

Université de Montréal

**Caractérisation du co-transporteur  $\text{Na}^+/\text{myo-}$   
**inositol SMIT2 dans les membranes en bordure en  
brosse de rein de lapin et d'intestin de rat****

par  
Rym Aouameur

Département de physiologie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise (M. Sc.) en physiologie

Août 2008  
© Rym Aouameur, 2008

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
Caractérisation du co-transporteur  $\text{Na}^+/\text{myo}$ -inositol SMIT2 dans les membranes  
en bordure en brosse de rein de lapin et d'intestin de rat

présenté par :  
Rym Aouameur

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Christiane Malo, président rapporteur  
Jean-Yves Lapointe, directeur de recherche  
Lucie Parent, membre du jury

## RÉSUMÉ

Le *myo*-inositol (MI) est un soluté organique impliqué dans diverses fonctions physiologiques de la cellule dont la signalisation cellulaire. Il est également un osmolyte compatible reconnu. Trois co-transporteurs de type actif secondaire responsables de son absorption ont été identifiés. Deux d'entre eux sont couplés au transport du sodium (SMIT1 et SMIT2) et le troisième est couplé au transport de protons (HMIT). L'objectif de cette étude a été la caractérisation du transport du MI par SMIT2 dans des membranes en bordure en brosse (BBMv) issues du rein de lapin et de l'intestin de rat ainsi qu'après expression dans les ovocytes de *Xenopus laevis*. La quantification de l'ARN<sub>m</sub> de SMIT1 et de SMIT2 dans le rein nous a appris que SMIT1 est majoritairement présent dans la médullaire alors que SMIT2 est principalement localisé dans le cortex. Ces résultats ont été confirmés par immunobuvardage en utilisant un anticorps dirigé contre SMIT2. Grâce à l'inhibition sélective de SMIT1 par le L-Fucose et de SMIT2 par le D-chiro-inositol (DCI), nous avons démontré que SMIT2 semble le seul responsable du transport luminal de MI dans le tubule contourné proximal avec un  $K_m$  de  $57 \pm 14 \mu\text{M}$ . Pour ce qui est de l'intestin, des études de transport de MI radioactif ont démontré une absence de transport de MI chez le lapin alors que l'intestin de rat présente un transport de MI très actif. Une quantification par qRT-PCR nous a permis de constater que l'intestin de lapin ne semble pas posséder les transporteurs de MI nécessaires. Comme pour le rein, SMIT2 semble le seul transporteur de MI présent au niveau du pôle apical des entérocytes intestinaux chez le rat. Il est chargé du prélèvement du MI de l'alimentation avec un  $K_m$  de  $150 \pm 40 \mu\text{M}$ . Les analyses fonctionnelles exécutées sur SMIT2 de rat en électrophysiologie après expression dans les ovocytes de *Xenopus laevis* donnent sensiblement les mêmes résultats que pour les BBMv de rein de lapin et d'intestin de rat. Dans les ovocytes, SMIT2 présente une grande affinité pour le MI ( $270 \pm 19 \mu\text{M}$ ) et le DCI ( $310 \pm 60 \mu\text{M}$ ) et aucune affinité pour le L-fucose. Il est

également très sensible à la phlorizine ( $16 \pm 7 \mu\text{M}$ ). Une seule exception persiste : la constante d'affinité pour le glucose dans les BBMv d'intestin de rat est 40 fois plus petite que celle observée sur les ovocytes de *Xenopus laevis*. Nous avons également testé la capacité de certains transporteurs de sucre présents à la surface des membranes apicales des entérocytes à prélever le MI. Vu que l'inhibition de ces transporteurs (SGLT1 et GLUT5) ne changeait rien au taux de MI radioactif transporté, nous en avons conclu qu'ils ne sont pas impliqués dans son transport. Finalement, l'efflux de MI à partir du pôle basolatéral des entérocytes n'est pas effectué par GLUT2 puisque ce dernier lorsqu'il est exprimé dans des ovocytes, est incapable de transporter le MI.

**Mots-clés** : SMIT2, *myo*-inositol, *D-chiro*-inositol, phlorizine, SMIT1, glucose, vésicules de la membrane en bordure en brosse, ovocytes, transport membranaire.

