Normand, votre soutien moral et financier m'aide depuis 24 ans à réaliser tous mes rêves. Sachez que la bienveillance que vous démontrez envers tous vos proches sera toujours pour moi une source d'inspiration et un modèle à suivre.

Merci à tous les amis qui m'ont apporté plein d'encouragements comme de divertissements!

Finalement, Martin, mon compagnon de toutes les joies et de toutes les épreuves durant cette maîtrise, je te remercie d'être à mes côtés. Je chéris le souvenir des merveilleux moments passés avec toi, et j'anticipe toutes les aventures qui nous attendent.

Chapitre I Introduction

L'eau est la molécule majoritaire des milieux intracellulaire comme extracellulaire, ce qui fait de l'homéostasie de l'eau un élément essentiel au bon fonctionnement de tout organisme. À chaque seconde, d'innombrables échanges de substrats ont lieu à travers la membrane plasmique d'une seule cellule, entraînant des flux d'eau tout aussi abondants. L'hydrophobicité de la membrane plasmique empêche une équilibration instantanée de l'eau suivant des flux importants de solutés. C'est pourquoi un certain nombre de mécanismes se sont développés avec l'évolution pour faciliter les flux d'eau d'une façon appropriée et spécifique à la fonction de chaque organe. La compréhension de ces flux d'eau microscopiques intéresse donc les scientifiques depuis très longtemps.

Un parcours historique portant sur les étapes déterminantes de l'évolution du concept de transport d'eau est d'abord présenté dans cette introduction. Suivront un retour sur les arguments majeurs en faveur d'un transport d'eau secondairement actif, une exposition du raisonnement à la base de la présente étude, ainsi qu'un résumé des caractéristiques importantes des protéines à l'étude.

1 Évolution de l'interprétation du transport de l'eau

1.1 Observations macroscopiques et osmose

L'osmose est un phénomène connu depuis des lustres. La déshydratation des aliments en les couvrant de sel ou de sucre est un exemple d'exploitation instinctive de l'osmose qui avait cours dès l'Antiquité. Une approche plus scientifique du processus d'osmose vit le jour par la suite avec, entre autres, les expériences de J. A. Nollet au 18^e siècle (Andreoli et Schafer 1980). À l'aide d'une vessie animale séparant deux enceintes contenant de l'eau pour l'une et du vin pour l'autre, il put observer que le volume du côté contenant le vin augmentait. Il baptisa ainsi ce phénomène d'*osmose* (du grec *ôsmós*, impulsion). Pfeffer apporta aussi une contribution plus quantitative en étudiant les flux d'eau à travers une membrane semi-perméable séparant des solutions à différentes concentrations de sucrose (Pfeffer 1877). La description mathématique de l'osmose fit par la suite un bond en avant vers la fin du 19^e siècle grâce à Jacobus H. van't Hoff (van't Hoff 1887). Ce dernier établit la loi suivante qui relie la différence de pression osmotique $\Delta\Pi$ (équivalente au gradient de pression hydrostatique qui serait nécessaire pour freiner le flux d'eau osmotique) à la différence de concentration de solutés imperméables C_s :

$$\Delta\Pi = RT\Delta C_s, \quad (1)$$

où R est la constante des gaz, de $8.31 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ et T la température en K. Dans le cas où C_s serait exprimé en mol/L, l'équation (1) permet d'obtenir la pression osmotique $\Delta\Pi$ en kPa.

Le flux d'eau à travers une membrane semi-perméable est ainsi la résultante de la différence entre les gradients de deux pressions distinctes : la pression hydrostatique P et la pression osmotique Π :

$$J_v = L_p (\Delta P - \Delta\Pi), \quad (2)$$

où J_v est le flux de volume et L_p la conductivité hydraulique de la membrane. Pour des pressions en kPa et un flux d'eau J_v en $\text{cm}^3 \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, les unités de la conductivité hydraulique L_p seraient des $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1}$.

1.2 Digression sur les unités

Dès le début de cette présentation, il serait utile de clarifier les unités qui seront utilisées. Tout d'abord, les flux d'eau sont donnés soit en tant que flux de volume ($\text{cm}^3 \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, comme J_v dans l'équation 2), soit en tant que flux de molécules d'eau (J_w , en $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Ces deux formes du flux d'eau sont reliées par le volume spécifique de l'eau \bar{v}_w ($18.2 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$).

On définit ensuite une perméabilité osmotique P_f telle que, pour un flux d'eau traversant une membrane du côté 1 vers le côté 2 :

$$J_w = P_f (C_{w1} - C_{w2}), \quad (3)$$

où C_{w1} et C_{w2} sont les « concentrations d'eau » de chaque côté. Pour des solutions assez diluées, on peut ensuite faire l'approximation suivante :

$$(C_{w1} - C_{w2}) \cong - (C_{s1} - C_{s2}) = - \Delta C_s. \quad (4)$$

Et donc :

$$J_w = - P_f \Delta C_s \quad (5)$$

La perméabilité osmotique P_f prendra alors des unités de $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$.

Dans le cadre du présent projet, il est peu probable que les conditions expérimentales mènent à la formation d'un gradient de pression hydraulique significatif de part et d'autre de la membrane des oocytes. C'est pourquoi on peut considérer dans notre

cas que $\Delta P = 0$ dans l'équation 2. Sachant que $J_v = \bar{v}_w \times J_w$, on peut utiliser les expressions pour ces flux données par les équations 2 et 5 pour établir que :

$$-L_p \Delta \Pi = -\bar{v}_w \times P_f \Delta C_s \quad (6)$$

et en remplaçant $\Delta \Pi$ par son expression donnée dans l'équation 1, on relie la conductivité hydraulique L_p à la perméabilité osmotique P_f de la façon suivante :

$$L_p = P_f \times \bar{v}_w \times (RT)^{-1}, \quad (7)$$

Pour les calculs de flux osmotiques qui suivront, une relation équivalente à l'équation 5 sera utilisée. Les solutions utilisées ne contiennent pas de protéines et ont une faible osmolalité (~ 200 mosm/kg H_2O), ce qui nous permet de considérer que le volume des solutés est très petit par rapport au volume occupé par l'eau. Par conséquent, nous utiliserons le terme osmolarité et décrirons nos solutions en terme de leur osmolarité au lieu de leur osmolalité, ce qui nous permettra d'utiliser $\Delta \pi$ en mOsm au lieu de ΔC_s en mosm/kg H_2O . Tout ceci résulte en une équation de la forme suivante :

$$\frac{dV}{dt} = -\bar{v}_w \times S \times P_f \times \Delta \pi, \quad (8)$$

où S est la surface standard d'un ovocyte, évaluée à 0.4 cm^2 pour un facteur de repliement de la membrane de 8.5 à 9.5. Il faut préciser cependant que la perméabilité à l'eau P_f (en $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$) est désignée dans le chapitre II par la variable L_p , afin assurer la cohérence avec les publications précédentes (Duquette et al. 2001; Zeuthen et al. 2001). C'est pourquoi on y retrouvera L_p en $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ plutôt qu'en $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1}$ comme dans l'équation 2.

1.3 Prédiction de pores perméables à l'eau dans les membranes plasmiques

La maîtrise approfondie des concepts de diffusion et d'osmose permettait la mesure des perméabilités à l'eau de diverses membranes. Néanmoins, ce n'est que lorsque des formes isotopiques (eau lourde : D₂O et eau tritiée : THO) de la molécule d'eau devinrent disponibles que la perméation de l'eau à travers une membrane a pu être observée d'une façon différente. L'eau marquée prenait alors un rôle de soluté ou de traceur plutôt que de solvant. Sa diffusion à travers une membrane, comme pour tout traceur, suit alors la loi de Fick :

$$J_w^* = -D_w \frac{dC_w^*}{dx}, \quad (9)$$

où J_w^* est le flux d'eau marquée en mol·s⁻¹·cm⁻², D_w le coefficient de diffusion de l'eau à travers la membrane en cm²·s⁻¹ et $\frac{dC_w^*}{dx}$ le gradient de concentration d'eau marquée à travers la membrane. L'intégration de la loi de Fick à travers l'épaisseur de la membrane permet d'obtenir une autre expression pour le flux :

$$J_w^* = P_d \Delta C_w^*, \quad (10)$$

où P_d est la perméabilité par diffusion de l'eau. Deux formes de perméabilités à l'eau pouvaient désormais être mesurées : une perméabilité osmotique (P_f ou L_p , équation 6), et une perméabilité par diffusion P_d ; la différence entre ces deux mesures étant la présence d'une force motrice et d'un flux net d'eau pour la situation d'osmose.

Cependant, dès les premières expériences répertoriées (Hevesy et al. 1935; Visscher et al. 1944), les comparaisons entre les flux d'eau osmotiquement induits et les flux d'eau lourde présentaient des contradictions. La perméabilité à l'eau de la membrane qu'on

déduisait de la diffusion d'eau lourde était trop petite pour prédire correctement le flux osmotique mesuré (Koefoed-Johnsen et Ussing 1953). Cet écart laissait supposer qu'une interaction entre les molécules d'eau avait lieu, plutôt que seulement leur diffusion individuelle à travers la membrane lipidique. La présence de pores aqueux traversant la membrane fut donc proposée (Pappenheimer et al. 1951; Koefoed-Johnsen et Ussing 1953) pour expliquer la divergence entre ces mesures et la théorie décrivant la diffusion des molécules d'eau dans les lipides. Avec l'hypothèse des pores perméables à l'eau, le rapport P_f/P_d permet de déduire le rayon du pore en question s'il est large (Pappenheimer et al. 1951; Koefoed-Johnsen et Ussing 1953; Solomon 1968), ou encore le nombre de molécules d'eau qu'il contient si celles-ci y circulent à la file indienne (Levitt 1974; Rosenberg et Finkelstein 1978).

Les nombreuses études utilisant des globules rouges permirent par la suite de raffiner l'interprétation des flux d'eau à travers de vraies membranes plasmiques (au lieu d'un épithélium au complet comme la peau de grenouille), et de bien les distinguer de la diffusion de l'eau à travers une couche de lipides. C'est ainsi qu'un certain nombre d'observations (bien résumées dans la revue suivante : Macey 1984) furent établies en faveur de l'existence d'un canal à eau hautement spécifique :

1) L'énergie d'activation E_a de la perméabilité à l'eau des globules rouges (4-6 kcal/mol (Vieira et al. 1970), est similaire à celle de la diffusion de l'eau en milieu aqueux (~ 5 kcal/mol, Agre et al. 2002)), et nettement inférieure à l'énergie d'activation pour la diffusion des molécules d'eau à travers une bicouche lipidique (11-15 kcal/mol, Fettiplace et Haydon 1980)).

2) La perméabilité à l'eau des globules rouges est plus élevée que celle des bicouches lipidiques. Aussi, tel que mentionné plus haut, la perméabilité osmotique des membranes de globules rouges est plus élevée que la perméabilité par diffusion de l'eau ($P_f/P_d \sim 5$ à 9 (Macey 1984)). Ces deux types de perméabilités sont identiques dans les bicouches lipidiques. Toutefois, la présence de couches non-mélangées auraient pu

augmenter le rapport P_f/P_d , les obstacles à la diffusion de l'eau diminuant préférentiellement la valeur obtenue pour P_d (Finkelstein 1987). L'épaisseur estimée de la couche non mélangée externe aux érythrocytes semblait cependant pouvoir être suffisamment réduite (1 à 4 μm pour des expériences de mélange rapide (Rice 1980)) pour écarter l'éventualité d'un rapport $P_f/P_d > 1$ artéfactuel.

3) Les composés mercurés ramènent la perméabilité à l'eau des globules rouges à des valeurs similaires à celles des bicouches lipidiques (Macey et Farmer 1970). Cet effet spécifique suggère la présence d'un groupement $-\text{SH}$ critique au passage des molécules d'eau à travers ces canaux.

4) Pour des molécules d'eau circulant à la file indienne dans le pore, le rapport P_f/P_d permet de déduire que 5 à 9 molécules d'eau doivent y être contenues (Macey 1984), ce qui paraissait assez raisonnable.

1.4 Observations moléculaires et canaux à eau

Bien que plusieurs observations semblaient suggérer la présence dans les membranes plasmiques de pores spécifiquement perméables à l'eau, la véritable confirmation de cette hypothèse survint quand une de ces protéines fut enfin identifiée.

La première protéine membranaire dont les propriétés de perméabilité à l'eau ont été démontrées est le transporteur de glucose GLUT (Fischbarg et al. 1990). La diminution de la perméabilité à l'eau causée par des inhibiteurs spécifiques des transporteurs de glucose fournit un premier indice à ce sujet (Fischbarg et al. 1987; Fischbarg et al. 1989). La surexpression de GLUT1, GLUT2 et GLUT4 dans les ovocytes de *Xenopus laevis* (Fischbarg et al. 1990) a ensuite pu apporter une preuve solide de la perméation de l'eau via ces protéines.

L'année suivante fut déterminante : le canal à eau cloné à partir des érythrocytes par Preston et Agre (Preston et Agre 1991) put apporter une brillante confirmation de certaines des hypothèses faites précédemment. La protéine CHIP28, baptisée depuis aquaporine 1, s'exprime en 120 000-160 000 copies par érythrocyte humain (Denker et al. 1988), et peut reproduire dans les ovocytes les caractéristiques spécifiques à la perméabilité à l'eau des érythrocytes telles que l'augmentation de la perméabilité osmotique, la sensibilité au chlorure de mercure (Preston et al. 1992) et la faible énergie d'activation (Preston et al. 1992).

Les aquaporines se regroupent en tétramères (Smith et Agre 1991; Jap et Li 1995; Murata et al. 2000), où chacun des monomère contient un pore aqueux fonctionnel. Chaque monomère (Figure I.1) possède 6 segments transmembranaires et deux boucles repliées se faisant face à l'intérieur de la membrane : la boucle B entre les segments 2 et 3 et la boucle E entre les segments 5 et 6. Le pore aqueux (Figure I.2) est bordé par les hélices 2 et 5, les portions C-terminales des hélices 1 et 4 ainsi que les boucles B et E qui contiennent les séquences Asn-Pro-Ala hautement conservées (Murata et al. 2000). La structure cristallographique la plus précise obtenue jusqu'à maintenant pour l'aquaporine 1 atteint une résolution de 2.2 Å (Sui et al. 2001). L'aquaporine existe sous plusieurs isoformes, dont 10 ont été identifiées jusqu'à maintenant (AQP0 à AQP9). Elles sont exprimées dans une large variété d'organes, et dans pratiquement tous les organismes, du plus simple (organismes unicellulaires) au plus complexe (mammifères). Pour une revue récente sur les aquaporines, consulter Agre et al. (Agre et al. 2002).

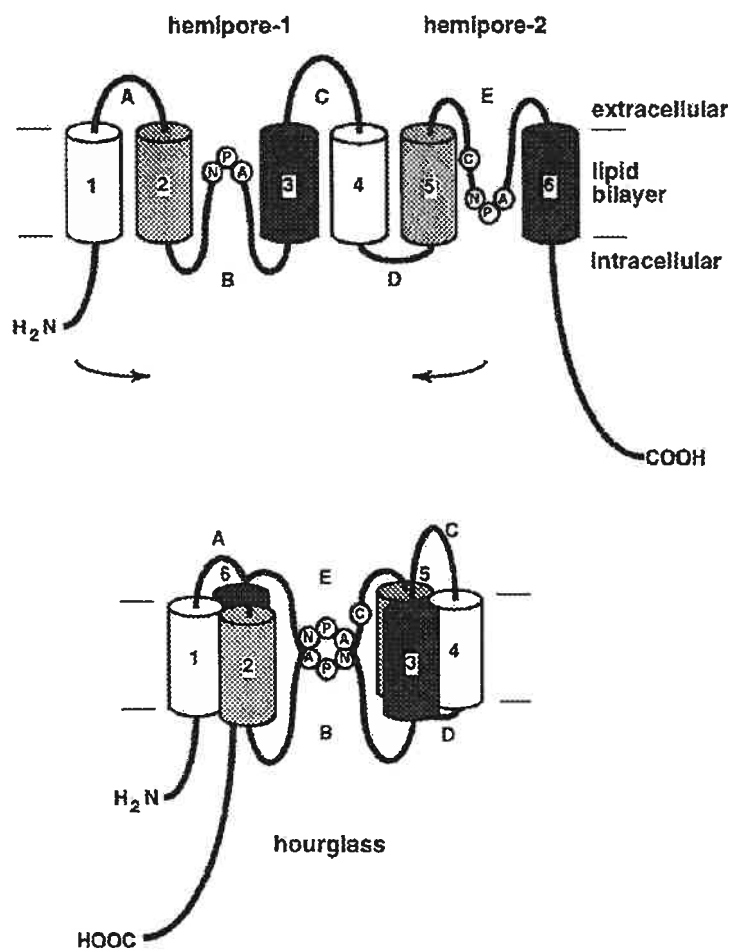


Figure I.1 Topologie de l'aquaporine 1 : modèle du sablier.

Tiré de (Borgnia et al. 1999), d'après la proposition originale de (Jung et al. 1994).

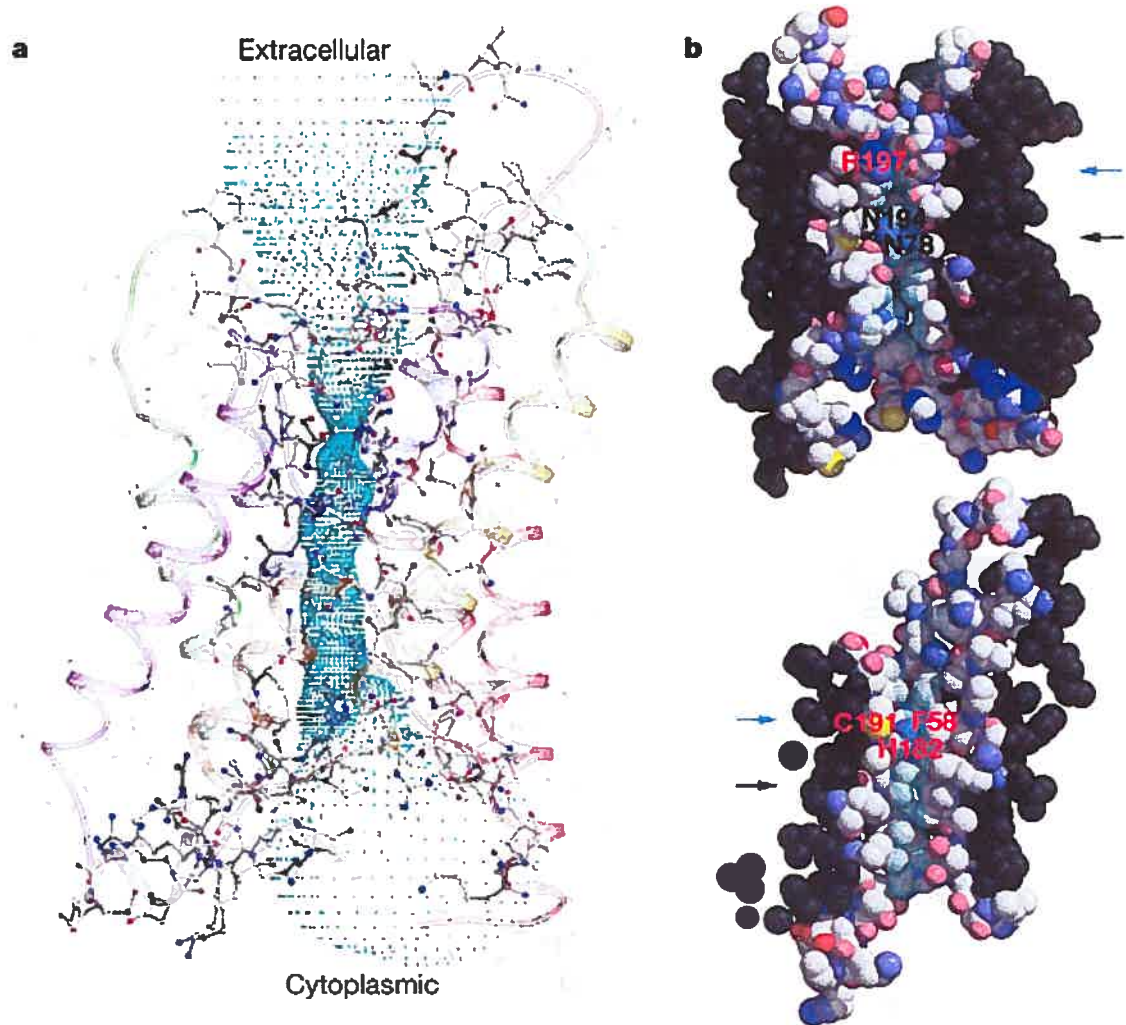


Figure I.2 Structure du pore aqueux de l'aquaporine 1.

Vue de côté d'une structure déterminée avec une résolution de 2.2 Å (Sui et al. 2001). Dans la partie B, une région de constriction est pointée par la flèche bleue, et la position du motif Asn-Pro-Ala hautement conservé est indiquée par la flèche noire.

1.5 L'épineuse question des flux d'eau dans les épithélia

Parmi les mécanismes biologiques impliquant le transport d'eau à travers des interfaces, l'absorption de fluide par les épithélia a suscité et continue de susciter beaucoup de recherches et de questionnement. En effet, bien que ~120 litres de fluide traversent l'épithélium du tubule proximal chaque jour et que ~8 litres par jour soient absorbés par le petit intestin, ces flux importants ont lieu en l'absence de tout gradient osmotique détectable entre les 2 côtés de l'épithélium. Il a plutôt été observé que le flux d'eau transépithélial dépendait de l'absorption des solutés. Pour expliquer ce phénomène, un modèle à 3 compartiments fut d'abord proposé (Curran et MacIntosh 1962), impliquant un compartiment central où l'accumulation active des solutés attirerait de l'eau par osmose en provenance du côté apical, le tout étant évacué par la suite vers le côté basolatéral suivant le gradient de pression généré. Par la suite, les espaces latéraux intercellulaires ont été suggérés (Whitlock et Wheeler 1964) pour tenir le rôle de cet espace particulier où l'accumulation active des solutés provenant des cellules adjacentes attirerait de l'eau par osmose. La pression hydrostatique engendrée par cet excès de fluide dans les espaces latéraux entrainerait ensuite l'eau comme les solutés dans l'interstitium basal. Basé sur ce principe, le modèle plus raffiné du flux osmotique à gradient stable (*standing-gradient osmotic flow*) vit le jour (Diamond et Bossert 1967). Cependant, aucune des vérifications expérimentales des caractéristiques nécessaires à l'occurrence d'un gradient stable (expression des pompes à solutés localisée près de la partie fermée des espaces latéraux intercellulaires, bonne étanchéité des jonctions serrées, diffusion restreinte des solutés dans les espaces latéraux) n'a donné le résultat escompté (Xia et al. 1998; Spring 1999). Des modèles alternatifs ont donc été présentés, revenant parfois (Spring 1999) au modèle à 3 compartiments qui avait précédé celui du gradient stable, suggérant des proportions variées entre les flux d'eau transcellulaires et paracellulaires, ou permettant une certaine recirculation des solutés pompés vers les espaces intercellulaires (Larsen et al. 2002; Spring

2002). Ces modèles restent toutefois basés sur le principe qu'un flux de solutés à travers une membrane génère un gradient osmotique local pour entraîner de l'eau.

Le mécanisme par lequel d'aussi grandes quantités d'eau peuvent traverser des épithélia sans altérer l'intégrité des cellules est donc encore loin d'être bien élucidé. Dans cette optique, l'éventualité de la présence de pompes à eau à la membrane apicale a généré beaucoup d'intérêt.

2 L'hypothèse du cotransport d'eau

La perméabilité osmotique de sa membrane plasmique permet à la cellule d'équilibrer l'osmolarité du cytosol avec celle du milieu environnant. Lorsqu'une certaine quantité de substrat est absorbée par une cellule, son osmolarité augmente graduellement, ce qui génère un flux d'eau proportionnel au gradient osmotique (équation 8). Le flux d'eau passif doit toujours survenir *suite* à la création d'un gradient d'osmolarité : c'est essentiellement ce principe qui a amené T. Zeuthen (Zeuthen 1991a) à suggérer la première fois un nouveau mécanisme de transport de l'eau. Ces premières études (Zeuthen 1991a; Zeuthen 1991b; Zeuthen 1994) portaient sur la membrane ventriculaire de l'épithélium du plexus choroïde de *Necturus maculosus*, et suggéraient la présence de cotransport K-Cl accompagné d'un transport secondairement actif d'eau. Le plexus choroïde est responsable de la sécrétion du liquide céphalo-rachidien, et son épithélium est de type « lâche » (Wright 1978). Les mesures de volume dans ce cas étaient relativement indirectes, puisque c'est avec des électrodes sélectives au K^+ , qui sont, en fait, encore plus sélectives à la choline (Ch^+), que les changements de concentrations intracellulaires de Ch^+ étaient enregistrés. C'est par l'intermédiaire de ces changements de concentration ΔCh^+ que des ΔVol étaient déduits. Quoi qu'il en soit, les flux de K^+ , de Cl^- et d'eau trouvés semblaient s'induire

mutuellement de manière rapide, et les effets attendus de l'accumulation de solutés dans les couches non-mélangées ont été écartés par des considérations théoriques. Un cotransport avec stoechiométrie de $1 \text{ K}^+ : 1 \text{ Cl}^- : 500 \text{ H}_2\text{O}$ fut donc proposé. Une conclusion semblable a été tirée de mesures similaires pour les flux de H^+ , de lactate et d'eau à travers la membrane rétinienne de l'épithélium pigmenté de la grenouille (Zeuthen et al. 1996).

En 1996, Loike et al. observaient (Loike et al. 1996) une perméabilité à l'eau sensible à la phlorizine chez les ovocytes exprimant le cotransporteur Na^+ /glucose de lapin (rSGLT1). Quelques mois plus tard, Loo et al. publiaient leurs premières mesures de volume avec des ovocytes exprimant rSGLT1 (Loo et al. 1996). Ces résultats obtenus avec un montage qui permettait des mesures de volume en temps réel ont amené Loo et al. à suggérer un couplage direct des flux d'eau avec ceux du sodium, impliquant le transfert de 260 molécules d'eau à chaque cycle du cotransporteur. Toujours pour le cotransporteur de lapin, ce nombre a par la suite été révisé à 390 (Zeuthen et al. 1997), puis 424 (Zeuthen et al. 2001). Cette première suggestion de transport secondairement actif d'eau par un cotransporteur cloné marquait le début d'une longue série de publications. Des activités de « pompe à eau » ont été suggérées pour le cotransporteur Na^+ /glucose d'humain (hSGLT1, Meinild et al. 1998), le cotransporteur Na^+ /dicarboxylate (NaDC-1, Meinild et al. 2000), le cotransporteur Na^+ /glutamate (EAAT1, MacAulay et al. 2001), et les cotransporteurs Na^+ /iode et H^+ /acide aminé (mentionnés dans Loo et al. 1996; Meinild et al. 2000). Le mécanisme de cotransport d'eau aurait pour chaque cotransporteur une stoechiométrie spécifique, allant de 50 à 400 molécules d'eau par cycle.

Les observations et arguments appuyant l'existence d'un transport d'eau secondairement actif sont à peu près les mêmes pour tous ces cotransporteurs. Ces arguments sont expliqués dans plusieurs revues ((Wright et Loo 2000; Loo et al. 2002; Zeuthen et al. 2002)). En voici un résumé :

1 - Quand le cotransporteur est activé, le gonflement suit rapidement et semble avoir initialement une pente constante. Les flux de cations n'ont pas cet effet rapide ; ils

stimulent plutôt un gonflement plus tardif, dont la pente augmente graduellement (Figure I.3). Ceci a été testé pour les ionophores gramicidine (Meinild et al. 1998; Zeuthen et al. 2001) et nystatine (Zeuthen et al. 1997), ainsi que pour les canaux connexine 50 (Wright et Loo 2000) et ROMK2 (Duquette et al. 2001).

