

2M11.3312.7

Université de Montréal

Mesure de la stœchiométrie de transport des cotransporteurs de myo-inositol HMIT et SMIT2

par
Francis Bourgeois

Département de physique
Faculté des arts et des 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 moléculaire

janvier 2005

© Francis Bourgeois, 2005



QC

3

U54

2005

V. 022

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 :
Mesure de la stœchiométrie de transport des
cotransporteurs de myo-inositol SMIT2 et HMIT

présenté par :
Francis Bourgeois

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Raynald Laprade, président rapporteur
Jean-Yves Lapointe, directeur de recherche
Alfred Berteloot, membre du jury

Résumé

Les cellules dépendent de transporteurs membranaires pour accumuler des solutés organiques essentiels tel le myo-inositol (MI). Trois cotransporteurs de myo-inositol sont actuellement connus chez les mammifères. SMIT1 et SMIT2 utilisent le gradient de sodium comme source d'énergie nécessaire au transport, et HMIT couple son transport aux protons. Leur stœchiométrie de transport n'a pas été établie jusqu'à présent, quoique les coopérativités mesurées dans l'activation de SMIT1 et SMIT2 par le sodium suggèrent que plus de 1 Na⁺ sont impliqués pour le transport de chaque molécule de myo-inositol. Nous utilisons ici deux approches pour déterminer la stœchiométrie de transport de SMIT2 et de HMIT, utilisant des ovocytes de *Xenopus* maintenus à un potentiel constant et exprimant le transporteur étudié. La première est la méthode bien connue consistant à comparer la charge entrant dans la cellule à l'influx de substrat marqué. Nous avons mis sur pied une autre méthode qui compare cette même charge à l'entrée nette d'osmolytes lors du transport, laquelle dépend de la stœchiométrie. Cette entrée d'osmolytes est dérivée de la mesure à haute précision du volume de l'ovocyte. L'étalonnage de cette nouvelle méthode est fait avec un canal ionique à potassium (ROMK2) et elle est validée avec le cotransporteur Na⁺/glucose SGLT1 dont la stœchiométrie est déjà établie à 2 Na⁺:1 glucose. Par la méthode utilisant le substrat marqué, nous obtenons $2,14 \pm 0,05$ ions par molécule d' α -méthylglucose (α MG) pour ce transporteur. Avec notre nouvelle approche, nous obtenons un nombre d'osmolytes par charge (n_{OPC}) de $1,02 \pm 0,04$, correspondant à une stœchiométrie de $1,78 \pm 0,27$. Pour SMIT2, on obtient une stœchiométrie de $1,82 \pm 0,10$ et $n_{\text{OPC}} = 1,03 \pm 0,06$ correspondant à une stœchiométrie de $1,75 \pm 0,30$, en accord avec une stœchiométrie de 2 Na⁺:1 MI. Dans le cas de HMIT, la mesure de flux radioactif donne $1,03 \pm 0,04$ charge par myo-inositol. Avec la méthode volumétrique toutefois, $n_{\text{OPC}} = 0,96 \pm 0,08$ et correspond, sous l'hypothèse de la recapture complète des protons par le tampon, à une stœchiométrie de $0,67 \pm 0,05$ charge par MI. L'utilisation de SGLT1 en mode cotransport protons/glucose de stœchiométrie 2:1 a cependant montré que cette hypothèse est inexacte et indique que 38 % des protons transportés sont échangés pour un ion osmotiquement actif. Considérant cela, on trouve une stœchiométrie de $0,89 \pm 0,11$ pour HMIT, compatible avec un couplage 1:1. Malgré

cette difficulté concernant l'effet osmotique d'une entrée de protons, la méthode volumétrique se montre prometteuse, étant sensible à la quantité totale d'osmolytes et pouvant donc contribuer à identifier un cotransport ou un échange inattendu.

Mots-clés : Biophysique, transport membranaire, stœchiométrie, cotransport de myo-inositol, cotransport couplé au sodium, cotransport couplé aux protons, mesures de volume, influx de traceur radioactif, influx d'osmolytes, ovocytes de *Xenopus*.

Abstract

Cells depend on membrane transporters to accumulate essential organic solutes such as myo-inositol (MI). Three mammalian myo-inositol cotransporters are currently known; two (SMIT1 and SMIT2) use the sodium electrochemical gradient to drive transport while the other uses the proton gradient (HMIT). Their transport stoichiometry have not yet been established, although a significant cooperativity observed in the activation of SMIT1 and SMIT2 by sodium ions indicates that more than one Na ion is implicated in the transport of each MI molecule. In the present study, two methods will be used to establish the transport stoichiometries of SMIT2 and HMIT. Each method employs voltage-clamped *Xenopus* oocytes heterologously expressing a cotransporter. The first method compares the amount of charge transported with the measured uptake of radiolabelled substrate. We developed a second method that compares the amount of charge to the net osmolyte uptake, which depends on stoichiometry. This uptake is deduced from high accuracy volume measurement of the oocyte. This new method was calibrated using a potassium channel (ROMK2) and validated with the Na⁺/glucose cotransporter SGLT1, which functions with a known stoichiometry of 2 Na⁺:1 glucose. With the radiolabelled substrate method, we obtained a stoichiometry of 2.14 ± 0.05 ions per α -methylglucose (α MG) molecule for this transporter. With the volumetric method, the number of osmolyte per charge (n_{OPC}) measured is 1.02 ± 0.04 yielding a stoichiometry of 1.78 ± 0.27 . In the case of SMIT2, we obtained a stoichiometry of 1.82 ± 0.10 , and $n_{\text{OPC}} = 1.03 \pm 0.06$ corresponding to a stoichiometry of 1.75 ± 0.30 , in agreement with a 2:1 stoichiometry. For HMIT the radiolabelled substrate method yielded 1.03 ± 0.04 ion per myo-inositol, but the volumetric method indicates $n_{\text{OPC}} = 0.96 \pm 0.08$. With the hypothesis that intracellular protons are largely buffered, this yields a stoichiometry 0.67 ± 0.05 H⁺ per MI molecule. The use of SGLT1 as a H⁺-driven cotransporter with a known stoichiometry of 2 H⁺ per glucose transported indicated that this assumption is not accurate and suggests that 38 % of the protons transported are exchanged for an osmotically active specie. Once this is accounted for, we find 0.89 ± 0.11 H⁺/MI, in agreement with a 1:1 coupling. Despite this difficulty in establishing the fate of newly transported proton, the volumetric method is promising as,

being sensitive to the total amount of transported osmolyte, it can help in identifying unexpected cotransport or exchange.

Keywords : Biophysics, membrane transport, stoichiometry, myo-inositol cotransport, Na⁺-coupled cotransport, H⁺-coupled cotransport, volume measurements, radiolabelled substrate uptake, osmolyte uptake, *Xenopus* oocyte.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract	v
Table des matières.....	vii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations.....	x
Remerciements.....	xi
Chapitre I - Introduction.....	1
1 Transports membranaires	2
2 La stœchiométrie	8
3 Le myo-inositol	10
3.1 Description et métabolisme.....	10
3.2 Rôles.....	11
4 Protéines à l'étude	14
4.1 SMIT2	14
4.2 HMIT	16
5 Problématique et justification de la recherche	21
5.1 Buts	21
5.2 Présentation des méthodes utilisées pour déterminer la stœchiométrie	21
5.2.1 Méthode volumétrique	21
5.2.2 Méthode de marquage radioactif.....	23
5.3 Autres protéines membranaires utilisées.....	24
5.3.1 ROMK2.....	24
5.3.2 AQP1 et AQP2.....	24
5.3.3 SGLT1	26
Chapitre II - Établissement de la stœchiométrie de transport de deux cotransporteurs de myo-inositol couplés à des cations : SMIT2 et HMIT	28
Chapitre III - Autres observations et analyses	55
1 AQP1 et les courants.....	55
2 Analyse par le gonflement total	60
Chapitre IV - Discussion.....	61
1 La stœchiométrie établie	61
2 Méthodes pour évaluer la stœchiométrie	62
2.1 Voies sans issue	62

2.2	Le transport de substrat radioactif : avantages et inconvénients.....	65
3	Notre nouvelle méthode	66
3.1	Le pour... ..	66
3.2	...Et le contre	68
	Conclusions.....	71
	Bibliographie.....	73

Liste des figures

Figure I-1 Mécanismes entourant l'absorption par transport épithélial actif.	4
Figure I-2 Dépendance au sodium de la vitesse initiale de transport par SGLT1.....	5
Figure I-3 Expériences de marches de potentiel et analyse résultante.....	7
Figure I-4 Comparaison entre le glucose et deux inositols.	11
Figure I-5 Importants régulateurs dérivés du myo-inositol.....	12
Figure I-6 La famille de transporteurs SLC5 (<i>Solute Carrier Family 5</i>).	15
Figure I-7 Profil hydrophatique de cotransporteurs au sodium.	16
Figure I-8 La famille des GLUT (famille SLC2).....	17
Figure I-9 Comparaison du profil hydrophatique de HMIT avec GLUT1.	19
Figure I-10 Profil hydrophatique de HMIT et de transporteurs bactériens.....	20
Figure III-1 Courants générés par le myo-inositol avec HMIT à pH 5,5.....	56
Figure III-2 Courants générés par la présence de divers substrats à pH 6,0	57
Figure III-3 Courbes I-V sous divers substrats en présence d'AQP1.	58
Figure III-4 Effet du sodium sur les courants en présence d'aquaporine.	59
Figure III-5 Comparaison des analyses possibles des mesures de volume.....	60
Figure IV-1 Détermination de la stœchiométrie par potentiels d'inversion.	64

Liste des abréviations

α MG	α -méthyl-glucose
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AQP	Aquaporine
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
cGMP	Guanosine monophosphate cyclique
CIC	Canal chlore
EAAC	Transporteur excitatoire d'acides aminés
ENaC	Canal sodique épithélial
FCCP	fluorophénylhydrazone carbonyle cyanide
GLUT	Transporteur facilité de glucose
HMIT	Transporteur proton-MI
IP	Inositolphosphate
Kir	Canal potassique à rectification entrante
MI	Myo-inositol
MIT	Transporteur de MI
NaPi-II	Cotransporteur de phosphate couplé au sodium de type 2
NHE	Échangeur sodium-proton
NKCC	Cotransporteur sodium-potassium-2 chlores
PtdIns	Phosphatidylinositol
ROMK	Canal sodique de la médulla rénale externe
SAT2	Transporteur d'acides aminés (famille SLC38, membre 2)
SLC	Famille de transporteurs de solutés
SGLT1	Transporteur sodium-glucose 1
SMCT	Transporteur sodium-monocarboxylates
SMIT1	Transporteur sodium-MI 1
SMIT2	Transporteur sodium-MI 2
STM	Segment transmembranaire

Remerciements

Je tiens à remercier tout spécialement Jean-Yves Lapointe, mon directeur de recherche, toujours disponible pour ses étudiants, jamais avare de son temps. Je veux remercier aussi le GÉPROM en tant qu'entité, qui m'a soutenu financièrement au cours de ma maîtrise, mais surtout en tant que groupe de gens qui m'ont accueilli et fait sentir chez moi dans ses laboratoires. Merci Louise, perle affectée au secrétariat, avec toujours le sourire et l'œil pétillant. Merci Bernadette pour l'humeur et les tuyaux techniques, merci Michael pour toutes les suggestions. Merci tout particulièrement à Pierre Bissonnette, pour le support scientifique, moral et humoristique de tous les instants. Merci aux collaborateurs, condisciples et amis sans qui ma maîtrise aurait été limitée au seul plan académique : Marilène, Sandra, Özlem, Cécile, Yohann, Marc-Olivier, Line, Zeinab, Manuel, Julie, Michel, Umberto, Hélène... Merci ma petite maman, pour l'appui et la relecture. Je veux aussi exprimer toute ma gratitude à Claudie, ma fiancée, qui me supporte et me pousse à trouver la motivation nécessaire pour trimer dans les moments creux et m'enseigne patiemment à bâtir un document aux numérotations entièrement automatisées.

Chapitre I - Introduction

Les organismes vivants sont constitués de cellules, lesquelles sont séparées de leur environnement par une membrane biologique. Il est maintenant admis que celle-ci est constituée d'une bicouche lipidique, suivant le modèle de la mosaïque fluide de Singer et Nicolson (1972). Chez les eucaryotes, les cellules elles-mêmes sont subdivisées en compartiments séparés de la même manière, permettant une diversité de compositions et ainsi de fonctions des divers organelles. Ces barrières lipidiques ne sont toutefois pas uniformes et inertes, passives; elles varient beaucoup dans leur composition lipidique, mais surtout contiennent nombre de protéines constitutives, dont la nature et la proportion varient selon le type de cellule et l'emplacement sur celle-ci. Ces protéines membranaires jouent plusieurs rôles. Elles peuvent servir de support structural entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire ou encore de jonction de communication entre cellules voisines et aussi d'enzymes. Elles peuvent également servir de récepteur chimique et enfin au passage d'ions et de différents substrats d'un côté à l'autre de la membrane. En effet, si les membranes lipidiques peuvent avoir une certaine perméabilité principalement aux molécules hydrophobes, c'est surtout par les protéines de transport que le transit des molécules hydrophiles s'effectue. C'est par celles-ci que les cellules peuvent échanger avec leur environnement, accumuler certains types de molécules, créer des gradients ioniques, se débarrasser de leurs déchets... Pensons seulement au glucose, un carburant des cellules; un apport constant et suffisant doit en être assuré dans celles-ci, et ne pourrait être fourni par la simple diffusion de cette molécule polaire à travers la membrane hydrophobe.

Dans ce mémoire, nous allons présenter une méthode originale pour déterminer la stœchiométrie de transport de telles protéines, applicable pour les mécanismes de cotransport électrogéniques exprimés dans les ovocytes. Elle sera appliquée à deux mécanismes de cotransport du myo-inositol, de concert avec une méthode plus conventionnelle impliquant la mesure simultanée du courant de cotransport et du flux isotopique.

Avant de présenter le cœur de l'ouvrage, soit l'article « **Determination of transport stoichiometry for two cation-coupled myo-inositol cotransporters: SMI2 and HMIT** », accepté par le *Journal of Physiology*, nous parcourons brièvement les caractéristiques du cotransport pour porter notre attention sur l'importance et la signification de la stœchiométrie dans les mécanismes de cotransport. La revue des faits connus pour les deux cotransporteurs de myo-inositol dont nous nous proposons ici d'établir la stœchiométrie de cotransport sera ensuite présentée, ainsi qu'un aperçu de l'importance de leur substrat commun. Nous présenterons ensuite le principe de la nouvelle méthode, puis les autres protéines connues utilisées dans cette étude.

Le cadre de cet ouvrage nous permettra enfin de présenter des résultats qui ne sont pas contenus dans l'article, puis d'élargir la discussion au sujet de la nouvelle méthode et des résultats obtenus plus qu'il est possible de le faire dans un article.

1 Transports membranaires

On distingue plusieurs types de transport membranaire. Il peut s'agir de diffusion facilitée, où le passage se fait dans la direction du gradient de concentration. On pense par exemple au *facilitated glucose transporters* (GLUT) ou aux aquaporines (AQP). Le transport facilité d'ions existe aussi; dans ce cas on parle plutôt de canaux ioniques, tels les canaux sodiques épithéliaux (ENaC), les canaux potassiques à rectification entrante (Kir), les canaux chlore ClC... Le passage se fait alors dans la direction du gradient électrochimique, qui inclut l'effet de la différence de potentiel à travers la membrane sur la charge de l'ion. Un autre type de canal qui facilite la diffusion de solutés est le pore ou porine. Beaucoup moins sélectives et très perméables, les porines permettent le passage de substrats à travers la paroi bactérienne. Elles sont souvent constituées de plusieurs feuillets bêta associés en un « barillet » constituant le cœur du pore. Des agents pathogènes peuvent aussi s'associer pour former de larges structures perméables qui détruisent les gradients et conséquemment la cellule.

Le transport de substances ne se limite cependant pas aux transporteurs passifs. Il est possible, en utilisant une source d'énergie, de faire traverser une molécule ou un ion à l'encontre de son gradient électrochimique; il s'agit de transport actif ou secondairement actif. La source d'énergie peut être l'hydrolyse d'ATP en ADP directement par la protéine qui pompe alors son substrat dans la direction voulue; le transport est alors dit actif primaire. Nous nous intéresserons toutefois plus particulièrement au transport actif secondaire dont la source d'énergie est le gradient électrochimique d'un autre ion. Cet ion peut être utilisé pour faire traverser le substrat soit dans le même sens (symport) soit dans le sens opposé (antiport). Ainsi, dans les cellules eucaryotes, la Na^+ , K^+ -ATPase et la Ca^{2+} -ATPase maintiennent par un transport actif primaire un gradient entrant de sodium et de calcium et sortant de potassium, qui peuvent être utilisés pour faire du transport secondairement actif. Il s'agit d'un transport largement utilisé, notamment dans les épithélia pour l'absorption ou la réabsorption, comme dans l'intestin ou le rein. La Figure I-1 illustre les mécanismes mis en jeu dans cette fonction.

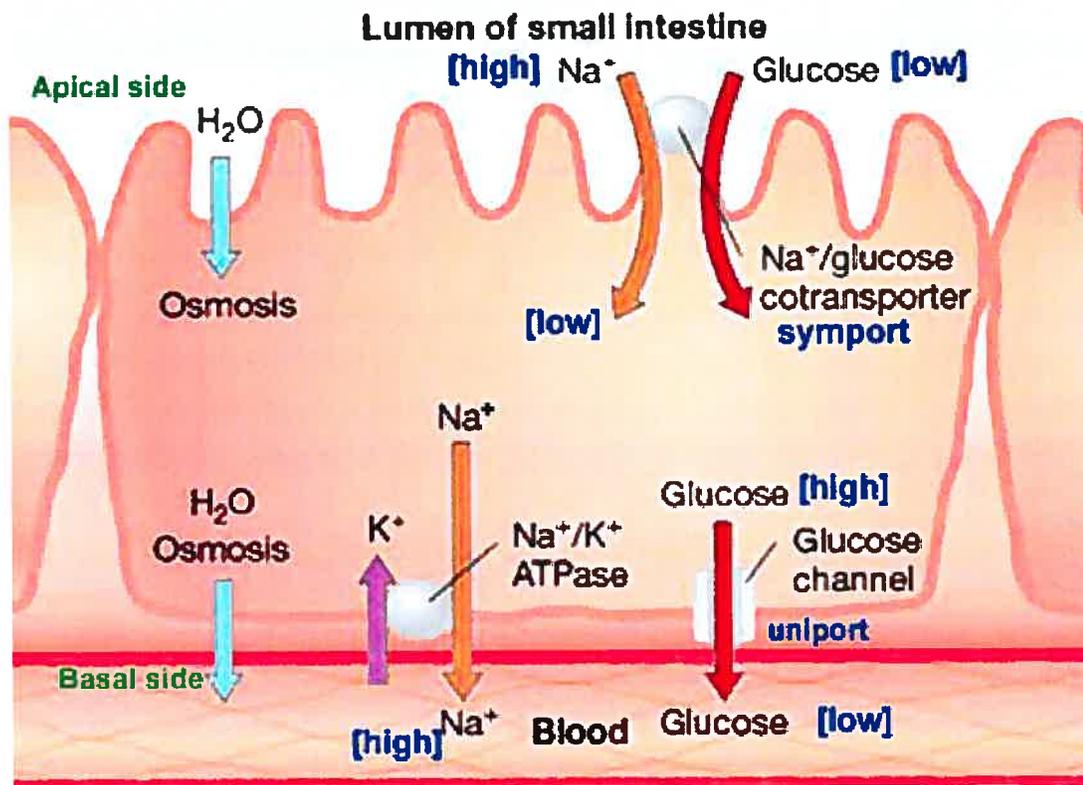


Figure I-1 Mécanismes entourant l'absorption par transport épithélial actif.

La Na^+ , K^+ -ATPase effectue un transport primaire utilisant l'énergie de l'ATP pour maintenir un gradient sodique et potassique. Le gradient sodique est utilisé pour le transport secondairement actif de glucose de la lumière au cytoplasme, qui diffuse alors passivement vers la circulation sanguine. Tiré de Allery 2004.

Les cotransporteurs de ce type sont caractérisés par plusieurs paramètres : bien évidemment, d'abord, la nature du ou des substrats, qui indique la fonction directe du transporteur, et celle de l'ion activateur, qui détermine le gradient utilisé. Ensuite, la vitesse maximale, qui est simplement le taux auquel le transport se fait en situation saturante d'ion ou de substrat; elle correspond à la valeur atteinte asymptotiquement dans l'exemple de la Figure I-2. Aussi, la stœchiométrie de transport d'une telle protéine membranaire est le nombre de chacune des espèces impliquées qui franchit la membrane à chaque cycle de transport; elle permet de déterminer la capacité de concentration du système étudié (voir section 2). L'affinité (K_m) à l'ion et au substrat est définie comme leur concentration à laquelle la vitesse (initiale) de transport correspond à la moitié de la vitesse maximale. Plus le K_m est élevé, plus l'affinité est basse. Il peut aussi y avoir une

coopérativité dans la liaison d'un substrat, reflétée par le nombre de Hill (n_H , Hill 1910). Dans une approche de cinétique enzymatique du transport, la relation entre la vitesse de transport et la concentration de substrat est la suivante :

$$v_i = \frac{V_{\max} [S]^{n_H}}{(K_m)^{n_H} + [S]^{n_H}} \quad (1)$$

En traçant la vitesse initiale de transport en fonction de la concentration de l'ion activateur (Figure I-2), on peut trouver une certaine sigmoïdité, provenant de la coopérativité entre les ions. Un nombre de Hill plus grand que 1 indique une coopérativité positive, alors qu'un nombre plus petit indique une coopérativité négative. Il faut prendre soin de bien distinguer la coopérativité du nombre de molécules transportées; en effet, le nombre de Hill indiquant une coopérativité, il constitue un seuil *minimum* du nombre de molécules de cette espèce impliquées dans la réaction (Weiss 1997). De plus, de ce nombre, certaines peuvent être *impliquées* mais pas *transportées*;

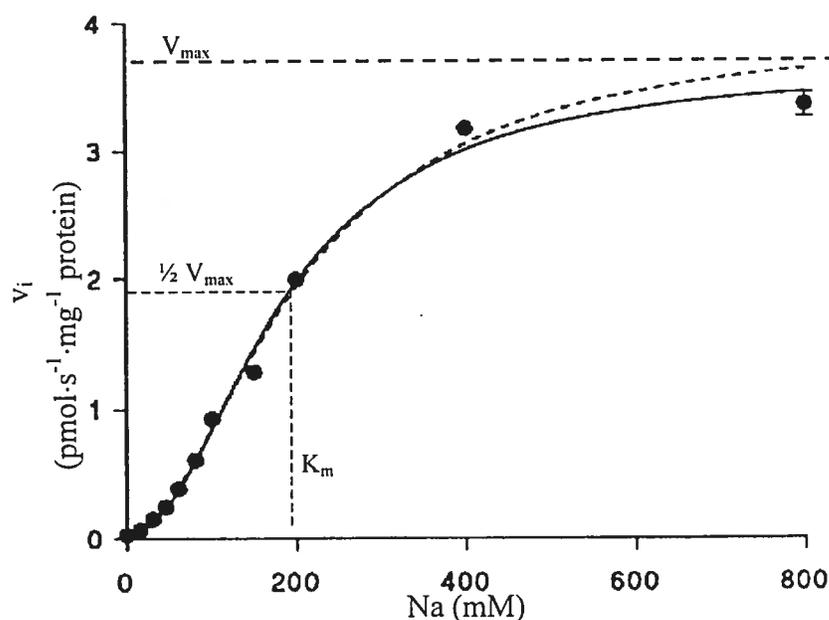


Figure I-2 Dépendance au sodium de la vitesse initiale de transport par SGLT1.

Le transport a été fait en condition de faible substrat (glucose). La ligne pointillée indique le meilleur ajustement du nombre de Hill n_H , alors que la ligne pleine correspond à une valeur fixée de 2,0 dans l'équation de Hill modifiée (Équation 1). Adapté de Berteloot 2003.

la mesure du nombre de Hill ne saurait donc en aucun cas établir la stœchiométrie de transport, comme il est encore parfois présumé (Krofchick *et al.* 2004).

Maints exemples illustrent la régulation de l'activité des protéines de transport. Le cotransporteur sodium-glucose, par exemple, est sensible au voltage intracellulaire ($\Delta\psi$) (Kimmich *et al.* 1985; Parent *et al.* 1992a), le cotransporteur $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2 Cl}^-$ NKCC l'est à son état de phosphorylation (Andersen *et al.* 2004) et NaPi-II et SAT2 (transporteur d'acides aminés neutres de la famille du système A) le sont au pH (Forster *et al.* 2000; Yao *et al.* 2000). La régulation peut aussi être due à des interactions protéine-protéine, tel que soutenu pour SGLT1 avec la *heat-shock protein 70* (Ikari *et al.* 2002) ou pour le *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* CFTR (Kim *et al.* 2004). Certains transporteurs sont aussi régulés par le calcium, tout comme de nombreux canaux ioniques (Faber et Sah 2003). Une régulation peut aussi être faite sur la quantité de protéines insérées à la membrane. Elles peuvent être en réserve dans des compartiments intracellulaires comme c'est le cas pour HMIT et SGLT1 (Kipp *et al.* 2003; Uldry *et al.* 2004), l'exo- ou l'endocytose de ce dernier dépendant des protéines kinases (Hirsch *et al.* 1996). Dans le cas de NaPi-II, cette régulation est sous le contrôle de la concentration du substrat et d'hormones. (Levi *et al.* 1994; Kempson *et al.* 1995). Un dernier type de régulation est celui de la synthèse du transporteur en réponse à diverses conditions (Beckett 2001).

De nombreux paramètres peuvent servir à caractériser un transporteur. Mentionnons, entre autres, les inhibiteurs spécifiques, la possible glycosylation, les courants de fuite (*leaks*), la distribution des charges mais surtout les courbes I-V (s'il est électrogénique bien sûr) et Q-V. Les courbes I-V sont obtenues en comparant des sauts rapides de potentiel aux courants stationnaires qu'ils génèrent (Figure I-3) et permettent de connaître le comportement sur une gamme de voltages, notamment le potentiel d'inversion, la conductance et la rectification s'il y a lieu. Des informations importantes peuvent aussi être tirées des courants transitoires (*pre-steady state currents*) apparaissant pour de nombreux transporteurs lors des sauts de potentiel; ces courants proviennent du mouvement de charges associé aux changements de conformation du

cotransporteur (Armstrong et Bezanilla 1973; Bezanilla 1982; Parent *et al.* 1992b; Parent *et al.* 1992a).