## ABSTRACT

*Myo*-inositol (MI) is an organic solute involved in various aspects of cell physiology, including cell signaling. It is also known as a compatible osmolyte. Three secondary active MI cotransporters have been identified; two are Na<sup>+</sup>-coupled (SMIT1 and SMIT2) and one is H<sup>+</sup>-coupled (HMIT). The main aim of this study was to characterize MI uptake through SMIT2 as expressed in epithelial cells and in *Xenopus laevis* oocytes. In order to achieve the characterization of this transport system, we used purified brush border membrane vesicles (BBMv) isolated from rabbit kidney and rat intestine. We first performed a quantification of mRNA levels in rabbit kidney using real time PCR for both SMIT1 and SMIT2. We found that SMIT1 is mainly expressed in the renal medulla while SMIT2 is mainly localized in the renal cortex. This result was confirmed on Western blots using an antibody raised against SMIT2. Through inhibition studies using selective substrates for SMIT1 (inhibited by L-fucose) and SMIT2 (inhibited by D-*chiro*-inositol), we showed that SMIT2 seems to be responsible for all the apical transport of MI into the proximal convoluted tubule with a K<sub>m</sub> of 57 ± 14 μM. By transport studies we established that rabbit intestine seems to lack apical transport of MI while rat intestine has a very active uptake of this molecule. qRT-PCR quantification confirmed the absence of MI transporters in rabbit intestine. As for kidney, SMIT2 seems to be the only transporter responsible for apical MI uptake in enterocytes with a K<sub>m</sub> of 150 ± 40 μM. Functional analysis of rat SMIT2 activity, via electrophysiological studies in *Xenopus* oocytes, demonstrated similarities to the activities of SMIT2 from rat intestine and rabbit kidney. SMIT2 displays high affinities for MI (270 ± 19 μM), DCI (310 ± 60 μM) and no affinity for L-fucose. SMIT2 is very sensitive to phlorizin (Pz; 16 ± 7 μM). Although these functional characteristics essentially confirmed those found in rat intestine, a

discrepancy exists between the two systems studied. Indeed, the affinity constant for glucose was approximately 40-fold lower in vesicles than in oocytes. We also tested the ability of SGLT1 and GLUT5, other sugar transport systems present in enterocytes apical membranes, to perform MI uptake. Because the inhibition of these transporters did not alter radiolabeled MI uptake, we concluded that they had no significant contribution to MI transport in rat intestine. Finally, the basolateral efflux of MI was not mediated by GLUT2 because when expressed in oocytes, this transporter was not able to transport MI.

**Key Words** : SMIT2, *myo*-inositol, *D-chiro*-inositol, phlorizine, SMIT1, D-glucose, Brush-Border Membrane Vesicles, oocytes, membrane transport.

## TABLE DES MATIÈRES

<i>Résumé</i> .....	i
<i>Abstract</i> .....	iii
<i>Table des matières</i> .....	v
<i>Liste des figures</i> .....	viii
<i>Liste des abréviations</i> .....	x
<i>Remerciements</i> .....	ix
<b>I – Introduction</b> .....	<b>1</b>
1- Le transport membranaire.....	2
2- La famille des SLC5.....	4
3- Le <i>myo</i> -inositol.....	6
3.1- Historique et structure.....	6
3.2- Origine.....	7
3.2.1- La biosynthèse du <i>myo</i> -inositol.....	7
3.2.2- Le recyclage.....	8
3.2.3- L'alimentation.....	8
3.3- Concentration et localisation.....	9
3.4- Rôles physiologiques du <i>myo</i> -inositol.....	10
3.4.1- Osmolyte compatible .....	10
3.4.2- Chaperon chimique.....	10
3.4.3- Précurseur de molécules vitales.....	11
3.5- Pathologies.....	13
4- Transporteurs.....	17
4.1- SMIT1.....	17
4.2- HMIT.....	19
4.3- SMIT2.....	20