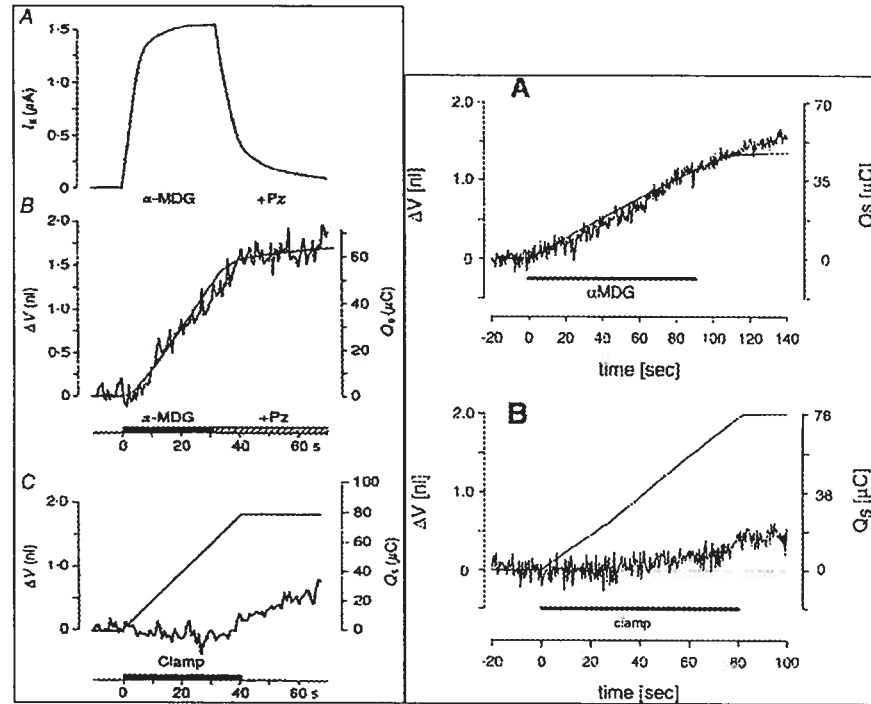


Figure I.3 Comparaison des flux de volumes provoqués par l'activation de SGLT1 ou d'influx de cations

À gauche : publié par (Loo et al. 2002) à partir des résultats originaux de (Meinild et al. 1998). *A* Courant de cotransport généré par hSGLT1 exprimé dans un ovocyte. *B* Comparaison du gonflement de l'ovocyte et de la charge déduite de l'intégration du courant entrant. *C* Gonflement et influx de Na^+ pour un ovocyte traité avec 200 nM de gramicidine.

À droite : tiré de (Wright et Loo 2000). *A* Gonflement et influx de Na^+ générés chez un ovocyte exprimant SGLT1 de rat. *B* Gonflement et influx de Na^+ pour un ovocyte exprimant la connexine 50.

2 - Suite à la stimulation de l'activité des cotransporteurs, la comparaison du flux d'eau initial et du courant semble résulter en une stoechiométrie stricte, indépendante du niveau d'expression et du taux de cotransport. Cette stoechiométrie est constante pour un type de cotransporteur, mais varie d'un cotransporteur à l'autre : 264 H₂O par cycle pour hSGLT1 (Zeuthen et al. 2001), 424 pour rSGLT1 (Zeuthen et al. 2001), 176 pour Na⁺DC-1 (Meinild et al. 2000), 436 par charge cotransportée pour EAAT1 (MacAulay et al. 2001), 200 par charge positive entrante pour le cotransporteur Na⁺/iode (mentionné dans Loo et al. 1996) et 50 par charge positive entrante pour le cotransporteur H/acide aminé de plante (mentionné dans Loo et al. 1996).

3 - L'énergie d'activation (E_a) du gonflement attribué au cotransport d'eau est nettement supérieure à celle de la perméabilité passive à l'eau, alors qu'elle est plutôt similaire à celle du courant de cotransport. Par exemple, pour hSGLT1 : $E_a = 26 \pm 0.3$, 25 ± 0.3 et 4.2 ± 0.6 kcal/mol pour le flux d'eau généré par le cotransport, le courant de cotransport et le flux d'eau osmotique, respectivement (Meinild et al. 1998).

4 - L'activité des cotransporteurs est en mesure de générer des flux d'eau contre un gradient osmotique.

Plus récemment, une troisième méthode a aussi été utilisée pour étudier les changements de volume des cellules d'un épithélium. Celle-ci exploite la décroissance de l'intensité de fluorescence générée par l'augmentation de concentration du fluorophore (*self-quenching*). La fluorescence de la calcéine (Hamann et al. 2003) ou du BCECF (Hamann et al. 2000) fut ainsi exploitée pour déduire des changements de volume et les mettre en relation avec les flux de protons et de lactate dans des cultures de cellules épithéliales du pigment rétinien. Des conclusions similaires aux précédentes ont été tirées.

3 Contexte du projet de recherche

3.1 Travaux précédents

Les flux d'eau associés au cotransport Na^+ /glucose dans les ovocytes ont déjà fait l'objet d'une série de travaux dans ce laboratoire. Les premières expériences de volumétrie combinée à des mesures électrophysiologiques, effectuées par Pierre-Pascal Duquette dans le cadre de sa maîtrise supervisée par le professeur Jean-Yves Lapointe (Duquette 2000; Duquette et al. 2001), avaient ainsi pour but d'identifier la force motrice à la source des flux d'eau reliés à l'activité de SGLT1. Tout d'abord, l'inhibition du cotransport Na^+ /glucose après une longue période d'activité stationnaire a permis de quantifier le gradient osmotique généré par l'accumulation des substrats sous la membrane (16 ± 2 mOsm après 15 minutes de cotransport). Même pour de courtes périodes d'activité (60 s), le gonflement observé se poursuivait après la réduction du courant de cotransport (Figure I.4), ce qui constitue une indication claire de l'établissement d'un gradient osmotique. Dans l'hypothèse du cotransport d'eau, les flux d'eau auraient dû se trouver réduits en même temps que le courant de cotransport.

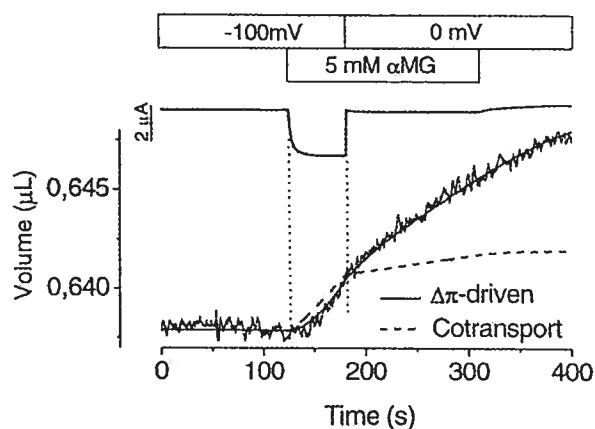


Figure I.4 Effet sur le volume d'une réduction rapide du courant de cotransport.

Tiré de (Duquette et al. 2001). Selon l'hypothèse du cotransport d'eau, le gonflement et le

courant observés suite à l'application de 5 mM α MG correspondraient à une stoechiométrie de 240 molécules d'eau par molécule d' α MG (trait pointillé). Avec la dépolarisation, le gonflement aurait alors dû s'interrompre en même temps que le courant, ce qui n'est clairement pas le cas. Le modèle de diffusion intracellulaire (courbe continue), quant à lui, reproduit très bien la mesure de volume.

Des mesures de potentiel d'inversion avec des ovocytes exprimant le canal potassique ROMK2 ont aussi indiqué que, malgré le fait que les flux d'eau suivant l'application du courant ne paraissent pas aussi immédiats qu'avec SGLT1, une accumulation de K^+ pouvait être détectée dès 30 secondes après le déclenchement du courant (Duquette et al. 2001).

Ces résultats ont permis de conclure que des gradients osmotiques considérables s'établissent rapidement suite au déclenchement du cotransport Na^+ /glucose. Un modèle numérique de diffusion intracellulaire a été élaboré. Dans ce modèle simple, l'ovocyte est subdivisé en 50 coquilles concentriques. La perméabilité à l'eau de la membrane est directement déduite du choc hypotonique imposé à l'ovocyte à la fin de l'expérience (équation 8). Le courant mesuré fournit la quantité d'osmolytes qui arrivent à chaque incrément de temps à la couche externe et en changeant la concentration. De plus, l'électrode de courant, pour maintenir un potentiel intracellulaire fixe, peut en théorie absorber des cations ou injecter des anions en réaction à l'entrée de Na^+ dans la cellule. C'est pourquoi un certain nombre d'osmolytes par α MG transporté est aussi présent comme paramètre ajustable. Ce nombre peut prendre une valeur entre 1 (si 2 K^+ sont absorbés par l'électrode quand 2 Na^+ arrivent) et 5 (si l'électrode émet 2 Cl^- quand 2 Na^+ arrivent). Par la suite, la diffusion des osmolytes entre chaque couche est calculée avec un coefficient de diffusion unique pour l'osmolyte intracellulaire « moyen ». Après cette phase de diffusion intracellulaire, l'osmolarité de la première couche et la perméabilité à l'eau de la membrane permettent de déduire l'entrée d'eau et le changement de volume

subséquent. Ainsi, 2 paramètres étaient ajustés (le coefficient de diffusion intracellulaire et le nombre d'osmolytes par charge) afin de reproduire une expérience donnée. Les expériences de gonflement d'ovocytes exprimant hSGLT1 ont pu être reproduites (Figure I.5) par ce modèle simple avec un coefficient de diffusion intracellulaire D_i entre 0.05 et $0.15 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et un nombre d'osmolytes par glucose transporté entre 3.5 et 5 (Duquette et al. 2001; Lapointe et al. 2002a). Un tel coefficient de diffusion est environ un ordre de grandeur plus petit que celui du glucose et du Na^+ en solution libre : $D_{\text{glc}} = 0.60 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et $D_{\text{Na}^+} = 1.39 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Macey 1980), ce qui semble raisonnable pour le cytosol d'un ovocyte. Pour ces modélisations, l'intérieur de l'ovocyte était cependant considéré comme accessible à l'eau à 85 %. Cette fraction accessible semble avoir été surestimée et serait probablement plutôt de l'ordre de 40 %, mais le modèle demeure applicable avec cette fraction accessible modifiée (Lapointe et al. 2002b).

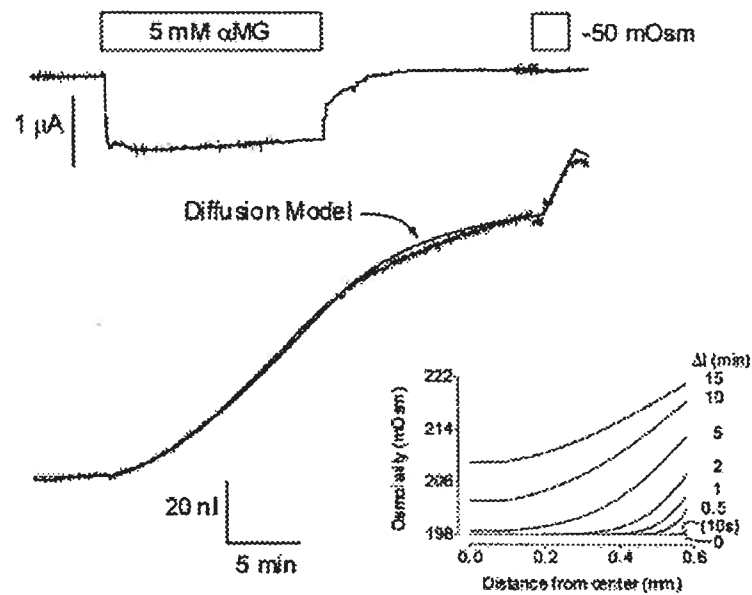


Figure I.5 Modèle de diffusion intracellulaire

Tiré de (Lapointe et al. 2002a). Le trait continu est ajusté à l'expérience à l'aide du modèle de diffusion. Les combinaisons de paramètres qui convenaient pour reproduire cette

expérience au complet incluant le choc hypotonique utilisaient en moyenne $D_i = 0.11 \pm 0.03 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et 4.1 ± 0.3 osmolytes par α MG transporté. Les profils d'osmolarité calculés du centre de l'ovocyte jusqu'à la membrane sont présentés à droite.

3.2 But du présent travail

À la lumière des résultats récoltés par Pierre-Pascal Duquette, des osmolytes accumulés sous la membrane peuvent expliquer entièrement le gonflement fort et rapide associé à l'activité du cotransporteur Na^+ /glucose. La plupart des observations utilisées pour soutenir l'occurrence d'un cotransport d'eau peuvent alors être expliquées si la diffusion intracellulaire est assez faible pour permettre une accumulation rapide des osmolytes sous la membrane.

Cependant, une observation incontestable demeure : c'est la rapidité et la force avec laquelle le gonflement de l'ovocyte est déclenché après la stimulation du courant de cotransport lorsqu'on le compare au cas où un flux purement ionique est activé (Figure I.3). Si le transport secondairement actif d'eau n'existe pas, il faut conclure qu'un flux combiné d'ions et de solutés neutres ne peut être comparé à un flux ionique équivalent, i.e. l'effet osmotique du transport du soluté neutre (par exemple, le glucose) est majeur. La quantification de cet effet osmotique du glucose dans les ovocytes et sa comparaison avec les effets osmotiques d'un flux cationique ou de cotransport constituent les buts du présent projet de recherche. Cette investigation se veut une suite logique de l'étude menée par Pierre-Pascal Duquette, car une fois la conclusion atteinte que les flux d'eau précédemment attribués à un transport actif d'eau peuvent être expliqués par une accumulation d'osmolytes, il est primordial de comprendre de quelle façon la nature des osmolytes transportés influence le processus d'accumulation. Si on peut reproduire les gradients osmotiques nécessaires pour expliquer les flux d'eau générés par SGLT1, et ce en utilisant des protéines qui ne sont pas apparentées à ce cotransporteur, il peut être conclu que la

force de ces flux d'eau n'est pas attribuable à la protéine en tant que telle mais plutôt aux substrats transportés par celle-ci.

3.3 Protéines à l'étude

Les deux protéines membranaires sélectionnées pour expliquer séparément l'effet des flux de cations et de glucose du cotransporteur Na^+ /glucose (hSGLT1) sont le canal potassique ROMK2 et le transporteur facilité de glucose GLUT2.

3.3.1 SGLT1 : le cotransporteur Na^+ /glucose

Le phénomène de transport de solutés neutres couplé au flux de sodium est connu depuis les travaux de Crane dans les années 60 (Crane 1962; Crane 1965). Le cotransport Na^+ /glucose constitue un exemple typique de cette exploitation des gradients de Na^+ par la cellule pour importer et accumuler différents solutés. De nombreuses études cinétiques du cotransporteur Na^+ /glucose ont été faites avant son clonage, notamment par l'exploitation de cellules du tubules proximal, ou de vésicules de membrane à bordure en brosse de l'intestin (BBMV) (articles de revue : Freel et Goldner 1981; Semenza et al. 1984). Le cotransporteur Na^+ /glucose SGLT1 du lapin a été cloné en 1987 en utilisant, pour la première fois, la technique du clonage par expression (Hediger et al. 1987). L'isoforme SGLT1 est la plus étudiée des cotransporteurs SGLT. Chez l'humain, ses sites d'expression les mieux connus sont les membranes apicales des cellules du tubule proximal du rein et du petit intestin. D'autres types de cotransporteurs Na^+ /glucose ont aussi été identifiés. Les deux principaux sont SGLT2 (Wells et al. 1992) et SGLT3 (Kong et al. 1993; Mackenzie et al. 1994), deux candidats potentiels pour le transport de glucose rénal à faible affinité (pour une revue récente : Wright 2001). On définit aujourd'hui une famille de cotransporteurs homologues à SGLT (la famille SLC5) qui compte plus de 220 membres, dont 11 chez l'humain jusqu'à maintenant (Wright et Turk 2003). Les membres

humains de la famille SLC5 (Figure I.6) sont de 21 à 59 % identiques à SGLT1 et sont impliqués dans le cotransport (couplé au Na^+) de glucose, de myo-inositol, de choline, de vitamine ou d'iode (Wright et Turk 2003).

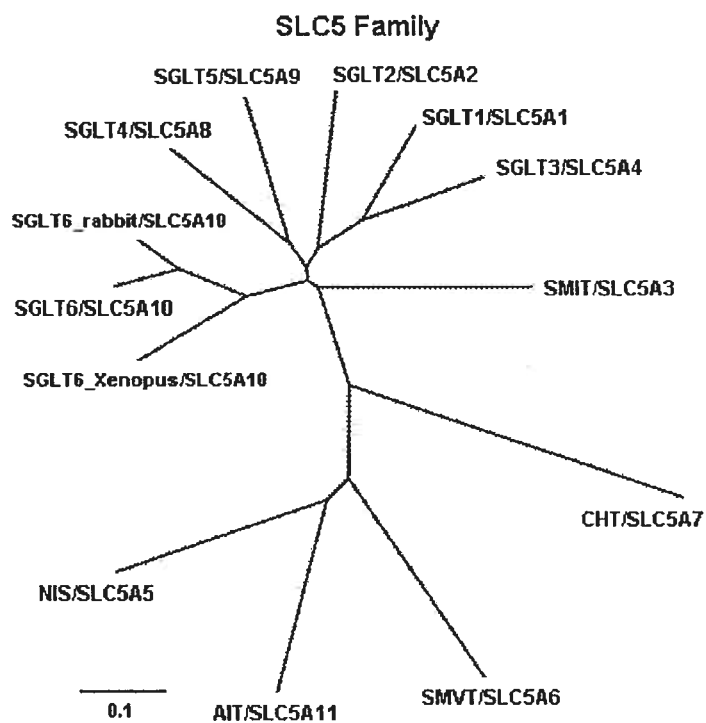


Figure I.6 La famille SLC5

Arbre phylogénétique des membres humains de la famille SLC5, et deux membres d'autres vertébrés (d'après Wright et Turk 2003). (*SGLT* cotransporteur Na^+ /glucose, *SMIT* cotransporteur Na^+ /myo-inositol, *SMVT* cotransporteur Na^+ /multivitamines, *CHT* transporteur de choline, *AIT* transporteur d'iode apical, *NIS* cotransporteur Na^+ /iode)

Plusieurs éléments sont connus concernant la structure de SGLT1, mais il y a aussi de nombreux aspects qui demeurent incertains à ce jour. Cette protéine de 664 acides aminés avec une masse prédite de 73 kDa comporte 14 segments transmembranaires

(Figure I.7). Cependant, il semble que la longue boucle cytosolique entre les segments 13 et 14 revienne dans la membrane ou soit du moins accessible de l'extérieur, puisqu'un mutant marqué avec une étiquette poly-histidine pouvait y être reconnu par l'anticorps anti-poly-his présenté du côté extracellulaire (Lin et al. 1999). Les segments N et C-terminaux sont extracellulaires. Une asparagine en position 248 est glycosylée.

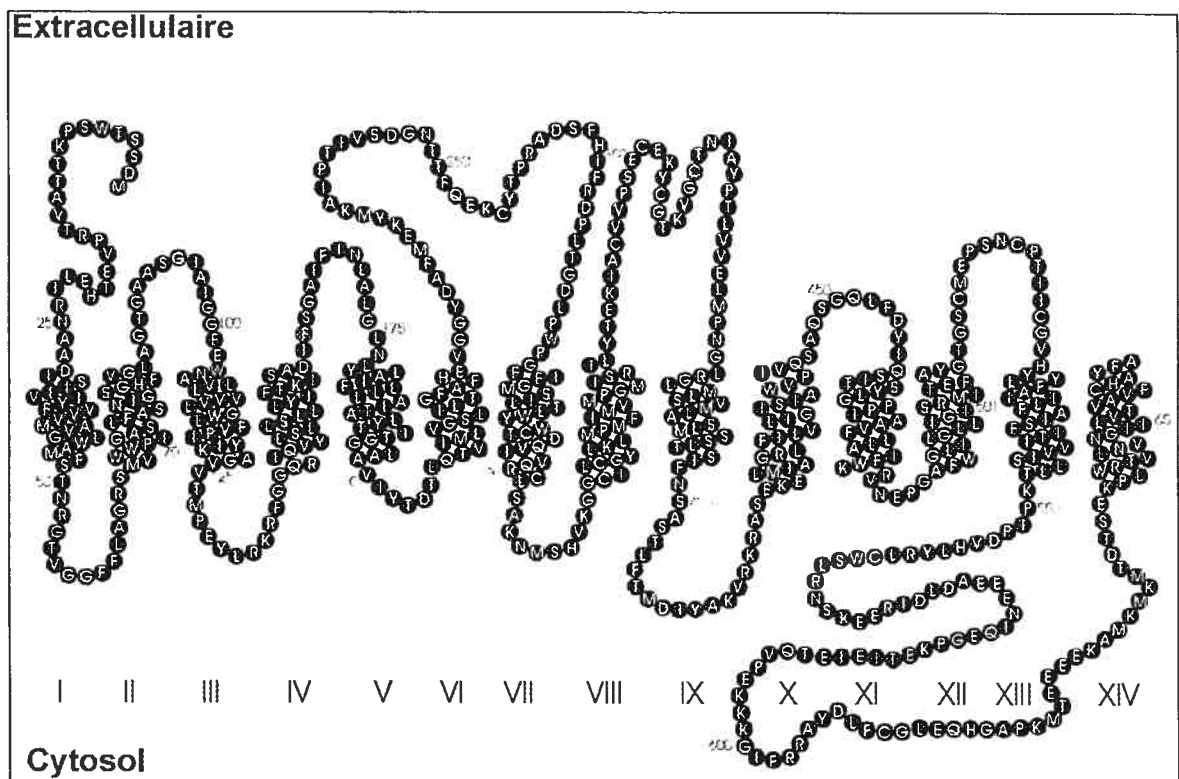


Figure I.7 Topologie prédite de hSGLT1.

Cette topologie pourrait être quelque peu modifiée puisqu'une section importante de la longue boucle cytosolique entre les segments XIII et XIV semble être détectée à partir de l'extérieur par un anticorps préparé contre un peptide correspondant aux résidus 606 à 630 (Lin et al. 1999).

Les opinions sont partagées concernant l'oligomérisation possible de SGLT1. Des études d'inactivation par radiation sur la membrane à bordure en brosse du rein de rat (Jette et al. 1997) ou de l'intestin de lapin (Stevens et al. 1990) suggèrent un cotransport Na^+ /glucose médié par un tétramère. Une autre analyse des flux de glucose dans les vésicules de membrane à bordure en brosse de l'intestin s'est montrée compatible avec une structure dimérique ou tétramérique de SGLT1 (Chenu et Berteloot 1993). Par contre, des observations par cryodécapage semblent indiquer que rSGLT1 formerait un monomère asymétrique à la membrane des ovocytes (Eskandari et al. 1998). Un consensus n'est donc pas encore atteint à ce sujet. Cependant, il est aussi possible que l'oligomérisation de SGLT1 varie selon la membrane où il est exprimé (tissu natif ou système hétérogène d'expression).

Les résultats disponibles présentement semblent montrer que le site de liaison au glucose est du côté C-terminal, et les sites de liaison aux ions Na^+ du côté N-terminal. En effet, une protéine tronquée possédant seulement les 5 derniers segments transmembranaires se comportait comme un transporteur facilité de glucose (Panayotova-Heiermann et al. 1997). Aussi, le remplacement de divers résidus par des cystéines (SCAM, *substituted cysteine accessibility method*) propose un rôle important de la boucle extracellulaire entre les segments 4 et 5 pour la liaison du Na^+ et la sensibilité au voltage (Lo et Silverman 1998). De plus, des mutations et des mesures de spectroscopie à résonance paramagnétique des électrons (EPR) dans le domaine N-terminal du cotransporteur Na^+ /proline (PutP), suggèrent une implication de ce domaine pour la liaison du Na^+ et le couplage des flux de Na^+ et de substrat (Quick et al. 1999; Wegener et al. 2000; Pirch et al. 2002).

Les propriétés cinétiques à l'état stationnaire des ovocytes exprimant SGLT1 sont bien connues (Parent et al. 1992a; Wright et al. 1998; Wright 2001). L' α -méthyl-D-glucoside (α MG) est transporté de façon dépendante du Na^+ , avec une constante d'affinité $K_M = 0.4$ mM pour la forme humaine de SGLT1 (Wright 2001). Le transport du sodium est

dépendant du voltage, avec $K_M = 3 \text{ mM}$ à -150 mV . La fréquence d'activité intrinsèque est de $60 \text{ cycles}\cdot\text{s}^{-1}$ pour hSGLT1. Le cotransport Na^+ /glucose par SGLT1 est inhibé par la phlorizine, avec un K_i entre une dizaine de nM et quelques μM , selon l'espèce. En absence de glucose, un courant de fuite de Na^+ sensible à la phlorizine est détecté, mais son amplitude est de beaucoup inférieure (2 à 10 %) à celle du cotransport (Umbach et al. 1990; Parent et al. 1992a; Chen et al. 1995).

Bien que des travaux initiaux sur le cotransport Na^+ /glucose aient proposé une stoechiométrie de 1 Na^+ pour 1 glucose à la fois pour des vésicules intestinales (Hopfer et Groseclose 1980) et pour des vésicules du cortex rénal (Beck et Sacktor 1978), on reconnaît aujourd'hui que la stoechiométrie dans l'intestin est de 2 Na^+ :1 glucose et que celle au niveau du rein est une combinaison de cotransports 1:1 et 2:1 (Turner et Moran 1982). Dans le cas du cotransporteur SGLT1 isolé, la stoechiométrie de 2 Na^+ : 1 glucose est maintenant bien acceptée. Des études variées ont amené différentes équipes à cette conclusion ; notamment par des mesures de potentiels d'inversion avec la méthode du *cut-open oocyte* (Chen et al. 1995), et par la mesure directes des flux de Na^+ ou d' αMG isotopiques en parallèle avec la mesure de courant dans les ovocytes exprimant SGLT1 (Mackenzie et al. 1998).

La cinétique précise du mode de fonctionnement de SGLT1 est l'objet de multiples recherches impliquant les modes stationnaire et pré-stationnaire (Loo et al. 1993; Chen et al. 1996; Chen et al. 1997; Falk et al. 1998). Néanmoins, l'ordre de liaison des substrats présentement privilégié est $1\text{Na}^+ : 1\text{Na}^+ : 1\text{glucose}$ (Parent et al. 1992b; Berteloot 2003).

3.3.2 ROMK2 : un canal potassique

Les canaux Kir1.1 ou ROMK (renal outer medullary K channel) sont des canaux potassiques à rectification entrante, activés par l'ATP. ROMK1, le premier membre de cette famille, a été découvert en 1993 (Ho et al. 1993). Les diverses isoformes des canaux ROMK semblent provenir de l'épissage alternatif d'un même gène (Boim et al. 1995).

L'isoforme ROMK2 (Kir1.1b) a été clonée par expression dans les ovocytes de *Xenopus laevis*, à partir de reins de rats (Zhou et al. 1994). ROMK2 est exprimée à divers endroits le long du tubule rénal : on en retrouve à la portion épaisse de l'anse ascendante de Henlé, au tubule contourné distal, au tubule connecteur et à la portion corticale du tubule collecteur (Boim et al. 1995). Ce canal possède deux segments transmembranaires qui jouxtent une région « H5 » contenant les résidus G-Y-G essentiels au filtre de sélectivité spécifique aux canaux potassiques (Wang et al. 1997). Le canal fonctionnel serait composé de 4 sous-unités de Kir et 4 sous-unités de SUR.

Le clone de ROMK2 fut offert à notre laboratoire par J. Xu et S. C. Hebert. L'injection de son ARN messager dans les ovocytes génère une expression forte et rapide, des expériences étant possibles dès le lendemain de l'injection. Ainsi, la membrane des ovocytes exprimant ROMK2 devient presque complètement sélective au potassium.

3.3.3 GLUT2 : un transporteur de glucose

Le premier transporteur de glucose GLUT1 fut cloné en 1985 (Mueckler et al. 1985). La famille des GLUT regroupe maintenant 13 transporteurs facilités de sucre/polyols (GLUT1-12 et HMIT), regroupés en trois classes (Figure I.8). Plusieurs nouveaux membres de cette famille ont récemment été découverts, par homologie de séquence entre les GLUTs déjà connus et les bases de données disponibles sur le génome (pour une revue récente sur la classification : Joost et Thorens 2001). Leur classification et nomenclature ont été réétablies suite à un consensus entre les équipes les plus impliquées (Joost et al. 2002).

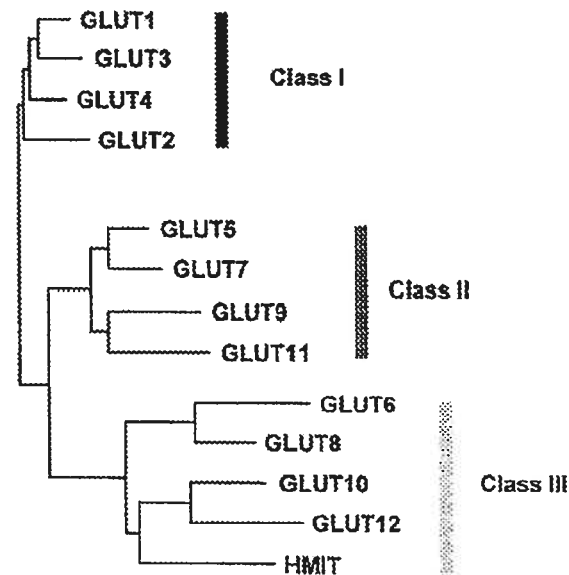


Figure I.8 Classification des transporteurs de glucose GLUT.