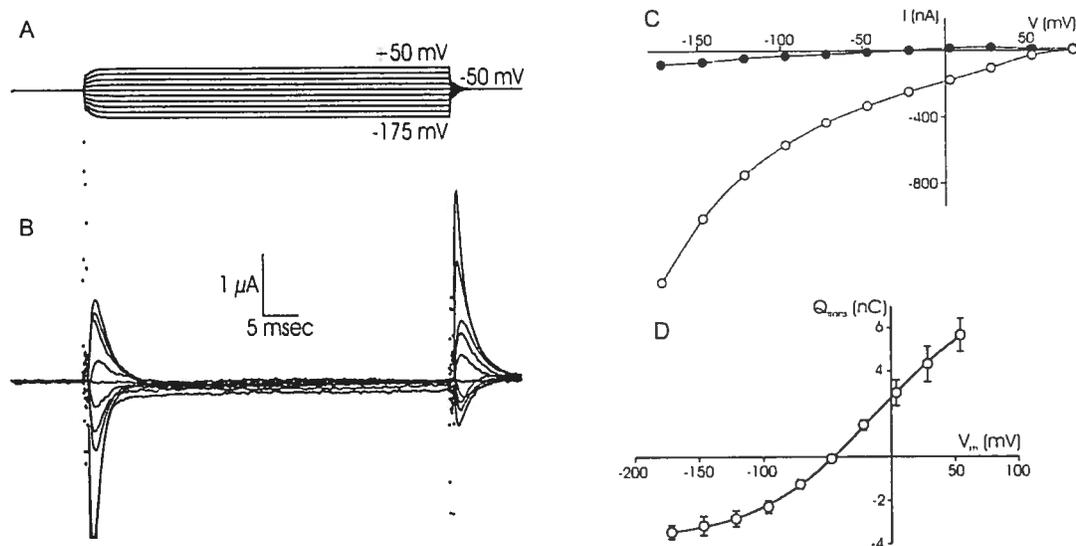


Figure I-3 Expériences de marches de potentiel et analyse résultante.

Effectuées avec la méthode du *voltage-clamp* en double microélectrode sur des ovocytes exprimant SMIT2. *A.* Potentiel imposé. *B.* Courant engendré. *C.* Courbe I-V des courants stationnaires. *D.* Courbe Q-V résultant de l'intégration des courants transitoires. Tiré de Coady *et al.* 2002.

La localisation du transporteur, c'est-à-dire le tissu où il est exprimé et la membrane où il s'insère (dans le cas des cellules polarisées), permet d'en connaître plus sur la fonction du transporteur dans une vision globale, systémique : à quoi sert-il dans l'organisme? Dans cette optique, le transport peut aussi être au moins partiellement caractérisé par les pathologies associées à son mauvais fonctionnement. Ainsi, les observations conjointes que la glycosurie rénale ne s'accompagne pas nécessairement d'une mauvaise absorption dans l'intestin et que la malabsorption intestinale du glucose et du galactose ne s'accompagne que d'une glycosurie bénigne (Elsas et Rosenberg 1969; Elsas *et al.* 1970) est irrécyclable avec un seul et unique mécanisme de transport pour ces deux systèmes (Kanai *et al.* 1994). Pour explorer l'effet global de la défektivité d'un transporteur dont on connaît le gène codant, une autre stratégie employée est de créer des espèces (généralement de souris) dites *knock-out*, c'est-à-dire

complètement dépourvues de ce gène (Koller *et al.* 1989) et d'explorer les déficiences présentées pour mieux comprendre la fonction de la protéine codée par ce gène.

2 La stœchiométrie

La stœchiométrie de transport d'un cotransporteur est définie comme le nombre et l'identité de chacune des molécules traversant la membrane ainsi que la direction de leur passage. Ainsi, la Na^+, K^+ -ATPase a une stœchiométrie de $3 \text{Na}^+_{\text{out}}:2 \text{K}^+_{\text{in}}$ pour chaque ATP (Sen et Post 1964), le cotransporteur NKCC de $1 \text{Na}^+:1 \text{K}^+:2 \text{Cl}^-$ tous dans la même direction (Geck *et al.* 1980) et SGLT1 de $2 \text{Na}^+:1$ glucose entrants (Chen *et al.* 1995; Mackenzie *et al.* 1998). Si l'échangeur sodium-potassium est un transporteur primaire utilisant l'énergie de l'ATP pour fonctionner, les transporteurs secondaires utilisent l'énergie du gradient électrochimique de l'ion activateur; la stœchiométrie de cet ion déterminera donc la « puissance » du transport, soit sa capacité à concentrer les espèces transportées contre leur gradient. Le transport aura lieu tant que le gradient électrochimique de l'ion activateur pour entrer sera plus grand que celui du substrat pour aller à contresens. Dans l'exemple d'un cotransporteur couplant n ions sodium à 1 substrat neutre, cette condition est

$$n \cdot \Delta\mu_{\text{Na}} \geq \Delta\mu_s \quad (2)$$

$$znF(\Psi_{\text{out}} - \Psi_m) + RT \ln \left[\frac{Na_{\text{out}}}{Na_m} \right]^n \geq RT \ln \left[\frac{S_m}{S_{\text{out}}} \right] \quad (3)$$

Pour le sodium, $z = +1$; F est la constante de Faraday, $\Delta\Psi \equiv (\Psi_m - \Psi_{\text{out}})$ est le potentiel de la cellule et R et T ont leur signification thermodynamique habituelle. Il en ressort que

$$\ln \left[\frac{S_m}{S_{\text{out}}} \right] \leq n \left(\ln \left[\frac{Na_{\text{out}}}{Na_m} \right] - \frac{F}{RT} \Delta\Psi \right) \quad (4)$$

En utilisant des valeurs plausibles de $[Na^+]_{out} = 140$ mM et $[Na^+]_{in} = 10$ et un potentiel membranaire de -50 mV, on trouve que la capacité de concentration d'un tel transporteur est

$$\ln\left[\frac{S_m}{S_{out}}\right] \leq n\left(\ln\left[\frac{140}{10}\right] - \frac{96500 C mol^{-1}}{8,31 mJ mol^{-1} K^{-1} * 300 K}(-50 mV)\right) \quad (5)$$

$$\frac{S_m}{S_{out}} \leq \exp\left(n\left(\ln\left[\frac{140}{10}\right] - \frac{96500 C mol^{-1}}{8,31 mJ mol^{-1} K^{-1} * 300 K}(-50 mV)\right)\right) \quad (6)$$

$$\frac{S_m}{S_{out}} \leq 97^n \quad (7)$$

On voit donc que la capacité de concentration croît très rapidement avec le nombre d'ions sodium activant le transport. Pour une concentration externe de l'ordre du μ M de substrat, un transporteur avec une stœchiométrie de 1:1 pourrait accumuler dans la cellule jusqu'aux centaines de μ M, alors qu'avec une stœchiométrie de 2:1 il pourrait aller jusqu'aux dizaines de mM. En conditions physiologiques où le substrat externe est relativement abondant ou le substrat interne évacué de la cellule, par exemple par diffusion facilitée, la capacité de concentration requise n'est pas très élevée et une stœchiométrie de 1:1 peut être suffisante. Par contre, aux endroits où l'on veut récupérer les substrats même à faible concentration, une stœchiométrie de 2:1 sera nécessaire (mais pas nécessairement suffisante : une affinité adéquate sera aussi requise). L'exemple du cotransport Na^+ /glucose dans le rein illustre bien l'importance de la stœchiométrie. Deux systèmes de transport du glucose sont présents dans le néphron. Au début du tubule proximal, où la concentration de glucose est pratiquement celle du plasma sanguin (Walker *et al.* 1941), la réabsorption est effectuée avec une stœchiométrie de 1:1 par un transport à basse affinité mais à haute capacité. Après les premiers millimètres du tubule proximal, la concentration de glucose est réduite d'un facteur 100 (Frohnert *et al.* 1970); un autre mode de transport est alors chargé de récupérer ce qu'il en reste, fonctionnant avec une forte capacité de concentration, c'est-à-dire une stœchiométrie de 2:1 (Turner et Moran 1982b; Turner et Moran 1982a;

Schafer et Williams 1985; Kanai *et al.* 1994), et à haute affinité mais à basse capacité. D'ailleurs, on ne retrouve normalement que des traces de glucose dans les urines, celui-ci étant presque totalement réabsorbé. Il est à noter cependant qu'une disparité de mécanismes n'implique pas nécessairement des transporteurs différents; dans l'intestin, deux mécanismes avec des stœchiométries de 2:1 et 1:1 peuvent être expliqués par une seule protéine (Chenu et Berteloot 1993) et il pourrait en être de même dans le rein (Oulianova et Berteloot 1996).

3 Le myo-inositol

Il est utile de prendre quelques lignes pour explorer la molécule dont nous nous proposons d'approfondir les caractéristiques de transport, le myo-inositol. Nous verrons sa nature et sa distribution dans le corps et présenterons aussi un aperçu des nombreuses fonctions qu'il y occupe.

3.1 Description et métabolisme

Les inositols, qui sont des polyols cycliques neutres, comprennent plusieurs molécules dont le myo-inositol (MI) est le membre le plus abondant chez les mammifères. Sa concentration normale dans le sérum sanguin s'étend de 30 à 70 μM (MacGregor et Matschinsky 1984; Dolhofer et Wieland 1987; Schmolke *et al.* 1991; Kouzuma *et al.* 2001), mais peut atteindre jusqu'à 6 mM dans le cerveau humain et même 17 mM dans certains neurones (Stokes *et al.* 1983; Novak *et al.* 1999; Fisher *et al.* 2002). Le myo-inositol a trois sources pour la cellule : i) le recyclage des inositol-phosphates (messagers secondaires), ii) l'apport de l'extérieur de la cellule et iii) la synthèse à partir du glucose-6-phosphate (Chen et Charalampous 1964; Eisenberg et Parthasarathy 1987). L'activité de synthèse par la mesure d'ARNm de *myo-inositol 1-phosphate synthase* s'est révélée être très grande dans les testicules, élevée dans le cœur, le placenta et le pancréas, mais mineure dans les leucocytes sanguins, le thymus, les muscles squelettiques et le côlon (Guan *et al.* 2003). Dans le cerveau, la synthèse de myo-inositol a été détectée seulement dans les parois vasculaires (Wong *et al.* 1987) malgré l'association du bon fonctionnement de cet organe avec une régulation adéquate

du MI (Shetty *et al.* 1995; Belmaker *et al.* 1996). Certains tissus doivent donc compter essentiellement sur l'apport extracellulaire de myo-inositol et, par conséquent, sur des transporteurs pour assurer une quantité suffisante de cette molécule.

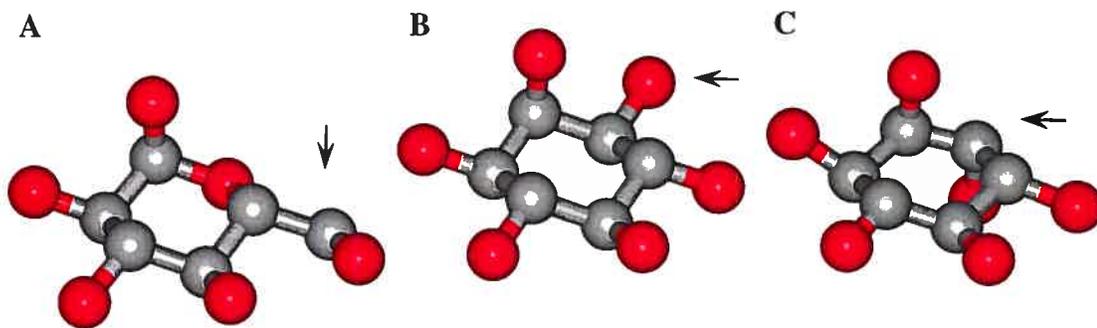


Figure I-4 Comparaison entre le glucose et deux inositols.

A. D-glucose; B. Myo-inositol; C. D-chiro-inositol. Les flèches indiquent les principales différences entre ces substrats. Obtenu de M.J. Coady.

3.2 Rôles

Le myo-inositol a de nombreux rôles dans l'organisme, certains bien établis et d'autres récemment proposés et actuellement explorés. Sans faire un examen exhaustif de chacun d'eux, nous nous proposons tout de même d'en faire un survol.

Un rôle bien établi du MI est celui d'« osmolyte compatible », c'est-à-dire un osmolyte qui contribue à augmenter la tonicité sans nuire aux fonctions normales de la cellule. En conditions externes hyperosmotiques, un mécanisme de régulation du volume de plusieurs types de cellules est d'accumuler de tels osmolytes (Nakanishi *et al.* 1989; Trachtman 1992; Karihaloo *et al.* 1997). L'expression de transporteurs de MI est ainsi régulée par la tonicité extérieure et permet de l'accumuler en conditions hyperosmotiques (Wiese *et al.* 1996; Yamauchi *et al.* 1996; Burg *et al.* 1997; Yorek *et al.* 1999a; Bissonnette *et al.* 2004).

Le myo-inositol fait aussi partie des chaperons chimiques pour les macromolécules. Certaines protéines ont une mutation ailleurs qu'à leur site actif mais qui les rend néanmoins inopérantes car elles sont identifiées comme mal conformées et ne sont donc pas acheminées à la membrane, ou encore sont endocytosées rapidement.

Les chaperons chimiques comme le myo-inositol ont un effet stabilisateur qui permet à certaines de ces protéines de rester à la membrane, comme dans le cas de la délétion $\Delta F508$ de CFTR, le régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose kystique (Howard *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2003). L'effet général de protection des protéines par le myo-inositol pourrait bien être expliqué par une amélioration des liens hydrophobes (Back *et al.* 1979; Gekko 1981). Le mécanisme est suffisamment général pour que le « sauvetage » par le MI d'autres transporteurs n'atteignant pas la membrane à cause de mutations pathogéniques soit exploré (équipe du Dr. D.G. Bichet, communication personnelle). Pour une revue sur les chaperons chimiques, voir Bernier *et al.* 2004 et Morello *et al.* 2000.

Les messagers secondaires inositol-phosphates (IP) et les phospholipides phosphatidylinositols (PtdIns) ont comme précurseur le myo-inositol et, par leurs phospho- et déphosphorylations, sont des régulateurs clés de maints processus. Ils sont tout d'abord impliqués dans la signalisation; en réponse à des signaux extracellulaires, ils génèrent des messagers secondaires et servent donc à transférer un signal à travers la membrane (Zhang et Majerus 1998). Les inositolphosphates, eux-mêmes des messagers secondaires, contrôlent plusieurs processus cellulaires, entre autres par la génération de signaux calciques intracellulaires (Berridge 1993).

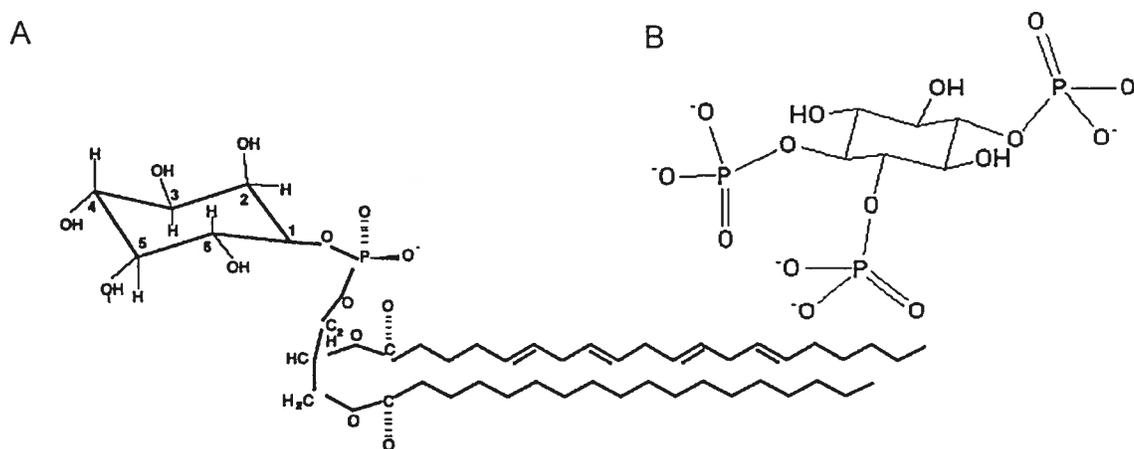


Figure I-5 Importants régulateurs dérivés du myo-inositol.

A. Phosphatidylinositol; B. Inositol 1,4,5-triphosphate (IP3).

Les PtdIns et IP sont aussi clairement nécessaires dans les processus synaptiques (Toker et Cantley 1997; Cremona *et al.* 1999; Cremona et De Camilli 2001; Osborne *et al.* 2001), que ce soit pour l'exocytose dépendante du calcium (Schiavo *et al.* 1996; Czech 2000; Mehrotra *et al.* 2000) ou pour le recyclage des vésicules synaptiques (Cremona et De Camilli 2001), ainsi que pour l'endocytose médiée par la clathrine (Jost *et al.*; Martin 1998), synaptique ou non (Rapoport *et al.* 1997). Ils sont aussi requis pour l'attache et l'activation des protéines qui lient la membrane plasmique au cytosquelette d'actine, pour le réarrangement de celui-ci, pour le trafic vésiculaire, ainsi que pour des processus ayant lieu à la membrane comme la phagocytose et la pinocytose (Czech 2000; Sechi et Wehland 2000; Takenawa et Itoh 2001; Janmey et Lindberg 2004). Les phosphatidylinositols triphosphates affecteraient aussi la croissance, la régulation de l'apoptose et la synthèse d'ADN (Vanhaesebroeck *et al.* 2001). Pour une revue en profondeur sur les maintes voies de signalisation impliquant les phosphatidylinositols, voir Toker 2002.

Une implication si ubiquitaire du myo-inositol dans la signalisation intracellulaire se reflète sur le nombre de maladies liées à une détérioration de son métabolisme. De fait, les maladies affectives bipolaires y seraient liées. Les premiers soupçons proviennent de mécanismes possibles d'action d'un médicament utilisé depuis un siècle pour soigner la dépression, le lithium (Williams et Harwood 2000), qui s'avère agir dans la voie métabolique des inositols (Vaden *et al.* 2001). Il diminuerait le recyclage des inositides et limiterait ainsi l'apport de myo-inositol dans les tissus où l'apport externe est limité (Berridge *et al.* 1989). Des mesures par résonance magnétique nucléaire du taux de MI dans les cerveaux de rats après un traitement chronique au lithium ont depuis révélé une baisse du myo-inositol libre reliée à une augmentation de l'inositol monophosphatase (O'Donnell *et al.* 2000). En effet, une dose de 2 mM LiCl par kg pour 2 semaines a provoqué une baisse significative du MI de $7,28 \pm 0,31$ à $6,60 \pm 0,33$ $\mu\text{M/g}$, soutenant donc cette hypothèse de déplétion du myo-inositol.

Hormis ces fonctions, le myo-inositol pourrait aussi avoir un rôle à jouer dans les complications du diabète mellitus et de la neuropathie diabétique (Stevens *et al.* 1993; Hotta 1997; Hansen 2001). Des fluctuations dans son métabolisme sont observées dans

la sclérose en plaques (Fernando *et al.* 2004), l'encéphalopathie hépatique (une complication neuropsychiatrique du à une défaillance du foie; Tandon 2003) et le syndrome de Louis-Bar (ataxie télangiectasie) (Yorek *et al.* 1999b). Il pourrait aussi potentiellement, ainsi que le D-chiro-inositol, prévenir le développement du spina-bifida chez le fœtus (Greene et Copp 1997; Cavalli et Copp 2002; Cogram *et al.* 2002). Pour un large tour d'horizon concernant les multiples maladies découlant de troubles dans les phosphatidylinositols, leurs phosphatases et leurs dérivés, voir Pendaries *et al.* 2003.

4 Protéines à l'étude

4.1 SMIT2

Le premier cotransporteur de sodium/myo-inositol, SMIT1, a été cloné par expression en 1992 (Kwon *et al.* 1992). L'identification d'un second cotransporteur de MI, nommé SMIT2, de séquence à 43 % identique, a été réalisée en 2002 (Coady *et al.* 2002) à partir de l'ADN clonal (*cDNA*) d'un membre de la famille des cotransporteurs au sodium (Figure I-6) resté jusque-là orphelin de fonction (Hitomi et Tsukagoshi 1994). Cette équipe a établi que son substrat principal est le myo-inositol, mais qu'il transporte aussi l'isomère dextrogyre du chiro-inositol ainsi que celui du glucose et du xylose dans une proportion moindre. SMIT2 fait donc preuve de stéréospécificité, ne transportant aucun isomère *L*. Les courbes I-V du courant stationnaire et Q-V de l'intégration des courants transitoires sont celles présentées à la Figure I-3. Les courants ne semblent pas saturer aux voltages négatifs jusqu'à -175 mV et les courants à potentiel positif sont négligeables. Cette propriété de rectification entrante rend la détermination du potentiel d'inversion très imprécise. L'affinité au MI du transporteur, à -50 mV, se situe environ à 120 μ M alors que celle pour le sodium est d'environ 30 mM. À ce potentiel, la variation du courant selon la concentration de sodium a révélé un coefficient de Hill de 1,4, indiquant une coopérativité significative, mais une étude plus poussée pour établir la stœchiométrie par les potentiels d'inversion s'est révélée infructueuse. Ce transporteur de myo-inositol s'exprime largement dans le rein, le cœur, les muscles squelettiques, le foie, le placenta et le cerveau, mais pas dans l'intestin (Roll *et al.* 2002). Il a récemment

été montré que dans le tubule proximal, il constituait la fraction du transport apical de MI résistant au L-fucose (Bissonnette *et al.* 2004).

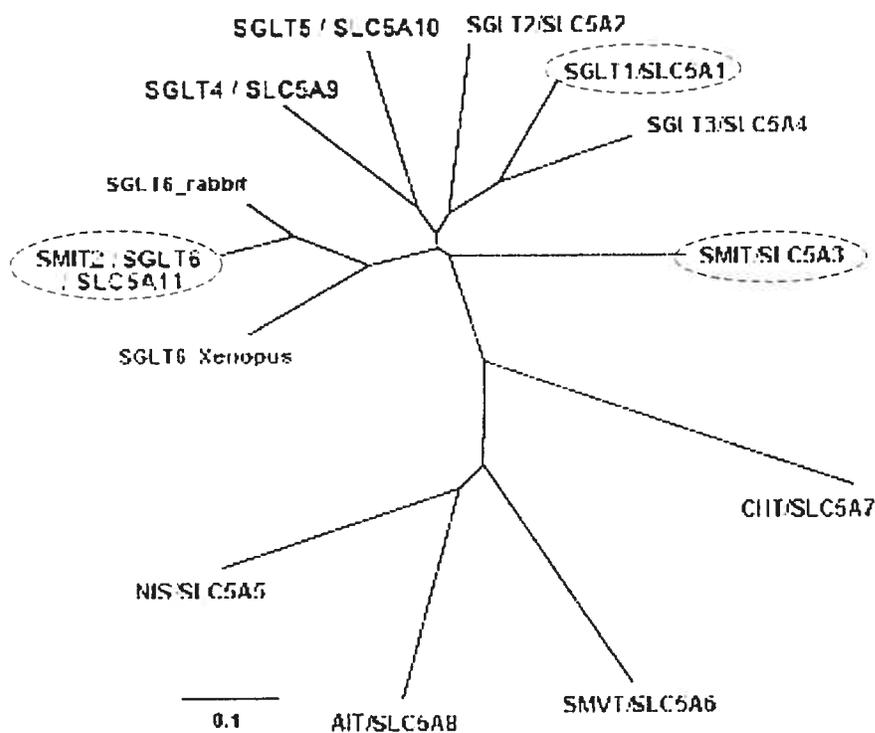


Figure I-6 La famille de transporteurs SLC5 (*Solute Carrier Family 5*).

Les différents transporteurs sont reliés par leur fraction d'homologie. Les protéines sont les isoformes humaines sauf indication contraire. Adapté de Wright et Turk 2003.

Une étude du profil hydrophatique de la série d'acides aminés selon la méthode de Kyte et Doolittle (1982) permet de constater que SMIT1 et SMIT2 sont pratiquement identiques selon ce point de vue et que le profil de ces deux transporteurs recoupe grandement celui de SGLT1 (Figure I-7). Si on pose un « seuil » de l'indice hydrophatique aux environs de +15, de manière à voir les 14 segments suggérés pour SGLT1 (Turk *et al.* 1996), on constate une forte similarité avec le profil de SMIT1 et SMIT2; nous proposons donc également pour ceux-ci un modèle topologique avec 14 segments transmembranaires (STM). Il est à noter toutefois que ce modèle de SGLT1 à 14 STM est encore spéculatif et fait toujours l'objet d'investigations (Lin *et al.* 1999; Gagnon *et al.* 2005).

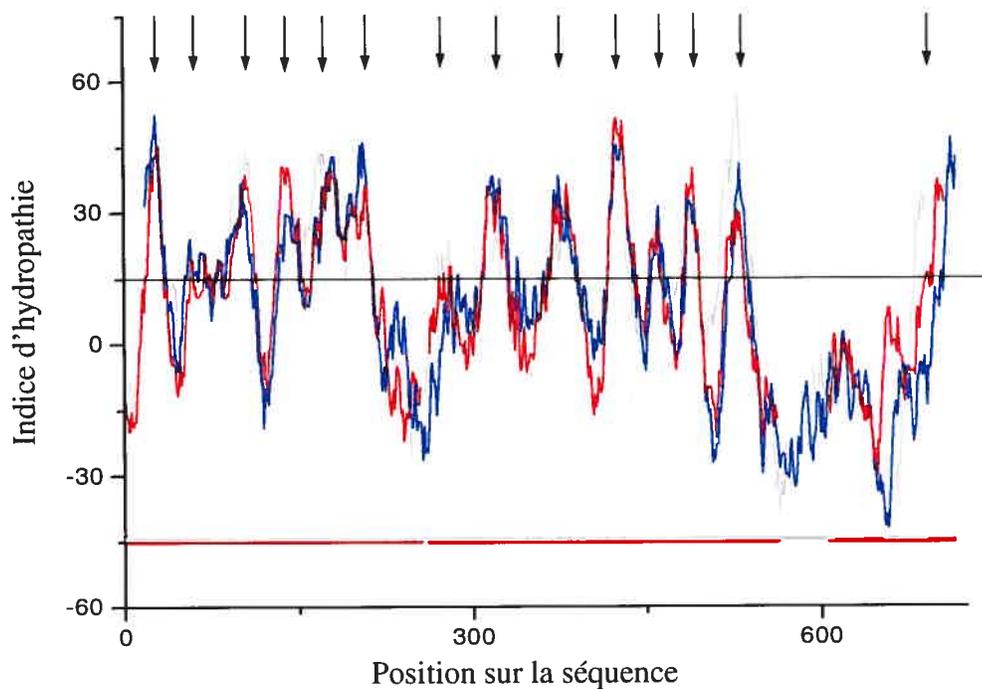


Figure I-7 Profil hydrophatique de cotransporteurs au sodium.