Tiré de (Joost et Thorens 2001).

L'isoforme GLUT2 a été clonée simultanément par deux équipes en 1988 (Fukumoto et al. 1988; Thorens et al. 1988). GLUT2 est plus fortement exprimé dans le foie, mais on le retrouve aussi dans les cellules β du pancréas ainsi qu'à la membrane basolatérale des cellules épithéliales du petit intestin et du rein. Avec son affinité réduite pour le glucose ($K_{D\text{-glc}} = 17$ à 66 mM selon le système d'expression et le clone utilisé (Gould et al. 1991; Thorens 1996; Uldry et al. 2002) et $K_{2DG} = 11$ mM (Gould et Holman 1993)), GLUT2 est le seul des GLUTs déjà décrits dont le taux de transport à haut taux de glucosémie peut encore varier proportionnellement à la concentration de glucose (i.e. le seul GLUT qui présente une affinité basse par rapport aux concentrations physiologiques de glucose). Ainsi, sa présence au niveau des tissus où les flux de glucose sont importants (intestin, rein, foie) constitue une adaptation judicieuse.

GLUT2 possède 524 acides aminés, un poids moléculaire de 57 kDa, et est à 55 % identique à son homologue des érythrocytes GLUT1 (Fukumoto et al. 1988). Sa topologie prédite serait similaire à celle de GLUT1, avec 12 segments transmembranaires et les extrémités N-terminale et C-terminale du côté intracellulaire (Thorens et al. 1988). Comme on le constate sur la Figure I.9, les segments transmembranaires semblent être reliés par de très courtes boucles extra-membranaires, à l'exception de la longue boucle entre les segments 6 et 7.

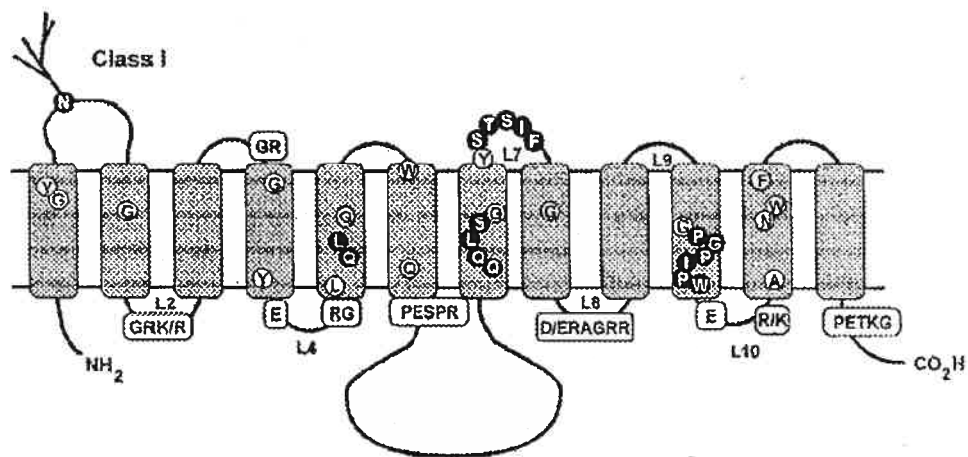


Figure I.9 Topologie des GLUT de la classe I, dont GLUT2 fait partie.

Tiré de (Joost et Thorens 2001).

Les études plus approfondies concernant la structure des transporteurs de glucose ont surtout été accomplies avec GLUT1. Cependant, les autres transporteurs facilités de glucose lui sont assez homologues pour qu'on puisse extrapoler les résultats avec GLUT1 à la structure tertiaire de tous les GLUTs (Hruz et Mueckler 2001). Bien qu'aucune structure cristalline ne soit disponible pour une protéine qui soit assez homologue aux transporteurs de glucose, la mutagenèse dirigée et des études d'accessibilité ont permis d'accumuler une quantité impressionnante d'indices sur la disposition tridimensionnelle des acides aminés

(pour une revue récente sur la structure de GLUT1 : Hruz et Mueckler 2001). De plus, des expériences d'échange du deutérium indiquent que 80 % des acides aminés de GLUT1 sont accessibles à l'eau (Alvarez et al. 1987). Ceci est cohérent avec l'existence d'une importante cavité aqueuse dans la protéine qui pourrait éventuellement être reliée à la perméabilité osmotique considérable des GLUT (Fischbarg et al. 1990; Iserovich et al. 2002). La présence de deux pores aqueux dans la protéine a même été récemment suggérée, suite aux résultats obtenus avec le mutant simple T310I de GLUT1, qui a pour effet de réduire le transport de glucose tout en augmentant la perméabilité osmotique (Iserovich et al. 2002). La Figure I.10 et la Figure I.11 présentent deux modèles récemment proposés pour l'organisation tridimensionnelle de GLUT1.

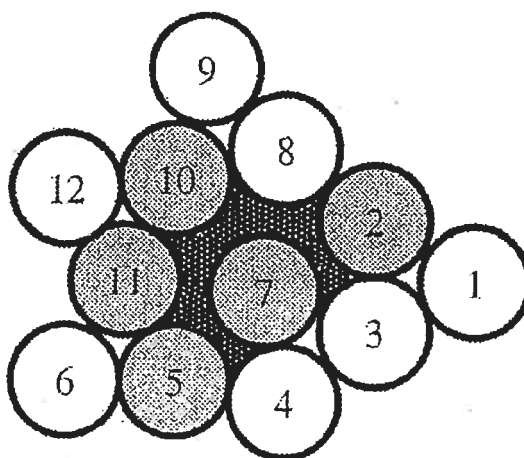


Figure I.10 Modèle proposé pour l'empaquetage des hélices transmembranaires de GLUT1.

Tiré de (Hruz et Mueckler 2001).

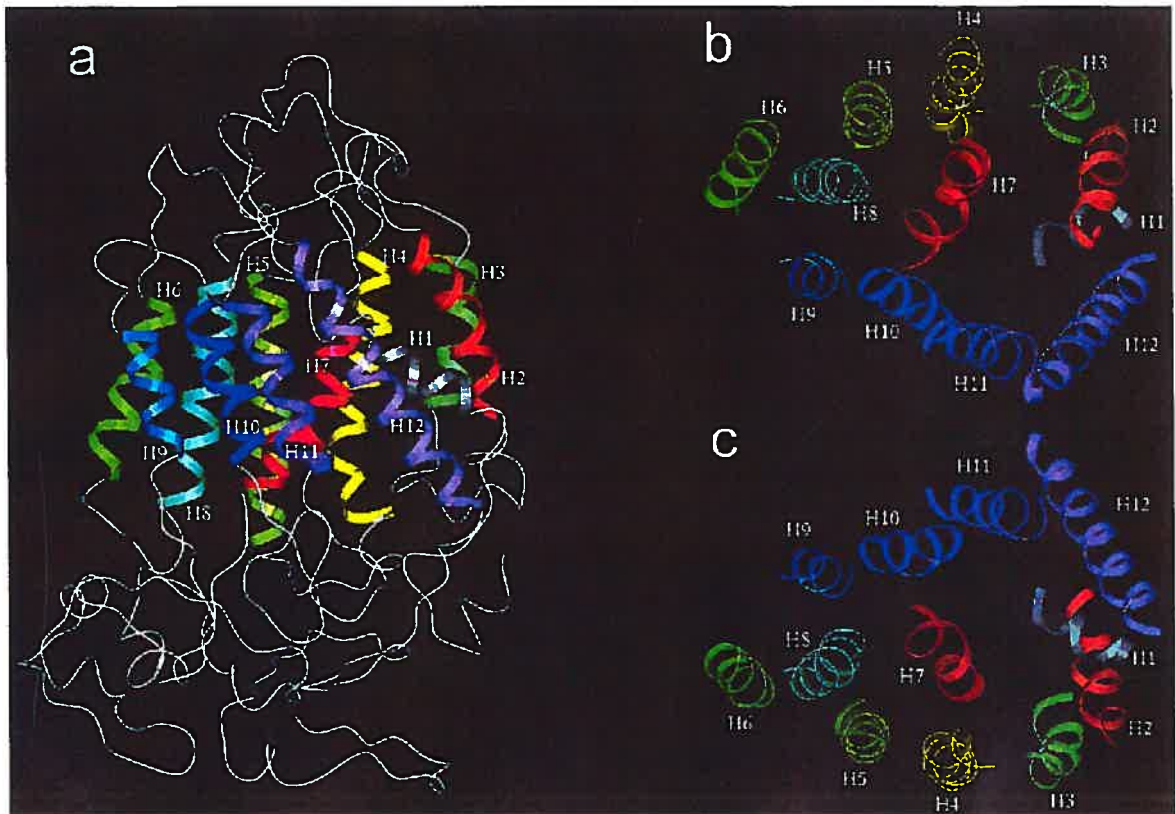


Figure I.11 Modèle tri-dimensionnel proposé par Zuniga et al.

A Vue de côté. B Vue à partir du côté extracellulaire. C Vue à partir du cytoplasme.

Cette prédiction (Zuniga et al. 2001) est basée sur l'empaquetage des hélices proposé pour la lactose perméase et sur les prédictions de structure secondaire, puis fut raffiné avec des minimisations d'énergie et des simulations de dynamique moléculaire.

Les conclusions quant à l'oligomérisation des GLUTs sont très variées. Certaines études indiquent que chaque monomère de GLUT à la membrane plasmique formerait une unité fonctionnelle (Jacobs et al. 1987; Lundahl et al. 1991; Burant et Bell 1992). Cependant, des expériences effectuées dans d'autres conditions semblent suggérer une activité de GLUT1 sous forme de dimère (Jarvis et al. 1986; Pessino et al. 1991) ou de

tétramère. Il a même été suggéré par le groupe de Carruthers que GLUT1 puisse fonctionner en tétramère avec une certaine coopération entre les sous-unités, ce qui donnerait à l'état d'oligomérisation un certain rôle dans la modulation du transport de glucose (Hebert et Carruthers 1992; Zottola et al. 1995; Hamill et al. 1999). Il semble donc qu'il n'y ait pas encore de consensus quant à l'état oligomérique des transporteurs de glucose. Cependant, la cinétique d'ovocytes coexprimant GLUT2 et GLUT3 n'offrait pas la possibilité d'hétérotétramères, et la coexpression de GLUT3 et d'un mutant non fonctionnel de GLUT3 n'altérait pas la cinétique non plus (Burant et Bell 1992). Ainsi, si l'unité fonctionnelle de GLUT3 à la membrane des ovocytes est le monomère, il est bien possible que ce soit aussi le cas pour GLUT2.

Le transport de substrat par les GLUTs semble à priori obéir à une cinétique michaelienne simple. Cependant, une asymétrie entre les flux de glucose entrants et sortants des érythrocytes ou des adipocytes a pu être observée (Cloherty et al. 1995; Cloherty et al. 1996). Pour expliquer cette asymétrie, l'équipe de Carruthers propose un influx biphasique provenant d'une occlusion, modulée par l'ATP, du glucose dans une sorte de cage à l'intérieur de la protéine (Heard et al. 2000; Cloherty et al. 2002). Les opinions quant à la liaison du glucose sont aussi quelques peu divisées. Suite à des études de liaison d'inhibiteurs spécifiques, il a pu être déduit que deux sites de liaison du glucose spatialement distincts étaient présents dans la protéine. En effet, des inhibiteurs compétitifs semblent se lier spécifiquement du côté cytosolique ou extracellulaire (Bell et al. 1993). Le modèle le plus simple actuellement proposé implique un mouvement de la protéine entre deux conformations exposant alternativement les sites de liaison extracellulaire ou intracellulaire (voir les revues Carruthers 1990; Bell et al. 1993). Cependant, des modifications à ce modèle ont été suggérées. Par exemple, le fonctionnement de GLUT1 en tétramère avec une coopération entre les sous-unités pourrait apporter une explication à l'accessibilité simultanée des deux sites de liaison qui a pu être observée (Hebert et Carruthers 1992; Sultzman et Carruthers 1999). De cette façon, deux sites de liaison

intracellulaire et deux sites de liaison extracellulaire seraient exposés en tout temps pour chaque tétramère.

Chapitre II L'accumulation de glucose peut expliquer les flux d'eau initiaux générés par le cotransport Na⁺/glucose

Le présent chapitre, contenant l'article *Glucose accumulation can account for the initial water flux triggered by Na⁺/glucose cotransport*, constitue le coeur de mon mémoire de maîtrise. Cet article a été soumis au *Biophysical Journal* le 12 juin 2003, accepté moyennant des corrections mineures et resoumis le 22 août 2003.

En tant que première auteure, je fut responsable de sa rédaction en entier. J'ai effectué toute l'analyse qui s'y retrouve, ainsi que la majorité des expériences. Les résultats qui ont été recueillis par d'autres chercheurs du laboratoire soit relèvent d'expériences qui ont été effectuées avant mon arrivée à la maîtrise (Bernadette Wallendorf, technicienne), soit sont complémentaires à des expériences que j'ai faites (Pierre Bissonnette, biologiste cellulaire et moléculaire), soit sont issus de la répétition d'expériences que j'avais déjà effectuées, mais que nous souhaitions refaire dans des conditions légèrement différentes (ceci a permis à un étudiant d'été, Louis-Martin Deslandes, d'appréhender la technique utilisée).

Un second article de revue auquel j'ai participé est aussi joint en annexe.

Glucose accumulation can account for the initial water flux triggered by Na⁺/glucose cotransport

Marilène P. Gagnon, Pierre Bissonnette, Louis-Martin Deslandes, Bernadette
Wallendorf, Jean-Yves Lapointe.

Groupe d'étude des protéines membranaires (GÉPROM) & Département de
Physique, Université de Montréal, Canada

Corresponding address : Jean-Yves Lapointe
Groupe d'étude des protéines membranaires
(GÉPROM)
Université de Montréal
C.P.6128, succ. centre-ville
Montréal, Québec
H3C 3J7
CANADA
email: [REDACTED]

Running title :

Glucose accumulation and water flux

keywords :

SGLT1, *Xenopus laevis* oocytes, volume measurement, water transport,
water cotransport, osmotic permeability.

Abstract

Over the last decade, several cotransport studies have led to the proposal of secondary active transport of water, challenging the dogma that all water transport is passive. The major observation leading to this interpretation was that a Na^+ influx failed to reproduce the large and rapid cell swelling induced by Na^+ /solute cotransport. We have investigated this phenomenon by comparing a Na^+ /glucose (hSGLT1) induced water flux to water fluxes triggered either by a cationic inward current (using ROMK2 K channels) or by a glucose influx (using GLUT2, a passive glucose transporter). These proteins were overexpressed in *Xenopus* oocytes and assayed through volumetric measurements combined with double-electrode electrophysiology or radioactive uptake measurements. The osmotic gradients driving the observed water fluxes were estimated by comparison with the swelling induced by osmotic shocks of known amplitude. We found that, for equivalent cation or glucose uptakes, the combination of substrate accumulations observed with ROMK2 and GLUT2 are sufficient to provide the osmotic gradient necessary to account for a passive water flux through SGLT1. Despite the fact that the Na^+ /glucose stoichiometry of SGLT1 is 2:1, glucose accumulation accounts for 2/3 of the osmotic gradient responsible for the water flux observed at $t=30\text{s}$. It is concluded that the different accumulation processes for neutral vs charged solutes can quantitatively account for the fast water flux associated with Na^+ /glucose cotransport activation without having to propose the presence of secondary active water transport.

Introduction

Understanding water transport through biological membranes has been a subject of continuous interest for the past fifty years. Measurements of activation energies, water permeabilities and sensitivity to mercurial inhibitors have led to the conclusion that certain proteins are responsible for mediating a significant portion of measured water flux. The first membrane proteins clearly identified to be water permeable were the facilitated glucose transporters (GLUTs) ; inhibitors of glucose transport significantly reduced the osmotic water permeability of J774 macrophages (Fischbarg et al. 1989), and overexpression of GLUT1, GLUT2 and GLUT4 isoforms in *Xenopus* oocytes increased their water permeability by ~5-fold (Fischbarg et al. 1990). Soon after, a first member of the family of water channels was discovered (Preston et Agre 1991; Zhang et al. 1993), providing a satisfying molecular basis to the contention that water was passing through a specific pathway characterized by a single file of 5 to 9 water molecules (Macey 1984).

The dogma that transmembrane water transport is always passive was first challenged in the early nineties by two studies which suggested that secondary active water transport is mediated by a K^+/Cl^- cotransporter in the choroid plexus epithelium of *Necturus maculosus* (Zeuthen 1991; Zeuthen 1994). Later, using overexpression in *Xenopus* oocytes, the rabbit Na^+ /glucose cotransporter rSGLT1 was proposed to operate as a water pump with a stoichiometry of 260 water molecules per glucose molecule transported (Loo et al. 1996), which was later re-evaluated to 390-424 water molecules per glucose . A series of publications then reported observations of water cotransport for several other cotransporters expressed in *Xenopus* oocytes: the human Na^+ /glucose cotransporter hSGLT1 (Meinild et al. 1998), the Na^+ /glutamate cotransporter EAAT1 (MacAulay et al. 2001), the Na^+ /dicarboxylate cotransporter (Meinild et al. 2000), the Na^+ /iodide cotransporter (mentioned in Loo et al. 1996; Meinild et al. 2000) and the H^+ /amino acid cotransporter (mentioned in Loo et al. 1996; Meinild et al. 2000), with stoichiometries ranging from 50 to 400 water molecules per transport cycle.

The most direct evidence supporting water cotransport is the observation that the initial water flux generated by a pure ionic inward current is much smaller than the water flux induced by a Na^+ /solute cotransport current of similar amplitude. This has been observed for cation pores including gramicidin (Meinild et al. 1998; Zeuthen et al. 2001) and nystatin (Zeuthen et al. 1997), as well as for cation channels such as connexin 50 (Wright et Loo 2000) and ROMK2 (Duquette et al. 2001). The delay (~1 min) observed between current stimulation and measurable volume increase has been interpreted as an experimental measurement of the time required to build a significant osmotic gradient. Consequently, it was assumed that the early swelling of an oocyte following the start of Na^+ /glucose cotransport was too fast to be osmotically-driven.

While it is acknowledged that a pure cation influx fails to reproduce the early water flux observed with Na^+ /glucose cotransport, it is not known whether a pure glucose influx would do the same. In fact, the osmotic consequences of an accumulation of ions may not be the same as the effects of cytosolic accumulation of a neutral solute like glucose. The present study is aimed at evaluating the osmotic effect of a glucose influx vs the effect of a cation influx by separately expressing a facilitated glucose transporter and a cation channel in oocytes. Volumetric measurements during transport allow osmolyte local accumulations to be deduced. The accumulations corresponding to K^+ , 2-deoxyglucose (2DG) and Na^+ /glucose are calculated for ROMK2, GLUT2 and SGLT1-expressing oocytes, respectively. A comparative analysis of these accumulations demonstrates that glucose accumulates much faster than do ions, which can quantitatively explain the early water flux that accompanies stimulation of Na^+ /glucose cotransport.

Materials and Methods

Oocyte injections and incubation

Preparation of the *Xenopus laevis* oocytes and cRNA injection with human SGLT1 or rat ROMK2 mRNA were done as previously described (Duquette et al. 2001; Coady et al. 2002). For GLUT2 expression, oocytes were injected with 46 nl of solution containing 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of human GLUT2 cRNA. They were then incubated for 4-7 days at 18°C in Barth's solution (in mM : 90 NaCl, 3 KCl, 0.82 MgSO_4 , 0.41 CaCl_2 , 0.33 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 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.

With hSGLT1-expressing oocytes, the bathing medium (control solution) used for volumetric measurements had the following composition (in mM) : 50 NaCl, 3 KCl, 0.82 MgCl_2 , 0.74 CaCl_2 , 5 HEPES and 85 mannitol, resulting in a measured osmolality of 197 mosm/kg of water. Solutions containing α -Methylglucose (α MG) were obtained by replacing 5 mM mannitol with 5 mM α MG. The bathing medium for ROMK2-expressing oocytes was the same as for SGLT1 experiments, except that 20 mM KCl was present rather than 3 mM and 50 mM mannitol was used rather than 85 mM. In experiments with GLUT2-expressing oocytes, 5 mM 2-deoxyglucose (2DG) was used as a non-metabolizable substrate in replacement of 5 mM mannitol.

For all experiments, hypotonic solutions were obtained by omitting 20 mM mannitol from the control solutions. Osmolalities were verified within ± 2 mosm/kg H_2O using a freezing point osmometer (Advanced DigiMatic Osmometer, model 3D2, Advanced Instruments, Needham Heights, MA).

Electrophysiology

The two-electrode voltage clamp technique was used as previously described (Bissonnette et al. 1999; Duquette et al. 2001). Electrode tips were filled with a cushion layer of 1 % agarose in 1 M KCl in order to reduce cell swelling associated with KCl leakage into the cytosol (Schreibmayer et al. 1994).

SGLT1-injected oocytes were clamped at -50 mV before stimulating a cotransport current by superfusing the α MG-containing solution. ROMK2-expressing oocytes were unclamped and a K^+ current between 0.8 and 1.5 μ A was then generated by rapidly clamping to a pre-set potential which was 1 to 3 mV more negative than the resting potential. GLUT2-injected oocytes were not clamped, but simply held in place by microelectrodes or suction pipettes of ~ 150 μ m tip diameter.

Optical measurements

The apparatus used for volumetric measurement was a new version of one previously described (Duquette et al. 2001). The perfusion rate was about 2 ml/min, and solution changes were controlled by an electrical valve and characterized by a total dead space of 50 μ l between the solution selector and the experimental chamber. The bath had a volume of ~ 120 μ l, and 80 % of the solution change was achieved within 3 s, as judged by the time required for the cotransport current to reach 80 % of its final value after applying a 5 mM concentration of α MG.

The oocyte was illuminated from above, and its cross section was continuously measured from below using a CCD camera (model CCD72, Dage-MTI, Michigan, IN), through the 3x objective of an inverted microscope. Custom-made software counted the pixels corresponding to the oocyte's cross section every 0.2 s and the data points were later averaged to obtain 1 point per s. Assuming the oocyte is spherical, and calibrating the system with a steel ball of known diameter, we could then translate the cross sectional

recordings into volume measurements. A noise level of 0.05 % of the volume measurement could usually be reached. Before starting the experiments, oocytes were equilibrated for at least 20 minutes in substrate-free bathing medium to obtain a stable volume measurement. However, a certain endogenous volume change could still be occasionally observed before starting the experiment. This volume change rate averaged 0.14 ± 0.26 , 0.17 ± 0.25 and -0.7 ± 0.5 $\text{pL}\cdot\text{s}^{-1}$ for SGLT1-, ROMK2- and GLUT2-expressing oocytes, respectively, and was subtracted from the raw measurements before further analysis.

Isotopic uptakes in oocytes

GLUT2-expressing oocytes were rinsed twice with substrate-free Barth's solution and transport was initiated by exposing a group of 4 to 6 oocytes to the transport solution containing 5mM 2-DG ($1\mu\text{Ci/ml}$ $[1,2]^3\text{H}$ 2DG, PerkinElmer - New England Nuclear, Boston, MA). The non-specific fraction of uptake was determined by similar incubation of oocytes in media containing 200 μM phloretin. The oocytes were incubated at room temperature for the required incubation time in 1 ml of transport media. The incubation was stopped by rapid removal of transport media followed by addition of 2 ml ice-cold substrate-free media. The oocytes were rinsed a further three times and individually transferred to scintillation vials. Digestion of the oocytes were performed by addition of 0.2 ml 10% SDS for two hours prior to addition of scintillation cocktail (Beta Blend (ICN, Irvine, CA)). The vials were counted for tritium activity using an LS6000 SC scintillation counter (Beckman, Fullerton, CA).

Analysis

In order to determine the osmotic pressure necessary to account for the water fluxes observed during transport, we exposed each oocyte to an osmotic shock of -20 mOsm at the end of each experiment. From the ratio of the slope of swelling during transport to the

change in swelling rate induced by the hypotonic shock, we could deduce the osmotic gradient corresponding to any observed swelling rate for that particular oocyte. The hypotonic shock also provided us with the apparent water permeability (L_p , in $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$) of the oocyte being tested using the following equation :

$$L_p = \frac{1}{\Delta\pi \times \bar{v}_w \times S} \left(\frac{dV}{dt} - \frac{dV}{dt_0} \right), \quad (1)$$

where dV/dt is the initial slope of swelling following the osmotic shock in $\text{cm}^3\cdot\text{s}^{-1}$, dV/dt_0 is the baseline swelling observed immediately before the osmotic shock, $\Delta\pi$ is the amplitude of the osmotic shock triggered (20 mOsm in all cases here), \bar{v}_w is the water-specific molar volume ($18.2 \text{ cm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$) and S is a standard oocyte surface of 0.4 cm^2 considering a membrane infolding factor of 8.5 to 9.5-fold (Zampighi et al. 1995).

Spontaneous volume changes of the order of 0.3 to 0.4 nl are present throughout our volume measurements. As these volume changes occur with characteristic time courses of ~ 10 s, they can significantly affect our time to time estimation of cell swelling rate. Consequently, in order to get an accurate estimation of water flux at any time, a continuous function was fitted to the volume data. For SGLT1 and ROMK2, a function was used where the swelling rate starts from an initial value (m_0) and exponentially reaches a second level (m_0+dm), as follows :

$$\text{slope} = m_0 + dm(1 - \exp(-t/\tau)) \quad (2)$$

This function was integrated to give a volume-time empirical relation, and the four parameters (m_0 , dm , τ and an initial volume) were numerically adjusted to minimize the chi-squared value. The parameters m_0 and dm were allowed to take any positive or negative value and no restriction was set on τ . Figure 1 shows an example of the empirical fit for an SGLT1-expressing oocyte exposed to 5 mM αMG . These fitted curves provide a good match to the slightly noisy volume curves, without being influenced by brief (<10 s), spontaneous volume changes.

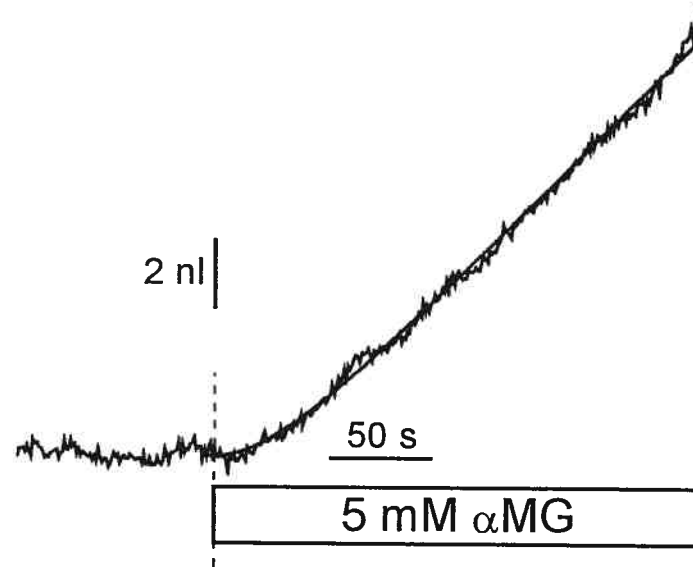


Figure 1 Volumetric measurement of an SGLT1-expressing oocyte exposed to 5 mM α -methyl-glucose.

Empirical fit (*smooth line*) of this experimental data (*jagged line*), using Eq. 2 with the following parameters : $m_0 = -13 \text{ pL}\times\text{s}^{-1}$, $dm = 72 \text{ pl} \times \text{s}^{-1}$, $\tau = 31.7 \text{ s}$ and initial volume = $0.901 \text{ }\mu\text{l}$.

For GLUT2-injected oocytes, since 2DG transport decreases over time, the volume curve did not simply accelerate to a steady-state swelling as was the case for channels and electrogenic cotransporters. Hence, we needed to use a different empirical function, where the cell swelling rate starts from an initial value, reaches a maximum, and progressively relaxes to a lower rate corresponding to a reduced, steady-state 2DG influx maintained by its continuous phosphorylation in the cytosol. We chose to describe this cell swelling rate by the addition of 2 Boltzmann equations as follows :

$$\text{slope} = \frac{\Delta A}{1 + e^{\frac{t_{50A} - t}{\tau_a}}} + \frac{\Delta B}{1 + e^{\frac{t_{50B} - t}{\tau_b}}} \quad (3)$$

With such an equation, the swelling rate can experience two transitions (ΔA and ΔB) centered at times t_{50A} and t_{50B} , and with time constants τ_a and τ_b . The second transition always resulted in a negative ΔB , corresponding to the low steady-state 2DG uptake rate (see Figure 3). Note that this equation allows for a non-zero initial swelling rate.