Une fenêtre de 19 acides aminés est utilisée. SGLT1 est en gris, SMIT1 en bleu et SMIT2 en rouge. Les interruptions dans les lignes horizontales indiquent les espacements introduits dans la séquence pour aligner les segments hydrophobes. Les flèches indiquent l'emplacement des segments transmembranaires.

4.2 HMIT

Le clonage du premier transporteur de myo-inositol utilisant le gradient de protons (H^+) chez le mammifère ne remonte qu'à tout récemment (Uldry *et al.* 2001); il a été identifié par criblage de bases de données avec la séquence peptidique de GLUT8. L'expression en est la plus forte dans le cerveau et l'hypothalamus. En dépit de sa fonction de cotransporteur, sa séquence le lie à la famille des facilitateurs de diffusion du glucose (Figure I-8). Il partage aussi une grande homologie avec MIT, un cotransporteur H^+ /myo-inositol bactérien provenant de *Leishmania donovani* et de stœchiométrie connue de 1:1 (Klamo *et al.* 1996). En effet, une comparaison de leurs séquences peptidiques avec le programme LALIGN (chez Infobiogen) révèle une **identité** de 33 % sur une séquence de 535 résidus (données non publiées).

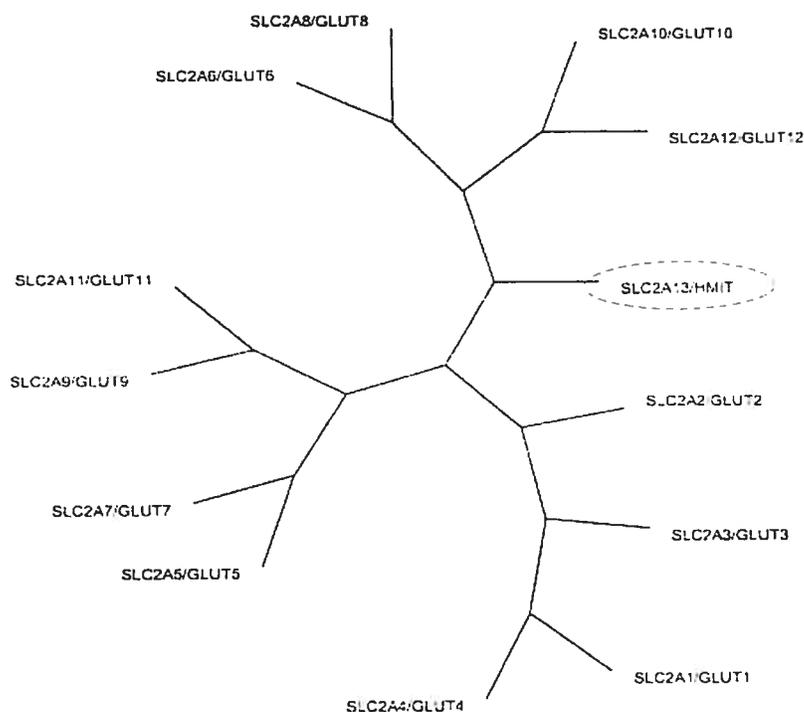


Figure I-8 La famille des GLUT (famille SLC2).

HMIT se trouve par sa séquence dans une famille de facilitateurs de transport d'hexoses. Tiré de Uldry et Thorens 2004.

Par expression hétérologue dans les ovocytes de *Xenopus*, Marc Uldry *et al.* (2001) ont montré que le transport effectué par leur nouveau clone était bien celui du MI, qu'il était indépendant du sodium, que son V_{max} augmentait avec la baisse du pH et qu'il était inhibé par la phlorizine, la phlorétine et la cytochalasine B. L'affinité du transport pour les protons conduit à un $pK_a = 5,8$ à -50 mV et dépend du voltage, alors que l'affinité pour le myo-inositol est reportée être ~ 100 μ M; cependant, entre nos mains, une valeur de ~ 6 mM est obtenue. La raison pour cet écart considérable n'a pas encore été éclaircie. Il est à noter que la forme utilisée n'est pas exactement la souche sauvage, qui présente deux motifs d'internalisation et un motif de rétention au réticulum endoplasmique, mais une protéine dépourvue de ces motifs pour permettre l'expression optimale du transporteur à la membrane plasmique dans les ovocytes. Uldry *et al.* ont aussi publié plus récemment (2004) certains résultats quant à la localisation subcellulaire et à la régulation de HMIT dans des cultures primaires de neurones et dans des cellules PC12, principalement utilisées comme modèle de différenciation cellulaire neuronale (Franke *et al.* 1986). Ils ont montré que le transporteur se situe dans des vésicules

intracellulaires et que son apparition à la membrane se fait rapidement (<10 s) à la suite d'une dépolarisation, et qu'elle est aussi déclenchée par la protéine kinase C et la hausse de calcium intracellulaire. Il est ensuite endocytosé en moins d'une heure et reste disponible pour un autre cycle d'exocytose. L'expression à la membrane se fait principalement à la synapse et aux cônes de croissance (*growth cones*), reliant encore plus l'exocytose et l'activité neuronale, qui de surcroît module le pH de son environnement (Chesler et Kaila 1992), et crée un gradient de pH contribuant au transport par HMIT.

Selon la même analyse de profil hydrophatique utilisée pour SMIT2, il s'avère que HMIT pour cette caractéristique ne se rapproche pas du tout de SGLT1 (Figure I-9). En utilisant le même critère de sélection des segments transmembranaires, on peut poser l'hypothèse de 13 segments mais, étant donné la disparité avec SGLT1, on ne peut se baser sur une forte ressemblance pour avancer un nombre plus plausible. D'ailleurs, certains segments sont plutôt en zone indéfinie. Cette disparité du profil hydrophatique de HMIT avec celui de SGLT1 n'est d'ailleurs pas surprenante étant donné sa parenté de séquence avec la famille des GLUT (SLC2) par laquelle il a été cloné (Uldry *et al.* 2001). Une comparaison avec le profil de GLUT1 montre une forte possibilité d'alignement, et donne à penser que HMIT pourrait plutôt être formé de 12 STM comme il est avancé pour GLUT1 (Zuniga *et al.* 2001; Salas-Burgos *et al.* 2004)

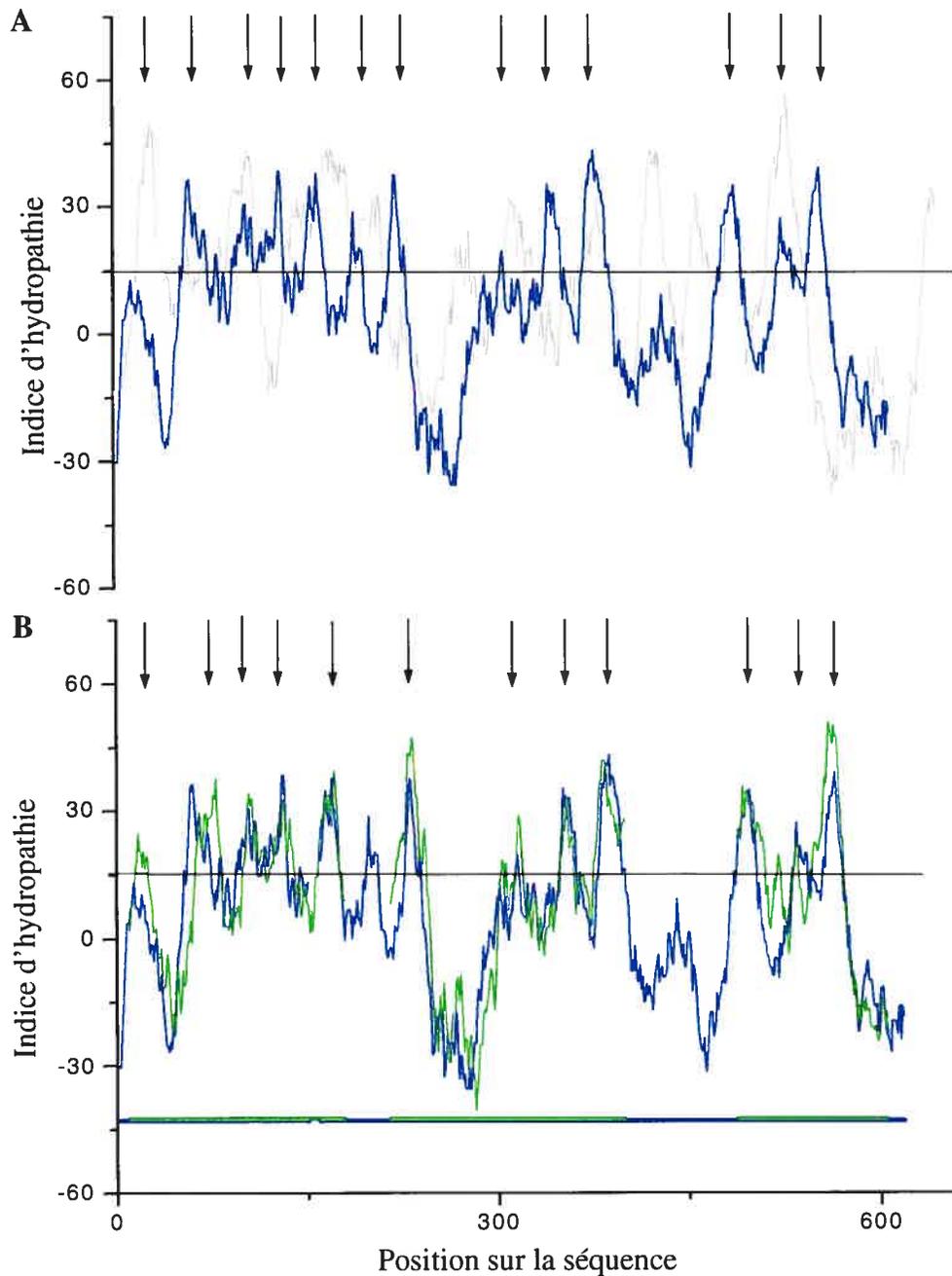
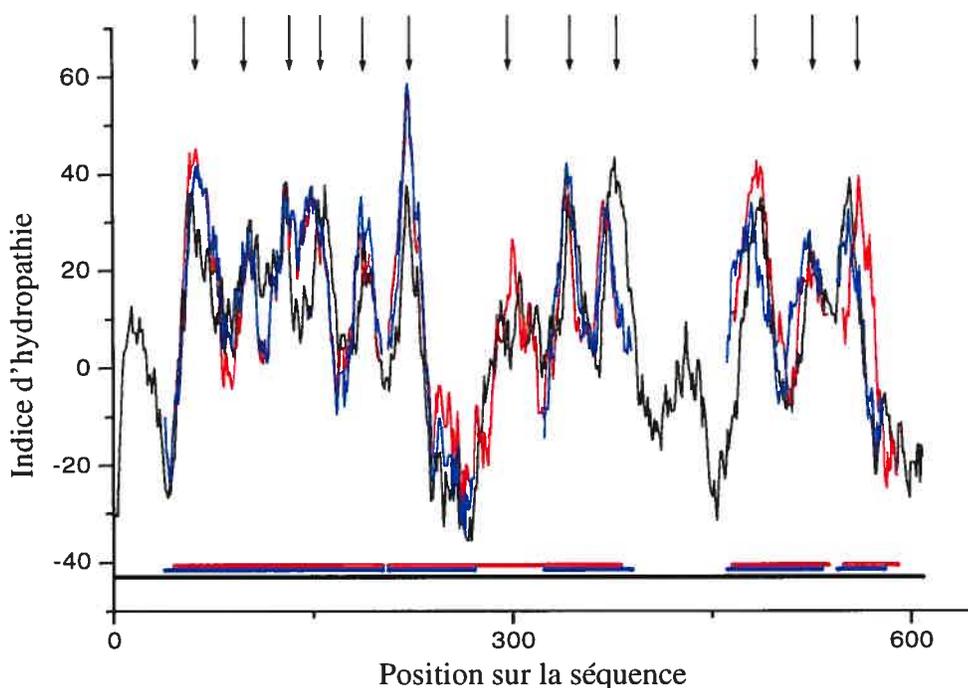


Figure I-9 Comparaison du profil hydropathique de HMIT avec GLUT1.

Une fenêtre de 19 acides aminés est utilisée. HMIT est en bleu, et (A) SGLT1 en gris; (B) GLUT1 en vert. Les flèches indiquent l'emplacement des segments transmembranaires possibles.

Un aspect intéressant de la similarité entre HMIT et GLUT1 est qu'une forte similarité est observée entre ce dernier et les cotransporteurs bactériens de H^+ /xylose, H^+ /arabinose et H^+ /galactose (Xy1E, AraE et GalP de *E. Coli*). Xy1E et AraE partagent

près de 40 % d'homologie avec GLUT1 (Maiden *et al.* 1987) et GalP 30 % (Griffith *et al.* 1992). Ces cotransporteurs pourraient donc aussi partager une ressemblance avec HMIT, ce que l'on peut vérifier par une comparaison de leurs séquences. Une analyse avec l'algorithme LALIGN révèle que Xy1E, AraE et GalP partagent entre eux 31-65 % d'identité, mais surtout 28-30 % avec HMIT, laissant supposer qu'il s'agit d'un transporteur du même type. SGLT1, lui, n'affiche pratiquement pas de similarité avec HMIT (17 % sur à peine 170 résidus), et appartiendrait donc plutôt à une autre famille de structure différente, peut-être à cause de sa stœchiométrie. Par comparaison de séquences, il a été proposé que ces transporteurs bactériens soient constitués de 12 STM avec un large segment hydrophile central (Henderson 1990). En comparant les profils d'hydrophathie, on peut voir que HMIT concorderait aussi avec ce modèle (FigureI-10).



FigureI-10 Profil hydrophathie de HMIT et de transporteurs bactériens

Une fenêtre de 19 acides aminés est utilisée. HMIT est en noir, GalP en rouge et AraE en bleu.

5 Problématique et justification de la recherche

Plusieurs années après leur clonage et malgré une exploration en largeur de leurs caractéristiques, les stœchiométries de SMIT2 et de HMIT, qui sont pourtant un aspect important de leur fonction physiologique, demeurent inconnues. Cela témoigne de la difficulté associée à la détermination de ce paramètre au-delà de la mesure du nombre de Hill, et justifie la recherche d'une nouvelle méthode pour ce faire.

5.1 Buts

Le but de cette recherche expérimentale est ainsi double. L'objectif global est de développer une méthode permettant de mesurer la stœchiométrie d'un transporteur cloné. Nous la mettrons à l'épreuve face à un transporteur de stœchiométrie connue puis l'appliquerons à l'objectif précis de déterminer le nombre d'ions impliqués dans le transport d'une molécule de myo-inositol pour les protéines membranaires HMIT et SMIT, de concert avec une méthode conventionnelle pour la valider.

5.2 Présentation des méthodes utilisées pour déterminer la stœchiométrie

Les techniques utilisées sont décrites en détail dans la section « Methods » de l'article ci-inclus, mais nous ferons ici une présentation plus large et explicative.

La première méthode, innovatrice, constitue le premier objectif de ce travail; nous la désignerons par l'appellation brève de « méthode volumétrique ». Le détail, équations comprises, en est fait dans l'article, mais une présentation plus conviviale en est offerte ici. Nous analyserons aussi plus en détail le transport activé par les protons, et l'essentiel de la seconde méthode sera présenté.

5.2.1 Méthode volumétrique

Cette méthode volumétrique repose sur une idée simple : chaque substrat franchissant la membrane constitue un osmolyte et chaque osmolyte pénétrant la cellule

contribue à établir un gradient osmotique qui tend à attirer l'eau de l'extérieur par osmose, causant un gonflement; l'ampleur de ce gonflement peut ainsi révéler la stœchiométrie de transport. On mesure donc simultanément, lors du transport, le changement de volume et le courant pour les comparer; cette méthode est rendue possible par notre capacité à mesurer des changements de volumes dans les ovocytes avec une précision de 0,05 %, soit moins de 1 nl par rapport à des ovocytes de volume $\sim 1 \mu\text{l}$ (Duquette *et al.* 2001). Le passage des ions est mesuré par la technique bien établie du voltage imposé en double microélectrode (Moore et Cole 1963; Eriksson *et al.* 1976; Sachs et Specht 1981; Stuhmer 1992). Le résultat brut en est essentiellement un nombre net d'osmolytes qui traversent la membrane par charge entrant. Cependant, puisque nous utilisons une méthode qui couple la mesure de l'entrée d'osmolytes avec le *voltage-clamp* qui injecte un courant, nous devons caractériser l'effet osmotique global des charges entrant à la membrane. En effet, pour une charge positive entrant dans la cellule, l'électrode chargée de maintenir le potentiel constant peut, pour créer un courant sortant équivalent, retirer une charge positive ou faire entrer une charge négative, ce qui ne donnera pas le même bilan osmotique global; on obtient zéro ou deux osmolytes entrés (un entre à la membrane et un entre ou sort à l'électrode de courant). Statistiquement, la moyenne se situera entre ces deux possibilités, le courant entrant menant à l'entrée de 0 à 2 osmolytes par charge. On peut évaluer ce paramètre en mesurant le gonflement obtenu par un influx uniquement de charges, ce que nous faisons ici en exprimant le canal potassique ROMK2, et en fixant le potentiel un peu plus négatif que le potentiel d'inversion de manière à obtenir un courant de l'ordre de grandeur de celui obtenu lors d'un cotransport. L'hypothèse utilisée est alors qu'un courant d'ions potassium induit le même effet osmotique qu'un influx d'ions sodium, ce qui semble fort raisonnable puisque les électrodes de *voltage-clamp* ne voient que la charge nette et que les deux types d'ions restent libres dans le cytoplasme.

Il en va autrement pour le cotransport avec les protons. Si les électrodes n'y devraient voir encore là aucune différence, il est certain que les ions H^+ sont soumis aux tampons intracellulaires de l'ovocyte. Pour un pouvoir tampon de 23,8 mM par unité de pH (Sasaki *et al.* 1992) au pH normal de l'ovocyte, 23,8 mM de H^+ doit donc être ajouté dans une cellule avant que son pH change d'une unité, soit un changement de

$10^{-6,6} - 10^{-7,6} = 0,23 \mu\text{M}$. Cela donne une proportion de 1 H^+ libre pour 100 000 liés par le tampon; c'est donc dire qu'une entrée de protons reste essentiellement invisible du point de vue osmotique.

Un influx d'osmolytes dans l'ovocyte n'induit cependant pas immédiatement une entrée d'eau proportionnelle; il doit se bâtir une accumulation d'osmolytes suffisante pour créer un gradient qui entraîne l'eau à traverser la membrane (Gagnon *et al.* 2004). Pour accélérer l'atteinte d'un état d'équilibre où l'eau passe en proportion des osmolytes de manière isotonique, nous coexprimons avec les protéines membranaire testées une aquaporine, qui augmente beaucoup la perméabilité à l'eau de la membrane et permet ainsi de connaître « en tout temps » le nombre d'osmolytes transportés en mesurant l'augmentation de volume qui lui est associée.

5.2.2 Méthode de marquage radioactif

Cette méthode a été utilisée pour la première fois par Hediger en 1994 (Kanai *et al.* 1994) et consiste à susciter un transport par un substrat dont une fraction infime est « marquée », c'est-à-dire dont les molécules contiennent un isotope radioactif, et à comparer la quantité de substrat entré au courant induit. On mesure donc maintenant simultanément le flux de charge et le flux isotopique. Nous référerons à cette seconde méthode, plus conventionnelle, par le nom de « méthode transport/courant ». La quantité de substrat ayant pénétré l'ovocyte est calculée par le comptage de son activité radioactive pondérée par l'activité du bain, de concentration connue en substrat. Ainsi, pour un bain de concentration C en substrat dont un aliquot de volume V présente une activité A , un ovocyte présentant une activité α révèle un influx de substrat total de

$$n_{(mol)} = \frac{\alpha_{(cpm)}}{A_{(cpm)}} C_{(M)} V_{(L)} \quad (8)$$

Il n'est donc nullement besoin de tenir compte de la décroissance exponentielle de l'activité de l'isotope utilisé (demi-vie) car elle est la même dans l'ovocyte et le bain, bien que le problème ne se pose pas pour le ^{14}C dont la demi-vie est de plusieurs milliers d'années. La méthode demande toutefois de faire un compromis sur la concentration de

substrat à utiliser. Trop peu de substrat ne permet pas d'obtenir un courant de transport raisonnable, mais si on augmente sa concentration, il inhibe alors (de façon compétitive) l'entrée de substrat marqué, réduisant l'activité détectée. Cet effet peut être compensé en augmentant la quantité de substrat marqué, mais les contingences matérielles limitent la quantité utilisable. Nous avons opté pour une concentration totale de substrat entre K_m et $2K_m$, donnant des courants correspondant entre $\frac{1}{2}V_{max}$ et $\frac{2}{3}V_{max}$.

5.3 Autres protéines membranaires utilisées

5.3.1 ROMK2

ROMK2 fait partie des canaux potassiques à rectification entrante des ROMK (*renal outer medullary* K^+ -channels : Kir1.1, ROMK2 correspond à Kir1.1b), dont le premier fut cloné par expression en 1993 (Ho *et al.* 1993). Leur structure ne renferme pas les 6 segments transmembranaires caractéristiques de beaucoup de canaux potassiques, mais possède deux STM partageant une grande homologie avec ceux qui forment le pore de ceux-ci (Ho *et al.* 1993) et surtout contient la séquence de résidus GXG caractéristique des canaux sélectifs au potassium (Heginbotham *et al.* 1994; Kerr et Sansom 1995). Ils sont régulés par l'ATP et sensibles au pH (McNicholas *et al.* 1996; McNicholas *et al.* 1998). ROMK2 fut cloné à partir du rein de rat en 1994 (Zhou *et al.* 1994) et posséderait une conductivité de ~ 30 pS à haut $[K^+]$ externe ainsi qu'une grande probabilité d'ouverture. Les canaux ROMK semblent tous résulter d'un épissage alternatif du même gène (Boim *et al.* 1995). L'essentiel de ses propriétés qui nous sont ici nécessaires est toutefois qu'il laisse entrer les ions potassium de façon sélective. Le clone utilisé est celui du rat et nous a été donné par Steve C. Hebert (Yale). Nous avons précédemment montré qu'un ovocyte exprimant ce canal pouvait générer des courants potassium de plusieurs μA (Duquette *et al.* 2001).

5.3.2 AQP1 et AQP2

L'existence de canaux à eau fut supposée longtemps avant leur découverte, notamment à cause de divergences importantes entre les résultats obtenus pour la

perméabilité par flux osmotique et par diffusion d'eau lourde (Pappenheimer *et al.* 1951; Koefoed-Johnsen et Ussing 1953). Ce n'est que 50 ans plus tard que le canal responsable du passage rapide de l'eau à travers la membrane lipidique fut cloné par l'équipe de Peter Agre (Preston et Agre 1991), lui méritant un (demi) prix Nobel en 2003. Initialement nommée CHIP28 pour *channel-like integral membrane protein of 28 kDa*, elle est maintenant désignée aquaporine-1 (AQP1) et dix isoformes sont identifiées chez l'humain.

Les aquaporines se présentent sous forme de tétramères (Murata *et al.* 2000), mais, contrairement à la plupart des canaux multimériques dont le pore est constitué par la jonction centrale des monomères (MacKinnon 2003), chaque sous-unité contient un pore fonctionnel et le « pore » central ne permet pas le passage de l'eau (Chakrabarti *et al.* 2004). Une caractéristique étonnante mais qui sera pour nous essentielle est que, malgré une grande perméabilité à l'eau, les aquaporines se révèlent imperméables aux ions, incluant les protons. Il aurait pourtant été plausible que les protons puissent aisément transférer d'un côté à l'autre le long d'un « *proton-wire* » (*Grotthuss mechanism*) (Pomes et Roux 1996), mais une séquence NPA, très conservée dans les aquaporines, vient créer des liens hydrogènes avec les molécules d'eau, coupant la chaîne par laquelle les protons pourraient passer en maintenant le moment dipolaire des molécules d'eau dans une orientation défavorable pour ce processus (Chakrabarti *et al.* 2004).

AQP1 avait les caractéristiques requises pour notre projet, qui se résumaient en fait à augmenter la perméabilité à l'eau de la membrane. Cependant, lors de mesures faites en milieu acide pour le cotransport couplé aux protons, ce canal semblait être à l'origine de courants ioniques importants et variables, perturbant de ce fait notre mesure des courants de transport. Une exposition en est faite au Chapitre III - Section 1, page 55. Pour contourner le problème, nous avons donc utilisé l'aquaporine-2, de même ordre de grandeur de perméabilité à l'eau (Meinild *et al.* 1998), lors de la coexpression avec HMIT pour éviter les problèmes encourus avec AQP1 lorsque le milieu extracellulaire devient acide.

5.3.3 SGLT1

Très exploré pour ses fonctions d'absorption et de réabsorption dans l'intestin et le rein, sites principaux de son expression, ce cotransporteur est l'un des membres de la famille des *sodium/substrate symporter* les mieux connus, pour laquelle il sert d'archétype. Il est aussi présent à la barrière hémato-encéphalique, dans les neurones, le foie, les poumons et les cardiomyocytes (Lee *et al.* 1994; Poppe *et al.* 1997; Zhou *et al.* 2003; Elfeber *et al.* 2004). L'absorption de glucose couplée à un gradient de sodium fut d'abord proposée dans les années soixante par Robert Crane (Crane *et al.* 1961). Le mécanisme global pour le cotransport fut confirmé dans la décennie suivante avec l'utilisation de microélectrodes sélectives et largement exploré par l'utilisation de vésicules de bordure en brosse. L'ensemble des connaissances disponibles alors peuvent être trouvées dans Semenza *et al.* (1984). Puis l'accent fut mis sur ce cotransporteur car il fut le premier cloné chez les mammifères par une méthode alors nouvelle, le clonage par expression (Hediger *et al.* 1987). Pour une revue historique de l'absorption du glucose, voir Reuss (2000)

SGLT1 utilise le gradient électrochimique de sodium pour transporter le glucose avec une stœchiométrie de $2 \text{ Na}^+ : 1 \text{ glucose}$ (p. 8) et est inhibé par la phlorizine. Il présente de larges courants transitoires lors de sauts de potentiel, dénotant le mouvement de ses charges dans la membrane. Tel que vu à la section 4.1, la topologie proposée comporte 14 segments transmembranaires; de plus, il a été proposé que les 5 segments C-terminaux (10-14) constitueraient la voie de passage du glucose car ils suffiraient pour constituer un uniporteur de glucose (Panayotova-Heiermann *et al.* 1997). Il faut cependant mettre cette conclusion en perspective puisque la voie de perméation induite par l'expression de cette protéine tronquée n'est plus sensible à la phlorizine et laisse aussi passer le mannitol et l'urée (Panayotova-Heiermann et Wright 2001). Il est donc permis de se demander si cette voie de perméation est spécifique et si elle est reliée d'une quelconque façon avec la structure qui fait passer le glucose dans SGLT1. En plus de la stœchiométrie de deux ions sodium par glucose transporté, l'autre caractéristique qu'il nous est crucial de connaître est sa capacité à fonctionner avec un gradient de protons au lieu d'un gradient de sodium (Quick *et al.* 2001), avec une affinité de $7 \mu\text{M}$

(près de pH 5) au lieu du mM avec le sodium. Ce remplacement nous permettra de comparer le transport par HMIT avec un transport utilisant le même type d'ions, évitant de devoir passer par une hypothèse quant au comportement des protons une fois entrés par cotransport.

Chapitre II - Établissement de la stœchiométrie de transport de deux cotransporteurs de myo-inositol couplés à des cations : SMIT2 et HMIT

Le cœur de mon travail de recherche fut synthétisé en un article, destiné à la publication au *Journal of Physiology (London)*, et ayant pour titre **Determination of transport stoichiometry for two cation-coupled myo-inositol cotransporters: SMIT2 and HMIT**. Il fut soumis le 2 octobre 2004 et accepté moyennant corrections mineures le 1^{er} novembre, puis resoumis le 13 décembre pour être publié sous format électronique le 21 puis papier en mars 2005 (Bourgeois *et al.* 2005). Ce chapitre le présente dans son intégralité.

J'en suis le premier auteur et, en tant que tel, je fus responsable de sa rédaction en entier, sous la supervision et la correction du second auteur et de mon directeur de maîtrise. J'ai effectué l'ensemble des expériences, de l'analyse et des figures qui y sont présentées, tant pour la volumétrie et l'électrophysiologie que pour les transports de substrats radioactifs.

Determination of transport stoichiometry for two cation-coupled myo-inositol cotransporters: SMIT2 and HMIT

Francis Bourgeois, Michael J. Coady & Jean-Yves Lapointe

Groupe d'étude des protéines membranaires (GÉPROM) and 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: HMIT and SMIT2 transport stoichiometry

Keywords: Na⁺-coupled cotransport, H⁺-coupled cotransport, Myo-inositol cotransport; Stoichiometry; Volumetry; Osmolyte uptake; Radioactive tracer uptake; *Xenopus* oocytes.

SUMMARY

Three different mammalian myo-inositol cotransporters are currently known; two are Na⁺-coupled (SMIT1 and SMIT2) and one is proton-coupled (HMIT). Although their transport stoichiometries have not been directly determined, significant cooperativities in the Na⁺ activation of SMIT1 and SMIT2 suggest that more than 1 Na⁺ ion drives the transport of each myo-inositol. The two techniques used here to determine transport stoichiometry take advantage of the electrogenicity of both SMIT2 and HMIT expressed in *Xenopus* oocytes. The first method compares the measurement of charge transferred into voltage-clamped oocytes with the simultaneous uptake of radiolabelled substrate. The second approach uses high accuracy volume measurements to determine the transport-dependent osmolyte uptake and compares it to the amount of charge transported. This method was calibrated using a potassium channel (ROMK2) and was validated with the Na⁺/glucose cotransporter SGLT1, which has a known stoichiometry of 2:1. Volume measurements indicated a stoichiometric ratio of 1.78 ± 0.27 ion per alpha-methyl-glucose (α MG) for SGLT1 whereas the radiotracer uptake method indicated 2.14 ± 0.05 . The two methods yielded a SMIT2 stoichiometry measurement of 1.75 ± 0.30 and 1.82 ± 0.10 , both in agreement with a 2 Na⁺:1 myo-inositol stoichiometry. For HMIT, the flux ratio was 1.02 ± 0.04 charge per myo-inositol but the volumetric method suggested 0.67 ± 0.05 charge per myo-inositol molecule. This last value is presumed to be an underestimate of the true stoichiometry of 1 proton for 1 myo-inositol molecule due to some proton exchange for osmotically active species. This hypothesis was confirmed by using SGLT1 as a proton-driven glucose cotransporter. In conclusion, despite the inherent difficulty in estimating the osmotic effect of a proton influx, the volumetric method was found valuable as it has the unique capacity of detecting unidentified transported substrates.

INTRODUCTION

Inositols are neutral cyclic polyols, among which the stereoisomer *myo*-inositol (MI) is by far the most abundant and important in mammalian tissues. MI has many important roles; it is a precursor to phosphatidylinositols (PtdIns) and to the inositol phosphates (IP), which serve as second messengers and as key regulators of many cell functions (Berridge, 1993; Zhang & Majerus, 1998). It is also well established that MI serves as a compatible osmolyte during volume regulation in many tissues where cells are exposed to hyperosmotic conditions (Nakanishi *et al.*, 1989; Trachtman, 1992; Wiese *et al.*, 1996). MI can also act as a chemical chaperone, assisting in the correct folding of mutant, dysfunctional proteins as seen with the $\Delta F508$ deletion in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) protein (Howard *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003). Normal MI levels in serum range from 30 to 70 μM (MacGregor & Matschinsky, 1984; Dolhofer & Wieland, 1987; Kouzuma *et al.*, 2001), but can attain up to 6 mM in human brain and as much as 17 mM in certain neurones (Fisher *et al.*, 2002), as well as 30 mM in outer renal medullary thick ascending limb cells (Schmolke *et al.*, 1990). Accumulation of MI within cells against its concentration gradient is accomplished by cotransport, using the electrochemical gradient of the coupled ion.

The cloning of the Na^+ /*myo*-inositol cotransporter SMIT1 was achieved more than a decade ago (Kwon *et al.*, 1992) and the role played by this cotransporter in cellular adaptation to hypertonicity has been intensively studied (Ibsen & Strange, 1996; Wiese *et al.*, 1996; Yamauchi *et al.*, 1996). Our laboratory has recently identified a second Na^+ /MI cotransporter, named SMIT2 (Coady *et al.*, 2002), which is 43% identical to SMIT1. SMIT1 and SMIT2 are both expressed in the kidney and also in the brain, where they are present both in glial cells and in neurones (Poppe *et al.*, 1997). HMIT, a proton-coupled *myo*-inositol transporter, was also recently identified (Uldry *et al.*, 2001) and is predominantly expressed in the brain. The precise physiological roles of SMIT2 and HMIT are not known and the requirement for three distinct, secondary active MI cotransporters (with similar reported affinities for MI) in the brain is not known. Transport stoichiometry (the number of ions cotransported per substrate molecule) is a crucial parameter that can help to rationalize the expression patterns of these cotransporters; stoichiometry sets the energy cost of transport, defining the accumulation capacity of each protein. The exact stoichiometry of each of the three cotransporters remains unknown although

the Hill coefficients obtained from the Na⁺-activation of SMIT1 and SMIT2 suggest ratios of more than one sodium ion per MI molecule transported (Hager *et al.*, 1995; Coady *et al.*, 2002).

Several methods exist to establish a transport stoichiometry; they rely on one of the following i) the ratio between the fluxes of two radiotracers (Kanai *et al.*, 1995; Jennings & Adame, 2001); ii) the ratio between one radiotracer flux and the net flux of electrical charge (Klamo *et al.*, 1996; Diez-Sampedro *et al.*, 2001); iii) the thermodynamic equilibrium, by measuring the reversal potential as a function of substrate concentration (Lapointe *et al.*, 1986; Smith-Maxwell *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1995) or by balancing the electrochemical gradients of all transported species in order to reach equilibrium, *i.e.* the static head method (Turner & Moran, 1982; Fukuhara & Turner, 1984). Here we have employed a novel method based on the fact that cell volume can be measured with high accuracy in oocytes expressing individual forms of transporters. Volume measurements can be used to calculate the total quantity of osmolyte uptake upon stimulation of transport and, when compared with electrophysiological measurements under voltage-clamp conditions, can yield the apparent amount of osmolyte uptake per elementary charge transported. This method is applied here to SMIT2, HMIT and SGLT1 and the results are compared to simultaneous measurements of radiolabelled substrate uptake and cotransport current. The methods confirm a 2 to 1 stoichiometry for SGLT1 and establish the stoichiometries of SMIT2 and HMIT as 2 Na⁺ / 1 MI and 1 H⁺ / 1 MI, respectively.

METHODS

Oocyte preparation and incubation. Stage V-VI *Xenopus laevis* (University of Alberta, Edmonton, CAN) oocytes were surgically removed under tricaine anesthesia and manually separated. They were then placed into a Ca^{2+} -free buffered saline solution (200 mOsm) and defolliculated by collagenase digestion. The oocytes were maintained 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 sodium pyruvate, 100 U ml^{-1} penicillin and 0.1 mg ml^{-1} streptomycin. All experiments were performed in accordance with the regulations of the *Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux* of the *Université de Montréal*, and following the experiments the frogs were humanely killed.

cRNA preparation and injection. SMIT2 RNA was transcribed from the rabbit cDNA coding region as previously described (Coady *et al.*, 2002). SGLT1 RNA was transcribed from a human cDNA clone (Hediger *et al.*, 1989; Bissonnette *et al.*, 1999). HMIT RNA was transcribed from a cDNA clone in which the sequences coding for endoplasmic reticulum retention and internalisation were omitted (Uldry *et al.*, 2001) and was kindly provided by Dr B. Thorens (*Institute of Pharmacology and Toxicology, Lausanne, Switzerland*), while aquaporin cDNA clones (AQP1 and AQP2) were kindly provided by JM Verbavatz (*CEA/Saclay, Gif-sur-Yvette Cedex, France*) and D. Bichet (*Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, Canada*), respectively. Rat ROMK2 (renal outer medullary potassium channel) cDNA was kindly provided by S. C. Hebert (*Yale University, New Haven CT*). RNA was injected (46 nl, 0.25 ng nl^{-1} for SMIT2 and HMIT, 0.1 ng nl^{-1} for SGLT1) using a Drummond microinjector (*Broomall, PA*) and oocytes were assayed 5-9 days after injection. AQP and ROMK RNA (46 nl, 0.1 ng nl^{-1}) were injected 1-2 day before use for volume measurements.

Solutions. Our control solution for both types of experiments contained (in mM): 80 NaCl, 3 KCl, 0.82 MgCl_2 , 0.74 CaCl_2 and 25 mannitol. For SGLT1 and SMIT2, solutions were buffered with 5 mM HEPES, pH 7.6 titrated with NaOH. For HMIT we used 10 mM MES titrated with TRIS to pH 6.0 or 5.5 as indicated. Solutions containing alpha-methyl-D-glucopyranose (αMG , a non-metabolized substrate for SGLT1) or myo-inositol were obtained by replacing 1, 5 or 10 mM of mannitol by the appropriate substrate, and hyposmotic solutions were made by omitting

20 mM mannitol. For Na⁺-free solutions used with SGLT1 as a H⁺-driven cotransporter, NaCl was omitted and replaced by 45 mM NMDG titrated to pH 7.0 with HCl, and 100 mM mannitol or α MG. The solution final pH of 5.5 was reached by adding 10 mM MES and the appropriate amount of TRIS. For ROMK2, KCL was increased to 20 mM in order to activate the channel and sodium was commensurately diminished. Phloridzin (Pz), an inhibitor of MI and α MG transport, was used for stop and rinse solutions for radioactive uptake experiments; these were made daily by directly dissolving Pz in the control solution. Measured osmolalities were $\sim 197 \text{ mosm kg}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ for control and substrate solutions and $\sim 177 \text{ mosm kg}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ for hyposmotic solution, their difference always being $20 \text{ mosm kg}^{-1} \text{H}_2\text{O}$, and osmolalities were verified within $\pm 2 \text{ mosm kg}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ using a freezing-point osmometer (Advanced DigiMatic Osmometer, model 3D2, Advanced Instruments, Needham Heights, MA).

Volume measurements. The apparatus used for volumetric measurements has previously been described (Gagnon *et al.*, 2004). Briefly, a chamber of 120 μl is illuminated from above by a light-emitting diode touching the surface of the solution. It was perfused, at a rate of $\sim 1.5 \text{ ml min}^{-1}$, under the control of an electrical valve with a characteristic dead space of 50 μl . The oocyte cross-section was continuously measured from below with a CCD camera and a 3x objective. Custom-made software was used to count the number of pixels corresponding to the oocyte cross-section 5 times per second and data were later averaged over 1 s periods. Oocyte volume was obtained assuming spherical symmetry and calibrating with a steel ball of known volume. After allowing a stabilization period of at least 20 min, a noise level for volume measurements of 0.05 % could usually be obtained.

Electrophysiology. For simultaneous current and volume measurements, the two-electrode voltage-clamp technique previously described in our laboratory was used (Duquette *et al.*, 2001; Gagnon *et al.*, 2004). Voltage-sensing electrodes were filled with 1 M KCl as described, but current-injecting electrodes were filled with a unique solution (in mM: 10 NaCl, 15 KCl, 70 K-gluconate, 10 HEPES pH 7.4). This was done to minimise salt exchange between electrode and cytosol and to reduce Cl⁻ injection when cotransporter activation generated an inward current. Current data acquisition was performed with Fetchex 6 (Axon Instruments, Foster City, CA) at a sampling rate of 40 Hz and analysis was made using Matlab 5.3 (MathWorks, Inc., Natick, MA). The bath reference and current electrodes were Ag-AgCl pellets. The chamber was continuously

perfused with control saline. Oocytes expressing cotransporters were maintained at -50 mV. For experiments with ROMK, the resting potential was measured for each oocyte (~ -35 mV with 20 mM extracellular K^+) and the membrane potential was later clamped a few mV more negative to generate an inward potassium current between 0.5 and 2 μA .

Radiotracer Experiments. For experiments comparing current and radiotracer uptake, both electrodes contained 1 M KCl. A non-perfused chamber of ~ 1200 μl was used. The oocytes were initially impaled and clamped at -50 mV in 400 μl of control solution. When a stable baseline was reached, 400 μl of solution containing twice the desired concentration of substrate and radiolabelled substrate (1 μCi μl^{-1} [2 - 3H] MI or 0.1 μCi μl^{-1} [glucose- $^{14}C(U)$] αMG) was gently added to stimulate a cotransport current. After 10 to 15 minutes of transport, 400 μl of saline solution containing 2 mM phloridzin was added as a stop solution to inhibit further transport and current. Electrodes were carefully withdrawn from the oocyte, which was then removed from the bath and rinsed 3 - 4 times in a saline solution containing 667 μM phloridzin before being transferred to a scintillation vial and dissolved in 200 μl 10% SDS for at least 2 h. 5 ml scintillation cocktail (*Beta Blend; ICN, Irvine, CA*) was then added and the vials were assayed for 3H or ^{14}C activity with an LS6000 SC scintillation counter (*Beckman, Fullerton, CA*). During the transport experiment, 20 μl of bathing medium was removed from the bath and radioactivity was assayed in the same manner in order to calculate the total quantity of substrate that entered the oocyte. Substrate concentrations used in the bath were between 500 and 2500 μM for SGLT1, SMIT2 and HMIT (for which the pH was set at 5.5). Control oocytes (non-injected) were exposed to the same treatment, with either radiolabelled αMG or myo-inositol. Transport activity into control oocytes was negligible for both substrates.

Concomitant transport current. Net flux of cotransported charge is obtained by integrating the total current minus baseline over time as linearly interpolated between the current before addition of substrate and after specific inhibition. As the initial baseline includes a leak current which is not present after transport inhibition, this calculation leads to a certain underestimation of transferred charge; however, as the leak current is often smaller than the spontaneous changes in the baseline current over time, correction for the leak current was not employed in the present study.

Volumetric method. Water permeability (P_f) of individual oocytes was calculated from the swelling induced by a hyposmotic shock according to the following relation:

$$P_f = \frac{1}{S \times v_w \times \Delta\pi} \left(\frac{dV}{dt} - \frac{dV}{dt_0} \right) \quad (1)$$

where $dV/dt - dV/dt_0$ is the difference in water fluxes, in this case measured immediately after and immediately before the shock, respectively. v_w is the specific volume of water ($18.2 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$), $\Delta\pi$ is the size of the hyposmotic shock imposed and S is a standard oocyte surface of 0.4 cm^2 assuming a membrane infolding factor of about 9 (Zampighi *et al.*, 1995).

As AQP was co-expressed with each of the different cotransporters, isosmoticity of transport is rapidly achieved as shown by the fact that the swelling rate reaches a constant value shortly after the addition of a cotransported substrate (see Fig. 1C for an example). Under these conditions, the net rate of osmolyte uptake (R_O) can be obtained from the relation:

$$R_O = \pi \left(\frac{dV}{dt} - \frac{dV}{dt_0} \right) \quad (2)$$

where π is the osmolarity of the bathing medium and dV/dt and dV/dt_0 refers to water fluxes during and before cotransport, respectively. Note that the specific pathway used by water to cross the oocyte membrane is irrelevant here provided that the net influx is assumed to be isosmotic. The concomitant rate of charge uptake (R_C), in moles of elementary charge per second, can be easily obtained by dividing the cotransport-associated membrane current measured over the same time interval by the Faraday constant:

$$R_C = \frac{\langle I - I_0 \rangle}{F} \quad (3)$$

The ratio of the two preceding quantities yields the apparent number osmolyte uptake per charge (n_{OPC}):

$$n_{OPC} \equiv \frac{R_O}{R_C}$$

At this point it is important to underscore the difference between n_{OPC} and true stoichiometry. n_{OPC} includes ionic movement that takes place at the electrode in order to maintain the membrane potential. For example, the apparent number of osmolytes per charge for a purely monovalent cationic transport across the membrane can be tested by analyzing potassium influx through ROMK2. It corresponds to 1 osmolyte per charge for each K^+ ion entering the cell minus OA_e , the average amount of osmolytes absorbed by the current electrode for each electrical charge injected:

$$n_{OPC}(K^+ \text{ influx}) = 1 - OA_e \quad (4)$$

$n_{OPC}(K^+ \text{ influx})$ could then vary between 0 and 2, depending on the process occurring at the current electrode to compensate for K^+ influx through the channel. For example, it would be 0 if intracellular K^+ ions were absorbed by the current electrode and it would be 2 if the electrode was injecting a negative ion for each charge entering the cell. For cotransport of x neutral substrates per cation, the apparent number of osmolytes per charge transported is given by simply adding x to the right hand side of Eq 4:

$$n_{OPC}(\text{cotransport}) = 1 + x - OA_e \quad (5)$$

After measuring the n_{OPC} 's for both cotransport (Eq 5) and for a pure cationic flux (Eq 4), x for a given cotransporter can be calculated as follows:

$$x = n_{OPC}(\text{cotransport}) - n_{OPC}(K^+ \text{ influx}) \quad (6)$$

The stoichiometry is simply $1/x$, the number of cations per substrate molecule transported.

In the case of HMIT, a proton influx cannot be treated like a Na^+ or a K^+ influx with regards to the osmotic effect produced. Considering that the *Xenopus* oocyte buffering power has been estimated at 23.8 mM per pH unit at physiological pH (Sasaki *et al.*, 1992), it can be calculated that less than 1 proton out of 10^5 entering an oocyte will remain unbound. Thus, our working hypothesis is that proton influx does not generate new intracellular osmolytes and that the apparent number of transported osmolytes per charge for HMIT would be given by:

$$n_{OPC}(H^+ \text{ cotransport}) = 0 + x - OA_e \quad (7)$$

As electrodes behave independently of the type of charge cotransported, the same OA_e applies, and x can be found from (7) – (4)

$$x = n_{OPC} (H^+ \text{ cotransport}) - [n_{OPC} (K^+ \text{ influx}) - 1] \quad (8)$$

RESULTS

Aquaporin expression and isosmotic transport assumption. Fig. 1A shows the volume change triggered by a hyposmotic shock for oocytes expressing different transporters. As previously reported (Loo *et al.*, 1999; Duquette *et al.*, 2001), the presence of SGLT1 increased the oocyte P_f by a factor of 2 (see Fig. 1A). Oocytes expressing HMIT or SMIT2 alone displayed water permeabilities very similar to the permeabilities observed with SGLT1 (data not shown). As illustrated in Fig. 1A, the presence of either AQP1 or AQP2 stimulated the oocyte P_f by at least an order of magnitude. Fig. 1B and 1C show the impact of this enhanced water permeability on transport-induced swelling. In the absence of AQP1 (B), at least 2 min are required for the cotransport-associated cell swelling to reach a constant value that parallels the uptake of Na^+ and αMG (shown here as the integral of the cotransport current). Not surprisingly, when cotransport current is shut down by removing αMG , the cell continues to swell for a few minutes before reaching a stable level. In contrast, in the presence of AQP1 (see Fig. 1C), the cell swelling closely followed the volume predicted by the integral of the cotransport current and quickly stops upon removal of substrate. This is fully consistent with isosmotic influx of water and osmolytes during the transport period.

Osmolyte uptake and cation influx. In Fig. 2, the combined effects of cation influx across the membrane and compensating current injection through the current electrode are shown using an oocyte expressing ROMK2 and AQP1. In the example presented, an inward K^+ flux corresponding to a 680 nA current was elicited by clamping the membrane potential a few mV more negative than the equilibrium potential. A difference of 22 pl s^{-1} in the oocyte swelling rate was immediately recorded. If the transport-dependent influx is assumed to be isosmotic with respect to the bathing solution (192 mOsm), it would correspond to an osmolyte uptake rate of 4.2 pmol s^{-1} . As the observed K^+ current corresponded to 7.0 pmol s^{-1} , this represents a ratio of 0.6 apparent osmolytes per charge. The average apparent amount of osmolytes per charge obtained for a series of similar ROMK2 experiments ($n_{\text{OPC}}(\text{K}^+ \text{ influx})$) was 0.46 ± 0.07 (mean \pm SEM, $n=15$).

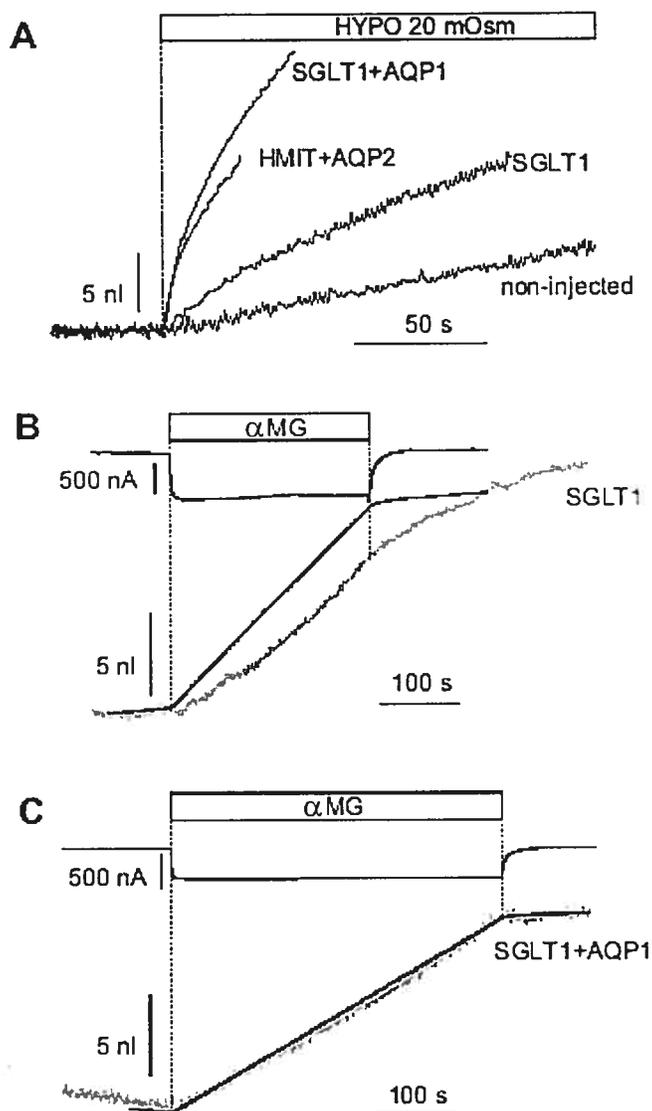


Figure 1 - Aquaporin effects

A, Volume response to a 20 mOsm hyposmotic shock by a control oocyte or by oocytes expressing different cotransporters and water channels. In these examples, the measured water permeabilities were $3.4 \mu\text{m s}^{-1}$ for the non-injected oocyte and 11, 79 and $87 \mu\text{m s}^{-1}$ for oocytes expressing SGLT1, HMIT+AQP2 and SGLT1+AQP1, respectively. *B*, Volume response to the addition of 5 mM α -methylglucose (α MG) for oocytes expressing SGLT1. The continuous line is the volume predicted from current integration assuming an isosmotic swelling, using the solution osmolarity and the best apparent osmolytes per charge (n_{OPC}). In the absence of AQP1, the cotransport stimulation induces a swelling that continues after substrate removal, indicating a net increase in intracellular osmolyte concentration during the transport period. *C*, When AQP1 is present, swelling ceases immediately after the substrate is removed, indicating that isosmotic transport was achieved.

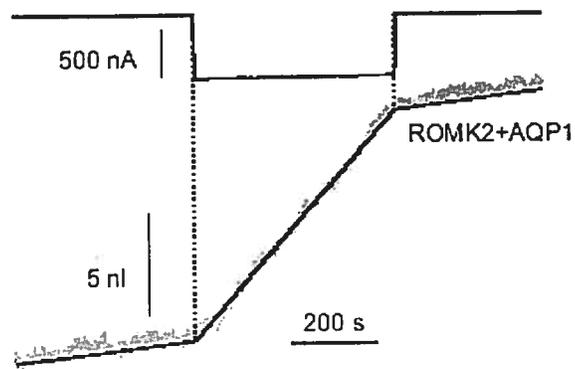


Figure 2 - Simultaneous volume and current measurements in an oocyte expressing ROMK2 and AQP1

Current and volume were monitored in a 20 mM $[K^+]$ solution as the membrane potential was suddenly clamped ~ 1 mV more negative than K^+ equilibrium potential. The inward current immediately triggered a volume uptake that was used to calculate the apparent amount of osmolyte transported for each K^+ ion entering the oocyte. The continuous line is the volume predicted if the swelling is assumed to be isosmotic with $n_{OPC} = 0.6$.

Cotransport-induced swelling. Volume and current were recorded from oocytes expressing SMIT2, SGLT1 and HMIT with either AQP1 or AQP2 (the use of two different aquaporins is explained in the Discussion). Examples of volume increases are presented in Fig. 3, together with associated clamp currents for the three cotransporters. In each case, it can be seen that the isosmotic swelling assumption is clearly supported since a constant transport rate induced a linear swelling rate, as well as because the oocyte volume rapidly reached a stable volume when cotransport was abruptly stopped. By analyzing the volume and current measurements as described in the Methods section, the n_{OPC} was determined for each transporter: 1.02 ± 0.04 osmolyte/ Na^+ (n=14) for SGLT1, 1.03 ± 0.06 osmolyte/ Na^+ (n=9) for SMIT2 and 0.96 ± 0.08 osmolyte/proton (n=10) for HMIT.