All numbers are given as means \pm SEMs with "n" corresponding to the number of experiments, unless otherwise stated. The experiments were always done using oocytes from at least two different donors.

All of the analysis and calculations were performed using Matlab 5.3.1 software (The Math Works Inc., Natick, MA), except for the empirical volume curve optimizations which were done using Origin 6.1 (OriginLab Corporation, Northampton, MA).

Results

Osmotic gradients generated by cation influx

The water flux activated by Na^+ /glucose cotransport was first compared to the osmotic water flux generated by a cationic inward current of similar amplitude using the ROMK2 potassium channel. Figure 2 *A* depicts typical experiments with ROMK2 and SGLT1-expressing oocytes. For comparable currents (SGLT1 and ROMK2 currents averaged 880 ± 120 nA and 950 ± 90 nA, respectively), SGLT1 activation clearly generates a much larger initial water flux (Figure 2 *B*). As can be seen from the effects of a 20 mOsm hypotonic shock (Figure 2 *A*), oocytes expressing SGLT1 also display a larger apparent water permeability (L_p , $6.8 \pm 0.9 \times 10^{-4}$ cm·s⁻¹, $n = 5$) vs ROMK2-expressing oocytes ($2.5 \pm 0.1 \times 10^{-4}$ cm·s⁻¹, $n = 5$), the L_p values of which are quite similar to the values reported by this laboratory for non-injected oocytes, $L_p^{\text{control}} = 2.12 \pm 0.14 \times 10^{-4}$ cm·s⁻¹ ($n = 21$, Duquette et al. 2001). This difference in L_p values is taken into account when a local osmolality gradient ($\Delta\pi$) is calculated by comparing the rate of volume change during current stimulation to the rate of cell swelling induced by a 20 mOsm hypotonic gradient. Normalizing to a standard 1 μ A inward current, comparison of the calculated osmotic gradient at $t = 30$ s indicates that 5.3 ± 1.5 mOsm ($n=5$) is required to explain the swelling rate of SGLT1-expressing oocytes while the transport-related water influx into ROMK2-expressing oocytes only corresponds to a gradient of 1.5 ± 0.3 mOsm ($n=5$). This confirms previous observations used to support the contention that the osmotic gradient generated by a given ionic influx is unable to explain the fast initial cell swelling associated with a similar current through SGLT1. Assuming that the current electrode is not injecting a significant amount of osmolytes (see Discussion), the cation entry would be expected to account for 2/3 of the osmolyte accumulation observed after stimulating a cotransport of 2 Na^+ ions for 1 α MG molecule. Analysis of the present series of experiments indicates that the cation uptake can account for only 29 ± 10 % of the osmotic gradient needed to explain the water flux observed at 30 s for the SGLT1 cotransporter. This would leave a dominant portion of the cotransport-associated water flux to be explained by either glucose accumulation or water cotransport.

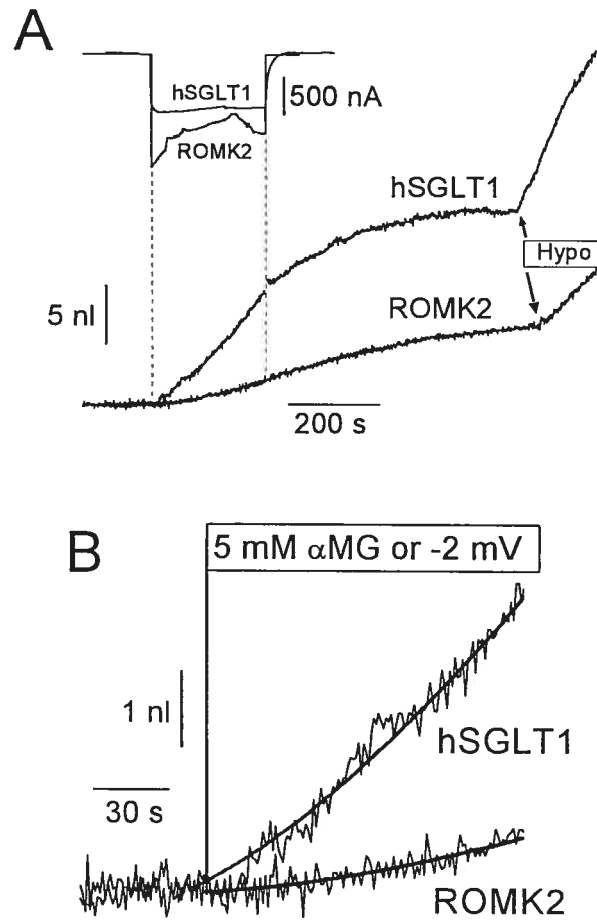


Figure 2 Comparative volumetric analysis between hSGLT1-expressing and ROMK2-expressing oocytes.

(A) Comparison of long time-course experiments, including an hypotonic shock of -20 mosm/kg at the end of each experiment. (B) Enlarged depiction of early events in volume changes. The water flow at 30 s of transport was determined from the slope of the empirical fit. For these specific experiments, the water permeabilities were $6.13 \times 10^{-4} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ for the SGLT1- and $2.38 \times 10^{-4} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ for the ROMK2-expressing oocyte. The osmotic pressures deduced from their swelling at $t = 30$ s are, after normalization to a standard $1 \mu\text{A}$ current, 6.8 mOsm and 1.7 mOsm for SGLT1 and ROMK2, respectively.

Osmotic gradients specifically generated by a glucose influx

A similar approach can be used to compare the water influx generated by activation of either the Na^+ /glucose cotransporter or the facilitated glucose transporter. The hepatic form of the glucose transporter, GLUT2, was chosen for its high expression level in oocytes. To make a significant water fluxes comparison, glucose uptakes through GLUT2 must be similar to the one through SGLT1. Since 2-DG transport by GLUT2 is not electrogenic, isotopic uptake measurements were first performed on a large number of GLUT2-expressing oocytes (Figure 3, filled circles with error bars represent the average and SE of 4 to 5 individual assays performed as described in the Material and Methods section). The mean 2DG uptake after 30 s is 0.23 ± 0.02 nmol per oocyte ($n = 4$). This initial uptake rate would be equivalent to a Na^+ /glucose cotransport current of 1500 nA. The uptake rate then relaxes to 0.07 nmol/min after 3-4 min, equivalent to a 225 nA cotransport current in the steady-state period. This period is believed to correspond to the condition where the rate of 2DG entry matches that of intracellular 2DG phosphorylation (Gould et al. 1991; Colville et al. 1993). In comparison, the present series of SGLT1-expressing oocytes averaged a cotransport current of 880 ± 120 nA ($n=5$) so that, as shown in Fig 3, the amount of sugar uptakes through SGLT1 and through GLUT2 are similar at $t=120$ s.

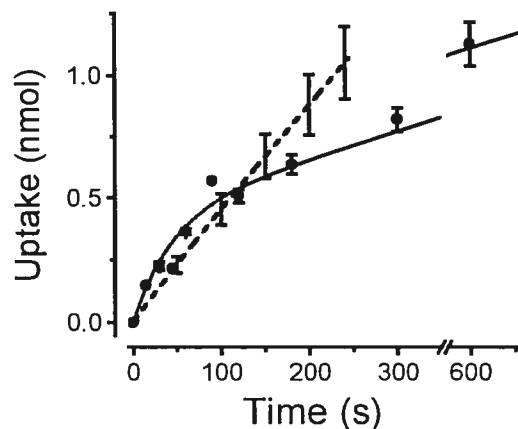


Figure 3 Determination of 2-deoxyglucose (2DG) uptake by GLUT2-expressing oocytes.

The filled circles represent the uptake of radiolabelled 2DG into GLUT2-expressing oocytes averaged over up to 5 different batches of oocytes. Error bars are shown for time points where the uptake represents at least 4 individual experiments. The smooth curve accompanying the 2DG uptake data is fitted to the data (see Appendix). For comparison, the dashed line represents α MG transport into SGLT1-injected oocytes ($n = 5$) as obtained from the cotransport current integration divided by 2.

The cell swelling corresponding to 2DG uptake was surprisingly fast (see Fig 4 *A* and *B*). In the first min of transport, the cell swelling observed for GLUT2-expressing oocytes is comparable to that for SGLT1-expressing oocytes and is much larger than the swelling observed in ROMK2-expressing oocytes (Figure 2 *B*). GLUT2 apparent water permeability averaged $8.1 \pm 0.8 \times 10^{-4} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ($n=9$).

As described for ROMK2, the size of the transport-generated osmotic gradient can be calculated by using the hypotonic cell swelling recorded in each experiment, followed by normalization for a 1 μA equivalent cotransport current. At 30 s, this calculation yields an effective osmotic pressure of $2.8 \pm 0.2 \text{ mOsm}$, compared to $5.3 \pm 1.5 \text{ mOsm}$ for SGLT1. Glucose accumulation could therefore explain $52 \pm 16 \%$ of the osmotic pressure observed 30 s after the triggering of Na^+ /glucose cotransport current, which is larger than the one third proportion expected from the stoichiometry of this cotransport. Figure 4 *C* summarizes the comparison between the osmotic gradients estimated at $t=30 \text{ s}$ for SGLT1, GLUT2 and ROMK2 after normalizing transport rates to 1 μA (or 5 pmol s^{-1} for 2DG uptake using the 2:1 stoichiometry of SGLT1). At $t = 30 \text{ s}$, addition of the separate contributions from cations and sugar uptakes can account for $81 \pm 19 \%$ of the osmotic gradient needed to explain the water flux associated to stimulation of Na^+ /glucose cotransport without having to invoke a secondary active mechanism.

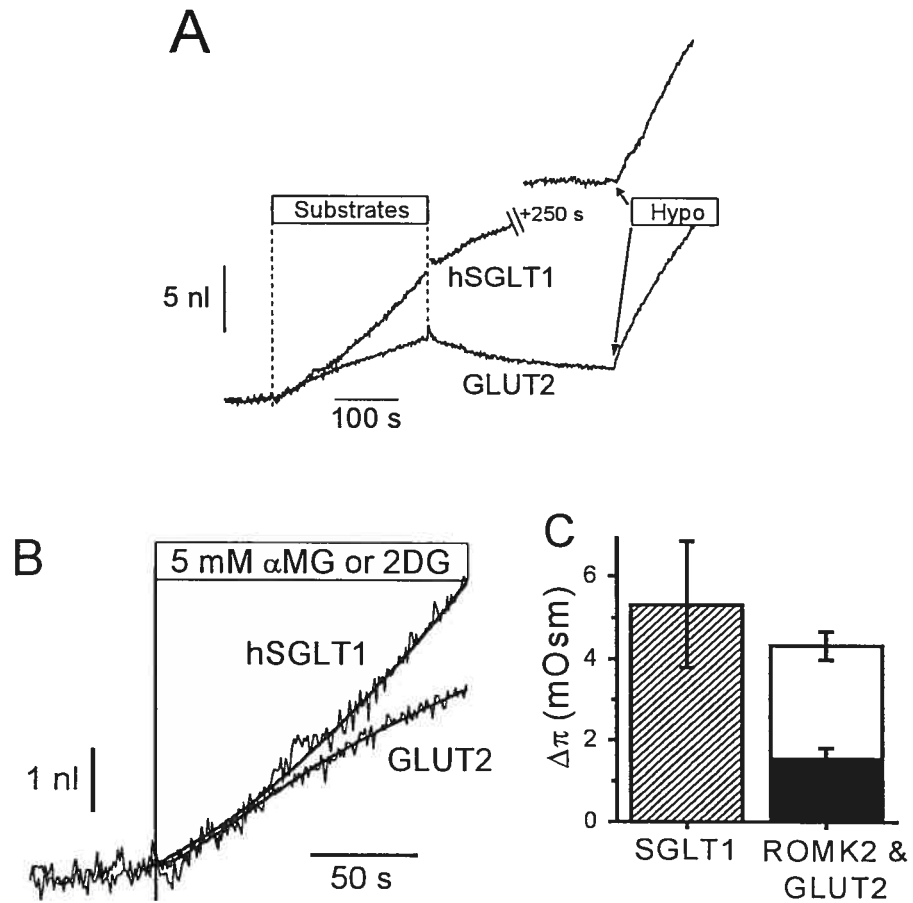


Figure 4 Comparative volumetric analysis between SGLT1- and GLUT2-expressing oocytes.

(A) Transport was stimulated for 250 s by the addition of 5 mM α MG or 5 mM 2DG for SGLT1- and GLUT2-expressing oocytes, respectively. An hypotonic shock of -20 mosm/kg is imposed at the end of each experiment in order to determine the L_p value.

(B) Enlargements of the volume changes presented in panel A. The water flows after 30 seconds of transport were determined from the slopes of the empirical fits (smooth lines shown in panel B). For these specific experiments, the water permeabilities were 6.13×10^{-4} $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ for the SGLT1- and 6.97×10^{-4} $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ for the GLUT2-expressing oocyte and the osmotic pressures deduced from their swelling at $t = 30$ s and normalized for the equivalent of a $1 \mu\text{A}$ cotransport current are 6.8 mOsm and 3.4 mOsm, respectively.

(C) Osmotic pressures determined from the ratios between swelling at 30 s and initial slope of the hypotonic shock (n=5, 5 and 9 for SGLT1, ROMK2 and GLUT2, respectively). The osmotic pressures were normalized for an equivalent 1 μA cotransport current at $t = 30$ s (which, for GLUT2, corresponds to $2\times$ the 2DG uptake multiplied by the Faraday constant of $96\,490\text{ Coul} \times \text{mol}^{-1}$). The mean ROMK2 value (*filled bar*) accounts for 29 ± 10 % of the SGLT1 value and the mean GLUT2 value (*open bar*) accounts for 52 ± 16 % of the SGLT1 value.

Data analysis

The analysis presented so far for a single time point of 30 s takes advantage of the fact that the initial uptake rates for oocytes expressing SGLT1, ROMK2 or GLUT2 were of similar amplitudes. This analysis cannot be carried over time as the time course of 2DG uptake differs somewhat from the rather stable Na⁺/glucose cotransport rate and the slowly declining ROMK2-mediated K current. An interesting alternative analysis is to compute the effective local concentration reached not as a function of time but as a function of the amount of solute transported for each type of expressing oocyte.

The actual local concentration of a transported solute (i.e. the concentration that is felt by the membrane) is distinct from the effective $\Delta\pi$ as the latter also includes a global intracellular dilution due to the measured amount of water uptake. As water fluxes are not identical for ROMK2, GLUT2 or SGLT1-expressing oocytes, the diluting effect of each water influx must be separately taken into account in order to estimate the true amounts of Na⁺, glucose or K⁺ accumulated. As water enters the oocyte (generating a volume increase of ΔV), it has a predictable diluting effect (Δosm) which is given by Eq. 4 as a function of the initial accessible volume V_{acc} and the initial internal osmolarity osm_{in} (assumed to be 197 mOsm). Once this volume is increased to $V_{\text{acc}} + \Delta V$, simple conservation calculations lead to the following decrease in osmolarity :

$$\Delta\text{osm} = \text{osm}_{\text{in}} \times \Delta V / V_{\text{acc}} , \quad (4)$$

given that $\Delta V \ll V_{\text{acc}}$. The accessible fraction of the volume was chosen as 0.4, in accordance with the data of Zeuthen et al. (Zeuthen et al. 2002) and with data from tritiated water experiments from our own laboratory (data not shown). The volume-time curve from the fitted equations described previously was used to obtain ΔV at any time. For example, at $t=30\text{s}$, the correction Δosm is minimal and amounts to 0.27 ± 0.1 mM, 0.05 ± 0.03 mM and 0.34 ± 0.07 mM for SGLT1, ROMK2 and GLUT2 respectively. At $t = 60$ s, the correction is more substantial and amounts to 0.75 ± 0.20 mM, 0.14 ± 0.05 mM, and 0.80 ± 0.15 mM for SGLT1, ROMK2 and GLUT2 respectively. When these corrections are

incorporated into the results, the real accumulation of transported substrates as a function of time can be calculated ($\text{accumulation (t)} = \Delta\pi (t) + \Delta\text{osm (t)}$) for oocytes expressing the three proteins studied (Figure 5). It is interesting to see that, in the case of GLUT2, the concentration of transported osmolytes reaches 4 mM within the first 30 s before experiencing a much slower steady state rate for the remaining of the experiment duration. This is what one would expect from a facilitated transporter exposed to 5 mM external 2DG and presenting an uptake rate that rapidly declines to 15 % of its initial rate as seen in Figure 3. This provides a good support to the assumptions made and to the accuracy of the intracellular concentration calculations based on volume measurements.

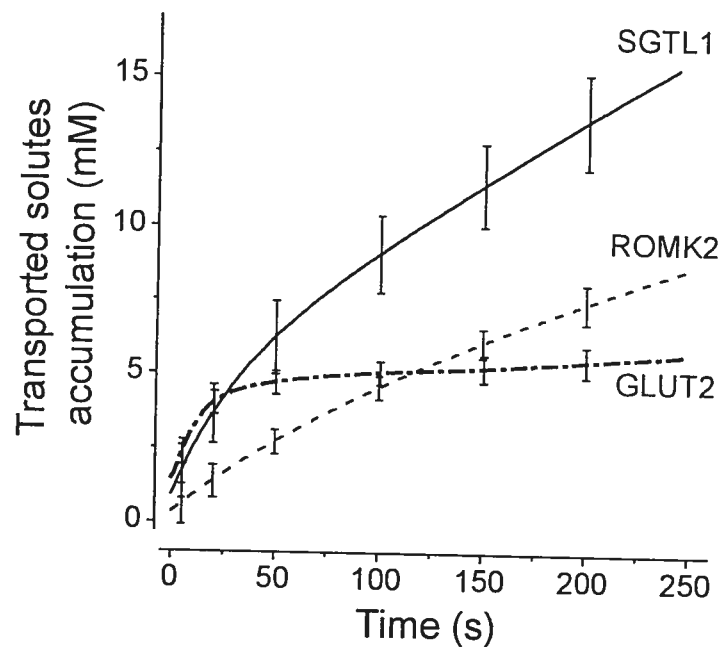


Figure 5 Corrected solute accumulation as a function of time

Corrected solute accumulation as a function of time for SGLT1 (full line, n=5), ROMK2 (dashed line, n=5), and GLUT2 (dash-dotted line, n=9). The corrections compensate for the global dilution due to water entry and are applied to each individual experiment before averaging.

Integration of the inward current observed in each experiment yields the uptake-time curves of K^+ for ROMK2 and of Na^+ (or αMG) for SGLT1. To compare the accumulations at any time, a continuous estimation of 2DG uptake in GLUT2 oocytes was also needed. The time course of 2DG uptake by GLUT2-expressing oocytes is relatively simple. The initial uptake rate is fast and progressively relaxes to a slower, linear uptake, the slope of which reflects the steady-state phosphorylation rate of intracellular 2DG. The experimental data could be fitted (Figure 3, smooth curve) to a theoretical equation obtained from the analysis of such an uptake mechanism (see Appendix 1). This fit is then used as the uptake/time curve for the volume experiments with GLUT2.

Using the uptake-time curves obtained for SGLT1, ROMK2 and GLUT2 expressing oocytes, the time axis of Figure 5 can be transformed into an uptake axis as shown in Figure 6 *A*. Since all oocytes did not express at the same level, this relation was calculated for each experiment and averaged afterwards using pre-determined uptake points. It is apparent that 2DG accumulation is about 2 to 3 times larger than K^+ accumulation in the initial phase (K^+ uptake < 0.6 nmol), but becomes progressively similar as uptake continues to increase. Addition of the separate contributions from K^+ and 2DG (Figure 6 *B*) gives rise to a complete reconstruction of the total Na^+ and αMG accumulation needed to explain the swelling of SGLT1-injected oocytes. It is clear that, throughout the uptake range studied, the effective concentration of the solutes transported by SGLT1 can be accounted for by the ion accumulation predicted by ROMK2-expressing oocytes and the sugar accumulation predicted by GLUT2-expressing oocytes.

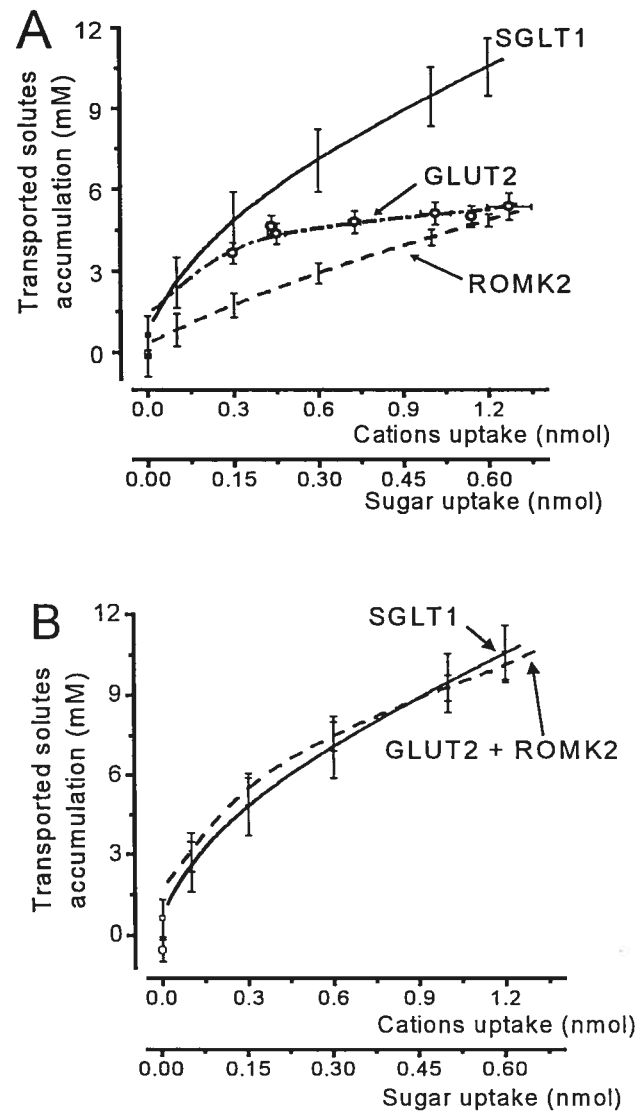


Figure 6 Effective transported osmolyte concentrations as a function of the quantity of substrate transported

(A) Effective transported osmolyte concentrations as a function of the quantity of substrate transported, for SGLT1 ($n=5$, *full line*), ROMK2 ($n=5$, *dashed line*) and GLUT2 ($n=9$, *dotted line and hollow circles*). The values at zero uptake are obtained with linear regressions over the minute preceding the onset of transport. (B) Addition of the substrate accumulations from GLUT2 and ROMK2 (*dashed line, hollow circle at $t = 0$*) reproduces the substrate accumulation calculated from SGLT1 experiments (*continuous line, hollow square at $t = 0$*).

Discussion

In 1996, SGLT1 was proposed to generate a secondary active water flux (Loo et al. 1996) as was previously proposed for the KCl cotransporter of the choroid plexus (Zeuthen 1991; Zeuthen 1994). Water flux through SGLT1 was particularly interesting as the high level of expression in *Xenopus* oocytes allowed for the simultaneous measurement of cotransport current and of oocyte volume with high sensitivity. The oocyte expression system first revealed that the Na⁺/glucose cotransporter has a significant water permeability. For example, in precedent series of experiments, $L_p = 2 \times 10^{-4} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ was obtained for native oocytes while $L_p = 4 \times 10^{-4} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ was obtained for hSGLT1-expressing oocytes (Duquette et al. 2001). This water permeability however stays much smaller than that of aquaporine-expressing oocytes which averages $43 \pm 2 \times 10^{-4} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ (Zeuthen et al. 2001). Although the L_p of a single AQP molecule is estimated to be 10 to 40 times larger than the L_p of SGLT1 (Wright et Loo 2000; Duquette et al. 2001), the passive water permeability of SGLT1 may serve an important role if the lower water permeability of SGLT1 can be compensated by a higher density of this cotransporter vs the AQP1 channel. The small intestine is a good example of a tissue presenting a high density of SGLT1 in the virtual absence of aquaporin (Ma et Verkman 1999). In the original and subsequent publications proposing a water pump activity for SGLT1, (Loo et al. 1996; Zeuthen et al. 1997; Meinild et al. 1998; MacAulay et al. 2001; Zeuthen et al. 2001), the most significant observation supporting the presence of a water cotransport in addition to the osmotically-driven passive water flow was the fact that a pure ionic current of amplitude similar to the cotransport current was completely ineffective in generating any significant water transport within the first minute of transport.

In the present study, we confirm that the cell swelling induced by SGLT1 is much faster than the cell swelling induced by the stimulation of an inward cationic current. By measuring L_p in each experiment, it was possible to show that the difference in swelling rates was not simply due to the larger L_p value of SGLT1 over that of ROMK2. Our analysis has also shown that the accumulation of an osmotic gradient was truly slower for ROMK2- than for SGLT1-expressing oocytes. In the case of ROMK2, a period of at least

30 s is needed to detect a significant osmotic gradient, which is not the case for SGLT1 (see Figure 2 *B*). This confirms the original observation that a cationic flux is significantly less efficient than a cotransport current in generating an early water flux. We aimed at completing this observation by comparing the volume increase induced by the transport of a neutral osmolyte to that induced by SGLT1. If water is cotransported through SGLT1, then the onset of SGLT1-dependent water transport should occur sooner than the water flux related to the combined neutral solute and ionic fluxes. Experimental observations showed that the water flux triggered by GLUT2 was fast and comparable in amplitude to the water flux associated with SGLT1 (Figure 4 *B*). Further analysis shows that, when added to the water flux expected from a cationic current, the water flux associated with glucose transport through a facilitated transporter can quantitatively explain the entire water flux associated with SGLT1 (Figure 6).

How could glucose accumulate faster than accompanying cations?

The comparison of the water flux induced by glucose accumulation in GLUT2-expressing oocytes to the flux associated with cation transport in ROMK2-expressing oocytes suggests that, for similar transport rates, glucose can locally accumulate much faster than K^+ . This can be explained by at least two processes. First, in aqueous solutions, glucose has a diffusion coefficient ($D = 0.60 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) 2.3 fold smaller than that for NaCl ($D = 1.39 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) and ~ 2.8 fold smaller than for KCl ($D = 1.68 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) (Macey 1980). This implies that, for a given transport rate, Na^+ should accumulate at the inner face of the plasma membrane much slower than would glucose. Second, during ion influx through the plasma membrane, electroneutrality must be respected at all times. If it is assumed that the steady-state cell swelling achieved by an SGLT1-expressing oocyte exposed to α MG for several minutes reflects isotonic water transport, it can be estimated that the cotransport of 1 glucose molecule corresponds to the net uptake of 2.6 to 3.3 osmolytes (Table 2 of Zeuthen et al. 2002). This indicates that, for 2 Na^+ ions entering through the plasma membrane, the current electrode will absorb 1 cation from the cytosol and inject one anion from the electrode resulting in the net uptake of 1 glucose and 2 other

osmolytes. As current is injected at the plasma membrane and at the tip of the electrode, it is not straightforward to predict where the osmolality should accumulate. Locally, when a Na^+ ion (or a K^+ ion) is transported through the plasma membrane of an oocyte, it will have to either repel another cation or attract an anion. Measurements with ion-selective microelectrodes in *Xenopus* oocytes yield the following intracellular ionic activities : 9 mM Na^+ , 76 mM K^+ and 24 mM Cl^- (Cougnon et al. 1996). Hence, as the cytosolic ion pool is generally composed of K^+ and negatively charged proteins, it can be expected that intracellular anions will be less mobile than intracellular cations. The preferential displacement of positive charges (mostly K^+) away from the plasma membrane should reduce the capacity of cation influx in generating local osmotic gradients. In other words, when a cation influx is generated at the plasma membrane, an equivalent current is injected at the current electrode and "salt" will accumulate either at the plasma membrane or at the current electrode site, depending on the relative mobilities of cytosolic cations and anions. As time progresses during a stimulated cation influx, the osmolyte accumulation generated around the current electrode will reach the plasma membrane and will add its contribution to the local osmotic gradient, which would explain the water flux that can be detected only after 30 to 60 s. Interestingly, assuming an intracellular diffusion coefficient of $0.2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (see below), half of the osmolytes will have diffused by more than 150 μm in 60 s (Macey 1980). If the distance between the electrode tip and the membrane was 150 μm , this simple diffusion process would explain the delay observed between the onset of an ionic current and the detection of its associated water flux.