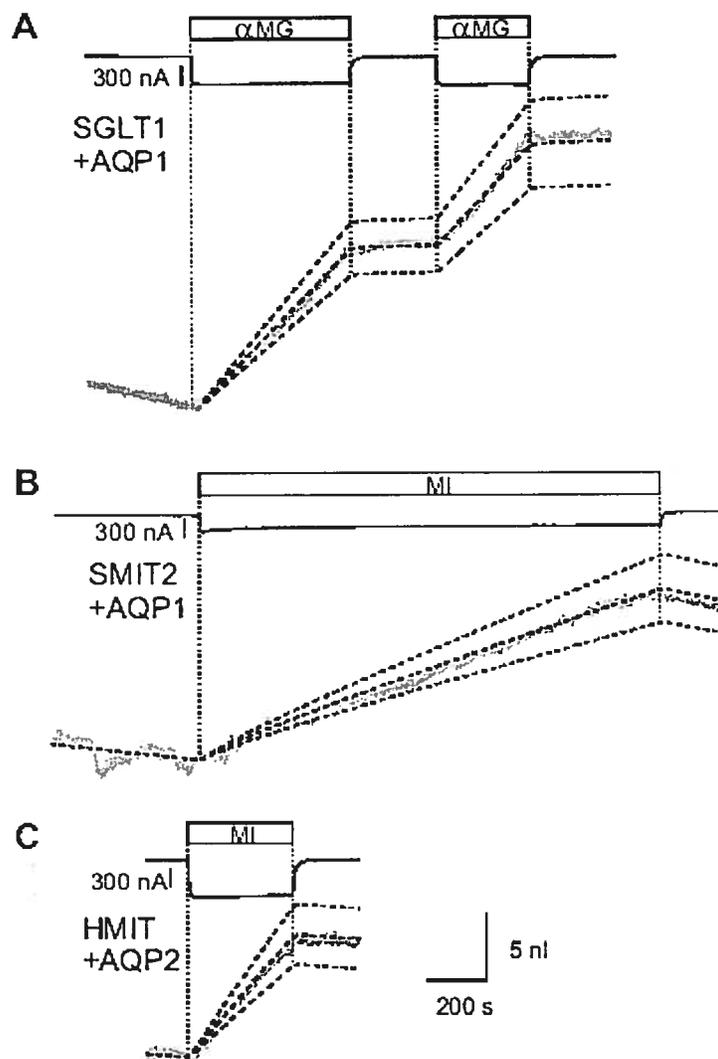


Figure 3 - Simultaneous volume and current measurements in oocytes expressing SGLT1 and AQP1 (A), SMIT2 and AQP1 (B), or HMIT and AQP2 (C). Isosmotic addition of substrate (5 mM, 1 mM and 10 mM, respectively) to oocytes clamped at -50 mV elicited inward currents together with linear swelling due to influx of both ions and substrates. Dashed lines present volume prediction from current integration for best n_{OPC} fit and for this $n_{OPC} \pm 0.2$. The time and volume scales apply to all three panels.

Stoichiometry calculation and accuracy. The number of electrical charges per substrate molecule transported can be readily obtained from the volumetric experiments as $1/x$ by using eq. (6) or (8). As the stoichiometry (S) is derived as the inverse of a difference in n_{OPC} , an underestimate in a particular n_{OPC} (cotransport) measurement could lead to a very high stoichiometric ratio which would skew the average ratio toward higher values. We chose to avoid this by obtaining an average n_{OPC} with a SEM for each cotransporter and using this value to derive the stoichiometry. In the case of Na^+ cotransport (Fig. 4A), the stoichiometric scale, as the number of charges per neutral osmolyte transported, was obtained from eq. (6)

$$S = \frac{1}{x} = \frac{1}{n_{OPC}(\text{cotransport}) - n_{OPC}(K^+ \text{influx})} \quad (9)$$

As expected, as n_{OPC} (cotransport) approaches $n_{OPC}(K^+ \text{influx})$, the number of substrates transported per Na approaches 0 and S approaches ∞ . The same applies for H^+ cotransport (Fig. 4B), with the stoichiometric scale obtained from eq. (8)

$$S = \frac{1}{x} = \frac{1}{n_{OPC}(H^+ \text{cotransport}) - [n_{OPC}(K^+ \text{influx}) - 1]} \quad (10)$$

It should be noted that the errors associated with an over- or under-estimation of n_{OPC} are not symmetrical. If one considers the differences between n_{OPC} (cotransport) and $n_{OPC}(K^+ \text{influx})$ and computes the errors by standard rules of error propagation (for a difference: $\sigma_{diff}^2 = \sigma_a^2 + \sigma_b^2$) and then observes the effect of a variation on each difference by 1 SEM, different error values will be obtained toward positive or negative values, yielding a two-part error. Consequently, the stoichiometries obtained here (net charge per substrate molecule transported) are most accurately described as $1.78 + 0.31 - 0.23$ for SGLT1 and $1.75 + 0.35 - 0.25$ for SMIT2. In the case of HMIT, as it is assumed that the protons are osmotically invisible, the stoichiometry calculated is $0.667 + 0.052 - 0.045$ net charges per substrate molecule transported. For the sake of comprehensibility, the two errors were averaged, producing the following values: 1.78 ± 0.27 for SGLT1, 1.75 ± 0.30 for SMIT2 and 0.67 ± 0.05 for HMIT.

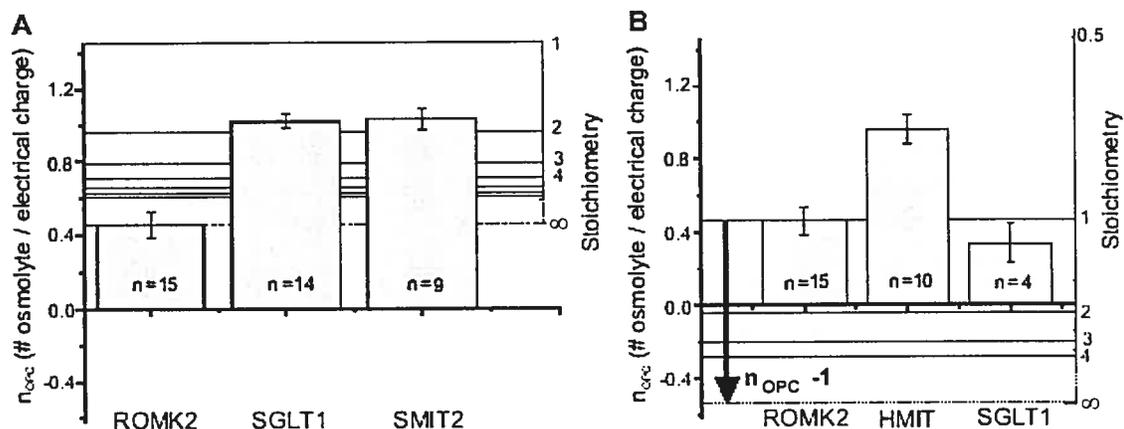


Figure 4 - Stoichiometry and apparent osmolyte influx per charge transported for the potassium channel and for transporters.

The left scale shows the apparent number of osmolytes measured per charge (n_{OPC}), while the right scale indicates the corresponding stoichiometry according to Eq 9 or Eq 10. (A) Na^+ :substrate stoichiometry for sodium cotransport; (B) H^+ :substrate stoichiometry for proton cotransport. Stoichiometric values for proton cotransport are calculated from $n_{OPC}(K^+$ influx) values lowered by 1 due to the hypothesized osmotic invisibility of protons (see Eq 10, Methods).

H⁺ cotransport with SGLT1. As a test of validity for the hypothesis that entering protons are osmotically invisible, we measured the swelling induced by SGLT1 activity when working as a proton-driven glucose cotransporter with a known stoichiometry of 2:1 (Quick *et al.*, 2001). The transport-dependent steady-state swelling rates measured yielded an average n_{OPC} of 0.33 ± 0.11 (Fig. 4B, $n=5$), suggesting a stoichiometry of $1.14 \pm 0.17:1$. This indicates that protons are not totally osmotically invisible as hypothesized.

Radiolabelled substrate uptake. Voltage-clamped oocytes were exposed to radiolabelled substrate (3H -MI or ^{14}C - α MG) for a period of at least 10 min as explained in the Methods section. The relationships between the net transported charge and the substrate influx are presented in Figure 5 for SGLT1, SMIT2 and HMIT. As the cotransport currents and the substrate uptakes were not significantly different from zero for non-injected oocytes (open symbols), each experiment performed with an injected oocyte can be considered as an independent determination of the cotransporter stoichiometry. The averages \pm SEM of these independent determinations yield cation to substrate stoichiometries of 2.14 ± 0.05 for SGLT1 ($n=10$), 1.82 ± 0.10 for SMIT2 ($n=9$) and 1.03 ± 0.04 for HMIT ($n=16$).

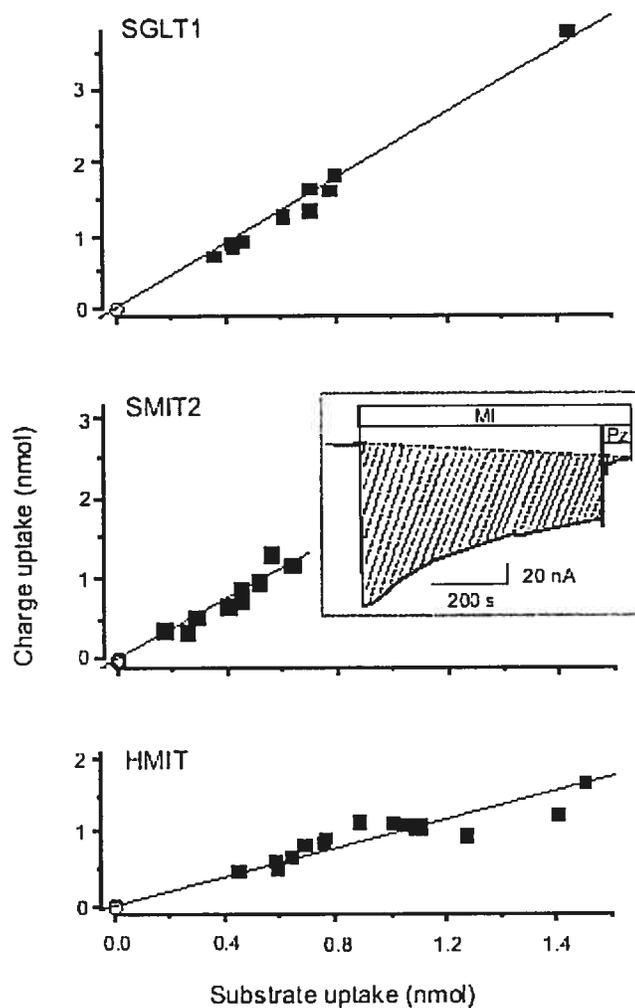


Figure 5 - Correlation between substrate-dependent net charge influx and radiolabelled substrate influx

Each point corresponds to a different oocyte; \circ represent 6 non-injected oocytes tested with ^{14}C - α -methylglucose or 4 with ^3H -myo-inositol, and all are positioned near the origin. Results were fitted to a straight line going through the origin for SGLT1, SMIT2 and HMIT (upper, center and lower panel respectively). Inset: Typical current trace recorded during addition of 2.5 mM MI followed by inhibition of cotransport with 667 μM Pz.

DISCUSSION

Several methods exist for determining cotransporter stoichiometry, demonstrating variable degrees of ease and accuracy. The determination of Hill numbers for cation or substrate-activated cotransport is an easily accessible method but it only provides a measure of the degree of cooperativity in the binding process (Weiss, 1997). In other words, this analysis can suggest that more than one molecule appear to interact but it is by no mean an accurate determination of the actual stoichiometry. The thermodynamic method, using the reversal potential of a cotransport-specific current, can distinguish between a substrate that is interacting with the cotransporter and a substrate that is actually transported across the membrane (Chen *et al.*, 1995; Gross & Hopfer, 1996). It obviously requires an electrogenic transport process, whose reversal potential has to be in the measurable voltage range. In the case of SMIT2, this method could not be used as the cotransporter is strongly rectifying (unpublished results), which makes the determination of the reversal potential inaccurate. The simultaneous measurement of a current and a radiolabelled substrate transport rate is appropriate when the background transport rate and binding are negligible, but it requires dedication of an electrophysiological setup to the use of radioisotopes. In the present study, we examined the possibility of measuring oocyte volumes with high accuracy as an innovative method of measuring cotransport stoichiometry. The method was tested successfully with the high affinity Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) before applying it to two MI cotransporters of unknown stoichiometry.

The number of osmolytes per charge (n_{OPC}) for a pure K^+ current. The measured stoichiometry values are based on the determination of n_{OPC} , which reflects the number of osmolytes accompanying a transported charge at the plasma membrane minus the number of osmolytes withdrawn from the cell by the current electrode. A theoretical estimate can be derived for the electrode performance by considering the fraction of the current carried by each ion present, as given by its transport number:

$$t_i = \frac{z_i^2 u_i C_i}{\sum_j z_j^2 u_j C_j} \quad (11)$$

where z_i is the valence of the ion “i”, C_i is its concentration and u_i , its mobility. The solution present at the tip of the electrode after being inserted into the oocyte for several minutes is expected to be a mixture between the cytosol and the intracellular pipette solution, which differ mainly in the major anions present. At the electrode tip, if the ionic composition is dominated by the pipette solution (including 70 mM gluconate with a relative mobility to K^+ of 0.33), the transport number for all cations “t” would be 0.65. In the case of K^+ influx through ROMK2, this means that for each K^+ ion entering the cell, 0.65 cation is leaving and 0.35 anion is entering at the current electrode, yielding a n_{OPC} of 0.70. On the other hand, if the solution at the electrode tip is similar to the cytosol with large, poorly mobile anions and a K^+ concentration of 100 mM, t^+ can be estimated at 0.78, yielding a $n_{OPC}(K^+ \text{influx})$ of 0.44. The experimentally measured n_{OPC} (0.46) is thus consistent with a situation where the conduction at the tip of the current electrode is dominated by the cations present.

Interpretation of the stoichiometry numbers obtained. We confirmed the 2:1 stoichiometry of SGLT1 (previously established by several techniques) and determined stoichiometrie for SMIT2 and HMIT by two distinct methods, both directly by comparing sugar-dependent currents and radiolabelled sugar uptake in the same oocyte, and indirectly by measuring oocyte swelling due to osmolyte uptake and comparing it to the clamp current. Overexpression of the transporters minimizes the importance of non-specific substrate fluxes, either by passive diffusion or by other transporters. For SGLT1, we obtained stoichiometry values of 2 Na^+ :1 α MG with both the direct method and with the swelling method, validating our methodology since the SGLT1 stoichiometry was previously established at 2 Na^+ :1 α MG by different methods (Chen *et al.*, 1995; Mackenzie *et al.*, 1998). In the case of SMIT2, both the volumetric and the radiotracer methods yielded a stoichiometry of 2 Na^+ :1 MI. This is in agreement with the Hill number of 1.4 reported for the Na^+ activation of SMIT2 (Coady *et al.*, 2002). Due to low expression levels in oocytes, the stoichiometry for SMIT1 has not yet been evaluated. However, the Hill number obtained for the Na^+ activation of SMIT1 is 1.9 (Hager *et al.*, 1995), suggesting that more than 1 Na^+ ions are involved in the MI cotransport. Therefore, different stoichiometries cannot be used to rationalize the presence of two distinct Na^+ /MI cotransporters found in the same organ (Kwon *et al.*, 1992; Poppe *et al.*, 1997). The reasons for having two Na^+ /MI cotransporter of similar stoichiometry may well be related to specific types of regulation and/or to different sub-cellular expression patterns (e.g. apical vs basolateral membrane.)

HMIT. Two different homologues of aquaporin water channels were used in our experiment. With its high water permeability and good expression in *Xenopus* oocytes, AQP1 performed perfectly in experiments involving SGLT1 and SMIT2. However, when extracellular pH was decreased to 5.5 during experiments with HMIT, abnormal currents of many hundreds nA were recorded upon addition of substrate, either when AQP1 was expressed alone or coinjected with HMIT (data not shown). The purported ion channel activities of AQP1 have been a matter of debate in recent years (Yool *et al.*, 1996; Anthony *et al.*, 2000; Saparov *et al.*, 2001; Tsunoda *et al.*, 2004), although we have not found any claims of pH dependency. Nonetheless, we turned to AQP2 for coexpression with HMIT. We found that AQP2 had similar levels of activity as had AQP1 but exhibited no abnormal currents in acidic conditions.

An apparent discrepancy seems to exist in our measurements of HMIT stoichiometry. While the direct method yields a proton:MI stoichiometry of 1:1, the swelling method gives a charge to neutral osmolytes ratio of only 0.67 ± 0.05 suggesting that more than 1 MI is transported per proton. This possibility is unlikely as the activation of HMIT by MI follows an unmodified Michaelis-Menten equation, i.e. is strictly hyperbolic with respect to MI concentration. It is also unlikely that another neutral substrate accompanies MI in the cotransport process as, with the exception of mannitol, there was no other neutral molecule in any of our experimental solutions. The possibility that Cl^- could be associated with the cotransport has also been tested, but varying the extracellular Cl^- concentration did not affect the MI-stimulated cotransport current (data not shown). Another possibility is that proton uptake might not be completely osmotically inactive. The observed $n_{OPC}(H^+ \text{cotransport})$ would be consistent with a stoichiometry of 1.00 ± 0.11 proton per MI if it is assumed that one half of the protons transported become osmotically visible instead of being simply captured by intracellular buffers. This could happen if the activation of oocyte pH regulatory mechanisms resulted in replacing a fraction of the transported protons by an osmotically active species. For example, a sodium/proton exchanger which is endogenously present in *Xenopus laevis* oocytes (Burckhardt *et al.*, 1992) could be responsible for this phenomenon. Indeed, if the entry of protons mediated by HMIT activates the $\text{Na}^+:\text{H}$ exchanger, some of the recently transported intracellular protons would be replaced by Na^+ and would be detected as active intracellular osmolytes instead of being captured by intracellular buffer. However, no change in swelling rate was observed when amiloride was added (data not shown),

suggesting that a transport mechanism different from the $\text{Na}^+:\text{H}$ exchanger, or some other intracellular chemical reactions could be involved in exchanging protons for osmotically active species.

The hypothesis that entering protons are not completely buffered is supported by the n_{OPC} measured when SGLT1 is used as a proton-driven glucose cotransporter. A stoichiometry of 1.14 ± 0.17 proton per glucose is calculated if protons are assumed to be completely buffered but this stoichiometry would reach 2.6 ± 1.0 if half of the entering protons ends up being osmotically active. Inversely, if the stoichiometry scale of Fig 4B is adjusted to give 2 protons per glucose transported as previously measured for SGLT1 (Quick *et al.*, 2001), the stoichiometry for HMIT would increase to $0.89 \pm 0.11 \text{ H}^+:\text{1 MI}$, which would be in excellent agreement with the value found using the radioactive uptake method.

HMIT acts in a very different manner than do SMIT1 and SMIT2; not only does it use protons and have a much lower affinity for MI (despite the previously published value of $100 \mu\text{M}$ (Uldry *et al.*, 2001), in our hands the K_m for MI was $\sim 6 \text{ mM}$, data not shown), but its 1:1 stoichiometry dictates a lower concentration capacity for a given ionic gradient. Brain is the principal location of HMIT. Mammalian brain cells are typically maintained at a pH about 7.0-7.2 for an external pH of 7.3, so the Nernst potential for protons must be between -10 and -20 mV ; an inward electromotive force of about 50 mV thus exist for protons which could account for an intracellular MI accumulation 10 times the extracellular concentration. The MI concentrations in neurones were reported to be as high as 10 mM for a cerebrospinal fluid concentration of $470 \mu\text{M}$ (Spector & Lorenzo, 1975; Fisher *et al.*, 2002). A possible role of HMIT in maintaining such a MI gradient remains to be established as, at least in oocytes, HMIT requires an acidic extracellular medium to become really active. The recent localization and regulation of HMIT at sites of extracellular medium acidification would satisfy this requirement (Chesler & Kaila, 1992; Uldry *et al.*, 2004).

Volumetric method. The volumetric method used to determine stoichiometry presents a certain number of advantages with respect to other published methods. First, it does not require the use of radioactive labeled substrates, which are not always commercially available. Second, it allows for the detection of all transported and osmotically active species. This could be helpful in distinguishing between ions or solutes that interact with a transporter either without crossing the

membrane or in exchange for another, identical ion (as in the case for Cl in gamma-aminobutyric acid transporters (Loo *et al.*, 2000; Sacher *et al.*, 2002). It can also help in identifying all of the substrates involved in complex cotransporter and exchange mechanisms. Despite these interesting advantages, one caveat must be borne in mind: since the stoichiometry is provided by the inverse of a difference in n_{OPC} 's (see Eq 6), the method is capable of distinguishing between a stoichiometry of 1:1 vs 2:1 (# of charge per substrate transported) but the sensitivity decreases rapidly for stoichiometries of 3:1 and higher (see Fig. 4).

- Hager K, Hazama A, Kwon HM, Loo DD, Handler JS & Wright EM (1995). Kinetics and specificity of the renal Na⁺/myo-inositol cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J Membr Biol* **143**, 103-113.
- Hediger MA, Turk E & Wright EM (1989). Homology of the human intestinal Na⁺/glucose and *Escherichia coli* Na⁺/proline cotransporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5748-5752.
- Howard M, Fischer H, Roux J, Santos BC, Gullans SR, Yancey PH, *et al.* (2003). Mammalian osmolytes and S-nitrosoglutathione promote Delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) protein maturation and function. *J Biol Chem* **278**, 35159-35167.
- Ibsen L & Strange K (1996). In situ localization and osmotic regulation of the Na⁽⁺⁾-myo-inositol cotransporter in rat brain. *Am J Physiol* **271**, F877-885.
- Jennings ML & Adame MF (2001). Direct estimate of 1:1 stoichiometry of K⁽⁺⁾-Cl⁽⁻⁾ cotransport in rabbit erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**, C825-832.
- Kanai Y, Nussberger S, Romero MF, Boron WF, Hebert SC & Hediger MA (1995). Electrogenic properties of the epithelial and neuronal high affinity glutamate transporter. *J Biol Chem* **270**, 16561-16568.
- Klamo EM, Drew ME, Landfear SM & Kavanaugh MP (1996). Kinetics and stoichiometry of a proton/myo-inositol cotransporter. *J Biol Chem* **271**, 14937-14943.
- Kouzuma T, Takahashi M, Endoh T, Kaneko R, Ura N, Shimamoto K, *et al.* (2001). An enzymatic cycling method for the measurement of myo-inositol in biological samples. *Clin Chim Acta* **312**, 143-151.
- Kwon HM, Yamauchi A, Uchida S, Preston AS, Garcia-Perez A, Burg MB, *et al.* (1992). Cloning of the cDNA for a Na⁺/myo-inositol cotransporter, a hypertonicity stress protein. *J Biol Chem* **267**, 6297-6301.
- Lapointe JY, Hudson RL & Schultz SG (1986). Current-voltage relations of sodium-coupled sugar transport across the apical membrane of *Necturus* small intestine. *J Membr Biol* **93**, 205-219.
- Loo DD, Hirayama BA, Meinild AK, Chandy G, Zeuthen T & Wright EM (1999). Passive water and ion transport by cotransporters. *J Physiol* **518 (Pt 1)**, 195-202.
- Loo DDF, Eskandari S, Boorer KJ, Sarkar HK & Wright EM (2000). Role of Cl⁻ in Electrogenic Na⁺-coupled Cotransporters GAT1 and SGLT1. *J. Biol. Chem.* **275**, 37414-37422.
- MacGregor LC & Matschinsky FM (1984). An enzymatic fluorimetric assay for myo-inositol. *Anal Biochem* **141**, 382-389.
- Mackenzie B, Loo DD & Wright EM (1998). Relationships between Na⁺/glucose cotransporter

REFERENCES

- Anthony TL, Brooks HL, Boassa D, Leonov S, Yanochko GM, Regan JW, *et al.* (2000). Cloned human aquaporin-1 is a cyclic GMP-gated ion channel. *Mol Pharmacol* **57**, 576-588.
- Berridge MJ (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**, 315-325.
- Bissonnette P, Noel J, Coady MJ & Lapointe JY (1999). Functional expression of tagged human Na⁺-glucose cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J Physiol* **520**, 359-371.
- Burckhardt BC, Kroll B & Fromter E (1992). Proton transport mechanism in the cell membrane of *Xenopus laevis* oocytes. *Pflugers Arch* **420**, 78-82.
- 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**, 2405-2414.
- Chesler M & Kaila K (1992). Modulation of pH by neuronal activity. *Trends Neurosci* **15**, 396-402.
- Coady MJ, Wallendorff B, Gagnon DG & Lapointe JY (2002). Identification of a novel Na⁺/myo-inositol cotransporter. *J Biol Chem* **277**, 35219-35224.
- Diez-Sampedro A, Eskandari S, Wright EM & Hirayama BA (2001). Na⁺-to-sugar stoichiometry of SGLT3. *Am J Physiol Renal Physiol* **280**, F278-282.
- Dolhofer R & Wieland OH (1987). Enzymatic assay of myo-inositol in serum. *J Clin Chem Clin Biochem* **25**, 733-736.
- 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**, 3796-3801.
- Fisher SK, Novak JE & Agranoff BW (2002). Inositol and higher inositol phosphates in neural tissues: homeostasis, metabolism and functional significance. *J Neurochem* **82**, 736-754.
- Fukuhara Y & Turner RJ (1984). The static head method for determining the charge stoichiometry of coupled transport systems. Applications to the sodium-coupled D-glucose transporters of the renal proximal tubule. *Biochim Biophys Acta* **770**, 73-78.
- Gagnon MP, Bissonnette P, Deslandes LM, Wallendorff B & Lapointe JY (2004). Glucose accumulation can account for the initial water flux triggered by na⁽⁺⁾/glucose cotransport. *Biophys J* **86**, 125-133.
- Gross E & Hopfer U (1996). Activity and stoichiometry of Na⁺:HCO₃⁻ cotransport in immortalized renal proximal tubule cells. *J Membr Biol* **152**, 245-252.