Why couldn't GLUT2 be considered as a water cotransporter?

GLUT2-activated 2DG transport can reproduce the early cell swelling triggered by Na^+ /glucose cotransport (Figure 4 A and B). It could be argued that this passive glucose transporter may also function as a molecular water pump. Activation energies of $14.1 \pm 1.2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ and 13-16 $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ were reported for glucose transport into human erythrocytes (Hu et al. 2000) and for the passive water permeability through GLUT1, respectively (Zeidel et al. 1992; Iserovich et al. 2002). This would be consistent with

important conformational changes associated with these activities. If GLUT2 could act as a water pump, a fixed stoichiometry between sugar uptake and the amount of water accompanying it would be expected. With time, as osmotic gradients are building up, the apparent stoichiometry tends to increase toward isotonicity which is ~280 water molecules per osmolyte. If one compares volume flow to 2DG uptake rate (Figure 3 and 4), the apparent stoichiometry would go from 35 to 310 in the first min of transport and would reach 700 water molecule per 2DG at $t=200$ s before slowly relaxing to 280 for a few long experiments lasting up to 900 s (data not shown). As discussed above, this is not consistent with a 2DG/water cotransporter with a fixed stoichiometry. This is, however, expected from a facilitated 2DG transporter which generates a significant osmotic gradient in the first 30-60 s and then continues to stimulate a passive water uptake even after the 2DG transport rate has decreased to a low steady-state level.

Is this consistent with an intracellular diffusion model?

Our lab has recently challenged the water cotransport hypothesis (Duquette et al. 2001; Lapointe et al. 2002a; Lapointe et al. 2002b), using a simple model where the required osmotic gradient could be generated with a low diffusion coefficient averaging $0.11 \pm 0.03 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Duquette et al. 2001) and an oocyte accessible space of 85 %. More recently, new experimental data has indicated that only 40 % of the oocyte volume is accessible (Zeuthen et al. 2002). Given that, in our model, a reduced accessible space has the same global effect as a low diffusion coefficient, this new estimate of the accessible space would permit the required diffusion coefficient to be as high as $\sim 0.23 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, which is ~ 40 % of the diffusion coefficient of glucose in free solution. This number can be considered as a rough estimate of the intracellular diffusion coefficient for an "average" intracellular osmolyte. Given that water entering the cell will dilute not only the transported osmolytes but also all intracellular osmolytes present, concentration gradients will be established for different solutes. The goal of the proposed model was to explain the transport-dependent cell swelling with a minimal number of adjustable parameters. As the accessible space was set and the osmotic permeability of each oocyte was measured, the

model was able to explain the glucose-dependent cell swelling for a 600 s experimental period followed by a 600 s recovery using only 2 adjustable parameters (intracellular diffusion coefficient and number of osmolytes per transported charge). Given the observations in this study, it is clear that a diffusion model should minimally include distinct diffusion coefficients for glucose and for a representative salt composed of Na^+ or K^+ and the most abundant and mobile intracellular anion. In addition, the osmolality associated with the cation influx should be distributed between the plasma membrane and the tip of the current electrode located at a certain distance from the membrane. If a diffusion model with 2 parameters was able to reproduce the cell swelling associated with Na^+ /glucose cotransport, it is clear that a more realistic model involving 4 or 5 adjustable parameters should perform even better. But this increased number of parameters would also decrease the relevance and simplicity of the model without changing our conclusions.

Conclusion

The observation that activation of Na^+ /glucose cotransport produced an initial rate of cell swelling much larger than did an equivalent cationic influx was one of the strongest pieces of experimental evidence supporting the hypothesis of water cotransport by SGLT1. In the present study, a complete comparison is presented between the cell swelling observed for a cationic flux, a glucose influx and a Na^+ /glucose cotransport. When analysed in terms of the capacity of each transport pathway to generate an osmotic gradient at the plasma membrane, it was found that the osmotic gradient required to explain the water flux associated with Na^+ /glucose cotransport can be quantitatively accounted for by adding the effects of a cationic flux to the effect of neutral solute transport. The initial water influx ($t < 45$ s after induction of Na^+ /glucose cotransport) can be largely explained by glucose accumulation while the contribution of Na^+ (and its associated intracellular anion) would become dominant only after ~ 100 s of cotransport.

Acknowledgments

We thank Drs. Jason Xu and Steve C. Hebert from Vanderbilt University for the gift of the ROMK2 clone. This work was supported by CIHR Grant No. MT-10580. M.P.G. received a scholarship from NSERC.

Appendix : Uptake of 2DG by GLUT2-expressing oocytes

The mechanism of 2DG uptake into *Xenopus* oocytes can be separated into two distinct steps : entry of 2DG molecules through GLUT2 uniporters (rate constant k_1), and their phosphorylation by hexokinase (rate constant k_2). The change in cytosolic, unphosphorylated 2DG is described by the following equation :

$$\frac{dG_i}{dt} = k_1(G_o - G_i) - k_2G_i, \quad (\text{A1})$$

where G_i and G_o are respectively the cytosolic and external unphosphorylated 2DG concentrations. The rate of change in phosphorylated 2DG (concentration P) is simply :

$$\frac{dP}{dt} = k_2G_i. \quad (\text{A2})$$

Assuming that $P = 0$ initially, solving this pair of equations yields the following result for total 2DG uptake :

$$G_i + P = \frac{k_1G_o}{k_1 + k_2} \left[\frac{k_1}{k_1 + k_2} \left(1 - e^{-(k_1 + k_2)t} \right) + k_2t \right] \quad (\text{A3})$$

It is this total quantity of 2DG that is detected in uptake measurements and which is osmotically active in volumetric experiments. Since this type of analysis describes concentration changes following enzymatic reactions without spatial considerations, it cannot be strictly applied to the uptake of the 2DG molecules into a certain intracellular accessible volume which might change with time. Therefore, 2DG uptake (Upt) was fitted using Eq. A4 which contains three parameters (A , τ and p_2) instead of two :

$$Upt = A \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}} + p_2t \right). \quad (\text{A4})$$

References

- Bissonnette P, Noel J, Coady MJ, Lapointe JY. 1999. Functional expression of tagged human Na⁺-glucose cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J Physiol* 520 Pt 2:359-71.
- Coady MJ, Wallendorff B, Gagnon DG, Lapointe JY. 2002. Identification of a novel Na⁺/myo-inositol cotransporter. *J Biol Chem* 277(38):35219-24.
- Colville CA, Seatter MJ, Jess TJ, Gould GW, Thomas HM. 1993. Kinetic analysis of the liver-type (GLUT2) and brain-type (GLUT3) glucose transporters in *Xenopus* oocytes: substrate specificities and effects of transport inhibitors. *Biochem J* 290 (Pt 3):701-6.
- Cougnon M, Bouyer P, Hulin P, Anagnostopoulos T, Planelles G. 1996. Further investigation of ionic diffusive properties and of NH₄⁺ pathways in *Xenopus laevis* oocyte cell membrane. *Pflugers Arch* 431(4):658-67.
- Duquette PP, Bissonnette P, Lapointe JY. 2001. Local osmotic gradients drive the water flux associated with Na⁽⁺⁾/glucose cotransport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(7):3796-801.
- Fischbarg J, Kuang KY, Hirsch J, Lecuona S, Rogozinski L, Silverstein SC, Loike J. 1989. Evidence that the glucose transporter serves as a water channel in J774 macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(21):8397-401.
- Fischbarg J, Kuang KY, Vera JC, Arant S, Silverstein SC, Loike J, Rosen OM. 1990. Glucose transporters serve as water channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(8):3244-7.
- Gould GW, Thomas HM, Jess TJ, Bell GI. 1991. Expression of human glucose transporters in *Xenopus* oocytes: kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocyte, liver, and brain isoforms. *Biochemistry* 30(21):5139-45.
- Hu XJ, Peng F, Zhou HQ, Zhang ZH, Cheng WY, Feng HF. 2000. The abnormality of glucose transporter in the erythrocyte membrane of Chinese type 2 diabetic patients. *Biochim Biophys Acta* 1466(1-2):306-14.

- Iserovich P, Wang D, Ma L, Yang H, Zuniga FA, Pascual JM, Kuang K, De Vivo DC, Fischbarg J. 2002. Changes in glucose transport and water permeability resulting from the T310I pathogenic mutation in Glut1 are consistent with two transport channels per monomer. *J Biol Chem* 277(34):30991-7.
- Lapointe JY, Gagnon M, Poirier S, Bissonnette P. 2002a. The presence of local osmotic gradients can account for the water flux driven by the Na⁺-glucose cotransporter. *J Physiol* 542(Pt 1):61-2.
- Lapointe JY, Gagnon MP, Gagnon DG, Bissonnette P. 2002b. Controversy regarding the secondary active water transport hypothesis. *Biochem Cell Biol* 80(5):525-33.
- Loo DD, Zeuthen T, Chandy G, Wright EM. 1996. Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(23):13367-70.
- Ma T, Verkman AS. 1999. Aquaporin water channels in gastrointestinal physiology. *J Physiol* 517 (Pt 2):317-26.
- MacAulay N, Gether U, Klaerke DA, Zeuthen T. 2001. Water transport by the human Na⁺-coupled glutamate cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 530(Pt 3):367-78.
- Macey RI. 1980. Mathematical Models of Membrane Transport Processes. In: Fanestil DD, editor. *Membrane Physiology*. New York: Plenum Medical. p 125-146.
- Macey RI. 1984. Transport of water and urea in red blood cells. *Am J Physiol* 246(3 Pt 1):C195-203.
- Meinild A, Klaerke DA, Loo DD, Wright EM, Zeuthen T. 1998. The human Na⁺-glucose cotransporter is a molecular water pump. *J Physiol* 508 (Pt 1):15-21.
- Meinild AK, Loo DD, Pajor AM, Zeuthen T, Wright EM. 2000. Water transport by the renal Na⁽⁺⁾-dicarboxylate cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol* 278(5):F777-83.
- Preston GM, Agre P. 1991. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(24):11110-4.
- Schreibmayer W, Lester HA, Dascal N. 1994. Voltage clamping of *Xenopus laevis* oocytes utilizing agarose-cushion electrodes. *Pflugers Arch* 426(5):453-8.

- Wright EM, Loo DD. 2000. Coupling between Na⁺, sugar, and water transport across the intestine. *Ann NY Acad Sci* 915:54-66.
- Zampighi GA, Kreman M, Boorer KJ, Loo DD, Bezanilla F, Chandy G, Hall JE, Wright EM. 1995. A method for determining the unitary functional capacity of cloned channels and transporters expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Membr Biol* 148(1):65-78.
- Zeidel ML, Albalak A, Grossman E, Carruthers A. 1992. Role of glucose carrier in human erythrocyte water permeability. *Biochemistry* 31(2):589-96.
- Zeuthen T. 1991. Secondary active transport of water across ventricular cell membrane of choroid plexus epithelium of *Necturus maculosus*. *J Physiol* 444:153-73.
- Zeuthen T. 1994. Cotransport of K⁺, Cl⁻ and H₂O by membrane proteins from choroid plexus epithelium of *Necturus maculosus*. *J Physiol* 478 (Pt 2):203-19.
- Zeuthen T, Meinild AK, Klaerke DA, Loo DD, Wright EM, Belhage B, Litman T. 1997. Water transport by the Na⁺/glucose cotransporter under isotonic conditions. *Biol Cell* 89(5-6):307-12.
- Zeuthen T, Meinild AK, Loo DD, Wright EM, Klaerke DA. 2001. Isotonic transport by the Na⁺-glucose cotransporter SGLT1 from humans and rabbit. *J Physiol* 531(Pt 3):631-44.
- Zeuthen T, Zeuthen E, Klaerke DA. 2002. Mobility of ions, sugar, and water in the cytoplasm of *Xenopus* oocytes expressing Na⁽⁺⁾-coupled sugar transporters (SGLT1). *J Physiol* 542(Pt 1):71-87.
- Zhang R, Skach W, Hasegawa H, van Hoek AN, Verkman AS. 1993. Cloning, functional analysis and cell localization of a kidney proximal tubule water transporter homologous to CHIP28. *J Cell Biol* 120(2):359-69.

Chapitre III Discussion

1 Limites de notre approche

Les expériences présentées au chapitre précédent ont été planifiées de façon à rapprocher entre elles les conditions expérimentales mettant en scène chacune des 3 protéines utilisées. Pour comparer les accumulations locales générées par le transport d'une même quantité de solutés, il était important que la vitesse à laquelle ces substrats ont été transportés dans l'ovocyte soit du même ordre de grandeur. En effet, il est parfaitement envisageable qu'une grande quantité de molécules se retrouvant rapidement sous la membrane cellulaire y crée un gradient osmotique plus fort que si la même quantité y était amenée progressivement et avait alors amplement le temps de diffuser dans le cytosol. De ce point de vue, les ovocytes hSGLT1 exposés à 5 mM α MG et les ovocytes GLUT2 exposés à 5 mM 2DG transportaient par chance des quantités comparables de sucre durant les 250 premières secondes, comme le montre la figure 3 du Chapitre II. Pour le canal ROMK2, qui jouit d'une forte expression dans les ovocytes, les expériences étaient effectuées très tôt après la micro-injection d'ARNm (souvent le lendemain ou le surlendemain) et la valeur du potentiel imposé lors de la période de transport était spécifiquement sélectionnée pour chaque expérience de façon à produire un courant potassique d'environ 1 μ A, c'est-à-dire similaire aux courants moyens de cotransport Na^+ /glucose.

Avant de faire la comparaison des accumulations générées par l'activité de nos différentes protéines, il a aussi fallu prendre en considération le fait que la perméabilité à l'eau de la membrane était différente selon la protéine exprimée et même d'un ovocyte à l'autre. C'est pourquoi les gradients osmotiques déduits des gonflements mesurés ont été comparés plutôt que les changements de volume eux-mêmes. En outre, l'eau traversant la membrane diluait les osmolytes intracellulaires. Il fallait aussi en tenir compte puisque l'information importante à recueillir était l'accumulation de substrats sous la membrane

suite au transport, et non la combinaison de cette accumulation et de la dilution subséquente. L'ampleur de la dilution subie par les osmolytes accumulés sous la membrane dépend de la quantité d'eau entrée, et cette dernière peut varier considérablement entre les ovocytes exprimant ROMK2 dont la perméabilité osmotique est de $P_f = 2.5 \pm 0.1 \times 10^{-4} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ et ceux exprimant GLUT2 pour lesquels $P_f = 8.1 \pm 0.8 \times 10^{-4} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$. Ainsi, pour un ovocyte de volume initial accessible V_{acc} et d'osmolarité initiale osm_{init} , l'osmolarité interne diminuait de Δosm lorsque le volume augmentait de ΔV . On a alors :

$$\text{osm}_{\text{init}} \times V_{\text{acc}} = (\text{osm}_{\text{init}} - \Delta\text{osm}) \times (V_{\text{acc}} + \Delta V) \quad (1)$$

$$\text{osm}_{\text{init}} \times V_{\text{acc}} = \text{osm}_{\text{init}} \times V_{\text{acc}} + \text{osm}_{\text{init}} \times \Delta V - \Delta\text{osm} \times V_{\text{acc}} - \Delta\text{osm} \times \Delta V$$

$$\Delta\text{osm} \times (V_{\text{acc}} + \Delta V) = \text{osm}_{\text{init}} \times \Delta V$$

et si on considère que $\Delta V \ll V_{\text{acc}}$, comme c'est le cas dans nos expériences où des ovocytes de près d'un microlitre (dont ~ 40 % est accessible, Zeuthen et al. 2002) gonflent de quelques nanolitres, on obtient :

$$\Delta\text{osm} = \text{osm}_{\text{init}} \times \Delta V / V_{\text{acc}}, \quad (2)$$

tel que donné par l'équation (4) du Chapitre II. Le gradient osmotique qu'on peut mesurer à chaque instant du transport est donc amoindri par cette dilution :

$$\Delta\pi(t) = \text{accumulation}(t) - \Delta\text{osm}(t), \quad (3)$$

mais puisque $\Delta\pi(t)$ et $\Delta V(t)$ sont mesurés, on a pu quantifier la véritable accumulation des solutés transportés en fonction du temps ou de la quantité totale de solutés transportés, tel que donné par les figures II.5 et II.6. Naturellement, le facteur de correction pour la dilution était minime au début du transport lorsque le volume n'a pas beaucoup changé, mais devenait plus important par la suite. Pour les expériences avec

GLUT2 en particulier, la correction atteignait 3 mM après 250 sec, alors que le gradient osmotique mesuré était lui-même de 2.7 mOsm.

Cette correction prenant de l'ampleur avec le temps imposait une première limite à la durée possible des expériences. D'autres contraintes se sont aussi ajoutées à cette dernière pour nous inciter à effectuer des expériences d'assez courte durée. En effet, après un certain temps, le transport d'eau et de solutés devient inévitablement isotonique et peut difficilement fournir un indice fiable des gradients osmotiques en présence. Finalement, il faut aussi garder en mémoire la cinétique du transport de 2DG par GLUT2 : puisque non-électrogénique, ce transport ne peut être forcé. Il perd donc progressivement son intensité initiale pour se poursuivre à un taux assez réduit correspondant à la phosphorylation interne des molécules de 2DG, comme on peut le voir sur la figure 3 du chapitre II. Pour des transports de plus de 300 sec, l'entrée de 2DG dans les ovocytes exprimant GLUT2 ne pouvait donc être comparée à celle d' α MG dans les ovocytes exprimant SGLT1.

Finalement, il est important de garder à l'esprit que, malgré la grande efficacité de la technique de volumétrie avec les ovocytes de *Xenopus laevis* pour des mesures de flux d'eau très sensibles en temps réel, on ne peut pas nécessairement se fier aux changements à très court terme (moins de 30 s) qui sont observés. C'est pourquoi des équations empiriques ont été numériquement ajustées sur les mesures de volume. Cette approche fournit une estimation continue de la pente du volume qui est moins bruyante que ne le seraient des régressions linéaires sur une petite fenêtre temporelle, et plus objective qu'une évaluation « visuelle » de la pente basée sur une portion choisie.

2 Réponse aux arguments appuyant le cotransport d'eau

Les résultats récoltés ici semblent indiquer que les flux d'eau reliés au cotransport Na^+ /glucose sont passifs et générés par une accumulation particulièrement rapide du glucose. Nous pouvons réévaluer sous cet angle les observations appuyant initialement l'existence d'un transport d'eau secondairement actif (Chapitre I 2).

1 - Gonflement relié au cotransport plus rapide et important que le gonflement associé à un courant ionique.

Ce projet de recherche a permis de réaliser que les molécules de glucose s'accumulent sous la membrane plus efficacement que ne le font les ions, d'où les flux d'eau osmotiques qui paraissent plus "immédiats" quand on observe un transport de solutés neutres.

2 - Un nombre fixe de molécules d'eau semble accompagner chaque cycle de cotransport. Cette stoechiométrie, qui serait de 264 H_2O par cycle pour hSGLT1, ne varie pas avec le niveau d'expression ni le taux de transport, et est spécifique à chaque type de cotransporteur.

Puisque ce sont les substrats transportés par SGLT1 qui s'accumulent et stimulent l'entrée passive d'eau, il est naturel que le taux d'entrée d'eau mesuré à l'état stationnaire soit proportionnel au taux de transport. Cependant, plusieurs expériences de courte durée où le courant de cotransport était brusquement réduit (Duquette et al.; Lapointe et al. 2002a; Lapointe et al. 2002b) ont montré que le changement de volume se poursuivait alors pour un certain temps en raison du gradient osmotique accumulé, puis ralentissait graduellement.

De plus, la stoechiométrie calculée pour le cotransport d'eau, qui semble être spécifique à chaque espèce de cotransporteur, est plus élevée lorsque la perméabilité osmotique des ovocytes est plus grande (figure 4 de l'article en annexe : Lapointe et al. 2002b). Cette proportionnalité serait fortuite dans l'hypothèse du transport actif d'eau, mais on ne s'attend pas à autre chose si on considère que les flux d'eau sont passifs : une perméabilité osmotique plus grande permet un taux d'entrée d'eau plus important pour la même accumulation de solutés.

3 - L'énergie d'activation du gonflement durant le cotransport ressemble à celle du courant plutôt qu'à celle de la perméabilité passive.

L'accumulation d'osmolytes sous la membrane est une conséquence de l'activité de cotransport. Si cette activité augmente, l'accumulation sera plus importante et les flux d'eau passifs aussi. Il est donc tout-à-fait prévisible que la dépendance en température soit la même pour le taux de cotransport et pour le flux d'eau causé indirectement par le cotransport.

4 - L'activité de cotransport Na^+ /glucose peut générer des flux d'eau contre un gradient osmotique.

Un flux d'eau osmotique dépend de la perméabilité à l'eau et du gradient osmotique de part et d'autre de la membrane (Chapitre I, équation 8). Si on augmente l'osmolarité de la solution externe en même temps qu'on génère une accumulation d'osmolytes sous la membrane par l'activité de cotransport, le gradient osmotique effectif à la membrane sera simplement la résultante de ces deux effets. Une accumulation due au cotransport qui serait plus importante que le gradient hypertonique imposé serait donc en mesure de générer un gonflement, tel que précédemment simulé par le modèle de diffusion intracellulaire (figure 6 de Duquette et al. 2001).

3 GLUT2, une autre pompe à eau?

Puisque l'activité de GLUT2 semble provoquer chez les ovocytes des flux d'eau rapides comme c'est le cas pour le cotransport Na^+ /glucose, on serait en droit de se demander si ceci ne pourrait pas signifier que GLUT2 agit aussi comme une pompe à eau. Pour vérifier cette hypothèse, on peut essayer de calculer pour le transporteur de glucose une relation stoechiométrique entre l'eau et le 2DG transportés. Il suffit d'obtenir le rapport entre la pente du gonflement et la pente de la courbe uptake-temps (figure 3 du Chapitre II). Les courbes empiriques numériquement ajustées sur les mesures de volume ont été une fois de plus utilisées pour fournir les flux d'eau requis.

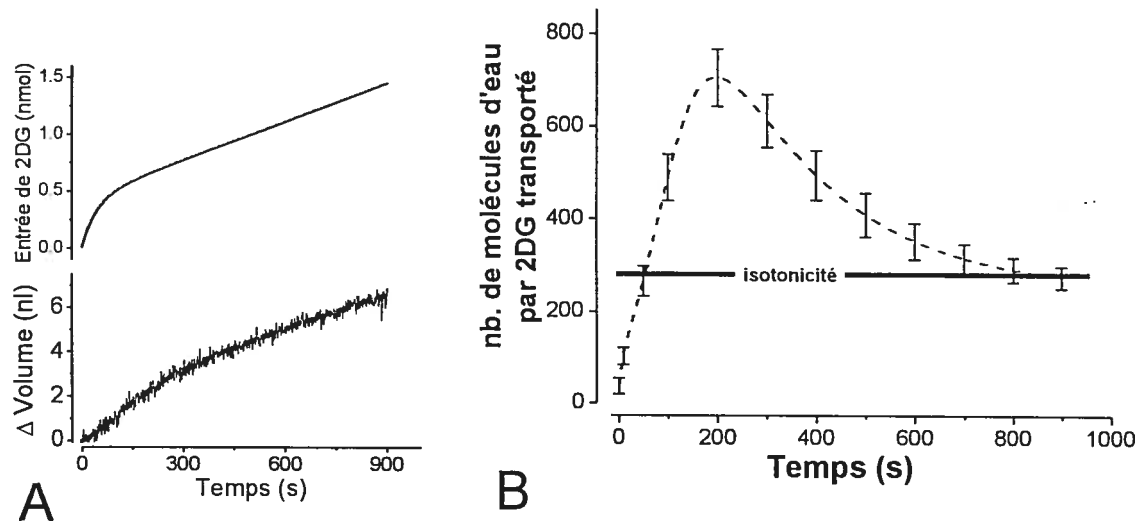


Figure III.1 Calcul d'une pseudo stoechiométrie de cotransport d'eau pour GLUT2.

A Courbes d'entrée de 2DG (ajustée sur les mesures de plusieurs ovocytes, voir Chapitre II figure 3) et de changement du volume (pour une expérience en particulier). Le rapport

entre la pente du gonflement et la pente de la courbe uptake-temps fournit la stoechiométrie hypothétique.

B La stoechiométrie (nb. molécules d'eau cotransportées par cycle) calculée n'a jamais une valeur constante, et rejoint éventuellement la valeur prédite pour un gonflement isotonique (200 mOsm ~ 280 molécules d'eau par molécule de 2DG).

Cette pseudo-stoechiométrie est tracée en fonction du temps (Figure III.1) pour une série de longues expériences avec des ovocytes exprimant GLUT2 (n = 6). On constate que la stoechiométrie calculée n'a jamais une valeur constante. Elle augmente durant les 200 premières secondes pour atteindre 700 H₂O/2DG. Ce gonflement hypotonique est incompatible avec un transport actif d'eau, mais tout-à-fait cohérent avec l'accumulation initiale sous la membrane d'une certaine quantité de 2DG stimulant une entrée d'eau qui demeure importante alors que le transport de 2DG a commencé à ralentir. Le nombre de molécules d'eau par 2DG relaxe ensuite graduellement vers la valeur de 280 correspondant à un gonflement isotonique (à ~200 mOsm comme les solutions).

4 Exigences structurelles pour faire une pompe à eau

Pour qu'une protéine membranaire parvienne à transporter efficacement de l'eau d'un côté à l'autre de la membrane, elle doit posséder un vestibule de volume au moins aussi important que celui de l'eau à transporter. Pour une stoechiométrie de 260 molécules d'eau par cycle, ceci impliquerait pour hSGLT1 que la protéine modifie son volume de 7850 \AA^3 ($260 \text{ H}_2\text{O} * 1/55 \text{ L/mol} * (6.023 \times 10^{23})^{-1} \text{ H}_2\text{O/mol} * 1000 \text{ cm}^3/\text{L} * (10^8 \text{ \AA}/\text{cm})^3$) à chaque cycle de cotransport. Compte tenu de sa masse prédite de 73 kDa et en lui attribuant une densité de $0.73 \text{ cm}^3/\text{g}$ (densité moyenne reportée pour 13 protéines solubles, Harpaz et al. 1994), on peut estimer le volume de SGLT1 à $88\,330 \text{ \AA}^3$. Donc, pour expulser 260 molécules d'eau, le cotransporteur doit être en mesure de changer son volume de 9 % de façon efficace. Elle doit aussi effectuer des changements de conformation selon une séquence très précise (Figure III.2 B) :

1. Un vestibule est rempli de plusieurs centaines de molécules d'eau.
2. Le chemin d'accès du côté extracellulaire se ferme et celui du côté intracellulaire s'ouvre.
3. Un changement de conformation fait diminuer le volume du vestibule de l'équivalent de 9% du volume global du cotransporteur.
4. Le chemin d'accès du côté intracellulaire se referme et celui du côté extracellulaire s'ouvre à nouveau.
5. Un changement de conformation fait augmenter le volume du vestibule en le remplissant de molécules d'eau provenant surtout du côté extracellulaire.

On sait que des protéines sont capables d'effectuer des changements de conformation très importants. C'est le cas de nombreux enzymes, mais aussi de protéines membranaires lors de leur insertion dans une membrane. Par exemple, la colicine E1

déploie séquentiellement la majorité de ses hélices α pour exposer ses deux hélices hydrophobes en « épingle à cheveux » et les insérer dans la membrane (Lindeberg et al. 2000). Dans le cas présent, cependant, c'est une protéine déjà installée dans une membrane qui doit se mouvoir, ce qui lui impose plus de contraintes.