- (SGLT1) currents and fluxes. *J Membr Biol* **162**, 101-106.
- Nakanishi T, Turner RJ & Burg MB (1989). Osmoregulatory changes in myo-inositol transport by renal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 6002-6006.
- Poppe R, Karbach U, Gambaryan S, Wiesinger H, Lutzenburg M, Kraemer M, *et al.* (1997). Expression of the Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT1 in neurons. *J Neurochem* **69**, 84-94.
- Quick M, Loo DDF & Wright EM (2001). Neutralization of a Conserved Amino Acid Residue in the Human Na⁺/Glucose Transporter (hSGLT1) Generates a Glucose-gated H⁺ Channel. *J Biol Chem* **276**, 1728-1734.
- Sacher A, Nelson N, Ogi JT, Wright EM, Loo DD & Eskandari S (2002). Presteady-state and steady-state kinetics and turnover rate of the mouse gamma-aminobutyric acid transporter (mGAT3). *J Membr Biol* **190**, 57-73.
- Saparov SM, Kozono D, Rothe U, Agre P & Pohl P (2001). Water and ion permeation of aquaporin-1 in planar lipid bilayers. Major differences in structural determinants and stoichiometry. *J Biol Chem* **276**, 31515-31520.
- Sasaki S, Ishibashi K, Nagai T & Marumo F (1992). Regulation mechanisms of intracellular pH of *Xenopus laevis* oocyte. *Biochim Biophys Acta* **1137**, 45-51.
- Schmolke M, Bornemann A & Guder WG (1990). Polyol determination along the rat nephron. *Biol Chem Hoppe Seyler* **371**, 909-916.
- Smith-Maxwell C, Bennett E, Randles J & Kimmich GA (1990). Whole cell recording of sugar-induced currents in LLC-PK1 cells. *Am J Physiol* **258**, C234-242.
- Spector R & Lorenzo AV (1975). Myo-inositol transport in the central nervous system. *Am J Physiol* **228**, 1510-1518.
- Trachtman H (1992). Cell volume regulation: a review of cerebral adaptive mechanisms and implications for clinical treatment of osmolal disturbances: II. *Pediatr Nephrol* **6**, 104-112.
- Tsunoda SP, Wiesner B, Lorenz D, Rosenthal W & Pohl P (2004). Aquaporin-1, nothing but a water channel. *J Biol Chem* **279**, 11364-11367.
- Turner RJ & Moran A (1982). Stoichiometric studies of the renal outer cortical brush border membrane D-glucose transporter. *J Membr Biol* **67**, 73-80.
- Uldry M, Ibberson M, Horisberger JD, Chatton JY, Riederer BM & Thorens B (2001). Identification of a mammalian H⁽⁺⁾-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *Embo J* **20**, 4467-4477.

- Uldry M, Steiner P, Zurich MG, Beguin P, Hirling H, Dolci W, *et al.* (2004). Regulated exocytosis of an H(+)/myo-inositol symporter at synapses and growth cones. *Embo J* **23**, 531-540.
- Weiss JN (1997). The Hill equation revisited: uses and misuses. *Faseb J* **11**, 835-841.
- Wiese TJ, Dunlap JA, Conner CE, Grzybowski JA, Lowe WL, Jr. & Yorek MA (1996). Osmotic regulation of Na-myo-inositol cotransporter mRNA level and activity in endothelial and neural cells. *Am J Physiol* **270**, C990-997.
- Yamauchi A, Sugiura T, Ito T, Miyai A, Horio M, Imai E, *et al.* (1996). Na⁺/myo-inositol transport is regulated by basolateral tonicity in Madin-Darby canine kidney cells. *J Clin Invest* **97**, 263-267.
- Yool AJ, Stamer WD & Regan JW (1996). Forskolin stimulation of water and cation permeability in aquaporin 1 water channels. *Science* **273**, 1216-1218.
- Zampighi GA, Kreman M, Boorer KJ, Loo DD, Bezanilla F, Chandy G, *et al.* (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.
- Zhang X & Majerus PW (1998). Phosphatidylinositol signalling reactions. *Semin Cell Dev Biol* **9**, 153-160.
- Zhang XM, Wang XT, Yue H, Leung SW, Thibodeau PH, Thomas PJ, *et al.* (2003). Organic solutes rescue the functional defect in delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* **278**, 51232-51242.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Bernard Thorens for the gift of the rat HMIT clone. The financial support of the Canadian Institutes for Health Research (J.-Y. Lapointe) is gratefully acknowledged.

Chapitre III - Autres observations et analyses

Certaines caractéristiques inédites du canal à eau AQP1 ont été observées dans le cours plus large de la mesure de la stœchiométrie des transporteurs de myo-inositol. Peu pertinents à l'article présenté ci-dessus ni suffisamment élucidés pour faire l'objet d'un autre article, ces résultats n'en sont pas moins intéressants et surprenants. Nous présentons également une analyse alternative des résultats de volume qui est théoriquement viable.

1 AQP1 et les courants

Les premières manifestations de ces caractéristiques survinrent au tout début de l'utilisation de HMIT. Celui-ci étant un cotransporteur fonctionnant avec le gradient de protons et ne transportant presque pas à pH 7,5 (Uldry *et al.* 2001), nous utilisons des conditions acides, le reste de la procédure restant inchangé, c'est-à-dire que nous coexprimons AQP1 avec le transporteur pour augmenter la perméabilité à l'eau de l'ovocyte. Avec ces paramètres, lors de la perfusion avec du substrat, des courants totalement inattendus se produisirent, que l'on peut comparer à la Figure III-1 aux courants générés dans un ovocyte exprimant HMIT seulement. Comme on s'y attend pour un transporteur, le courant augmente rapidement lors de la perfusion avec le substrat, puis il baisse légèrement. Quand on retire le substrat le courant revient progressivement à son niveau de base. Toutefois, lorsque coexprimé avec AQP1, l'arrivée du myo-inositol provoque une diminution temporaire du courant, qui ensuite augmente normalement. De plus, lorsque l'on retire le substrat, un pic de courant survient avant que le courant diminue lentement.

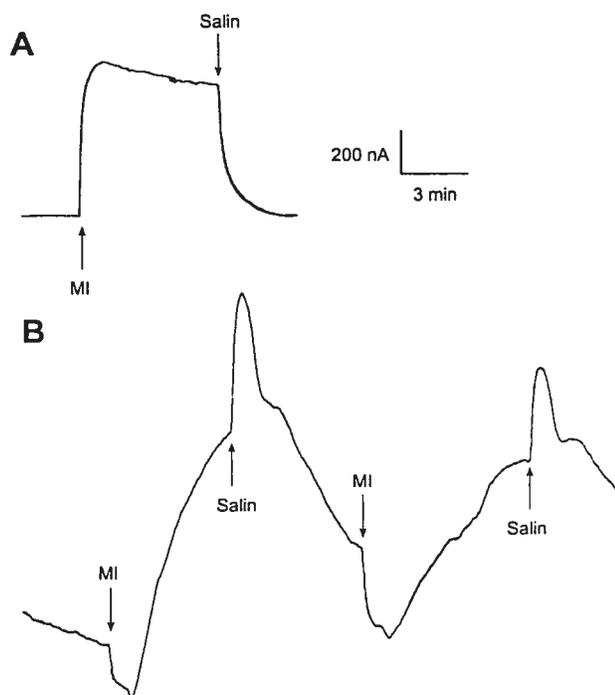


Figure III-1 Courants générés par le myo-inositol avec HMIT à pH 5,5
 A. Avec HMIT exprimé seulement; B. Coexprimé avec AQP1.

Après plusieurs essais avec des ovocytes exprimant HMIT (n=5) et des ovocytes exprimant HMIT et AQP1 (n=5), nous envisageâmes que le problème soit relié à l'aquaporine. Notre surprise fut au comble lorsque le même type de courant fut observé avec des ovocytes exprimant AQP1 seulement, sans que les ovocytes non injectés réagissent (n=5) (Figure III-2). Nous avons investigué ce problème plus en détail et avons observé que des courants du même genre pouvaient être induits par l'addition de certains substrats. De plus, cet effet est provoqué par le D-glucose mais pas par le L-glucose, et par le L-fucose mais pas par le D-fucose, présentant donc une certaine stéréospécificité. Des courants engendrés par divers substrats sont présentés à la Figure III-2 et les courbes courant-voltage correspondantes à la Figure III-3, mesurées après l'application du substrat. Une certaine désensibilisation semble aussi avoir lieu (Figure III-3E).

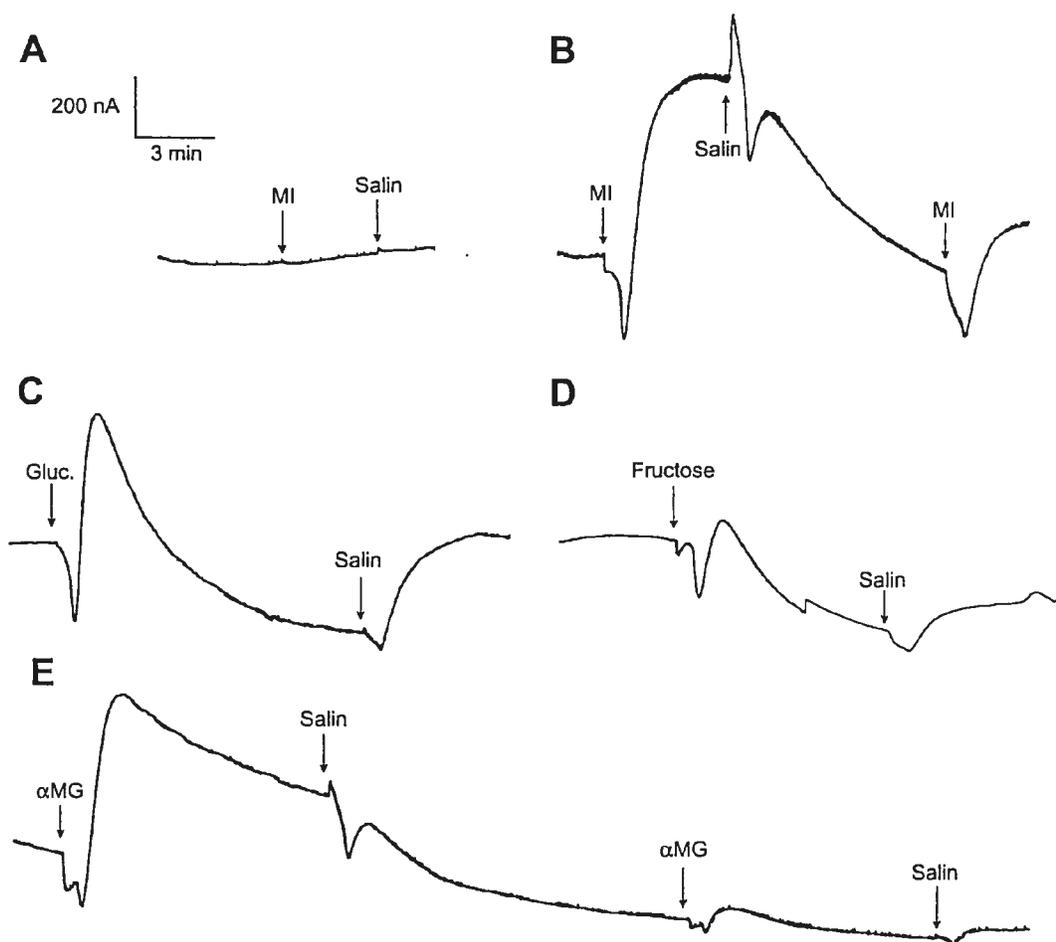


Figure III-2 Courants générés par la présence de divers substrats à pH 6,0

A. Ovocyte non injecté, [MI]=10 mM; Ovocytes injectés avec AQP1 seulement auxquels on présente (B) 10 mM myo-inositol; (C) 1 mM D-glucose; (D) 1 mM fructose ou (E) 1 mM α MG.

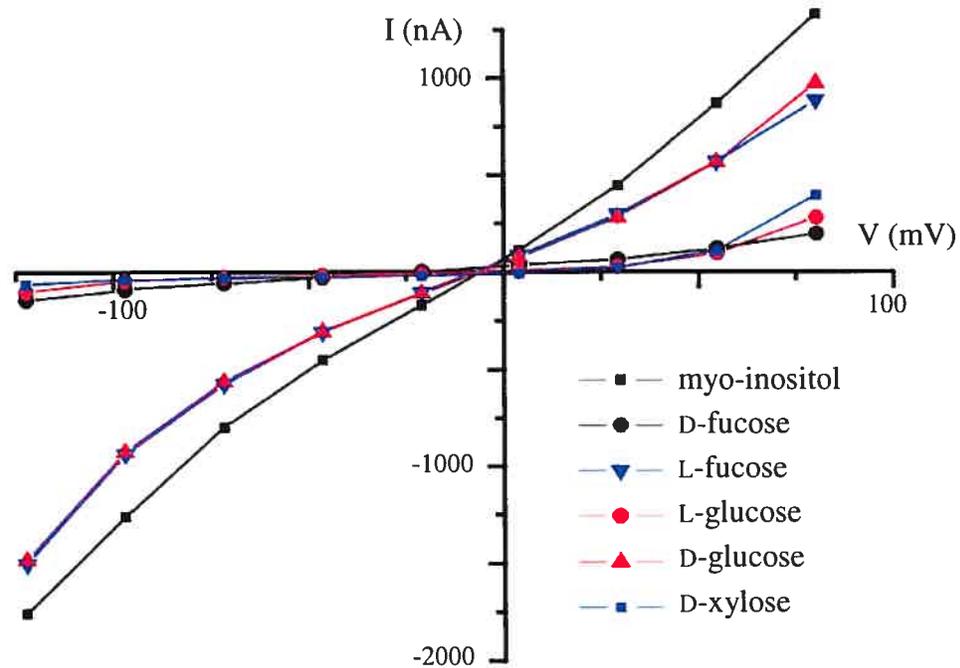


Figure III-3 Courbes I-V sous divers substrats en présence d'AQP1.

Les courbes montrées sont les différences entre les valeurs mesurées en présence de substrat et les mesures en salin.

Dans l'optique de déterminer la nature de ces courants, nous avons examiné l'effet du sodium, toujours à pH acide (Figure III-4). On constate que lorsqu'on enlève le Na^+ , le courant de base (entrant) diminue beaucoup et même s'inverse. De plus, sans sodium, le MI ne fait plus aucun effet ni sur le courant à -50 mV ni sur la forme de la courbe I-V sur toute la gamme de potentiels. Nous n'avons malheureusement pas l'effet de 0 Na sur les ovocytes non injectés, mais il reste que cet ion est fort probablement impliqué dans le courant inattendu.

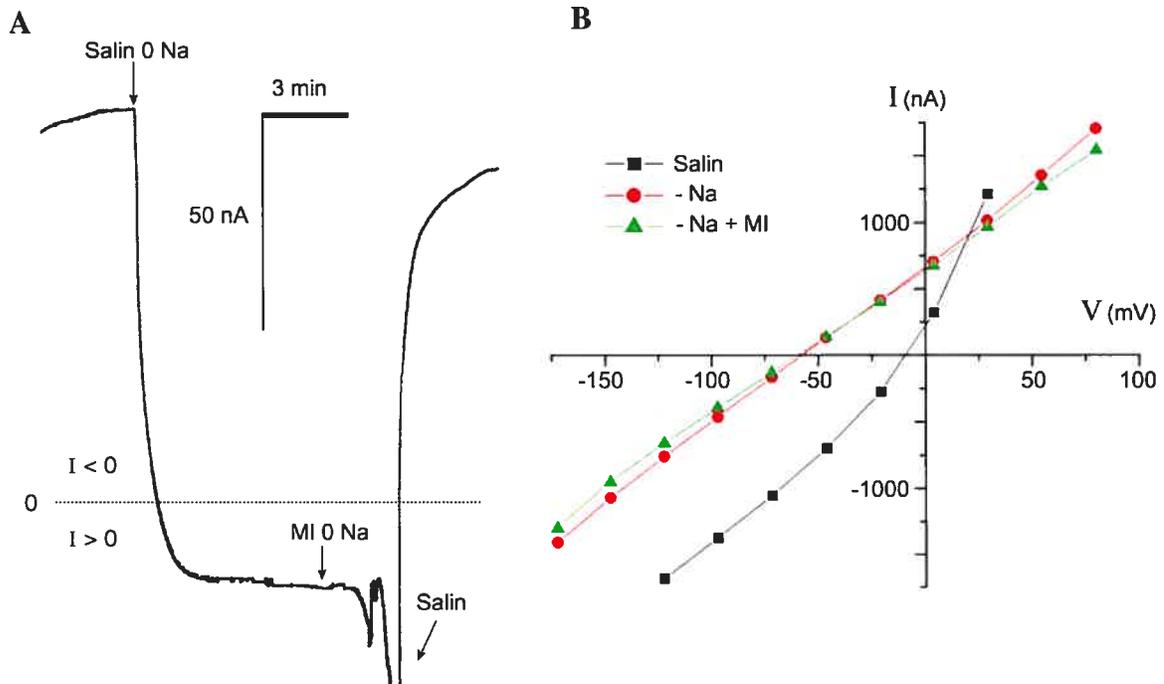


Figure III-4 Effet du sodium sur les courants en présence d'aquaporine.

A. Courant de base à -50 mV avec et sans sodium et addition de MI sans sodium. B. Courbes I-V correspondantes.

Une revue de la littérature a révélé que l'activité de AQP1 comme canal ionique à ouverture contrôlée par le guanosine monophosphate cyclique (cGMP) a été proposée par Andrea Yool (Yool *et al.* 1996; Yool et Weinstein 2002; Boassa et Yool 2003), mais aussi contestée (Agre *et al.* 1997; Deen *et al.* 1997; Verkman et Yang 1997; Tsunoda *et al.* 2004). Malgré la polémique entre les tenants et les détracteurs du passage d'ions à travers AQP1, aucune assertion d'une quelconque sensibilité au pH n'a été faite à notre connaissance. Dans le but d'explorer ces phénomènes nouveaux, suivant les résultats de Yool *et al.*, nous entreprîmes d'activer indirectement AQP1 par la nitroprussite de sodium, qui en principe fait augmenter le cGMP interne, ainsi que directement avec un isoforme perméable du cGMP (*8-bromocyclic GMP*), dans l'intention de varier ensuite le pH; cependant, aucune de ces manipulations ne révéla une perméabilité ionique d'AQP1. Nos résultats restent donc à ce jour inexplicables et dérangeants et nous obligèrent aussi à nous tourner vers l'isoforme AQP2 pour compléter la mesure de la stœchiométrie de HMIT.

2 Analyse par le gonflement total

La base théorique justifiant le couplement du volume et du courant lors du transport pourrait s'appliquer différemment dans l'analyse des données recueillies. En effet, au lieu de mesurer un taux de gonflement et de le comparer à un taux de passage de charges (courant), il serait possible de mesurer une augmentation totale du volume d'un ovocyte et de la comparer au total des charges entrées, ce qui est équivalent (voir Figure III-5A). Cela tiendrait même compte des variations dans le courant de transport. Cependant, les sauts spontanés pouvant survenir dans la mesure du volume (Figure III-5B) rendent cette mesure moins fiable. De plus, un seul saut dans une expérience peut suffire à la faire rejeter, alors qu'il est possible de mesurer le gonflement ailleurs qu'en un tel point. Les résultats de stœchiométrie utilisant cette ligne de pensée sont d'ailleurs plus ou moins probants; si l'on obtient pour SGLT1 et HMIT des stœchiométries de respectivement $1,83 \pm 0,19$ et $0,69 \pm 0,04$ (comparativement à $1,78 \pm 0,27$ et $0,67 \pm 0,05$ par la méthode choisie), on obtient pour SMIT2 $3,35 \pm 0,37$, illustrant bien que l'analyse par comparaison des taux d'entrée de charges et d'eau est préférable.

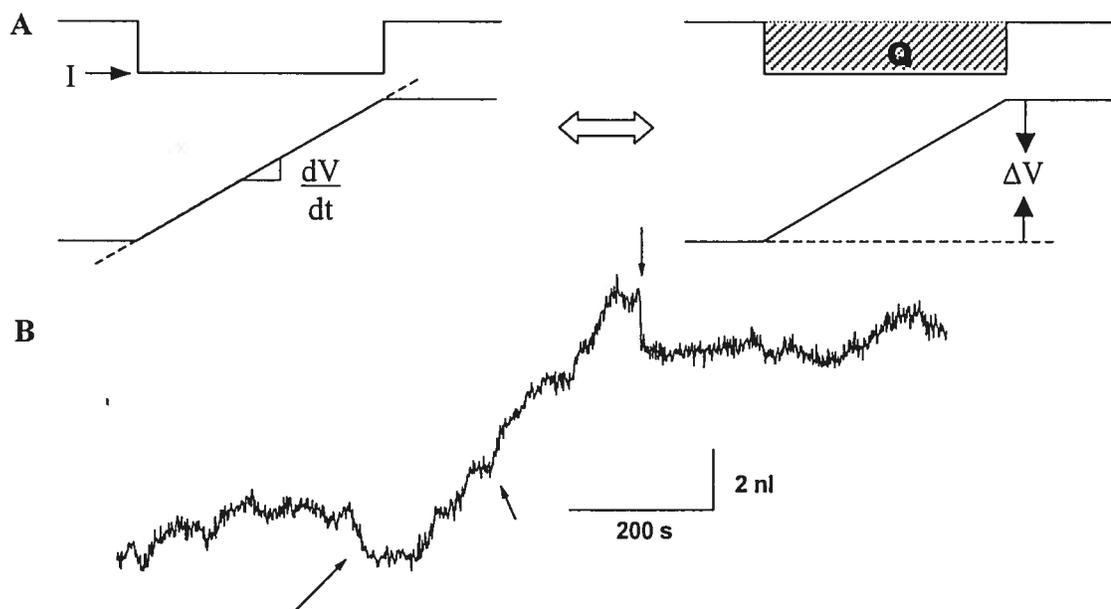


Figure III-5 Comparaison des analyses possibles des mesures de volume.

A. Schématisation d'une expérience volumétrique. B. Exemple de mesure qui ne peut être utilisée selon la seconde analyse.

Chapitre IV - Discussion

1 La stœchiométrie établie

Nous avons mesuré, par deux méthodes distinctes dont l'une est novatrice, la stœchiométrie des cotransporteurs de myo-inositol SMIT2 et HMIT. La mesure de ce paramètre pour SGLT1, valeur antérieurement établie, nous a permis de confirmer la validité de nos méthodes. Nous pouvons donc avancer en toute confiance le couplage de 2 ions sodium et 1 molécule de myo-inositol transportés par SMIT2, en accord aussi avec le nombre de Hill de 1,4 (Coady *et al.* 2002) qui suggérait une stœchiométrie plus élevée que 1:1. Pour HMIT, la proportion H^+ :MI est 1:1; cependant, la méthode volumétrique donne un résultat moins élevé (0,67 proton par MI transporté), ce qui pourrait suggérer en fait une stœchiométrie de 2 H^+ :3 MI. Une telle valeur apparaît cependant trop basse pour être physiologiquement utile, à cause du faible pouvoir de concentration qu'elle permet. Aussi, comme mentionné dans l'article, il est facilement concevable que le cotransport par proton ne soit pas aussi facilement analysable que dans le cas d'autres cations. En effet, il suffirait qu'une moitié des protons qui entrent ne soient pas liés aux tampons internes pour que nous retrouvions exactement la valeur de 1:1, ce que confirme la mesure du cotransport par SGLT1 activé par les protons. La possibilité qu'existent des mécanismes affectant les protons après leur entrée sera discutée plus loin. Aussi, le seul autre cotransporteur protons/myo-inositol de stœchiométrie connue et identique à 32 % à HMIT (MIT) a une stœchiométrie de 1:1.

La spécificité de fonction de SMIT2 ne peut être discriminée par rapport à celle de SMIT1 sur la base de la nouvelle valeur établie pour sa stœchiométrie, ce dernier ayant la même. Outre certaines différences de sélectivité aux substrats (notamment le D-glucose, le L-fucose et le D-chiro-inositol), les activités de SMIT1 et de SMIT2 diffèrent peu. On peut donc poser l'hypothèse que la nécessité de deux mécanismes de transport différents relève de leur distribution subcellulaire et de leur régulation respective, bien que l'expression des deux soit haussée par la tonicité et que les deux soient présents à la membrane apicale (Ibsen et Strange 1996; Yamauchi *et al.* 1996;

Bissonnette *et al.* 2004). La présence de HMIT est, quant à elle, clairement liée à sa capacité d'utiliser le gradient de pH pour le passage de MI. En fait, étant donné l'affinité de ce transporteur pour le MI que nous avons réévaluée à $\sim 6\text{mM}$ (malgré une valeur publiée de $100\ \mu\text{M}$, Uldry *et al.* 2001) et la concentration en MI du fluide cérébro-spinal qui est en dessous du mM (Spector et Lorenzo 1975; Fisher *et al.* 2002), on peut supposer que son transport dans les neurones reste toujours dans la partie linéaire selon le MI et que la régulation de l'influx ne se fait pas par une modulation du K_m . Étant donné les changements de pH qui peuvent survenir dans le cerveau par l'activité neuronale (Chesler et Kaila 1992) et la régulation de l'exocytose de HMIT par la dépolarisation (Uldry *et al.* 2004), c'est beaucoup plus l'activité qui stimulera le transport de MI, surtout en conditions acides où l'on sait que SMIT1 est inhibé (Matskevitch *et al.* 1998). La conclusion de Uldry à ce sujet est d'ailleurs que

« ... as inositol metabolism and production of phosphoinositides is required for the control of vesicle endo- and exocytosis, microfilament dynamics, ion channel regulation and signal transduction, the regulated surface expression of HMIT may represent an important control step in these mechanisms. » (Uldry *et al.* 2004)

2 Méthodes pour évaluer la stœchiométrie

Il existe bien sûr d'autres méthodes pour évaluer la stœchiométrie que celles utilisées ici. Certaines sont moins valides, d'autres ne peuvent s'appliquer à tout transporteur; nous en discuterons, comme des avantages et inconvénients de celles que nous avons choisi d'utiliser.

2.1 Voies sans issue

Comme il est mentionné au passage dans l'introduction, la coopérativité indiquée par le nombre de Hill a été et est encore parfois considérée par certains comme une mesure de la stœchiométrie, et son sens exact n'est que rarement bien compris; or, l'adéquation entre le nombre de Hill et la stœchiométrie n'est vraie que sous certaines conditions limites. Nous nous rapportons ici à Weiss (1997), qui montre que, par exemple dans le cas de deux molécules d'un substrat se liant à une enzyme, la

coopérativité ne révélera la stœchiométrie de 2 que si la liaison de la première confère une affinité beaucoup plus grande pour la seconde. Autrement, le nombre de Hill ne constitue qu'une limite inférieure au nombre de molécules impliquées. C'est ce qu'on constate par exemple pour l'hémoglobine, qui lie quatre molécules d'oxygène mais montre un nombre de Hill entre 2,5 et 3 (Roughton *et al.* 1955; Tyuma *et al.* 1971). Une totale non-coopérativité aurait montré dans ce cas un nombre de Hill de 1, alors qu'une coopérativité très élevée aurait montré la stœchiométrie de 4. Une interprétation similaire de la signification du nombre de Hill apparent dans le cas des systèmes de transport est faite par Falk *et al.* (1998) et Berteloot (2003), en plus de montrer que la valeur de ce paramètre peut dépendre de la concentration du substrat et de l'ordre de liaison. Comme mentionné plus haut, cette approche avait déjà été utilisée avec SMIT2, avec pour résultat $n_H=1,4$, compatible avec une stœchiométrie de 2:1.

Il est aussi possible d'utiliser la mesure du potentiel d'inversion du transporteur pour trouver la stœchiométrie par une interprétation thermodynamique; c'est la stratégie utilisée par Chen *et al.* (1995). Le principe est le même que celui utilisé pour calculer la capacité de concentration (Équation 4, p. 8), sauf qu'au lieu de calculer un rapport de concentration avec une différence de potentiel connue, on relie par la stœchiométrie ce rapport avec la différence de potentiel nécessaire pour être à l'équilibre (i.e. aucun courant net). On arrive à une équation du potentiel d'inversion qui dépend de la stœchiométrie de la façon suivante (en ne considérant pas de *leak*) :

$$V_r = \frac{RT}{nF} \ln \frac{[S]_o [X^+]_i^p}{[S]_i [X^+]_o^p} \quad (9)$$

On peut donc en tirer une relation linéaire entre le potentiel d'inversion V_r et la concentration de substrat sur une échelle logarithmique. La Figure IV-1 présente cette analyse pour SGLT1 et pour SMIT2. La déviation de la linéarité pour SGLT1 provient du courant de *leak* à faible substrat et a été prise en compte dans le calcul de la stœchiométrie par l'introduction d'une nouvelle constante K_c , soit la concentration où le courant de *leak* est de même grandeur que le courant de cotransport. Cette méthode requiert toutefois une mesure valide des potentiels d'inversion. Comme on peut le

constater, les potentiels d'inversion pour SMIT2 ne sont pas bien définis et donnent des valeurs ne convergeant pas vers une valeur explicite de stœchiométrie. Même en préinjectant les ovocytes avec du myo-inositol pour ramener le potentiel d'inversion vers des valeurs plus négatives, les résultats ne sont pas concluants, exigeant l'approche par une autre méthode.

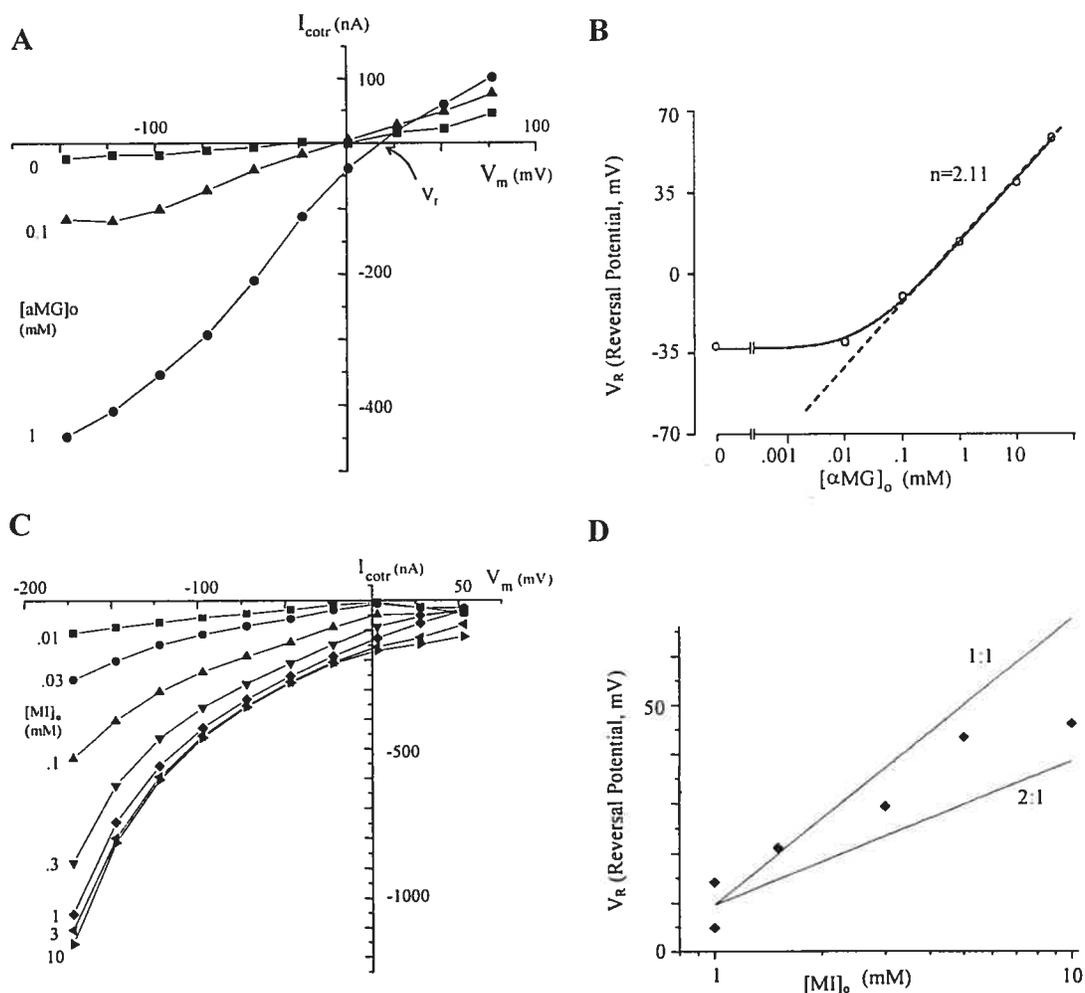


Figure IV-1 Détermination de la stœchiométrie par potentiels d'inversion.

Les courants de cotransport sont obtenus par la soustraction des courants en phlorizine (inhibiteur) des courants totaux pour diverses concentrations de substrat pour (A) SGLT1 et (C) SMIT2. En sont tirées des valeurs qui devraient permettre de trouver la stœchiométrie de SGLT1 et SMIT2 (B et D, respectivement). Adapté de Chen *et al.* 1995 et de résultats non publiés.

Ces mêmes considérations d'équilibre peuvent être utilisées pour connaître la stœchiométrie en trouvant un rapport des concentrations des deux espèces impliquées tel

qu'aucun transport n'a lieu; c'est la méthode dite de « *static head* » (Turner et Moran 1982c; Fukuhara et Turner 1984). Ces mesures se font par mesure radioactive sur vésicules; comme le potentiel ne peut être contrôlé, la membrane est électriquement court-circuitée par de la valinomycine et une grande concentration de potassium des deux côtés, fixant le voltage à zéro. Nos transporteurs fonctionnent toutefois beaucoup moins bien sans différence de potentiel, et il serait de plus difficile d'obtenir des préparations membranaires qui expriment un haut niveau de SMIT2 ou de HMIT par rapport aux autres mécanismes de transport endogènes qui pourraient être présents, alors que nous disposons d'un système d'expression hétérologue qui se prête facilement à l'électrophysiologie. Cette méthode ne fut donc pas retenue non plus.

2.2 Le transport de substrat radioactif : avantages et inconvénients

Une autre approche expérimentale intéressante pour déterminer le passage des substrats effectué par un transporteur est la mesure de l'influx de marqueurs radioactifs. L'une des substances dont on veut quantifier le passage comporte une proportion contenant un isotope qui permet de connaître directement le nombre de molécules qui ont pénétré dans la cellule. Cette méthode semble directe et sans aléas, mais elle requiert certaines connaissances préalables, connaît quelques limites et appelle à des attentions particulières. Il est en effet préférable de connaître la nature de tous les substrats d'un cotransporteur donné, car on voudra obtenir un marqueur radioactif pour chacun si possible. Quant à identifier ceux-ci de cette manière, c'est simplement irréalisable. De plus, l'usage de substances radioactives comporte toujours un certain risque; si celui-ci est réductible à un seuil acceptable selon la ligne de conduite ALARA (*As Low As Reasonably Achievable*) prônée par le Comité de radioprotection de l'Université de Montréal, il n'en reste pas moins que cette procédure exige un manipulateur et un laboratoire dotés des permis adéquats. De plus, si l'on souhaite faire une expérience simultanée avec mesure du courant, un montage d'électrophysiologie doit être dédié aux substances radioactives. Il est aussi important de tenir compte, dans ce type d'expériences, du possible efflux de substrat. En effet, après un certain temps de transport, l'équilibre (dynamique) est approché, cas où autant de substrat ressort qu'il en

entre. L'efflux de substrat ne se fait alors pas nécessairement dans la même proportion de substrat marqué ni selon la stoechiométrie. Cet état d'approche de l'équilibre se traduit par une déviation de la linéarité vers le bas du transport total selon le temps, et l'on doit éviter cet écueil en travaillant avec des temps moins longs que le « temps de linéarité ».

Appliquée à la mesure de la stoechiométrie, cette méthode fut initialement décrite par Kanai *et al.* (1994). Ils rapportent l'échec de la comparaison directe de l'*uptake* de ^{22}Na et de $[^{14}\text{C}]\alpha\text{MG}$ dans des ovocytes dû à un trop faible rapport signal/bruit pour la mesure de sodium et initient la voie qui consiste à comparer le courant dépendant du substrat avec l'influx de substrat marqué, voie qui sera ensuite utilisée à la comparaison du courant avec l'influx de ^{22}Na (Klamo *et al.* 1996; Mackenzie *et al.* 1998; Diez-Sampedro *et al.* 2001). Kanai *et al.* utilisaient le même ovocyte pour d'abord faire une mesure de taux de transport initial de substrat marqué pour ensuite mesurer, en maintenant le potentiel à celui de repos, le courant de transport. Cette manière de faire induit une erreur, étant donné la présence de substrat interne rendue plus élevée à la deuxième partie. Malgré cette lacune, elle a tout de même fonctionné, présumément à cause du très faible transport (<1 nA). L'électrophysiologie est maintenant effectuée simultanément au transport radioactif, tenant compte de la variabilité du transport dans le temps et des différences entre les ovocytes individuels (Mackenzie *et al.* 1998), au lieu de moyenner sur plusieurs ovocytes des mesures indépendantes d'influx et de courant.

3 Notre nouvelle méthode

3.1 Le pour...

Évaluer la stoechiométrie d'un transport couplé par la mesure de l'entrée d'osmolytes présente des avantages originaux par rapport aux autres méthodes. En effet, cette façon de faire permet de distinguer tout déplacement net d'osmolyte, même si l'on ne soupçonnait pas son implication dans le transport. Par exemple, deux ions de charges opposées traversant la membrane dans le même sens ne pourraient être détectés par

électrophysiologie (sauf par une méthode thermodynamique qui requiert de varier leurs concentrations, donc d'envisager à la base l'implication de ceux-ci). Même constat pour la mesure d'influx de substrat marqué; il faut vouloir en tester spécifiquement le passage, donc connaître son implication possible. Il n'y a là nulle place pour l'observation « fortuite » d'un autre substrat impliqué. Notre méthode permet donc d'accéder à une donnée complémentaire précieuse quant au nombre de substrats que l'on cherche. De la même manière, elle permettrait facilement de distinguer un canal activé par un substrat d'un cotransporteur (Diez-Sampedro *et al.* 2003), le nombre d'osmolytes par charge différant beaucoup entre l'un et l'autre.

À titre d'exemple, notre équipe envisage d'utiliser cette méthode pour éclaircir les données relatives aux substrats impliqués dans l'activité du transporteur de monocarboxylates SMCT, récemment identifié comme tel (Coady *et al.* 2004; Miyauchi *et al.* 2004). La stœchiométrie suggérée par le premier groupe est de 3:1 pour le propionate comme pour le lactate, tandis que celle rapportée par le second est de 4 Na⁺ pour 1 propionate mais 2:1 pour le lactate (Gopal *et al.* 2004). Ces substrats étant chargés négativement, un cycle de transport à une stœchiométrie de x:1 correspond à l'entrée de x+1 osmolytes mais de x-1 charges. En formalisant de la même manière que dans l'article mais en considérant la charge du substrat, l'équation (5) devient

$$n_{OPC}(\text{cotransport}) = \frac{x}{x-1} + \frac{1}{x-1} - OA_e \quad (10)$$

que l'on peut résoudre pour x avec l'équation (4) de l'article,

$$n_{OPC}(K^+ \text{ influx}) = 1 - OA_e \quad (4^*)$$

donnant

$$x = \frac{n_{OPC}(\text{cotransport}) - n_{OPC}(K^+ \text{ influx}) + 2}{n_{OPC}(\text{cotransport}) - n_{OPC}(K^+ \text{ influx})} \quad (11)$$

Avec $n_{OPC}(K^+ \text{ influx}) = 0,46$, on peut s'attendre à une mesure du nombre net d'osmolytes par charge de 2,46, 1,46 ou 1,13 selon que la stœchiométrie est de 2:1, 3:1 ou 4:1 respectivement.

3.2 ...Et le contre

Il faut toutefois garder certaines restrictions en tête avec cette façon de déterminer la stœchiométrie. Premièrement, une attention particulière doit être accordée à la propagation des erreurs. En effet, avec une stœchiométrie déterminée par une équation du type $1/(a-b)$, l'incertitude dans la mesure de a et b n'entraîne pas une incertitude symétrique sur la valeur finale, i.e. la valeur $(a-b) \pm x$ ne donne pas une stœchiométrie avec une erreur $\pm y$; il serait donc inadéquat d'utiliser directement

$$\sigma_s^2 = \sum \left(\frac{\partial S}{\partial x_i} \sigma_{x_i}^2 \right)$$

et nous avons donc procédé en trouvant les valeurs extrêmes atteintes par une déviation dans chaque direction de l'erreur sur $a-b$, c'est-à-dire que $S - \Delta S_- = \frac{1}{(a-b)+x}$ et $S + \Delta S_+ = \frac{1}{(a-b)-x}$, donnant des valeurs différentes pour ΔS_- et ΔS_+ , avec $\Delta S_- < \Delta S_+$.

Un corollaire de cette asymétrie est la limite de sensibilité de cette méthode pour discriminer entre les diverses stœchiométries. En effet, comme on le voit à la Figure 4 de l'article, la différence d'osmolytes par charge entre deux stœchiométries s'amenuise à mesure que ces dernières augmentent, permettant de distinguer entre des rapports de 1:1 et 2:1 et possiblement de 2:1 et 3:1, mais certainement pas au-delà; comme on peut le voir dans l'exemple ci-dessus, des stœchiométries de 2:1 et 3:1 seraient séparées de 1 osmolyte par charge, mais 3:1 et 4:1 le seraient de seulement de 0,33. Cet exemple s'applique dans le cas d'un substrat neutre; le seuil de sensibilité dépend de l'équation exacte.

Cette méthode repose également grandement sur l'hypothèse que le sodium qui entre provoque les mêmes effets osmotiques que le potassium, utilisé pour la calibration. Pour le comportement des électrodes, plusieurs centaines de microns plus loin, seule la charge est visible et cette hypothèse semble très plausible. Les deux espèces doivent aussi, pour provoquer le même effet, générer le même nombre d'osmolytes, c'est-à-dire

ne pas être chélatés ou concentrés différemment, ce qui semble aussi le cas tel qu'indiqué par la confirmation avec SGLT1. Idéalement, pour se passer complètement de cette hypothèse, il faudrait toutefois mesurer l'effet osmotique d'un influx sodium avec un canal à sodium.

Par contre, pour les protons, l'hypothèse utilisée à la base est l'invisibilité osmotique des protons due à leur capture par les tampons intracellulaires de l'ovocyte. Or, avec cette hypothèse, on obtient une stœchiométrie de $0,67 \text{ H}^+$ par MI. Si l'on croit la valeur de 1:1 obtenue par la mesure d'influx de substrat marqué, cela voudrait donc dire qu'en fait la moitié des protons entrés sont visibles d'une manière ou d'une autre. Un candidat possible à cet effet serait un échangeur sodium-proton (NHE), présent dans l'ovocyte de *Xenopus* (Burckhardt *et al.* 1992). Si des protons sont sortis de la cellule en échange d'ions Na^+ , ceux-ci seront visibles en tant qu'osmolytes. La mesure de volume n'a cependant montré aucune différence lors de la présence d'amiloride, un inhibiteur de NHE; cette hypothèse a donc dû être rejetée.

Indépendamment du mécanisme impliqué, une évaluation globale de l'effet osmotique d'une entrée de protons est aussi souhaitable, mais requiert un canal ionique sélectif au H^+ . L'utilisation à cet effet d'un ionophore tel que le FCCP pourrait être envisagée, mais ce genre d'ionophore est utilisé pour court-circuiter la membrane mitochondriale et s'y rend en quelques secondes, laissant supposer une mort rapide de l'ovocyte. Quant aux protéines découplantes mitochondriales, elles ne s'expriment bien sûr pas à la membrane cellulaire (Klaus *et al.* 1990). Ces problèmes peuvent toutefois être contournés par la mesure du nombre d'osmolytes par charge lors d'un gonflement induit par un cotransporteur utilisant l'entrée de protons, à condition que sa stœchiométrie soit connue, comme pour SGLT1 (Quick *et al.* 2001). En fait, au-delà de considérer cette mesure comme une confirmation de la sous-estimation de la stœchiométrie de HMIT, on peut s'en servir pour l'étalonnage pour les cotransporteurs à protons en général. En effet, l'équation (4) de l'article peut être adaptée en

$$n_{OPC}(SGLT1(H^+)) = fv + 0,5 - OA_e, \quad (12)$$

où f_v est la fraction des charges visibles et 0,5 le nombre d'osmolytes dus au α MG puisque la stœchiométrie est de 2:1. Avec un transporteur de 1 H^+ pour x substrat neutre, on aura

$$n_{OPC}(\text{cotransport}(H^+)) = f_v + x - OA_e \quad (13)$$

d'où

$$S = \frac{1}{x} = \frac{1}{n_{OPC}(\text{cotransport}(H^+)) - n_{OPC}(\text{SGLT1}(H^+)) + 0,5} \quad (14)$$

et nous avons ainsi une mesure qui nous permet d'établir la stœchiométrie d'un cotransporteur à protons selon ce que l'on obtient avec SGLT1 en absence de sodium, indépendamment de ce qui se passe avec les protons dans l'ovocyte. Les équations (12) et (4*) avec les mesures correspondantes nous permettent de déterminer la fraction des protons qui sont visibles, soit ~38 %.

Une autre limite de cette méthode provient des courants de fuite (*leak currents*) propres à certains transporteurs. Pour ceux que nous avons examinés ici, ces courants étaient faibles et surtout remplacés par le courant de cotransport lors de la perfusion avec un substrat, ce qui n'entraînait qu'une faible erreur sur le courant initial et le dV_0/dt associé. De plus, en utilisant un inhibiteur avant et après la présence de substrat, on pourrait éliminer complètement cette source d'erreur en bloquant le *leak*. Cependant, certains transporteurs exhibent un caractère de canal ionique ouvert par le substrat en plus de leur transport couplé, comme les *excitatory amino acid carriers (EAAC)* (Sonders et Amara 1996; Fairman et Amara 1999). Dans de tels cas, la stœchiométrie ne peut être déterminée par la mesure d'entrée d'osmolytes car elle requiert un couplage fort. Il est bien entendu que la mesure précise d'une stœchiométrie implique la supposition d'un mécanisme de cotransport bien couplé. La présence d'un *leak* est en fait l'aveu d'un certain découplage et il est clair que la présence d'un *leak* va conduire à une mauvaise estimation du rapport de couplage entre les différents substrats.

Conclusions

Dans un premier temps, cette étude a permis de confirmer la validité d'une nouvelle méthode pour déterminer la stœchiométrie de transport de cotransporteurs, à condition que le transport des différents substrats soit bien couplé et que le transport net soit électrogénique. Cette méthode passe par l'expression du transporteur dans des ovocytes de *Xenopus* et par la mesure simultanée du courant de transport et du volume de l'ovocyte, fournissant des données sur le nombre net d'osmolytes entrés. Elle repose sur un passage rapide d'eau avec les osmolytes, assuré par la coexpression d'aquaporine.

Cette manière de déterminer la stœchiométrie constitue une vision complémentaire de ce champ d'expérimentation, car elle mesure des éléments différents des autres méthodes. Elle procure ainsi un autre élément d'analyse pour déterminer le fonctionnement des transporteurs et permet aussi de détecter des substrats qui pourraient passer inaperçus autrement.

Plus le nombre d'osmolytes net par charge est grand, plus la méthode est sensible; elle atteint par ailleurs sa limite à plus grande stœchiométrie (quand plusieurs charges passent pour peu d'autres substrats). Sa validité a été confirmée par la mesure de la stœchiométrie de SGLT1, aussi bien avec le Na^+ qu'avec les protons, mais aussi par la comparaison avec la méthode plus classique de mesure d'influx de substrat radioactif.

Cette méthode a un avenir prometteur. Elle est maintenant en utilisation pour déterminer la stœchiométrie de SMCT, et cela pour plusieurs substrats, certains cotransportés et d'autres entrant seuls. Elle est également utilisée pour caractériser l'efflux (couplé ou non) et l'effet de certains inhibiteurs. Utilisant un équipement relativement facile d'accès, elle pourrait facilement faire partie de la trousse de base pour la détermination des caractéristiques de transporteurs en ovocytes.

Ce projet apporte de plus un élément supplémentaire à la compréhension des mécanismes d'absorption du MI. Nous avons déterminé la stœchiométrie de transport des cotransporteurs de myo-inositol SMIT2 et HMIT : SMIT2 fonctionne avec une stœchiométrie de deux ions sodium pour une molécule de MI, tel que supposé pour

SMIT1 selon la coopérativité mesurée. L'existence de ces deux cotransporteurs différents dans les mêmes organes ne se justifie donc pas par leur stœchiométrie. En conséquence, il faut se tourner vers l'affinité, la vitesse de transport, la régulation et la localisation subcellulaire pour établir leurs fonctions respectives. Par exemple, lors de l'imposition de conditions hyperosmotiques, le transport de MI par SMIT2 est quintuplé, mais sa présence à la membrane n'est augmentée que de 70 %, ne justifiant pas la hausse de transport à elle seule et laissant donc supposer une régulation post-transcriptionnelle (Bissonnette *et al.* 2004). Quant à HMIT, il couple à 1:1 le passage des protons et du MI, donc avec une capacité de concentration du MI beaucoup plus faible; toutefois, l'activité neuronale même peut engendrer une acidification du milieu extracellulaire (Chesler et Kaila 1992) et donc augmenter l'entrée de MI. Ce fait peut être corrélé à l'exocytose synaptique du transporteur à la membrane lors de cette même activité (Uldry *et al.* 2004), suggérant qu'elle requiert un apport de MI pour avoir lieu ou qu'elle suscite le remplacement du myo-inositol utilisé comme messager secondaire. La spécificité d'un anticorps primaire pour SMIT2 est présentement à l'essai, et permettrait d'obtenir et de confirmer des informations sur sa distribution subcellulaire et tissulaire. Des équipes explorent aussi l'utilisation possible du MI pour le « sauvetage » de protéines membranaires ayant une mutation les empêchant de se rendre à la membrane.

D'autres voies d'exploration se sont aussi ouvertes durant cette recherche, notamment au sujet de l'aquaporine. Ce canal à eau, réputé pour son imperméabilité aux ions et surtout aux protons, génère soudainement, en conditions acides, des courants en réaction à la présence de sucres divers; voilà qui est pour le moins étrange et mériterait d'être exploré plus en profondeur. Il serait possible, par exemple, d'examiner quels résidus sont susceptibles d'être changés par le pH pour ensuite les remplacer par mutagenèse dirigée, ou encore de bloquer le canal par du mercure pour voir si l'effet persiste. Il serait également opportun d'examiner les substrats provoquant ou non un courant pour trouver un *pattern* éventuel, décrivant la « forme » du site de « liaison »; bref, un tout autre projet.

Bibliographie

- Agre P, Lee MD, Devidas S, Guggino WB. 1997. Aquaporins and ion conductance. *Science* 275(5305):1490; author reply 1492.
- Allery CH. 2004. How Things Get In/Out of Cells. <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/memb/membranes.htm>.
- Andersen GO, Skomedal T, Enger M, Fidjeland A, Brattelid T, Levy FO, Osnes J-B. 2004. α 1-AR-mediated activation of NKCC in rat cardiomyocytes involves ERK-dependent phosphorylation of the cotransporter. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286(4):H1354-1360.
- Armstrong CM, Bezanilla F. 1973. Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature* 242(5398):459-61.
- Back JF, Oakenfull D, Smith MB. 1979. Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. *Biochemistry* 18(23):5191-6.
- Beckett D. 2001. Regulated assembly of transcription factors and control of transcription initiation. *J Mol Biol* 314(3):335-352.
- Belmaker RH, Bersudsky Y, Agam G, Levine J, Kofman O. 1996. How does lithium work on manic depression? Clinical and psychological correlates of the inositol theory. *Annual Review Of Medicine* 47:47-56.
- Bernier V, Lagace M, Bichet DG, Bouvier M. 2004. Pharmacological chaperones: potential treatment for conformational diseases. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 15(5):222-228.
- Berridge MJ. 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361(6410):315-25.
- Berridge MJ, Downes CP, Hanley MR. 1989. Neural and developmental actions of lithium: a unifying hypothesis. *Cell* 59(3):411-9.
- Berteloot A. 2003. Kinetic mechanism of Na⁺-glucose cotransport through the rabbit intestinal SGLT1 protein. *J Membr Biol* 192(2):89-100.
- Bezanilla F. 1982. Gating charge movements and kinetics of excitable membrane proteins. *Prog Clin Biol Res* 79:3-16.
- Bissonnette P, Coady MJ, Lapointe JY. 2004. Expression of the sodium-myo-inositol cotransporter SMIT2 at the apical membrane of Madin-Darby canine kidney cells. *J Physiol* 558(Pt 3):759-68.

- Boassa D, Yool AJ. 2003. Single amino acids in the carboxyl terminal domain of aquaporin-1 contribute to cGMP-dependent ion channel activation. *BMC Physiol* 3(1):12.
- 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 Renal Physiol* 268(6):F1132-1140.
- Bourgeois F, Coady MJ, Lapointe JY. 2005. Determination of transport stoichiometry for two cation-coupled myo-inositol cotransporters: SMIT2 and HMIT. *J Physiol* 563(Pt 2):333-43.
- Burckhardt BC, Kroll B, Fromter E. 1992. Proton transport mechanism in the cell membrane of *Xenopus laevis* oocytes. *Pflugers Arch* 420(1):78-82.
- Burg MB, Kwon a, Eugene D., KULTZ D. 1997. Regulation of gene expression by hypertonicity. *Annu Rev Physiol* 59(1):437-455.
- Cavalli P, Copp AJ. 2002. Inositol and folate resistant neural tube defects. *J Med Genet* 39(2):5e-.
- Chakrabarti N, Roux B, Pomes R. 2004. Structural Determinants of Proton Blockage in Aquaporins. *J Mol Biol* 343(2):493-510.
- Chen IW, Charalampous FC. 1964. Biochemical Studies on Inositol. Vii. Biosynthesis of Inositol by a Soluble Enzyme System. *J Biol Chem* 239:1905-10.
- 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.
- 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.
- Chesler M, Kaila K. 1992. Modulation of pH by neuronal activity. *Trends Neurosci* 15(10):396-402.
- Coady MJ, Chang MH, Charron FM, Plata C, Wallendorff B, Sah JF, Markowitz SD, Romero MF, Lapointe JY. 2004. The human tumour suppressor gene SLC5A8 expresses a Na⁺-monocarboxylate cotransporter. *J Physiol* 557(Pt 3):719-31.
- Coady MJ, Wallendorff B, Gagnon DG, Lapointe JY. 2002. Identification of a novel Na⁺/myo-inositol cotransporter. *J Biol Chem* 277(38):35219-24.