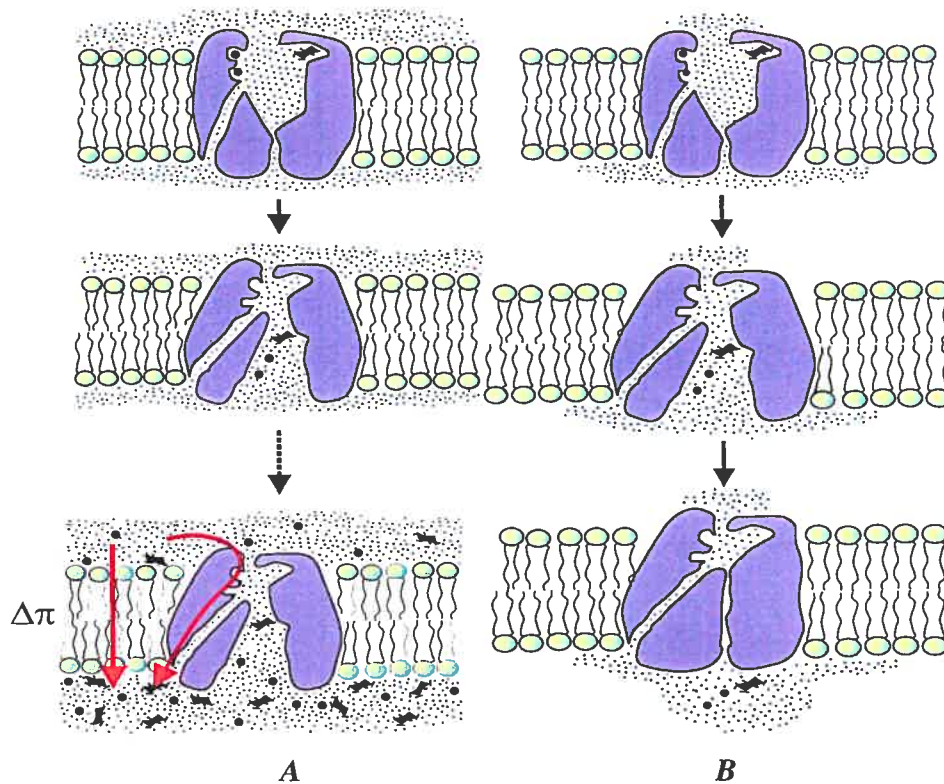


Figure III.2 Les modes de transport d'eau envisagés pour SGLT1.

A Transport passif : l'activité de cotransport Na^+ /glucose génère un gradient osmotique local qui attire de l'eau via les perméabilités passives endogène et intrinsèque à SGLT1.

B Cotransport d'eau : la protéine effectue des changements de conformation pour expulser 260 molécules d'eau en même temps que ses 3 substrats.

Depuis quelques années, un certain nombre de structures tri-dimensionnelles ont pu être élucidées pour des protéines membranaires dans des conditions qui devraient reproduire assez bien celles de la membrane plasmique. Les structures par diffraction des rayons X dans différentes conditions (ex. : avec ou sans inhibiteur) fournissent de précieux indices sur la nature des changements de conformation. Les canaux potassiques sont les protéines membranaires qu'on connaît le mieux actuellement au niveau de la structure. Le vestibule central formé par le tétramère du canal KcsA dans l'état fermé (Figure III.3B) contiendrait 27 molécules d'eau, selon les plus récentes estimations (Kuo et al. 2003). Dernièrement, la structure d'un canal potassique dans l'état ouvert a été élucidée pour la première fois (Jiang et al. 2002b; Jiang et al. 2002a). Il s'agit du canal K^+ bactérien régulé par le calcium, MthK. Les domaines formant le pore de KcsA et de MthK sont considérés comme assez homologues pour être comparés. La Figure III.3 confronte donc les structures du canal potassique dans l'état ouvert et fermé. La cavité (moitié inférieure des canaux sur la Figure III.3) qui contient ~ 30 molécules d'eau à l'état fermé semble à peu près doubler de volume lorsque le canal est à l'état ouvert, ce qui permettrait à 30 molécules d'eau supplémentaires de s'y insérer. La fermeture du canal potassique est donc un changement de conformation qui modifierait considérablement l'hydratation de la protéine, mais on demeure tout de même loin des 260 molécules d'eau prédites pour le cotransport d'eau par hSGLT1. L'activité de transport de K^+ à travers le filtre de sélectivité du canal ouvert, quant à elle, impliquerait une seule molécule d'eau transportée par ion K^+ (Berneche et Roux 2000; Zhou et al. 2001)).

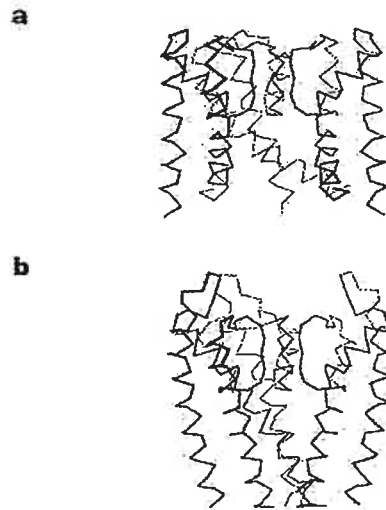


Figure III.3 États ouvert et fermé du canal potassique.

Tiré de (Jiang et al. 2002b). (A) État ouvert : canal MthK. (B) État fermé : canal KcsA.

Des structures ont aussi été récemment élucidées pour la Ca^{2+} ATPase dans deux conformations distinctes, permettant de spéculer sur les changements de conformation qu'elle effectue. La Ca^{2+} ATPase du réticulum sarcoplasmique des muscles squelettiques est un transporteur actif qui fonctionne à une vitesse de 10 à 30 cycles par seconde (selon l'utilisation du transport de Ca^{2+} ou de l'hydrolyse d'ATP pour la détermination de cette vitesse, Lytton et al. 1992), ce qui est fort comparable à l'activité de SGLT1. C'est donc la protéine membranaire à structure connue qui se rapproche le plus fonctionnellement de SGLT1. Une structure de cette ATPase de type P dans son état lié au Ca^{2+} (état E1Ca^{2+}) a d'abord été obtenue en 2000 (Toyoshima et al. 2000). Par la suite, une deuxième structure de la Ca^{2+} ATPase liée à la thapsigargine a été obtenue (Toyoshima et Nomura 2002). L'état de la protéine liée à l'inhibiteur thapsigargine est considéré comme analogue (Sagara et Inesi 1991) à l'état sans ions Ca^{2+} (état E2), et la transition entre les états E1Ca^{2+} et E2 n'implique pas d'ATP ou de phosphorylation. Ainsi, le changement de conformation

observé impliquerait uniquement la liaison ou la dissociation des ions Ca^{2+} . La Figure III.4 montre bien que ce changement de conformation induit de grands déplacements des domaines cytoplasmiques. Cependant, les segments transmembranaires se déplacent aussi de façon assez importante : une partie amphipathique de l'hélice 1 se retrouve presque parallèle à la bicouche lipidique et les hélices 4 et 5 changent partiellement d'orientation.

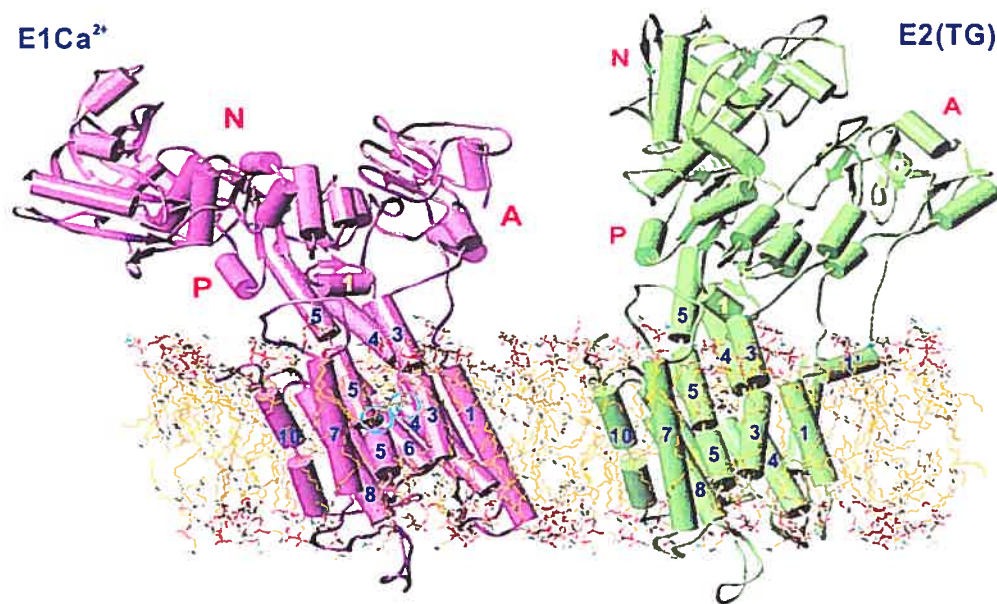


Figure III.4 Ca^{2+} ATPase : changement de conformation relié à la liaison du Ca^{2+}

Tiré de (Toyoshima et al. 2003). Les ions Ca^{2+} sont encerclés en bleu pour l'état E1Ca^{2+} .

On peut donc conclure des exemples du canal potassique et de la Ca^{2+} ATPase que des mouvements importants peuvent bel et bien avoir lieu pour les protéines membranaires en général et les transporteurs en particulier. Des résultats cristallographiques très récents sur la lactose permease bactérienne (H.R. Kaback, Gordon conference juin 2003) semblent aussi démontrer la présence d'un vestibule de volume suffisant pour contenir ~ 150 molécules d'eau, vestibule qui doit forcément changer quelque peu de volume durant le

cycle de la protéine. Les cotransporteurs Na^+ /soluté subissent donc probablement aussi des changements de conformations considérables, comme les courants transitoires et des résultats de fluorescence (Meinild et al. 2002) semblent l'indiquer. Cependant, tel que mentionné plus haut, des mouvements très précis dans un ordre strict sont requis pour l'activité d'une pompe à eau moléculaire forçant le transfert d'une quantité fixe de molécules d'eau à chaque cycle. Jusqu'à ce jour, on n'a jamais présenté une structure de protéine membranaire qui supporterait les changements de conformation nécessaires pour effectuer ce genre de travail. Ce type de pompage d'eau, si jamais il a vraiment lieu, serait sans précédent.

Conclusion et perspectives

L'hypothèse d'un transport d'eau secondairement actif présente des perspectives très intéressantes dans plusieurs domaines. Au niveau moléculaire, d'abord, l'occurrence de protéines formant des pompes à eau serait captivante, mais assez surprenante (voir Discussion).

Au niveau physiologique ensuite, le cotransport d'eau par SGLT1 a été suggéré comme un acteur important de l'absorption d'eau par l'intestin (Loo et al. 1999; Loo et al. 2002). En effet, puisque des gradients osmotiques n'ont pu être observés jusqu'à présent à travers cet épithélium et que l'absorption d'eau semble y être reliée à l'absorption de glucose (voir Chapitre I 1.5), la présence de pompes à eau dépendantes du glucose arriverait à point pour combler une lacune dans la compréhension de l'absorption des fluides par l'épithélium intestinal. Considérant qu'environ une mole de glucose est absorbée chaque jour par l'intestin humain, le cotransport de 260 molécules d'eau par molécule de glucose expliquerait le transport de 5 des 8 litres d'eau absorbés quotidiennement par l'intestin. Cependant, même si ce cotransport d'eau par l'épithélium intestinal est physiologiquement attrayant, ce n'est pas la seule option qui subsiste pour expliquer l'absorption de fluides par l'intestin. Ce projet a permis de constater que les solutés neutres comme le glucose peuvent s'accumuler d'une façon particulière à leur arrivée dans les cellules. Le transport de solutés pourrait donc générer des gradients osmotiques locaux n'ayant pu être détectés jusqu'à maintenant. Si c'est le cas, diverses voies de perméabilité à l'eau dans les entérocytes pourraient ensuite médier les flux d'eau osmotiques : SGLT1 possède une perméabilité passive à l'eau, des aquaporines ont récemment été détectées à divers sites le long de l'intestin (Ma et Verkman 1999; Gallardo et al. 2001), et une série d'études récentes (Helliwell et al. 2000b; Helliwell et al. 2000a; Kellett et Helliwell 2000; Kellett 2001; Helliwell et Kellett 2002; Helliwell et al. 2003) suggèrent un recrutement de GLUT2 à la membrane apicale dépendant de la concentration de glucose luminale. Ce dernier mécanisme expliquerait la portion passive de l'absorption de glucose, mais apporterait aussi une perméabilité à l'eau supplémentaire via GLUT2 lorsque la quantité de glucose ingérée devient importante.

Bien que le cotransport d'eau soit une hypothèse intéressante, le principe de la diffusion passive de l'eau est toujours en mesure d'expliquer les résultats avec les ovocytes qui ont mené à cette nouvelle hypothèse (pour une revue des arguments pour et contre l'hypothèse du cotransport d'eau, consulter l'article en annexe). En outre, la perméabilité passive du cotransporteur Na^+ /glucose est à elle seule une propriété très intéressante. Les études futures pourraient s'orienter vers une meilleure description de cette perméabilité, en s'inspirant par exemple de ce qui a déjà été fait pour les aquaporines et les GLUTs. Ainsi, on pourrait d'abord mesurer le rapport des perméabilités osmotiques et de diffusion, comme il a déjà été fait pour les érythrocytes (voir Chapitre I 1.3). Si la perméabilité à l'eau de SGLT1 prend la forme d'un canal bien déterminé, peut-être ce rapport P_f/P_d permettrait-il de déduire un nombre de molécules d'eau en file indienne. Aussi, l'observation qu'un mutant du transporteur facilité GLUT1 altérerait différemment ses activités de transport de glucose et d'eau a mené à la suggestion de 2 pores aqueux par monomère de GLUT1 (Iserovich et al. 2002). Les mutants cystéine de hSGLT1 déjà élaborés dans ce laboratoire pourraient être exploités de façon similaire : la comparaison des effets de mutations simples sur la fonction de cotransport et de perméabilité à l'eau permettrait de voir si l'eau et les substrats suivent des voies distinctes ou communes dans la protéine. De plus, des mesures de perméabilité à la suite de l'application de réactifs sulfhydryls méthane-thio-sulfonate (MTS) pourrait faire découvrir des résidus situés aux abords du pore aqueux du cotransporteur.

Ainsi, l'hypothèse du transport d'eau secondairement actif n'est toujours pas nécessaire à l'interprétation des flux d'eau générés par le cotransporteur Na^+ /glucose. L'accumulation locale combinée du glucose et des ions est suffisante pour générer des gradients osmotiques importants, lesquels peuvent ensuite déclencher les flux d'eau observés. Le fait que des transporteurs de solutés neutres comme GLUT2 et SGLT1 comportent une perméabilité osmotique considérable est particulièrement intéressant du point de vue évolutif. En effet, cette association d'une perméabilité osmotique à des protéines susceptibles de générer d'importants gradients osmotiques locaux semble bien à

propos. Est-ce que ce type de transporteurs perméables pourrait avoir été favorisé à un certain moment par rapport à des transporteurs plus étanches? Peut-être le nombre croissant de structures et de fonctions connues pour des protéines membranaires permettra-t-il un jour de répondre à cette question...

Bibliographie

- Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A, Nielsen S. 2002. Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol* 542(Pt 1):3-16.
- Alvarez J, Lee DC, Baldwin SA, Chapman D. 1987. Fourier transform infrared spectroscopic study of the structure and conformational changes of the human erythrocyte glucose transporter. *J Biol Chem* 262(8):3502-9.
- Andreoli TE, Schafer JA. 1980. Principles of water and nonelectrolyte transport across membranes. In: Fanestil DD, editor. *Membrane Physiology*. New York: Plenum Medical. p 165-184.
- Beck JC, Sacktor B. 1978. The sodium electrochemical potential-mediated uphill transport of D-glucose in renal brush border membrane vesicles. *J Biol Chem* 253(15):5531-5.
- Bell GI, Burant CF, Takeda J, Gould GW. 1993. Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J Biol Chem* 268(26):19161-4.
- Berneche S, Roux B. 2000. Molecular dynamics of the KcsA K(+) channel in a bilayer membrane. *Biophys J* 78(6):2900-17.
- Berteloot A. 2003. Kinetic Mechanism of Na(+)-Glucose Cotransport through the Rabbit Intestinal SGLT1 Protein. *J Membr Biol* 192(2):89-100.

- Boim MA, Ho K, Shuck ME, Bienkowski MJ, Block JH, Slightom JL, Yang Y, Brenner BM, Hebert SC. 1995. ROMK inwardly rectifying ATP-sensitive K⁺ channel. II. Cloning and distribution of alternative forms. *Am J Physiol* 268(6 Pt 2):F1132-40.
- Borgnia M, Nielsen S, Engel A, Agre P. 1999. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annu Rev Biochem* 68:425-58.
- Burant CF, Bell GI. 1992. Mammalian facilitative glucose transporters: evidence for similar substrate recognition sites in functionally monomeric proteins. *Biochemistry* 31(42):10414-20.
- Carruthers A. 1990. Facilitated diffusion of glucose. *Physiol Rev* 70(4):1135-76.
- Chen XZ, Coady MJ, Jackson F, Berteloot A, Lapointe JY. 1995. Thermodynamic determination of the Na⁺: glucose coupling ratio for the human SGLT1 cotransporter. *Biophys J* 69(6):2405-14.
- Chen XZ, Coady MJ, Jalal F, Wallendorff B, Lapointe JY. 1997. Sodium leak pathway and substrate binding order in the Na⁺-glucose cotransporter. *Biophys J* 73(5):2503-10.
- Chen XZ, Coady MJ, Lapointe JY. 1996. Fast voltage clamp discloses a new component of presteady-state currents from the Na⁽⁺⁾-glucose cotransporter. *Biophys J* 71(5):2544-52.
- Chenu C, Berteloot A. 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. *J Membr Biol* 132(2):95-113.

- Cloherty EK, Heard KS, Carruthers A. 1996. Human erythrocyte sugar transport is incompatible with available carrier models. *Biochemistry* 35(32):10411-21.
- Cloherty EK, Levine KB, Graybill C, Carruthers A. 2002. Cooperative nucleotide binding to the human erythrocyte sugar transporter. *Biochemistry* 41(42):12639-51.
- Cloherty EK, Sultzman LA, Zottola RJ, Carruthers A. 1995. Net sugar transport is a multistep process. Evidence for cytosolic sugar binding sites in erythrocytes. *Biochemistry* 34(47):15395-406.
- Crane RK. 1962. Hypothesis of mechanism of intestinal transport of sugars. *Fed Proc* 21:891-895.
- Crane RK. 1965. Na⁺-dependent transport in the intestine and other animal tissues. *Fed Proc* 24(5):1000-6.
- Curran PF, MacIntosh JR. 1962. A model system for biological water transport. *Nature* 193:347-348.
- Denker BM, Smith BL, Kuhajda FP, Agre P. 1988. Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *J Biol Chem* 263(30):15634-42.
- Diamond JM, Bossert WH. 1967. Standing-gradient osmotic flow. A mechanism for coupling of water and solute transport in epithelia. *J Gen Physiol* 50(8):2061-83.
- Duquette PP. 2000. *Étude de la force motrice impliquée dans le flux d'eau associé au cotransport Na⁺/glucose* [mémoire de Maîtrise]. Montréal: Université de Montréal. 85 p.

- Duquette PP, Bissonnette P, Lapointe JY. 2001. Local osmotic gradients drive the water flux associated with Na(+)/glucose cotransport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(7):3796-801.
- Eskandari S, Wright EM, Kreman M, Starace DM, Zampighi GA. 1998. Structural analysis of cloned plasma membrane proteins by freeze-fracture electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(19):11235-40.
- Falk S, Guay A, Chenu C, Patil SD, Berteloot A. 1998. Reduction of an eight-state mechanism of cotransport to a six-state model using a new computer program. *Biophys J* 74(2 Pt 1):816-30.
- Fettiplace R, Haydon DA. 1980. Water permeability of lipid membranes. *Physiol Rev* 60(2):510-50.
- Finkelstein A. 1987. *Water movement through lipid bilayers, pores, and plasma membranes*. New York: Wiley-Interscience. 228 p.
- Fischbarg J, Kuang KY, Hirsch J, Lecuona S, Rogozinski L, Silverstein SC, Loike J. 1989. Evidence that the glucose transporter serves as a water channel in J774 macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(21):8397-401.
- Fischbarg J, Kuang KY, Vera JC, Arant S, Silverstein SC, Loike J, Rosen OM. 1990. Glucose transporters serve as water channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(8):3244-7.
- Fischbarg J, Liebovitch LS, Koniarek JP. 1987. Inhibition of transepithelial osmotic water flow by blockers of the glucose transporter. *Biochim Biophys Acta* 898(3):266-74.

- Freel RW, Goldner AM. 1981. Sodium-coupled nonelectrolyte transport across epithelia: emerging concepts and directions. *Am J Physiol* 241(6):G451-60.
- Fukumoto H, Seino S, Imura H, Seino Y, Eddy RL, Fukushima Y, Byers MG, Shows TB, Bell GI. 1988. Sequence, tissue distribution, and chromosomal localization of mRNA encoding a human glucose transporter-like protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(15):5434-8.
- Gallardo P, Cid LP, Vio CP, Sepulveda FV. 2001. Aquaporin-2, a regulated water channel, is expressed in apical membranes of rat distal colon epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281(3):G856-63.
- Gould GW, Holman GD. 1993. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem J* 295 (Pt 2):329-41.
- Gould GW, Thomas HM, Jess TJ, Bell GI. 1991. Expression of human glucose transporters in *Xenopus* oocytes: kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocyte, liver, and brain isoforms. *Biochemistry* 30(21):5139-45.
- Hamann S, Kiilgaard JF, Cour M, Prause JU, Zeuthen T. 2003. Cotransport of H(+), lactate, and H(2)O in porcine retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 76(4):493-504.
- Hamann S, la Cour M, Lui GM, Bundgaard M, Zeuthen T. 2000. Transport of protons and lactate in cultured human fetal retinal pigment epithelial cells. *Pflugers Arch* 440(1):84-92.
- Hamill S, Cloherty EK, Carruthers A. 1999. The human erythrocyte sugar transporter presents two sugar import sites. *Biochemistry* 38(51):16974-83.

- Harpaz Y, Gerstein M, Chothia C. 1994. Volume changes on protein folding. *Structure* 2(7):641-9.
- Heard KS, Fidyk N, Carruthers A. 2000. ATP-dependent substrate occlusion by the human erythrocyte sugar transporter. *Biochemistry* 39(11):3005-14.
- Hebert DN, Carruthers A. 1992. Glucose transporter oligomeric structure determines transporter function. Reversible redox-dependent interconversions of tetrameric and dimeric GLUT1. *J Biol Chem* 267(33):23829-38.
- Hediger MA, Coady MJ, Ikeda TS, Wright EM. 1987. Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter. *Nature* 330(6146):379-81.
- Helliwell PA, Kellett GL. 2002. The active and passive components of glucose absorption in rat jejunum under low and high perfusion stress. *J Physiol* 544(Pt 2):579-89.
- Helliwell PA, Richardson M, Affleck J, Kellett GL. 2000a. Regulation of GLUT5, GLUT2 and intestinal brush-border fructose absorption by the extracellular signal-regulated kinase, p38 mitogen-activated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase intracellular signalling pathways: implications for adaptation to diabetes. *Biochem J* 350 Pt 1:163-9.
- Helliwell PA, Richardson M, Affleck J, Kellett GL. 2000b. Stimulation of fructose transport across the intestinal brush-border membrane by PMA is mediated by GLUT2 and dynamically regulated by protein kinase C. *Biochem J* 350 Pt 1:149-54.
- Helliwell PA, Rumsby MG, Kellett GL. 2003. Intestinal sugar absorption is regulated by phosphorylation and turnover of PKC bII mediated by PI 3-kinase- and mTOR-dependent pathways. *J Biol Chem*.

- Hevesy G, Hofer E, Krogh A. 1935. je l'ai pas ... et la revue pas à la bibli... *Skand. Archiv Physiol.* 72:199.
- Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanazirska MV, Hebert SC. 1993. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 362(6415):31-8.
- Hopfer U, Groseclose R. 1980. The mechanism of Na⁺-dependent D-glucose transport. *J Biol Chem* 255(10):4453-62.
- Hruz PW, Mueckler MM. 2001. Structural analysis of the GLUT1 facilitative glucose transporter (review). *Mol Membr Biol* 18(3):183-93.
- Iserovich P, Wang D, Ma L, Yang H, Zuniga FA, Pascual JM, Kuang K, De Vivo DC, Fischbarg J. 2002. Changes in glucose transport and water permeability resulting from the T310I pathogenic mutation in Glut1 are consistent with two transport channels per monomer. *J Biol Chem* 277(34):30991-7.
- Jacobs DB, Berenski CJ, Spangler RA, Jung CY. 1987. Radiation inactivation target size of rat adipocyte glucose transporters in the plasma membrane and intracellular pools. *J Biol Chem* 262(17):8084-7.
- Jap BK, Li H. 1995. Structure of the osmo-regulated H₂O-channel, AQP-CHIP, in projection at 3.5 Å resolution. *J Mol Biol* 251(3):413-20.
- Jarvis SM, Ellory JC, Young JD. 1986. Radiation inactivation of the human erythrocyte nucleoside and glucose transporters. *Biochim Biophys Acta* 855(2):312-5.

- Jette M, Vachon V, Potier M, Beliveau R. 1997. Radiation-inactivation analysis of the oligomeric structure of the renal sodium/D-glucose symporter. *Biochim Biophys Acta* 1327(2):242-8.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. 2002a. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 417(6888):515-22.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. 2002b. The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 417(6888):523-6.
- Joost HG, Bell GI, Best JD, Birnbaum MJ, Charron MJ, Chen YT, Doege H, James DE, Lodish HF, Moley KH and others. 2002. Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282(4):E974-6.
- Joost HG, Thorens B. 2001. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol* 18(4):247-56.
- Jung JS, Preston GM, Smith BL, Guggino WB, Agre P. 1994. Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *J Biol Chem* 269(20):14648-54.
- Kellett GL. 2001. The facilitated component of intestinal glucose absorption. *J Physiol* 531(Pt 3):585-95.
- Kellett GL, Helliwell PA. 2000. The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane. *Biochem J* 350 Pt 1:155-62.

- Koefoed-Johnsen V, Ussing HH. 1953. The contribution of diffusion and flow to the passage of D₂O through living membranes : Effect of neurohypophysial hormone on isolated anuran skin. *Acta Physiol. Scand.* 28:60-76.
- Kong CT, Yet SF, Lever JE. 1993. Cloning and expression of a mammalian Na⁺/amino acid cotransporter with sequence similarity to Na⁺/glucose cotransporters. *J Biol Chem* 268(3):1509-12.
- Kuo A, Gulbis JM, Antcliff JF, Rahman T, Lowe ED, Zimmer J, Cuthbertson J, Ashcroft FM, Ezaki T, Doyle DA. 2003. Crystal Structure of the Potassium Channel KirBac1.1 in the Closed State. *Science* 300(5627):1922-6.
- Lapointe JY, Gagnon M, Poirier S, Bissonnette P. 2002a. The presence of local osmotic gradients can account for the water flux driven by the Na⁺-glucose cotransporter. *J Physiol* 542(Pt 1):61-2.
- Lapointe JY, Gagnon MP, Gagnon DG, Bissonnette P. 2002b. Controversy regarding the secondary active water transport hypothesis. *Biochem Cell Biol* 80(5):525-33.
- Larsen EH, Sorensen JB, Sorensen JN. 2002. Analysis of the sodium recirculation theory of solute-coupled water transport in small intestine. *J Physiol* 542(Pt 1):33-50.
- Levitt DG. 1974. A new theory of transport for cell membrane pores. I. General theory and application to red cell. *Biochim Biophys Acta* 373(1):115-31.
- Lin J, Kormanec J, Homerova D, Kinne RK. 1999. Probing transmembrane topology of the high-affinity Sodium/Glucose cotransporter (SGLT1) with histidine-tagged mutants. *J Membr Biol* 170(3):243-52.

- Lindeberg M, Zakharov SD, Cramer WA. 2000. Unfolding pathway of the colicin E1 channel protein on a membrane surface. *J Mol Biol* 295(3):679-92.
- Lo B, Silverman M. 1998. Cysteine scanning mutagenesis of the segment between putative transmembrane helices IV and V of the high affinity Na⁺/Glucose cotransporter SGLT1. Evidence that this region participates in the Na⁺ and voltage dependence of the transporter. *J Biol Chem* 273(45):29341-51.
- Loike JD, Hickman S, Kuang K, Xu M, Cao L, Vera JC, Silverstein SC, Fischbarg J. 1996. Sodium-glucose cotransporters display sodium- and phlorizin-dependent water permeability. *Am J Physiol* 271(5 Pt 1):C1774-9.
- Loo DD, Hazama A, Supplisson S, Turk E, Wright EM. 1993. Relaxation kinetics of the Na⁺/glucose cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(12):5767-71.
- Loo DD, Wright EM, Meinild AK, Klaerke DA, Zeuthen T. 1999. Commentary on "Epithelial Fluid Transport--A Century of Investigation". *News Physiol Sci* 14:98-100.
- Loo DD, Wright EM, Zeuthen T. 2002. Water pumps. *J Physiol* 542(Pt 1):53-60.
- Loo DD, Zeuthen T, Chandy G, Wright EM. 1996. Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(23):13367-70.
- Lundahl P, Mascher E, Andersson L, Englund AK, Greijer E, Kameyama K, Takagi T. 1991. Active and monomeric human red cell glucose transporter after high performance molecular-sieve chromatography in the presence of octyl glucoside and phosphatidylserine or phosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta* 1067(2):177-86.

- Lytton J, Westlin M, Burk SE, Shull GE, MacLennan DH. 1992. Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J Biol Chem* 267(20):14483-9.
- Ma T, Verkman AS. 1999. Aquaporin water channels in gastrointestinal physiology. *J Physiol* 517 (Pt 2):317-26.
- MacAulay N, Gether U, Klaerke DA, Zeuthen T. 2001. Water transport by the human Na⁺-coupled glutamate cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 530(Pt 3):367-78.
- Macey RI. 1980. Mathematical Models of Membrane Transport Processes. In: Fanestil DD, editor. *Membrane Physiology*. New York: Plenum Medical. p 125-146.
- Macey RI. 1984. Transport of water and urea in red blood cells. *Am J Physiol* 246(3 Pt 1):C195-203.
- Macey RI, Farmer RE. 1970. Inhibition of water and solute permeability in human red cells. *Biochim Biophys Acta* 211(1):104-6.
- Mackenzie B, Loo DD, Wright EM. 1998. Relationships between Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) currents and fluxes. *J Membr Biol* 162(2):101-6.
- Mackenzie B, Panayotova-Heiermann M, Loo DD, Lever JE, Wright EM. 1994. SAAT1 is a low affinity Na⁺/glucose cotransporter and not an amino acid transporter. A reinterpretation. *J Biol Chem* 269(36):22488-91.
- Meinild A, Klaerke DA, Loo DD, Wright EM, Zeuthen T. 1998. The human Na⁺-glucose cotransporter is a molecular water pump. *J Physiol* 508 (Pt 1):15-21.

- Meinild AK, Hirayama BA, Wright EM, Loo DD. 2002. Fluorescence studies of ligand-induced conformational changes of the Na(+)/glucose cotransporter. *Biochemistry* 41(4):1250-8.
- Meinild AK, Loo DD, Pajor AM, Zeuthen T, Wright EM. 2000. Water transport by the renal Na(+)-dicarboxylate cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol* 278(5):F777-83.
- Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, Allard WJ, Lienhard GE, Lodish HF. 1985. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 229(4717):941-5.
- Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, Engel A, Fujiyoshi Y. 2000. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 407(6804):599-605.
- Panayotova-Heiermann M, Eskandari S, Turk E, Zampighi GA, Wright EM. 1997. Five transmembrane helices form the sugar pathway through the Na+/glucose cotransporter. *J Biol Chem* 272(33):20324-7.
- Pappenheimer JR, Renkin EM, Borero LM. 1951. Filtration, diffusion and molecular sieving through peripheral capillary membranes. *Am J Physiol* 167:13-46.
- Parent L, Supplisson S, Loo DD, Wright EM. 1992a. Electrogenic properties of the cloned Na+/glucose cotransporter: I. Voltage-clamp studies. *J Membr Biol* 125(1):49-62.
- Parent L, Supplisson S, Loo DD, Wright EM. 1992b. Electrogenic properties of the cloned Na+/glucose cotransporter: II. A transport model under nonrapid equilibrium conditions. *J Membr Biol* 125(1):63-79.

- Pessino A, Hebert DN, Woon CW, Harrison SA, Clancy BM, Buxton JM, Carruthers A, Czech MP. 1991. Evidence that functional erythrocyte-type glucose transporters are oligomers. *J Biol Chem* 266(30):20213-7.
- Pfeffer W. 1877. *Osmotische Untersuchungen*. Engelmann, editor. Leipzig. 236 p.
- Pirch T, Quick M, Nietschke M, Langkamp M, Jung H. 2002. Sites important for Na⁺ and substrate binding in the Na⁺/proline transporter of *Escherichia coli*, a member of the Na⁺/solute symporter family. *J Biol Chem* 277(11):8790-6.
- Preston GM, Agre P. 1991. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(24):11110-4.
- Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. 1992. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256(5055):385-7.
- Quick M, Stolting S, Jung H. 1999. Role of conserved Arg40 and Arg117 in the Na⁺/proline transporter of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 38(41):13523-9.
- Rice SA. 1980. Hydrodynamic and diffusion considerations of rapid-mix experiments with red blood cells. *Biophys J* 29(1):65-77.
- Rosenberg PA, Finkelstein A. 1978. Water permeability of gramicidin A-treated lipid bilayer membranes. *J Gen Physiol* 72(3):341-50.
- Sagara Y, Inesi G. 1991. Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport ATPase by thapsigargin at subnanomolar concentrations. *J Biol Chem* 266(21):13503-6.

- Semenza G, Kessler M, Hosang M, Weber J, Schmidt U. 1984. Biochemistry of the Na⁺, D-glucose cotransporter of the small-intestinal brush-border membrane. The state of the art in 1984. *Biochim Biophys Acta* 779(3):343-79.
- Smith BL, Agre P. 1991. Erythrocyte Mr 28,000 transmembrane protein exists as a multisubunit oligomer similar to channel proteins. *J Biol Chem* 266(10):6407-15.
- Solomon AK. 1968. Characterization of biological membranes by equivalent pores. *J Gen Physiol* 51:335s-364s.
- Spring KR. 1999. Epithelial Fluid Transport--A Century of Investigation. *News Physiol Sci* 14:92-98.
- Spring KR. 2002. Solute recirculation. *J Physiol* 542(Pt 1):51.
- Stevens BR, Fernandez A, Hirayama B, Wright EM, Kempner ES. 1990. Intestinal brush border membrane Na⁺/glucose cotransporter functions in situ as a homotetramer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(4):1456-60.
- Sui H, Han BG, Lee JK, Walian P, Jap BK. 2001. Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature* 414(6866):872-8.
- Sultzman LA, Carruthers A. 1999. Stop-flow analysis of cooperative interactions between GLUT1 sugar import and export sites. *Biochemistry* 38(20):6640-50.
- Thorens B. 1996. Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes. *Am J Physiol* 270(4 Pt 1):G541-53.
- Thorens B, Sarkar HK, Kaback HR, Lodish HF. 1988. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. *Cell* 55(2):281-90.

- Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H, Ogawa H. 2000. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405(6787):647-55.
- Toyoshima C, Nomura H. 2002. Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature* 418(6898):605-11.
- Toyoshima C, Nomura H, Sugita Y. 2003. Crystal structures of Ca²⁺-ATPase in various physiological states. *Ann N Y Acad Sci* 986:1-8.
- Turner RJ, Moran A. 1982. Further studies of proximal tubular brush border membrane D-glucose transport heterogeneity. *J Membr Biol* 70(1):37-45.
- Uldry M, Ibberson M, Hosokawa M, Thorens B. 2002. GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Lett* 524(1-3):199-203.
- Umbach JA, Coady MJ, Wright EM. 1990. Intestinal Na⁺/glucose cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes is electrogenic. *Biophys J* 57(6):1217-24.
- van't Hoff JH. 1887. Die rolle des osmotischen druckes in der analogie zwischen lösungen und gasen. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 1:481-493.
- Vieira FL, Sha'afi RI, Solomon AK. 1970. The state of water in human and dog red cell membranes. *J Gen Physiol* 55(4):451-66.
- Visscher MB, Fetcher ES, Carr CW, Gregor HP, Bushey MS, Barker DE. 1944. Isotopic tracer studies on the movement of water and ions between intestinal lumen and blood. *Am J Physiol* 142:550.
- Wang W, Hebert SC, Giebisch G. 1997. Renal K⁺ channels: structure and function. *Annu Rev Physiol* 59:413-36.

- Wegener C, Tebbe S, Steinhoff HJ, Jung H. 2000. Spin labeling analysis of structure and dynamics of the Na(+)/proline transporter of Escherichia coli. *Biochemistry* 39(16):4831-7.
- Wells RG, Pajor AM, Kanai Y, Turk E, Wright EM, Hediger MA. 1992. Cloning of a human kidney cDNA with similarity to the sodium-glucose cotransporter. *Am J Physiol* 263(3 Pt 2):F459-65.
- Whitlock RT, Wheeler HO. 1964. Coupled transport of solute and water across rabbit gallbladder epithelium. *J. Clin. Invest.* 43:2249-2265.
- Wright EM. 1978. Transport processes in the formation of the cerebrospinal fluid. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 83:3-34.
- Wright EM. 2001. Renal Na(+)-glucose cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 280(1):F10-8.
- Wright EM, Loo DD. 2000. Coupling between Na⁺, sugar, and water transport across the intestine. *Ann N Y Acad Sci* 915:54-66.
- Wright EM, Loo DD, Panayotova-Heiermann M, Hirayama BA, Turk E, Eskandari S, Lam JT. 1998. Structure and function of the Na⁺/glucose cotransporter. *Acta Physiol Scand Suppl* 643:257-64.
- Wright EM, Turk E. 2003. The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch.*
- Xia P, Bungay PM, Gibson CC, Kovbasnjuk ON, Spring KR. 1998. Diffusion coefficients in the lateral intercellular spaces of Madin-Darby canine kidney cell epithelium determined with caged compounds. *Biophys J* 74(6):3302-12.

- Zeuthen T. 1991a. Secondary active transport of water across ventricular cell membrane of choroid plexus epithelium of *Necturus maculosus*. *J Physiol* 444:153-73.
- Zeuthen T. 1991b. Water permeability of ventricular cell membrane in choroid plexus epithelium from *Necturus maculosus*. *J Physiol* 444:133-51.
- Zeuthen T. 1994. Cotransport of K⁺, Cl⁻ and H₂O by membrane proteins from choroid plexus epithelium of *Necturus maculosus*. *J Physiol* 478 (Pt 2):203-19.
- Zeuthen T, Hamann S, la Cour M. 1996. Cotransport of H⁺, lactate and H₂O by membrane proteins in retinal pigment epithelium of bullfrog. *J Physiol* 497 (Pt 1):3-17.
- Zeuthen T, Meinild AK, Klaerke DA, Loo DD, Wright EM, Belhage B, Litman T. 1997. Water transport by the Na⁺/glucose cotransporter under isotonic conditions. *Biol Cell* 89(5-6):307-12.
- Zeuthen T, Meinild AK, Loo DD, Wright EM, Klaerke DA. 2001. Isotonic transport by the Na⁺-glucose cotransporter SGLT1 from humans and rabbit. *J Physiol* 531(Pt 3):631-44.
- Zeuthen T, Zeuthen E, Klaerke DA. 2002. Mobility of ions, sugar, and water in the cytoplasm of *Xenopus* oocytes expressing Na⁽⁺⁾-coupled sugar transporters (SGLT1). *J Physiol* 542(Pt 1):71-87.
- Zhou H, Tate SS, Palmer LG. 1994. Primary structure and functional properties of an epithelial K channel. *Am J Physiol* 266(3 Pt 1):C809-24.
- Zhou Y, Morais-Cabral JH, Kaufman A, MacKinnon R. 2001. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* 414(6859):43-8.

Zottola RJ, Cloherty EK, Coderre PE, Hansen A, Hebert DN, Carruthers A. 1995.

Glucose transporter function is controlled by transporter oligomeric structure. A single, intramolecular disulfide promotes GLUT1 tetramerization. *Biochemistry* 34(30):9734-47.

Zuniga FA, Shi G, Haller JF, Rubashkin A, Flynn DR, Iserovich P, Fischbarg J. 2001. A

three-dimensional model of the human facilitative glucose transporter Glut1. *J Biol Chem* 276(48):44970-5.

Annexe 1 Article complémentaire : L'hypothèse controversée du transport d'eau secondairement actif

Étant donné sa grande pertinence avec les sujets discutés ici, l'article suivant est présenté en complément du mémoire : *Controversy regarding the secondary active water transport hypothesis*. Les différents arguments ayant mené à la suggestion d'un cotransport d'eau y sont discutés en détail.

Faisant suite à la participation du professeur Jean-Yves Lapointe au 12e Symposium international annuel d'hiver de la SCBBMC (Société canadienne de biochimie et de biologie moléculaire et cellulaire), il a été soumis pour révision le 29 mai 2002 et accepté le 22 juillet 2002 pour publication dans le journal canadien *Biochemistry and Cell Biology : Biochimie et Biologie Cellulaire*.

Ma contribution se situe au niveau des calculs et de l'élaboration de 3 figures sur 4. J'ai aussi participé à la réflexion menant à l'élaboration du contenu de l'article.

Controversy regarding the secondary active water transport hypothesis

Jean-Yves Lapointe, Marilène P. Gagnon, Dominique G. Gagnon, and Pierre Bissonnette

Abstract: Historically, water transport across biological membranes has always been considered a passive process, i.e., the net water transport is proportional to the gradients of hydrostatic and osmotic pressure. More recently, this dogma was challenged by the suggestion that secondary active transporters such as the Na/glucose cotransporter (SGLT1) could perform secondary active water transport with a fixed stoichiometry. In the case of SGLT1, the stoichiometry would consist of one glucose molecule to two Na⁺ ions to 220–400 water molecules. In the present minireview, we summarize and criticize the evidence supporting and opposing this water cotransport hypothesis. Published and unpublished observations from our own laboratory are also presented in support of the idea that transport-dependent osmotic gradients begin to build up immediately after cotransport commences and are fully responsible for the cell swelling observed.

Key words: *Xenopus* oocyte, intracellular diffusion, water cotransport, SGLT1.

Résumé : Le transport de l'eau à travers les membranes biologiques a toujours été décrit comme un phénomène passif nécessitant la présence d'un gradient de pression hydrostatique ou osmotique pour expliquer la présence de tout flux net mesuré. Récemment, ce dogme a été remis en question par une série d'articles où l'on prétendait que certains cotransporteurs, dont le cotransporteur Na/glucose (SGLT1), avaient la capacité de faire du transport d'eau secondairement actif. Dans le cas de SGLT1, la stoechiométrie du cotransport serait d'une molécule de glucose, deux ions Na⁺ et 220–400 molécules d'eau. Dans cette minisynthèse, nous allons faire la synthèse des arguments en faveur et contre l'hypothèse du transport secondairement actif d'eau. Nous allons notamment présenter des données de notre laboratoire (publiées ou inédites) afin de défendre l'idée que des faibles coefficients de diffusion pour les solutés intracellulaires peuvent expliquer quantitativement tout gonflement cellulaire associé à l'activation du cotransport par l'établissement rapide de gradients osmotiques locaux.

Mots clés : ovocyte de Xénope, diffusion intracellulaire, cotransport d'eau, SGLT1.

Introduction

One of the earliest reports suggesting the existence of a plasma membrane was published in 1877 by Wilhelm Pfeffer and described the behaviour of plant cells exposed to a hypertonic shock (Pfeffer 1877). It is interesting to note that this initial observation of a plasma membrane involves a most fundamental property: its water permeability. A considerable body of literature, drawing mainly on experiments

with red blood cells (Sidel and Solomon 1957; Paganelli and Solomon 1957; Brahm 1982; Finkelstein 1987), has clearly established that the water permeation process utilises at least two different pathways: a diffusion permeability through the lipid bilayer and a much larger permeability associated with a mercurial-sensitive pathway. This latter pathway presents results characteristic of a single file of ~15 water molecules diffusing through a narrow pore and triggered the search for a membrane protein that could mediate this type of water permeability. Interestingly, the first membrane protein found to mediate water permeability was not a water channel but a glucose carrier. Fischbarg et al. (1989) first reported a phloretin-sensitive water permeability in a macrophage-like cell line, suggesting that water could be carried across the plasma membrane by a mechanism intimately related to the glucose-facilitated transporter. This suggestion was rapidly confirmed by expressing GLUT1 transporters in oocytes (Fischbarg et al. 1990). A year later, the cloning of CHIP28 (Preston and Agre 1991) revolutionised the field of water

Received 29 May 2002. Accepted 22 July 2002. Published on the NRC Research Press Web site at <http://bcf.nrc.ca> on 13 September 2002.

J.-Y. Lapointe,¹ M.P. Gagnon, D.G. Gagnon, and P. Bissonnette. Groupe de recherche en transport membranaire and département de Physique, Université de Montréal, C.P. 6128, succ. « centre-ville », Montreal, QC H3C 3J7, Canada.

¹Corresponding author (e-mail: [redacted]).

transport. This protein, which was later named aquaporin 1 (AQP1), was found to function as a true water channel (Zhang et al. 1993) capable of transporting 10^9 water molecules \cdot s $^{-1}$. At this time, 10 aquaporin isoforms have been identified in human tissues and hundreds of related proteins have been found in animals cells, plant cells, and different microorganisms (Borgnia et al. 1999; Verkman and Mitra 2000).

Classically, the transmembrane water flux (J_w) has always been described as a passive mechanism, i.e., being driven by a hydrostatic (ΔP) and an osmotic ($\Delta\pi$) pressure gradient according to the Kedem–Katchalsky equation:

$$[1] \quad J_w = L_p \times v_w(\Delta P + \Delta\pi)$$

where L_p is the hydraulic permeability (centimetres per second) and v_w is the water specific volume (~ 18.07 mL \cdot mol $^{-1}$). In a series of two papers published in 1991, it was proposed that a KCl cotransporter in the choroid plexus could mediate water transport in a secondary active manner (Zeuthen 1991a, 1991b). Soon after, a paper describing the fast water flux that accompanies Na/glucose cotransport in *Xenopus* oocytes more firmly established the foundation for the water cotransport hypothesis (Loo et al. 1996). In the following years, several publications reported the occurrence of water cotransport associated with the human Na/glucose cotransporter (hSGLT1, Meinild et al. 1998), the Na/glutamate cotransporter (EAAT1, MacAulay et al. 2001), the Na/dicarboxylate cotransporter (Meinild et al. 2000), the Na/iodide cotransporter (mentioned in Loo et al. 1996 and Meinild et al. 2000), and a H/amino acid cotransporter (mentioned in Loo et al. 1996) with calculated stoichiometries varying from 50 to 400 water molecules per turnover of the carrier.

The existence of secondary active water transport would profoundly change the physiological concepts of water transport and isotonic absorption (Reuss 1996; Spring 1999; Diamond 1996; Schultz 2001). The present minireview summarises the evidence gathered during the last 6 years, both for and against the possibility of water cotransport with SGLT1.

Experimental approach

The examination of water cotransport relies on the combination of measuring a cell volume with great sensitivity and obtaining an electrophysiological recording of the solute transport rate. The large size and low surface to volume ratio provided by *Xenopus laevis* oocytes permit the accurate measurement of water fluxes over a time frame of seconds to hours. A low-magnification inverted microscope equipped with an imaging system is used to record the cross section of an oocyte while continuously recording transmembrane currents with a two-microelectrode voltage-clamp system (Zeuthen et al. 1997). With this approach, the signal to noise ratio is of the order of 2000 to 1, allowing for the detection of volume changes as small as 0.3 nL. Solutions can be changed within 15–20 s on a routine basis (Zeuthen et al. 2001; Duquette et al. 2001) and solution exchange times as fast as 5 s were occasionally reported (Zeuthen et al. 1997; Meinild et al. 1998).

Initial observations suggesting water cotransport

“Instantaneous” cell swelling

The main observation supporting the water cotransport hypothesis is the surprisingly fast onset of cell swelling upon addition of sugar to an SGLT1-expressing oocyte (Zeuthen et al. 1997, 2001; Meinild et al. 1998). In these experiments, cell swelling was found to closely match the time course of the cotransport current. More specifically, the cell swelling induced by activation of Na/glucose cotransport was significantly faster than the cell swelling induced by activation of a Na $^+$ current of similar size through gramicidin (Zeuthen et al. 1997; Meinild et al. 1998) or a K $^+$ current through ROMK2 channels (Duquette et al. 2001). The fast cell swelling was best observed when the cotransport current was rapidly modulated by sudden hyperpolarisation or depolarisation in the presence of cotransported sugar (Loo et al. 1996; Zeuthen et al. 2001). As membrane potential can be controlled within 5–10 ms, this is the fastest way to increase or decrease the cotransport current.

Each cotransporter studied is characterised by a distinct water to solute transport stoichiometry

The cell swelling observed during the first minute after glucose addition was reported to be somewhat linear and was suggested to have been directly mediated by a secondary active transport mechanism. In the case of hSGLT1, comparing the initial water uptake with the initial cotransport current indicates that 210 water molecules accompany each glucose molecule transported (Meinild et al. 1998). This apparent stoichiometry was shown to vary from 50 for the H/amino acid cotransporter (mentioned in Loo et al. 1996, 2002) to 424 for rabbit SGLT1 (Zeuthen et al. 2001). It was argued that if the water flux were dependent on osmolyte accumulation, similar rates of water flux should accompany similar transport rates (Loo et al. 2002).

It should be recognised, however, that in all cases studied the amount of water cotransported with a given number of substrate molecules results in hypertonic solute transport. For example, if the current electrode is osmotically inactive when compensating for the inward Na/glucose current (i.e., if as much Cl $^-$ travels from the electrode to the cytosol as K $^+$ from the cytosol to the electrode), then 210 water molecules accompany the influx of two Na $^+$ ions and one glucose molecule. With an external solution osmolarity of 200 mosmol, each solute is surrounded by an average of 275 water molecules, indicating that the three transported osmolytes should be accompanied by ~ 825 water molecules in order to generate isotonic absorption. As a result, the osmolyte cotransport described must generate a transmembrane osmotic gradient that increases with time producing a progressive increase in the water influx.

Similar activation energies for water cotransport and Na/glucose cotransport

Another piece of evidence presented in favour of the water cotransport hypothesis is the temperature dependence of the different water transport mechanisms (Loo et al. 1996). In the absence of glucose, SGLT1-expressing oocytes pres-

ent a passive water permeability that is phlorizin (Pz, the specific inhibitor of SGLT1) sensitive and approximately equal in size to the water permeability of noninjected oocytes. The water permeability of SGLT1-expressing oocytes is temperature sensitive and displays an activation energy (E_a) of $9 \pm 1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ as compared with the $12 \pm 2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ E_a for noninjected oocytes. In contrast, the initial transport-dependent water flux has an E_a of $23 \pm 2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, which is remarkably similar to the E_a of Na/glucose cotransport itself ($26 \pm 4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$). This is consistent with two different means of water transport through SGLT1: a low- E_a water channel and a high- E_a water cotransport mechanism.

Water cotransport can occur against an osmotic gradient

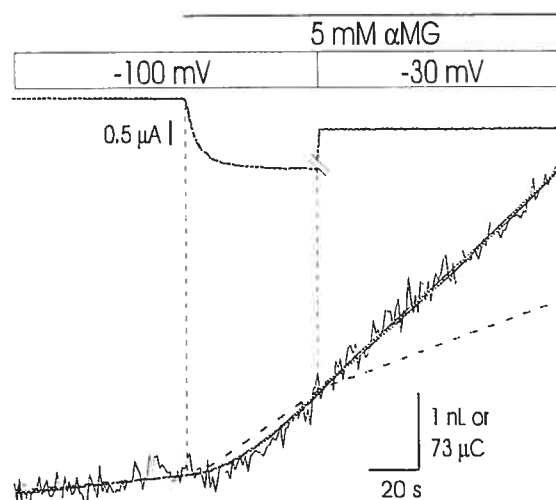
Further evidence supporting water cotransport was the observation that the addition of glucose can drive water transport against an externally applied osmotic gradient (Meinild et al. 1998). To demonstrate this, 10 mM mannitol was added to the bathing solution, causing cell shrinkage due to the increase in extracellular osmolarity. If mannitol is replaced by glucose, the cotransport current activation generates a water influx that fully compensates for the water efflux expected due to the ambient hypertonicity. Similar observations were reported for EAAT1 (MacAulay et al. 2001).

Testing the water cotransport hypothesis

Our laboratory has initiated a series of experiments aimed at testing the water cotransport hypothesis using hSGLT1 expressed in oocytes (Duquette et al. 2001; Lapointe et al. 2002). We first confirmed that SGLT1-expressing oocytes displayed a passive water permeability that was about twice as high as the endogenous water permeability of noninjected oocytes. This additional water permeability was further shown to be completely Pz sensitive. Addition of 5 mM α -methylglucose (α MG, a nonhydrolysable glucose analogue) generated a fast cell swelling that reached a constant rate after 5–10 min. By measuring swelling rates in the presence of α MG before, or just after, the addition of Pz and then comparing these values with the swelling rate induced by the application of a 50-mosmol hypotonic shock in the absence of α MG (with and without Pz), it was possible to estimate the “steady-state” osmotic gradient accumulated across the oocyte membrane. It was found that after 15 min of Na/glucose cotransport, an osmotic gradient of $16 \pm 2 \text{ mosmol}$ was sufficient to explain the passive water flux observed immediately after adding Pz. Given the measured water permeability in the absence of Pz, such a hypertonicity could account for ~94% of the cell swelling observed when α MG was present. The remaining water flux, which could not be accounted for by the osmotic gradient, averaged $7 \pm 8 \text{ pL}\cdot\text{s}^{-1}$. Under these conditions that reproduce the steady-state behaviour of a renal or intestinal SGLT1, it was concluded that the portion of water transport corresponding to a secondary active component was undetectable.

It can be argued that the presence of a relatively minor water cotransport component may be difficult to resolve in the face of a large passive water transport that occurs natu-

ally after prolonged exposure to α MG. In order to test this possibility, the early effect of Na/glucose cotransport on water flux was studied at 1 min after the addition of α MG. According to the water cotransport hypothesis, no significant osmotic gradients are present during the first minute of cotransport and the cell swelling should correspond exclusively to water cotransport (Zeuthen et al. 2001). While our measurements showed that the initial cell swelling did correspond to 200–300 water molecules per α MG molecule transported, the cell swelling failed to decrease in proportion to the cotransport current when the membrane potential was rapidly depolarised to 0 mV. These measurements were presented in our original paper (Duquette et al. 2001) and other examples have been shown more recently (Lapointe et al. 2002). In Fig. 1, we present new data regarding this apparent irreversibility of the water flux triggered by the initial cotransport current. In this series of experiments, the membrane potential (V_m) traversed a smaller voltage range, i.e. from -100 to -30 mV. In order to minimize the level of noise in the volume measurement, five synchronised experiments were averaged. It can be seen that the average cotransport current is reduced by 55% upon cell depolarisa-



tion. The two almost identical continuous lines represent the prediction of the osmolyte accumulation model (see text and Fig. 2) using either an intracellular diffusion coefficient of $0.05 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$, five osmolytes per α MG molecule transported, and an accessible water volume ratio of 0.8 or an intracellular diffusion coefficient of $0.09 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$, 4.4 osmolytes per α MG molecule transported, and an accessible water volume ratio of 0.4.

tion but that the oocyte swelling rate clearly fails to diminish proportionately. In contrast, as we will see below, the prediction from an osmolyte accumulation model can completely account for the cell swelling observed.

Intracellular diffusion model

The obvious alternative explanation to water cotransport is the hypothesis of significant osmolyte accumulation in the local environment of the plasma membrane. We have built a numerical model in an attempt to determine whether the intracellular diffusion coefficient needed to satisfy such an osmotic gradient was reasonable. The model was built to involve a minimum number of adjustable parameters. In its simplest expression, the model considers the diffusion of a single type of osmolyte that is assumed to represent Na⁺ and glucose as well as the "average" intracellular osmolyte. Given that glucose, in free aqueous solution, has a diffusion coefficient two to three times slower than Na⁺ or K⁺ (diffusion coefficients for KCl, NaCl, and glucose are 1.68×10^{-5} , 1.39×10^{-5} , and 0.60×10^{-5} cm²·s⁻¹, respectively (Macey 1980)), this assumption is rather crude, but our purpose here is only to establish the range of parameter values required to quantitatively explain the total water flux observed through the accumulation of a local osmotic gradient. Additional parameters (e.g., different diffusion coefficients for Na⁺ and glucose) would certainly improve the accuracy of the fitting procedure but would diminish the significance of the model by making it too compliant. In the present model, the oocyte volume is divided into 50 concentric shells of 10 μm thickness along with a central core that is adjusted in size as a function of the measured diameter of each oocyte studied (see Fig. 2A). Osmolyte displacement is assumed to occur through measured transport across the plasma membrane and through diffusion from one shell to the other. The transport rate at the plasma membrane is continuously measured and is entered as an input to the model. The net diffusion from shell *i* to *i* + 1 is calculated from the following equation:

$$[2] \quad J_{i,i+1} = D_i \frac{(C_i - C_{i+1})}{(r_i - r_{i+1})}$$

where D_i is the intracellular diffusion coefficient (parameter No. 1) and C_i is the osmolyte concentration in shell *i* characterized by a mean radius of r_i . The time increment is set at 0.1 s in order to achieve a stable model (no oscillations) for the range of diffusion coefficients studied. At each time increment, a new set of C_i is calculated and a new water flux (J_v) across the plasma membrane is introduced according to the following equation:

$$[3] \quad J_v = L_p S (C_1 - C_{out}) v_w$$

where J_v is given in units of volume per second, L_p is the oocyte water permeability, and S is the typical oocyte surface area (assumed to be 0.4 cm², considering a membrane infolding factor of 9 (Zampighi et al. 1995)), C_{out} is the external solution osmolarity (=200 mosmol), C_1 is the osmolarity of the first shell, and v_w is the water specific volume. The new volume influx is added to the first shell volume and its osmolarity (C_1) and radius (r_1) are recalculated.