- Cogram P, Tesh S, Tesh J, Wade A, Allan G, Greene NDE, Copp AJ. 2002. D-chiro-inositol is more effective than myo-inositol in preventing folate-resistant mouse neural tube defects. *Hum Reprod* 17(9):2451-2458.
- Crane RK, Miller D, Bihler I. 1961. The restrictions on possible mechanisms of intestinal active transport of sugars. In: Kleinzeller A, Kotyk A, editors. *Membrane Transport and Metabolism; proceedings*. New York: Academic Press. p 439-449.
- Cremona O, De Camilli P. 2001. Phosphoinositides in membrane traffic at the synapse. *J Cell Sci* 114(Pt 6):1041-52.
- Cremona O, Di Paolo G, Wenk MR, Luthi A, Kim WT, Takei K, Daniell L, Nemoto Y, Shears SB, Flavell RA *et al.* 1999. Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* 99(2):179-88.
- Czech MP. 2000. PIP2 and PIP3: complex roles at the cell surface. *Cell* 100(6):603-6.
- Deen PM, Mulders SM, Kansen SM, van Os CH. 1997. Aquaporins and ion conductance. *Science* 275(5305):1491; author reply 1492.
- Diez-Sampedro A, Eskandari S, Wright EM, Hirayama BA. 2001. Na⁺-to-sugar stoichiometry of SGLT3. *Am J Physiol Renal Physiol* 280(2):F278-82.
- Diez-Sampedro A, Hirayama BA, Osswald C, Gorboulev V, Baumgarten K, Volk C, Wright EM, Koepsell H. 2003. A glucose sensor hiding in a family of transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(20):11753-8.
- Dolhofer R, Wieland OH. 1987. Enzymatic assay of myo-inositol in serum. *J Clin Chem Clin Biochem* 25(10):733-6.
- 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.
- Eisenberg F, Jr., Parthasarathy R. 1987. Measurement of biosynthesis of myo-inositol from glucose 6-phosphate. *Methods Enzymol* 141:127-43.
- Elfeber K, Kohler A, Lutzenburg M, Osswald C, Galla HJ, Witte OW, Koepsell H. 2004. Localization of the Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT1 in the blood-brain barrier. *Histochem Cell Biol* 121(3):201-7.
- Elsas LJ, Hillman RE, Patterson JH, Rosenberg LE. 1970. Renal and intestinal hexose transport in familial glucose-galactose malabsorption. *J Clin Invest* 49(3):576-85.

- Elsas LJ, Rosenberg LE. 1969. Familial renal glycosuria: a genetic reappraisal of hexose transport by kidney and intestine. *J Clin Invest* 48(10):1845-54.
- Eriksson NE, Sandblom J, Hagglund J. 1976. A voltage clamp circuit for measuring rapid current transients in membranes. *Med Biol Eng* 14(3):334-8.
- Faber ESL, Sah P. 2003. Calcium-Activated Potassium Channels: Multiple Contributions to Neuronal Function. *Neuroscientist* 9(3):181-194.
- Fairman WA, Amara SG. 1999. Functional diversity of excitatory amino acid transporters: ion channel and transport modes. *Am J Physiol* 277(4 Pt 2):F481-6.
- 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.
- Fernando KTM, McLean MA, Chard DT, MacManus DG, Dalton CM, Miszkiel KA, Gordon RM, Plant GT, Thompson AJ, Miller DH. 2004. Elevated white matter myo-inositol in clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. *Brain* 127(6):1361-1369.
- Fisher SK, Novak JE, Agranoff BW. 2002. Inositol and higher inositol phosphates in neural tissues: homeostasis, metabolism and functional significance. *J Neurochem* 82(4):736-54.
- Forster IC, Biber J, Murer H. 2000. Proton-Sensitive Transitions of Renal Type II Na⁺-Coupled Phosphate Cotransporter Kinetics. *Biophys. J.* 79(1):215-230.
- Franke WW, Grund C, Achtstatter T. 1986. Co-expression of cytokeratins and neurofilament proteins in a permanent cell line: cultured rat PC12 cells combine neuronal and epithelial features. *J Cell Biol* 103(5):1933-43.
- Frohnert PP, Hohmann B, Zwiebel R, Baumann K. 1970. Free flow micropuncture studies of glucose transport in the rat nephron. *Pflugers Arch* 315(1):66-85.
- Fukuhara Y, Turner RJ. 1984. The static head method for determining the charge stoichiometry of coupled transport systems. Applications to the sodium-coupled D-glucose transporters of the renal proximal tubule. *Biochim Biophys Acta* 770(1):73-8.
- Gagnon DG, Holt A, Bourgeois F, Wallendorff B, Coady MJ, Lapointe J-Y. 2005. Membrane topology of loop 13-14 of the Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1): A SCAM and fluorescent labelling study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* In Press, Corrected Proof.

- Gagnon MP, Bissonnette P, Deslandes LM, Wallendorff B, Lapointe JY. 2004. Glucose accumulation can account for the initial water flux triggered by Na^+ /glucose cotransport. *Biophys J* 86(1):125-33.
- Geck P, Pietrzyk C, Burckhardt BC, Pfeiffer B, Heinz E. 1980. Electrically silent cotransport on Na^+ , K^+ and Cl^- in Ehrlich cells. *Biochim Biophys Acta* 600(2):432-47.
- Gekko K. 1981. Mechanism of polyol-induced protein stabilization: solubility of amino acids and diglycine in aqueous polyol solutions. *J Biochem (Tokyo)* 90(6):1633-41.
- Gopal E, Fei YJ, Sugawara M, Miyauchi S, Zhuang L, Martin P, Smith SB, Prasad PD, Ganapathy V. 2004. Expression of *slc5a8* in kidney and its role in Na^+ -coupled transport of lactate. *J Biol Chem* 279(43):44522-32.
- Greene ND, Copp AJ. 1997. Inositol prevents folate-resistant neural tube defects in the mouse. *Nat Med* 3(1):60-6.
- Griffith JK, Baker ME, Rouch DA, Page MG, Skurray RA, Paulsen IT, Chater KF, Baldwin SA, Henderson PJ. 1992. Membrane transport proteins: implications of sequence comparisons. *Curr Opin Cell Biol* 4(4):684-95.
- Guan G, Dai P, Shechter I. 2003. cDNA cloning and gene expression analysis of human myo-inositol 1-phosphate synthase. *Arch Biochem Biophys* 417(2):251-9.
- Hansen SH. 2001. The role of taurine in diabetes and the development of diabetic complications. *Diabetes Metab Res Rev* 17(5):330-46.
- 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.
- Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, MacKinnon R. 1994. Mutations in the K^+ channel signature sequence. *Biophys J* 66(4):1061-7.
- Henderson PJ. 1990. Proton-linked sugar transport systems in bacteria. *J Bioenerg Biomembr* 22(4):525-69.
- Hill AV. 1910. The possible effects of the aggregation of the molecules of hæmoglobin on its dissociation curves. *J Physiol* 40:iv-vii.
- Hirsch JR, Loo DDF, Wright EM. 1996. Regulation of Na^+ /Glucose Cotransporter Expression by Protein Kinases in *Xenopus laevis* Oocytes. *J Biol Chem* 271(25):14740-14746.

- Hitomi K, Tsukagoshi N. 1994. cDNA sequence for rkST1, a novel member of the sodium ion-dependent glucose cotransporter family. *Biochim Biophys Acta* 1190(2):469-72.
- 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.
- Hotta N. 1997. New concepts and insights on pathogenesis and treatment of diabetic complications: polyol pathway and its inhibition. *Nagoya J Med Sci* 60(3-4):89-100.
- Howard M, Fischer H, Roux J, Santos BC, Gullans SR, Yancey PH, Welch WJ. 2003. Mammalian osmolytes and S-nitrosoglutathione promote Delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) protein maturation and function. *J Biol Chem* 278(37):35159-67.
- Ibsen L, Strange K. 1996. In situ localization and osmotic regulation of the Na(+)-myo-inositol cotransporter in rat brain. *Am J Physiol* 271(4 Pt 2):F877-85.
- Ikari A, Nakano M, Kawano K, Suketa Y. 2002. Up-regulation of Sodium-dependent Glucose Transporter by Interaction with Heat Shock Protein 70. *J Biol Chem* 277(36):33338-33343.
- Janmey PA, Lindberg U. 2004. Cytoskeletal regulation: rich in lipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(8):658-66.
- Jost M, Simpson F, Kavran JM, Lemmon MA, Schmid SL. 1998. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is required for endocytic coated vesicle formation. *Current Biology: CB* 8(25):1399-1402.
- Kanai Y, Lee WS, You G, Brown D, Hediger MA. 1994. The human kidney low affinity Na⁺/glucose cotransporter SGLT2. Delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose. *J Clin Invest* 93(1):397-404.
- Karihaloo A, Kato K, Greene DA, Thomas TP. 1997. Protein kinase and Ca²⁺ modulation of myo-inositol transport in cultured retinal pigment epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 273(2):C671-678.
- Kempson SA, Lotscher M, Kaissling B, Biber J, Murer H, Levi M. 1995. Parathyroid hormone action on phosphate transporter mRNA and protein in rat renal proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol* 268(4):F784-791.
- Kerr ID, Sansom MS. 1995. Cation selectivity in ion channels. *Nature* 373(6510):112.

- Kim JY, Han W, Namkung W, Lee JH, Kim KH, Shin H, Kim E, Lee MG. 2004. Inhibitory Regulation of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Anion-transporting Activities by Shank2. *J Biol Chem* 279(11):10389-10396.
- Kimmich GA, Randles J, Restrepo D, Montrose M. 1985. The potential dependence of the intestinal Na⁺-dependent sugar transporter. *Ann N Y Acad Sci* 456:63-76.
- Kipp H, Khoursandi S, Scharlau D, Kinne RKH. 2003. More than apical: distribution of SGLT1 in Caco-2 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 285(4):C737-749.
- Klamo EM, Drew ME, Landfear SM, Kavanaugh MP. 1996. Kinetics and stoichiometry of a proton/myo-inositol cotransporter. *J Biol Chem* 271(25):14937-43.
- Klaus S, Casteilla L, Bouillaud F, Raimbault S, Ricquier D. 1990. Expression of the brown fat mitochondria uncoupling protein in *Xenopus* oocytes and important into mitochondrial membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 167(2):784-9.
- Koefoed-Johnsen V, Ussing HH. 1953. The contributions of diffusion and flow to the passage of D₂O through living membranes; effect of neurohypophyseal hormone on isolated anuran skin. *Acta Physiol Scand* 28(1):60-76.
- Koller BH, Hagemann LJ, Doetschman T, Hagaman JR, Huang S, Williams PJ, First NL, Maeda N, Smithies O. 1989. Germ-line transmission of a planned alteration made in a hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(22):8927-31.
- Kouzuma T, Takahashi M, Endoh T, Kaneko R, Ura N, Shimamoto K, Watanabe N. 2001. An enzymatic cycling method for the measurement of myo-inositol in biological samples. *Clin Chim Acta* 312(1-2):143-151.
- Krofchick D, Huntley SA, Silverman M. 2004. Transition states of the high-affinity rabbit Na⁺/glucose cotransporter SGLT1 as determined from measurement and analysis of voltage-dependent charge movements. *Am J Physiol Cell Physiol* 287(1):C46-54.
- Kwon HM, Yamauchi A, Uchida S, Preston AS, Garcia-Perez A, Burg MB, Handler JS. 1992. Cloning of the cDNA for a Na⁺/myo-inositol cotransporter, a hypertonicity stress protein. *J Biol Chem* 267(9):6297-301.
- Kyte J, Doolittle RF. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157(1):105-32.
- Lee WS, Kanai Y, Wells RG, Hediger MA. 1994. The high affinity Na⁺/glucose cotransporter. Re-evaluation of function and distribution of expression. *J Biol Chem* 269(16):12032-9.

- Levi M, Lotscher M, Sorribas V, Custer M, Arar M, Kaissling B, Murer H, Biber J. 1994. Cellular mechanisms of acute and chronic adaptation of rat renal P(i) transporter to alterations in dietary P(i). *Am J Physiol Renal Physiol* 267(5):F900-908.
- Lin J-T, Kormanec J, Homerova D, Kinne RK-H. 1999. Probing transmembrane topology of the high-affinity sodium/glucose cotransporter (SGLT1) with histidine-tagged mutants. *Journal of Membrane Biology* 170(3):243-252.
- MacGregor LC, Matschinsky FM. 1984. An enzymatic fluorimetric assay for myo-inositol. *Anal Biochem* 141(2):382-9.
- Mackenzie B, Loo DD, Wright EM. 1998. Relationships between Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) currents and fluxes. *J Membr Biol* 162(2):101-6.
- MacKinnon R. 2003. Potassium channels. *FEBS Letters* 555(1):62-65.
- Maiden MC, Davis EO, Baldwin SA, Moore DC, Henderson PJ. 1987. Mammalian and bacterial sugar transport proteins are homologous. *Nature* 325(6105):641-3.
- Martin TFJ. 1998. Phosphoinositide lipids as signaling molecules: Common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 14(1):231-264.
- Matskevitch J, Wagner CA, Risler T, Kwon HM, Handler JS, Waldegger S, Busch AE, Lang F. 1998. Effect of extracellular pH on the myo-inositol transporter SMIT expressed in *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch* 436(6):854-7.
- McNicholas CM, MacGregor GG, Islas LD, Yang Y, Hebert SC, Giebisch G. 1998. pH-dependent modulation of the cloned renal K⁺ channel, ROMK. *Am J Physiol Renal Physiol* 275(6):F972-981.
- McNicholas CM, Yang Y, Giebisch G, Hebert SC. 1996. Molecular site for nucleotide binding on an ATP-sensitive renal K⁺ channel (ROMK2). *Am J Physiol* 271(2 Pt 2):F275-85.
- Mehrotra B, Myszka DG, Prestwich GD. 2000. Binding kinetics and ligand specificity for the interactions of the C2B domain of synaptogmin II with inositol polyphosphates and phosphoinositides. *Biochemistry* 39(32):9679-86.
- Meinild AK, Klaerke DA, Zeuthen T. 1998. Bidirectional water fluxes and specificity for small hydrophilic molecules in aquaporins 0-5. *J Biol Chem* 273(49):32446-51.
- Miyauchi S, Gopal E, Fei Y-J, Ganapathy V. 2004. Functional Identification of SLC5A8, a Tumor Suppressor Down-regulated in Colon Cancer, as a Na⁺-

- coupled Transporter for Short-chain Fatty Acids. *J. Biol. Chem.* 279(14):13293-13296.
- Moore JW, Cole KS. 1963. Voltage clamp techniques. In: Nastuk WL, editor. *Physical techniques in biological research, Vol. IV - Electrophysiological Methods Part B*. New York: Academic Press. p 263-321.
- Morello J-P, Bouvier M, Petaja-Repo UE, Bichet DG. 2000. Pharmacological chaperones: a new twist on receptor folding. *Trends in Pharmacological Sciences* 21(12):466-469.
- 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.
- Nakanishi T, Turner RJ, Burg MB. 1989. Osmoregulatory changes in myo-inositol transport by renal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(15):6002-6.
- Novak JE, Turner RS, Agranoff BW, Fisher SK. 1999. Differentiated human NT2-N neurons possess a high intracellular content of myo-inositol. *J Neurochem* 72(4):1431-40.
- O'Donnell T, Rotzinger S, Nakashima TT, Hanstock CC, Ulrich M, Silverstone PH. 2000. Chronic lithium and sodium valproate both decrease the concentration of myo-inositol and increase the concentration of inositol monophosphates in rat brain. *Brain Research* 880(1-2):84-91.
- Osborne SL, Meunier FA, Schiavo G. 2001. Phosphoinositides as key regulators of synaptic function. *Neuron* 32(1):9-12.
- Oulianova N, Berteloot A. 1996. Sugar transport heterogeneity in the kidney: two independent transporters or different transport modes through an oligomeric Protein? 1. Glucose transport studies. *J Membr Biol* 153(3):181-94.
- 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):20324-20327.
- Panayotova-Heiermann M, Wright EM. 2001. Mapping the urea channel through the rabbit Na⁽⁺⁾-glucose cotransporter SGLT1. *J Physiol* 535(Pt 2):419-25.
- Pappenheimer JR, Renkin EM, Borrero LM. 1951. Filtration, diffusion and molecular sieving through peripheral capillary membranes; a contribution to the pore theory of capillary permeability. *Am J Physiol* 167(1):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.
- Pendaries C, Tronchere H, Plantavid M, Payrastra B. 2003. Phosphoinositide signaling disorders in human diseases. *FEBS Letters* 546(1):25-31.
- Pomes R, Roux B. 1996. Structure and dynamics of a proton wire: a theoretical study of H⁺ translocation along the single-file water chain in the gramicidin A channel. *Biophys J* 71(1):19-39.
- Poppe R, Karbach U, Gambaryan S, Wiesinger H, Lutzenburg M, Kraemer M, Witte OW, Koepsell H. 1997. Expression of the Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT1 in neurons. *J Neurochem* 69(1):84-94.
- 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.
- Quick M, Loo DDF, Wright EM. 2001. Neutralization of a Conserved Amino Acid Residue in the Human Na⁺/Glucose Transporter (hSGLT1) Generates a Glucose-gated H⁺ Channel. *J Biol Chem* 276(3):1728-1734.
- Rapoport I, Miyazaki M, Boll W, Duckworth B, Cantley LC, Shoelson S, Kirchhausen T. 1997. Regulatory interactions in the recognition of endocytic sorting signals by AP-2 complexes. *Embo J* 16(9):2240-50.
- Reuss L. 2000. One-Hundred Years of Inquiry: The Mechanism of Glucose Absorption in the Intestine. *Annual Review of Physiology* 62(1):939-946.
- Roll P, Massacrier A, Pereira S, Robaglia-Schlupp A, Cau P, Szepetowski P. 2002. New human sodium/glucose cotransporter gene (KST1): identification, characterization, and mutation analysis in ICCA (infantile convulsions and choreoathetosis) and BFIC (benign familial infantile convulsions) families. *Gene* 285(1-2):141-8.
- Roughton FJ, Otis AB, Lyster RL. 1955. The determination of the individual equilibrium constants of the four intermediate reactions between oxygen and sheep haemoglobin. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 144(914):29-54.
- Sachs F, Specht P. 1981. Fast microelectrode headstage for voltage clamp. *Med Biol Eng Comput* 19(3):316-20.

- Salas-Burgos A, Iserovich P, Zuniga F, Vera JC, Fischbarg J. 2004. Predicting the three-dimensional structure of the human facilitative glucose transporter glut1 by a novel evolutionary homology strategy: insights on the molecular mechanism of substrate migration, and binding sites for glucose and inhibitory molecules. *Biophys J* 87(5):2990-9.
- Sasaki S, Ishibashi K, Nagai T, Marumo F. 1992. Regulation mechanisms of intracellular pH of *Xenopus laevis* oocyte. *Biochim Biophys Acta* 1137(1):45-51.
- Schafer JA, Williams JC, Jr. 1985. Transport of metabolic substrates by the proximal nephron. *Annu Rev Physiol* 47:103-25.
- Schiavo G, Gu Q-M, Prestwich GD, Sollner TH, Rothman JE. 1996. Calcium-dependent switching of the specificity of phosphoinositide binding to synaptotagmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(23):13327-13332.
- Schmolke M, Bornemann A, Guder WG. 1991. Distribution and regulation of organic osmolytes along the nephron. *Contrib Nephrol* 95:255-63.
- Sechi AS, Wehland J. 2000. The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P(2) influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane. *J Cell Sci* 113 Pt 21:3685-95.
- 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.
- Sen AK, Post RL. 1964. Stoichiometry and Localization of Adenosine Triphosphate-Dependent Sodium and Potassium Transport in the Erythrocyte. *J Biol Chem* 239:345-52.
- Shetty HU, Schapiro MB, Holloway HW, Rapoport SI. 1995. Polyol profiles in Down syndrome. myo-Inositol, specifically, is elevated in the cerebrospinal fluid. *J Clin Invest* 95(2):542-546.
- Singer SJ, Nicolson GL. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175(23):720-731.
- Sonders MS, Amara SG. 1996. Channels in transporters. *Curr Opin Neurobiol* 6(3):294-302.
- Spector R, Lorenzo AV. 1975. Myo-inositol transport in the central nervous system. *Am J Physiol* 228(5):1510-18.
- Stevens MJ, Lattimer SA, Kamijo M, Van Huysen C, Sima AA, Greene DA. 1993. Osmotically-induced nerve taurine depletion and the compatible osmolyte

- hypothesis in experimental diabetic neuropathy in the rat. *Diabetologia* 36(7):608-14.
- Stokes CE, Gillon KR, Hawthorne JN. 1983. Free and total lipid myo-inositol concentrations decrease with age in human brain. *Biochim Biophys Acta* 753(1):136-8.
- Stuhmer W. 1992. Electrophysiological recording from *Xenopus* oocytes. *Methods Enzymol* 207:319-39.
- Takenawa T, Itoh T. 2001. Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin cytoskeletal organization and membrane traffic from the plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1533(3):190-206.
- Tandon BN. 2003. Hepatic encephalopathy syndromes. *Indian J Gastroenterol* 22 Suppl 2:S4-6.
- Toker A. 2002. Phosphoinositides and signal transduction. *Cell Mol Life Sci* 59(5):761-79.
- Toker A, Cantley LC. 1997. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387(6634):673-6.
- Trachtman H. 1992. Cell volume regulation: a review of cerebral adaptive mechanisms and implications for clinical treatment of osmolal disturbances: II. *Pediatr Nephrol* 6(1):104-12.
- Tsunoda SP, Wiesner B, Lorenz D, Rosenthal W, Pohl P. 2004. Aquaporin-1, nothing but a water channel. *J Biol Chem* 279(12):11364-7.
- Turk E, Kerner CJ, Lostao MP, Wright EM. 1996. Membrane Topology of the Human Na[IMAGE]/Glucose Cotransporter SGLT1. *J. Biol. Chem.* 271(4):1925-1934.
- Turner RJ, Moran A. 1982a. Further studies of proximal tubular brush border membrane D-glucose transport heterogeneity. *J Membr Biol* 70(1):37-45.
- Turner RJ, Moran A. 1982b. Heterogeneity of sodium-dependent D-glucose transport sites along the proximal tubule: evidence from vesicle studies. *Am J Physiol* 242(4):F406-14.
- Turner RJ, Moran A. 1982c. Stoichiometric studies of the renal outer cortical brush border membrane D-glucose transporter. *J Membr Biol* 67(1):73-80.
- Tyuma I, Shimizu K, Imai K. 1971. Effect of 2,3-diphosphoglycerate on the cooperativity in oxygen binding of human adult hemoglobin. *Biochem Biophys Res Commun* 43(2):423-8.

- Uldry M, Ibberson M, Horisberger JD, Chatton JY, Riederer BM, Thorens B. 2001. Identification of a mammalian H(+)-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *Embo J* 20(16):4467-77.
- Uldry M, Steiner P, Zurich MG, Beguin P, Hirling H, Dolci W, Thorens B. 2004. Regulated exocytosis of an H(+)/myo-inositol symporter at synapses and growth cones. *Embo J* 23(3):531-40.
- Uldry M, Thorens B. 2004. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch* 447(5):480-9.
- Vaden DL, Ding D, Peterson B, Greenberg ML. 2001. Lithium and valproate decrease inositol mass and increase expression of the yeast INO1 and INO2 genes for inositol biosynthesis. *J Biol Chem* 276(18):15466-71.
- Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD. 2001. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annual Review of Biochemistry* 70(1):535-602.
- Verkman AS, Yang B. 1997. Aquaporins and ion conductance. *Science* 275(5305):1491; author reply 1492.
- Walker AM, Bott PA, Oliver J, MacDowell MC. 1941. The collection and analysis of fluid from single nephrons of the mammalian kidney. *Am J Physiol* 134(3):580-595.
- Weiss JN. 1997. The Hill equation revisited: uses and misuses. *Faseb J* 11(11):835-41.
- Wiese TJ, Dunlap JA, Conner CE, Grzybowski JA, Lowe WL, Jr., Yorek MA. 1996. Osmotic regulation of Na-myoinositol cotransporter mRNA level and activity in endothelial and neural cells. *Am J Physiol* 270(4 Pt 1):C990-7.
- Williams RS, Harwood AJ. 2000. Lithium therapy and signal transduction. *Trends Pharmacol Sci* 21(2):61-4.
- Wong YH, Kalmbach SJ, Hartman BK, Sherman WR. 1987. Immunohistochemical staining and enzyme activity measurements show myo-inositol-1-phosphate synthase to be localized in the vasculature of brain. *J Neurochem* 48(5):1434-42.
- Wright EM, Turk E. 2003. The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch*.
- Yamauchi A, Sugiura T, Ito T, Miyai A, Horio M, Imai E, Kamada T. 1996. Na⁺/myo-inositol transport is regulated by basolateral tonicity in Madin-Darby canine kidney cells. *J Clin Invest* 97(1):263-7.

- Yao D, Mackenzie B, Ming H, Varoqui H, Zhu H, Hediger MA, Erickson JD. 2000. A Novel System A Isoform Mediating Na⁺/Neutral Amino Acid Cotransport. *J Biol Chem* 275(30):22790-22797.
- Yool AJ, Stamer WD, Regan JW. 1996. Forskolin stimulation of water and cation permeability in aquaporin 1 water channels. *Science* 273(5279):1216-8.
- Yool AJ, Weinstein AM. 2002. New roles for old holes: ion channel function in aquaporin-1. *News Physiol Sci* 17:68-72.
- Yorek M, Dunlap J, Lowe J, WL. 1999a. Osmotic regulation of the Na⁺/myo-inositol cotransporter and postinduction normalization. *Kidney Int* 55(1):215-224.
- Yorek MA, Dunlap JA, Manzo-Fontes A, Bianchi R, Berry GT, Eichberg J. 1999b. Abnormal myo-inositol and phospholipid metabolism in cultured fibroblasts from patients with ataxia telangiectasia. *Biochim Biophys Acta* 1437(3):287-300.
- Zhang X, Majerus PW. 1998. Phosphatidylinositol signalling reactions. *Semin Cell Dev Biol* 9(2):153-60.
- Zhang XM, Wang XT, Yue H, Leung SW, Thibodeau PH, Thomas PJ, Guggino SE. 2003. Organic solutes rescue the functional defect in delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 278(51):51232-42.
- 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 L, Cryan EV, D'Andrea MR, Belkowski S, Conway BR, Demarest KT. 2003. Human cardiomyocytes express high level of Na⁺/glucose cotransporter 1 (SGLT1). *J Cell Biochem* 90(2):339-46.
- 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.