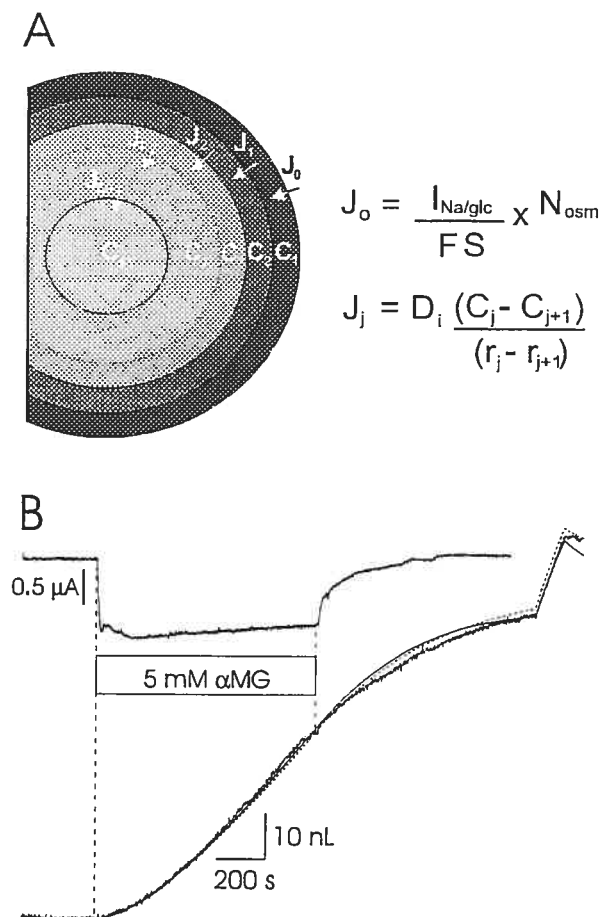
Additionally, one has to assume a certain proportion between the geometric volume of a shell and its accessible water content. Based on total oocyte desiccation experiments in the presence of an extracellular space marker, we estimated that 85% of the oocyte volume was composed of water and this was considered indicative of the accessible water content of each shell throughout the oocyte (Duquette et al. 2001). Finally, in the case of Na/glucose cotransport experiments, the number of osmolytes per glucose transported (N_{osm}) also has to be adjusted (parameter No. 2). It is clear that the stoichiometry of SGLT1 is two Na⁺ ions per glucose molecule transported, but one must also consider the contribution of the current-injecting electrode. As the electrode contains a 1 M KCl solution, and given the cytosolic K⁺ concentration (80–100 mM (Dascal 1987)), it is expected that the Na⁺ inward cotransport current will be balanced at the current-injecting electrode by Cl⁻ injection from the electrode and, to a smaller extent, by some cytosolic K⁺ entering the electrode. Theoretically, N_{osm} can vary between 1 (if the exit of two K⁺ compensates for the entry of two Na⁺) and 5 (if the entry of two Cl⁻ accompanies the entry of two Na⁺). Given the high Cl⁻ concentration of the electrode versus the K⁺ concentration of the cytosol, N_{osm} can reasonably be expected to exist between 3 and 5. Note that in this model, the actual value of L_p was not considered as a third adjustable parameter, since it was measured by applying a hypotonic shock at the end of each experiment. With the oocyte surface area and accessible volume fixed, the cell swelling induced by Na/glucose cotransport can be fitted with the adjustment of only two parameters (D_i and N_{osm}). It was found that satisfactory modelling of the complete volume versus time curve in an αMG-stimulated cell swelling experiment could be obtained using a D_i in the range of 0.05×10^{-5} to 0.15×10^{-5} cm²·s⁻¹ and N_{osm} values between 3.5 and 5 osmolytes per glucose molecule transported (Duquette et al. 2001; Lapointe et al. 2002). In Fig. 2, a representative example of the curve fitting result is shown where D_i and N_{osm} are set to 0.05×10^{-5} cm²·s⁻¹ and 3.7 osmolytes per αMG molecule transported, respectively. If the accessible water volume ratio is diminished from 0.85 to 0.4, an acceptable fit can be obtained using D_i and N_{osm} values of 0.10×10^{-5} cm²·s⁻¹ and 3.0 osmolytes per αMG molecule transported, respectively (see Fig. 2). Over the range of free access volumes between 0.4 and 0.85, combination of either a low access volume with a high diffusion coefficient or a large access volume with a low diffusion coefficient is equally capable of providing an accurate simulation of the cotransport-induced cell swelling.

Discussion

Comparing the two interpretations

With sets of data that are often quite similar, it is remarkable that such different conclusions have been reached in support of (Zeuthen et al. 1997, 2001; Meinild et al. 1998) and in opposition to (Duquette et al. 2001; Lapointe et al. 2002) the water cotransport hypothesis. Although important differences in interpretations do exist, there are several points of agreement between both camps. That water can use SGLT1 to cross cell membranes in a passive and Pz-sensitive

Fig. 2. Osmolyte accumulation model. (A) Geometry used by the model and the definition of the transport flux (J_o) and the diffusive flux from one shell to the other (J_j). $I_{\text{Na/glc}}$ is the current induced by glucose addition, N_{osm} is the number of osmolytes transported per Na^+ ion through the Na/glucose cotransporter (SGLT1), F is the Faraday constant, and S is the standard oocyte membrane area ($\approx 0.4 \text{ cm}^2$). The diffusive flux of osmolytes is described in terms of D_i , the intracellular diffusion coefficient, and C_j , the osmolyte concentration in shell j , which is characterized by a radius of r_j . (B) Performance of the osmolyte accumulation model. The cell swelling induced by the addition of 5 mM α -methylglucose (α MG) to a hSGLT1-expressing oocyte was fitted by the osmolyte accumulation model using two different sets of parameters. The dashed curve was generated with a ratio of free intracellular volume over total volume (V_F/V_T) of 0.85 and an average D_i of $0.05 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. The solid curve was obtained by fixing V_F/V_T to 0.40 and adjusting D_i to $0.1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. In both cases, the oocyte water permeability (L_p) was set to $4.5 \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ in order to correctly represent the swelling rate triggered by the 50-mosmol hypotonic shock performed at the end of the recording.



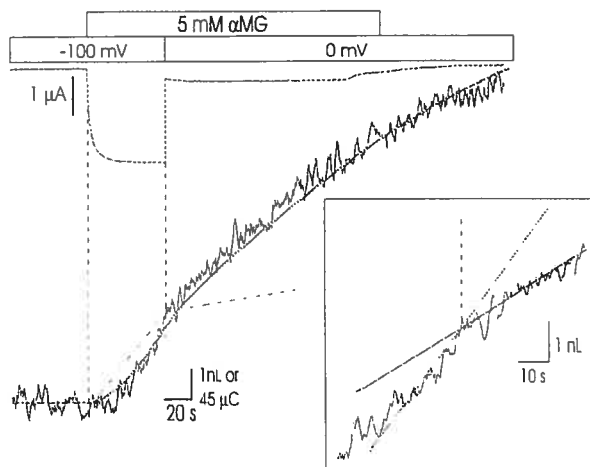
way is beyond dispute (Loo et al. 1999). Also, there is no question that the cell swelling induced by the Na/glucose cotransport current is relatively fast in comparison with the cell swelling obtained with a purely ionic current. Finally, both sides agree that the initial amount of water transported as a direct or indirect response to the onset of Na/glucose cotransport results in a hypertonic transport causing signifi-

cant osmolyte accumulation after several minutes of cotransport.

On the other hand, several clear-cut discrepancies remain. During one calendar year, Duquette et al. (2001) published the finding that water cotransport could not be quantitatively detected after prolonged exposure to sugar, and Zeuthen et al. (2001) reported that in steady state, $38 \pm 4\%$ of the water influx was carried through a cotransport mechanism. This discrepancy might be explained by the fact that after a protracted exposure to sugar, the determination of water cotransport is the result of a subtraction between two large numbers, water cotransport being assumed to be whatever is left once the passive water flux has been subtracted from the total water flux measured. In our experiments, we took great care to estimate the initial swelling rate occurring immediately after Pz addition (Duquette et al. 2001) by fitting the volume versus time curve with a function containing both a linear (final rate) and an exponential term in order to better estimate the initial rate. Zeuthen et al. (2001), on the other hand, have used the alternative procedure of removing α MG over a 2-min period once a steady-state sugar-induced swelling rate has been reached. In our experience, osmotic gradients can be significantly altered well within the time window of 2 min used by Zeuthen et al. (2001) such that a large proportion of the water flux assumed to be cotransported ($38 \pm 4\%$ of the total water influx) could be explained by partial dissipation of the osmotic gradient during the time required for washing out α MG from the bath.

An even more significant discrepancy concerns the influence of rapid cell depolarisation on cell swelling. This is the main argument of Duquette et al. (2001) and of Lapointe et al. (2002), supporting our contention that water cotransport is not present in hSGLT1-expressing oocytes. In short, after 1 min of sugar application, a very large fraction of the cotransport current can be inhibited (up to 94% in our case) without observing a proportional decrease in the swelling rate (see Figs. 1 and 3). Zeuthen et al. (2001) have presented results showing the exact opposite behaviour for rSGLT1, i.e., a depolarisation producing a rapid decrease in the cotransport current (by 60%) and a concomitant decrease in the swelling rate (by 46%, using the numbers given in the legend to fig. 4A of their article). The main difference between the two sets of data is the time course of the protocols used. In Zeuthen et al. (2001), sugar is presented for only 30 s and the change in swelling rate is shown for only the following 40 s. For Duquette et al. (2001) and Lapointe et al. (2002) (also see Fig. 1 of the present paper), sugar is presented for 60 s and the change in swelling rate is observed over the following 120 s. As Zeuthen et al. (2001) have presented data indicating that water cotransport was responsible for nearly all of the cell swelling observed in the first minute of sugar addition, the time used for sugar exposure in our experiments appears to be appropriate, and our measurement of an initial swelling rate consistent with a putative stoichiometry of 210 water molecules per glucose molecule transported also supports the validity of our protocol. It is also important to test if the water cotransport hypothesis can account for the entire duration of the cell swelling observed rather than concentrating on the initial 40 s. Measurements of several volume recordings published by the two groups

Fig. 3. Example of the effect of a rapid cell depolarisation on human Na/glucose cotransporter (hSGLT1) expressing oocyte volume. The osmolyte accumulation model fit is shown and, given the crude assumptions involved in this model, provides a relatively satisfactory description of the oocyte volume. The dashed line is the integral of the cotransport current on a scale adjusted to give an apparent water stoichiometry of 234 water molecule per α -methylglucose (α MG) molecule transported. The inset shows an enlargement of the volume curve around the time where the cell was rapidly depolarised from -100 to 0 mV. Fitting the curves with straight lines suggests that the swelling rate was immediately reduced by 55%, which is still smaller than the observed reduction of the cotransport current by 85%.



clearly indicate that spontaneous volume changes can occur over 10- to 20-s time periods, and thus, longer periods are required to clearly identify the changes in volume over time. Figure 3 provides another example of the effect of cell depolarisation on cotransport current and cell volume. The inset in Fig. 3 shows an enlargement of the volume measurements within 40 s of cell depolarisation. In isolating this recording segment and fitting straight lines to the cell swelling observed immediately before and after cell depolarisation, one could argue that the swelling rate has been reduced by 55%. Two points are worth noticing. First, the apparent immediate reduction in cell swelling is much smaller than the reduction of the cotransport current, which is 85 % in the present case. Second, these types of sharp breaks in the cell swelling rate cannot be trusted, as they are not consistently associated with the sudden cotransport current reduction triggered through cell depolarisation (see Fig. 1 of the present paper; Duquette et al. 2001; Lapointe et al. 2002). It is interesting that the osmolyte accumulation model predicts the cell volume change occurring over a time course of several minutes much better than does the integral of the cotransport current. Our conclusion has consistently been (Duquette et al. 2001; Lapointe et al. 2002; present paper) that the cell swelling was not reduced in proportion to the integral of the cotransport current. By analysing a shorter time interval, Zeuthen and his collaborators have reached the opposite conclusion. The accuracy of their procedure (using linear regressions over a reduced time window) can be questioned, as it sometimes leads to inconsistent conclusions. For example, in fig. 4 of Loo et al. (1996) (also reported in fig.

3A of Loo et al. 2002), a hyperpolarisation from 0 to -100 mV was shown to trigger an immediate increase in the rate of cell swelling from 9 to 40 $\text{pL}\cdot\text{s}^{-1}$ (a 4.4-fold stimulation) and an increase in the cotransport current from 280 to 950 nA (a 3.4-fold stimulation). The apparent similarity between the factors by which the two phenomena were increased is at best fortuitous, as the experiment was performed in the presence of a 15-mosmol osmotic gradient (as acknowledged in their figure legend), which probably accounts for the major fraction of the cell swelling reported before and after cell hyperpolarisation.

Reviewing the evidence for water cotransport

In all of the experimental or review papers, four principal pieces of evidence have been brought forward in support of the water cotransport hypothesis (Loo et al. 2002). These will be reviewed in light of our own hypothesis that water requires a hydrostatic or an osmotic pressure difference in order to move across biological membranes.

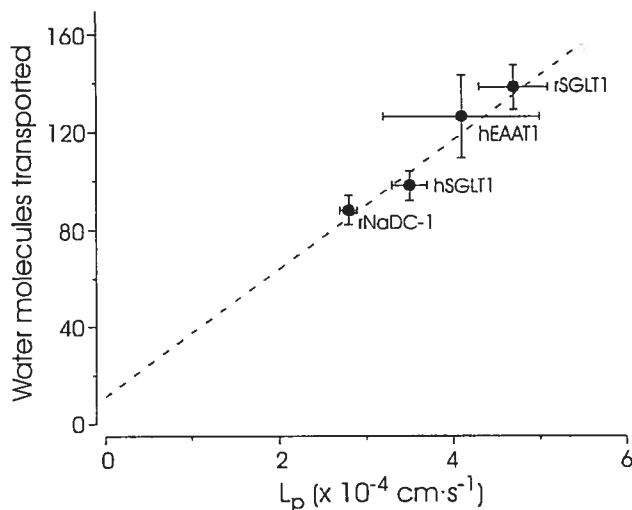
1. Glucose-induced cell swelling is fast

We agree that the water flux triggered by glucose cotransport is a relatively fast process, i.e., it is indeed faster than the water flux induced by an ionic current through gramicidin, ROMK, and others. However, a pure ionic flux might not be entirely suited for comparison with a Na/glucose cotransport process. For example, it is possible that glucose uptake by the cell has a more important osmotic effect than similar uptakes of Na^+ or K^+ for some reasons. In support of this, the glucose diffusion coefficient in aqueous solutions is 2.5 times smaller than for KCl (Macey 1980). In addition, the space available for diffusion does not have to be identical for both Na^+ and glucose.

2. The stoichiometry of water cotransport appears to differ between transporters

According to the osmolyte accumulation hypothesis, the initial swelling rate depends on the transport rate and on the water permeability of the oocytes expressing a given type of transporter. From table 1 of Zeuthen et al. (2001), it is possible to calculate the average water stoichiometry and the average L_p for five oocytes expressing hSGLT1 and for seven oocytes expressing rSGLT1. With similar cotransport current amplitudes, it is interesting to note that the calculated water stoichiometries (294 ± 18 water molecules per turnover for hSGLT1 and 414 ± 27 water molecules for rSGLT1) appear to be proportional to their respective L_p ($3.5 \times 10^{-4} \pm 0.2 \times 10^{-4} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ for hSGLT1 and $4.7 \times 10^{-4} \pm 0.4 \times 10^{-4} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ for rSGLT1). It is possible to obtain corresponding figures for the Na/dicarboxylic acid cotransporter (Meinild et al. 2000) and the Na/glutamate cotransporter (MacAulay et al. 2001). In order to obtain a meaningful comparison, the water apparent stoichiometry has to be normalised by the number of osmolytes transported during each turnover of the cotransporter. We assumed in all cases that the current electrode is osmotically inactive when it injects a current that compensates for the cotransport current occurring at the plasma membrane. This gives us three osmolytes per turnover for SGLT1 (two Na^+ and one glucose molecule) and four osmolytes per turnover for the Na/dicarboxylate cotransporter (three Na^+ and one citrate molecule for exam-

Fig. 4. Correlation between the number of water molecules transported per osmolyte and the water permeability (L_p) of oocytes expressing the rabbit Na/dicarboxylate transporter (rNaDC-1), the human Na/glucose cotransporter (hSGLT1), the human Na/glutamate cotransporter (hEAAT1), and the rabbit Na/glucose cotransporter (rSGLT1). Data for rSGLT1 and hSGLT1 were taken from table 1 of Zeuthen et al. (2001). For hEAAT1, data were taken from table 1 (oocytes 6–9) of MacAulay et al. (2001). For rNaDC-1, we used the average L_p and the average water cotransport stoichiometry given in Meinild et al. (2000). The initial rate of cell swelling upon addition of a specific substrate was used to calculate the number of water molecules transported per second. This number was divided by the number of osmolytes transported per second, which was calculated from the reported initial current and the known stoichiometry of each transporter. A linear regression was performed using each data point and their respective SEMs. The best fit yielded a slope of 26 ± 5 water molecules per unit of L_p (i.e., $1 \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$) and an intercept of 11 ± 16 water molecules.



ple). In the case of the Na/glutamate cotransporter, we assumed that the uptake of each glutamate molecule is accompanied by one proton and two Na^+ entering the cell and one K^+ leaving the cell (see MacAulay et al. (2001) for a brief discussion on the different stoichiometries proposed). As the cotransported proton will be rapidly taken up by the oocyte intracellular buffers, its osmotic effect can be neglected and one calculates that two active osmolytes are transported per turnover. The number of putative cotransported water molecules per osmolytes transported is plotted in Fig. 4 as a function of the L_p reported for the group of oocytes expressing each type of cotransporter. As predicted by the osmolyte accumulation model, a definitive correlation can be observed, suggesting that the highest water stoichiometry estimated appears to be the reflection of the number of osmolyte transported and the water permeability of the oocytes expressing each type of cotransporter.

3. Water cotransport and Na/glucose cotransport have similar E_a

This criterion cannot be used to distinguish between the two hypotheses discussed here. Whether water is actually cotransported or passively transported following solute up-

take, the temperature dependence of the process must follow that of Na/glucose cotransport, since for both hypotheses, water flux is driven by the cotransport activity.

4. Possibility of uphill water transport

The occurrence of water cotransport is not required to explain apparent uphill water transport, as it was shown by Duquette et al. (2001) that the osmolyte accumulation model is capable of generating a water flux against an applied osmotic gradient. The water movement across the oocyte plasma membrane has to be considered as a global phenomenon. When a hypertonic solution is applied to an SGLT1-expressing oocyte, water will be passing through both the endogenous and the SGLT1 passive permeabilities. According to the osmolyte accumulation hypothesis, the addition of glucose induces a local accumulation of osmolyte, which acts as an additional driving force for water influx. The final water transport observed reflects the sum of the external osmotic gradient applied and the transport-dependent buildup of a supplementary local gradient.

Physiological relevance of water transport through SGLT1

Now that we have considered the experimental evidence regarding the possibility of water cotransport through SGLT1, an important scientific issue remains. As there is a significant water permeability associated with each SGLT1 molecule, is water transport through such proteins of any physiological relevance? As addressed by Spring (1999), such a role has been dismissed in the kidney where a high water permeability is provided by different aquaporins. In the proximal tubule, where ~120 L of water is reabsorbed daily, the isotonic reabsorption of glucose with its associated Na^+ could account for the concomitant reabsorption of 4 L of water, which corresponds to only 3% of the proximal tubule load. Furthermore, the crucial role of AQP1 in water reabsorption was confirmed when knock-out mice exhibited a decrease of 80% in renal water reabsorption (Schnermann et al. 1998). The transport of water through intestinal cells is a different matter, as no aquaporins have been reported so far for this tissue. However, at body temperature, the osmotic water permeabilities of intestinal brush-border and basolateral membranes were shown to be relatively low and to be insensitive to membrane protein modification with mercurial reagents (Dempster et al. 1991), suggesting that the permeabilities originate primarily through the lipid bilayer itself. At this point, the prevailing evidence supports the contention that intestinal water absorption occurs mainly through the paracellular route, where an intense convective flow (solvent drag) would exist (Chang and Rao 1994). In this light, a true physiological role in water homeostasis for SGLT1 still requires convincing evidence and it is too soon to reach such a conclusion.

Still, there is no doubt that SGLT1 and many other transporters are capable of mediating a passive water transport. If the role of this water permeability in transepithelial transport does not yet appear significant, is it possible that this local coupling between transport and water permeability serves a biophysical function? The presence of a passive L_p associated with each cotransporter molecule could be considered

as an evolutionary trait of the protein designed to help osmotic water fluxes or, alternatively, it could simply be an unavoidable consequence of the high protein flexibility that is likely required for the normal functioning of cotransporters. A parallel might be drawn with the anionic exchanger (AE1), which interacts directly with a carbonic anhydrase in such a way that the bicarbonate entering the cell is rapidly transformed into CO₂ and H₂O, which facilitates maintaining a high net flux (Sterling et al. 2001). Can we apply a similar concept to SGLT1, which carries its own water permeability within the cotransporter molecule itself?

Conclusion

The water cotransport hypothesis has generated a considerable amount of interest within the community of transport physiologists. It is not easy to prove this hypothesis right or wrong, but we feel that the burden of the proof rests on the authors who proposed it. They need to show that water transport can occur in the absolute absence of any significant osmolarity gradient. In our view, it remains to be proven.

Acknowledgements

This work was supported by CIHR grant No. MT-10580 to J.-Y.L. M.P.G. received a scholarship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

References

- Borgnia, M., Nielsen, S., Engel, A., and Agre, P. 1999. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 425–458.
- Brahm, J. 1982. Diffusional water permeability of human erythrocytes and their ghosts. *J. Gen. Physiol.* **79**: 791–819.
- Chang, E.B., and Rao, M.C. 1994. Intestinal water and electrolyte transport. *In Physiology of the gastrointestinal tract. Edited by L.R. Johnson.* Raven Press, New York. pp. 2027–2081.
- Dascal, N. 1987. The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **22**: 317–387.
- Dempster, J.A., van Hoek, A.N., de Jong, M.D., and van Os, C.H. 1991. Glucose transporters do not serve as water channels in renal and intestinal epithelia. *Pflügers Arch.* **419**(3–4): 249–255.
- Diamond, J.M. 1996. Wet transport proteins. *Nature (Lond.)*, **384**: 611–612.
- Duquette, P.P., Bissonnette, P., Lapointe, J.Y. 2001. Local osmotic gradients drive the water flux associated with Na⁽⁺⁾/glucose cotransport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 3796–3801.
- Finkelstein, A. 1987. Water movement through lipid bilayers, pores, and plasma membranes. Theory and reality. John Wiley & Sons, New York.
- Fischbarg, J., Kuang, K.Y., Hirsch, J., Lecuona, S., Rogozinski, L., Silverstein, S.C., and Loike, J. 1989. Evidence that the glucose transporter serves as a water channel in J774 macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 8397–8401.
- Fischbarg, J., Kuang, K.Y., Vera, J.C., Arant, S., Silverstein, S.C., Loike, J., and Rosen, O.M. 1990. Glucose transporters serve as water channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 3244–3247.
- Lapointe, J.-Y., Gagnon, M., Poirier, S., Bissonnette, P. 2002. The presence of local osmotic gradients can account for the water flux driven by the Na⁺-glucose cotransporter. *J. Physiol. (Lond.)*. **542**: 61–62.
- Loo, D.D., Zeuthen, T., Chandy, G., and Wright, E.M. 1996. Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 13 367 – 13 370.
- Loo, D.D., Hirayama, B.A., Meinild, A.K., Chandy, G., Zeuthen, T., and Wright, E.M. 1999. Passive water and ion transport by cotransporters. *J. Physiol. (Lond.)*, **518**(Pt. 1): 195–202.
- Loo, D.D., Wright, E.M., Meinild, A.K., Klaerke, D.A., and Zeuthen, T. 1999b. Commentary on “Epithelial fluid transport — a century of investigation”. *News Physiol. Sci.* **542**: 53–60.
- MacAulay, N., Gether, U., Klaerke, D.A., and Zeuthen, T. 2001. Water transport by the human Na⁺-coupled glutamate cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol. (Lond.)*, **530**: 367–378.
- Macey, R.I. 1980. Mathematical models of membrane transport process. *In Membrane physiology. Edited by T.E. Andreoli, J.F. Hoffman, and D.D. Fanestil.* Plenum Medical Book Company, New York and London. pp. 125–146.
- Meinild, A., Klaerke, D.A., Loo, D.D., Wright, E.M., and Zeuthen, T. 1998. The human Na⁺-glucose cotransporter is a molecular water pump. *J. Physiol. (Lond.)*, **508**(Pt. 1): 15–21.
- Meinild, A.K., Loo, D.D., Pajor, A.M., Zeuthen, T., and Wright, E.M. 2000. Water transport by the renal Na⁺-dicarboxylate cotransporter. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **278**: F777–F783.
- Paganelli, C.V., and Solomon, A.K. 1957. The rate of exchange of tritiated water across the human red cell membrane. *J. Gen. Physiol.* **41**: 259–277.
- Pfeffer, W.F. 1877. Osmotische Untersuchungen: Studien zur Zeil-Mechanik. 1st ed. (2nd ed. in 1921). Engelmann, Leipzig.
- Preston, G.M., and Agre, P. 1991. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 11 110 – 11 114.
- Reuss L. 1996. ‘Active’ water transport. *J. Physiol. (London)* **497**: 1.
- Schnermann, J., Chou, C.L., Ma, T., Traynor, T., Knepper, M.A., and Verkman, A.S. 1998. Defective proximal tubular fluid reabsorption in transgenic aquaporin-1 null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 9660–9664.
- Schultz, S.G. 2001. Epithelial water absorption: osmosis or cotransport? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 3628–3630.
- Sidel, V.W., and Solomon, A.K. 1957. Entrance of water into human red cells under an osmotic pressure gradient. *J. Gen. Physiol.* **41**: 243–257.
- Spring, K.R. 1999. Epithelial fluid transport – a century of investigation. *News Physiol. Sci.* **14**: 92–98.
- Sterling, D., Reithmeier, R.A., and Casey, J.R. 2001. A transport metabolon. Functional interaction of carbonic anhydrase II and chloride/bicarbonate exchangers. *J. Biol. Chem.* **276**: 47 886 – 47 894.
- Verkman, A.S., and Mitra, A.K. 2000. Structure and function of aquaporin water channels. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **278**: F13–F28.
- Zampighi, G.A., Kreman, M., Boorer, K.J., Loo, D.D., Bezanilla, F., Chandy, G., Hall, J.E., and Wright, E.M. 1995. A method for determining the unitary functional capacity of cloned channels and transporters expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Membr. Biol.* **148**: 65–78.
- Zeuthen, T. 1991a. Water permeability of ventricular cell membrane in choroid plexus epithelium from *Necturus maculosus*. *J. Physiol. (Lond.)*, **444**: 133–151.
- Zeuthen, T. 1991b. Secondary active transport of water across ventricular cell membrane of choroid plexus epithelium of *Necturus maculosus*. *J. Physiol. (Lond.)*, **444**: 153–173.

Zeuthen, T., Meinild, A.K., Klaerke, D.A., Loo, D.D., Wright, E.M., Belhage, B., and Litman, T. 1997. Water transport by the Na⁺/glucose cotransporter under isotonic conditions. *Biol. Cell.* **89**(5-6): 307-312.

Zeuthen, T., Meinild, A.K., Loo, D.D., Wright, E.M., and Klaerke, D.A. 2001. Isotonic transport by the Na⁺-glucose cotransporter

SGLT1 from human and rabbit. *J. Physiol. (London)*, **531**: 631-644.

Zhang, R., Skach, W., Hasegawa, H., van Hoek, A.N., and Verkman, A.S. 1993. Cloning, functional analysis and cell localization of a kidney proximal tubule water transporter homologous to CHIP28. *J. Cell Biol.* **120**: 359-369.