5- La présente étude.....	21
5.1- Objectif.....	21
5.2- Stratégie et paramètres cinétiques.....	22
5.2- Substrats et inhibiteurs utilisés.....	23
5.3- Modèles à l'étude.....	25
5.4.1- Les ovocytes et l'électrophysiologie.....	25
5.4.2- Les vésicules de membrane en bordure en brosse.....	26
5.4.2.1- L'anatomie intestinale.....	27
5.4.2.2- L'anatomie rénale.....	28
<b>II – Article 1.....</b>	<b>31</b>
<i>Abstract</i> .....	32
<b>1- Introduction.....</b>	<b>33</b>
<b>2- Materials and Methods.....</b>	<b>35</b>
<b>3- Results.....</b>	<b>38</b>
<b>4- Discussion.....</b>	<b>41</b>
<b>5- Conclusion.....</b>	<b>44</b>
<b>6- Acknowledgment .....</b>	<b>44</b>
<b>7- References .....</b>	<b>45</b>
<b>8- Legends and Figures .....</b>	<b>48</b>
<b>III – Article 2.....</b>	<b>55</b>
<i>Abstract</i> .....	56
<b>1- Introduction.....</b>	<b>57</b>
<b>2- Materials and Methods.....</b>	<b>59</b>
<b>3- Results.....</b>	<b>63</b>
<b>4- Discussion.....</b>	<b>67</b>
<b>5- Conclusion.....</b>	<b>71</b>
<b>6- Acknowledgment .....</b>	<b>71</b>
<b>7- References .....</b>	<b>72</b>
<b>8- Legends and Figures .....</b>	<b>76</b>



<b>IV – Discussion.....</b>	<b>86</b>
1- La caractérisation de SMI2 dans les BBMv de rein.....	<b>88</b>
2- La caractérisation de SMI2 dans les BBMv d'intestin.....	<b>94</b>
3- Le cas particulier du glucose.....	<b>99</b>
4- SMI2.....	<b>101</b>
<b>V- Conclusion.....</b>	<b>107</b>
<b>VI- Références.....</b>	<b>110</b>

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** Illustration des différents mécanismes de transport passif et actif exprimés au niveau de la membrane plasmique ou de la membrane des organelles intracellulaires. Tirée de Hediger *et al* 2004..... **3**
- Figure 2.** L'arbre phylogénique des 11 membres humains de la famille des transporteurs SLC5. Adaptée de Wright et Turk 2003..... **5**
- Figure 3.** Structure du *myo*-inositol (1) plan de symétrie traversant les carbones 2 et 5, (2) conformation chaise du *myo*-inositol et (3) la tortue d'Agranoff..... **6**
- Figure 4.** Synthèse du *myo*-inositol à partir du D-glucose. L'Enzyme I est une hexokinase, l'enzyme II est la *myo*-inositol-1-phosphate synthétase et l'enzyme III est une phosphatase. Tirée de Hoffmann-Ostenhof et Pittner (1982).....**7**
- Figure 5.** Structures du (a) *myo*-inositol, de (b) l'Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, (c) de l'ancre GPI et du PtdIns..... **12**
- Figure 6.** Schéma de l'anatomie intestinale et les différents niveaux de structure de l'intestin : (a) les plis circulaires, (b) les villosités intestinales et (c) les microvillosités situées sur la face apicale des anthérocytes. Figure tirée de Marieb, 1999, p. 880..... **27**
- Figure 7.** Schéma de l'anatomie du rein ainsi que de (a) la localisation du néphron dans le rein et (b) une vue schématique du néphron et les caractéristiques

structurales des tissus formant ses principales parties. Figure tirée de Marieb, 1999 p.977..... **29**

**Figure 8.** Illustration du modèle cellulaire selon lequel SMIT1 (basolatéral) et SMIT2 (apical) cohabitent..... **93**

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

2DG	2-déoxy-D-glucose
AMG	$\alpha$ -méthylglucose
BBMv	«Brusher-Border Membrane vesicles» ou membranes en bordure en brosse
DCI	D- <i>chiro</i> -inositol
Fuc	L-fucose
Glc	D-glucose
GLUT	«Glucose Transporter» ou transporteur passif de glucose de type uniport
GPI	Glycophosphatidyl inositols
HMIT	«H <sup>+</sup> - <i>myo</i> -inositol transporter» ou co-transporteur de MI dépendant d'un gradient de protons
IMPase	« <i>myo</i> -Inositol Monophosphatase»
InsP	Inositols phosphates
K <sup>+</sup>	Potassium
LCI	L- <i>chiro</i> -inositol
LCR	Liquide céphalo-rachidien
Li <sup>+</sup>	Lithium
MI	<i>myo</i> -Inositol
Na <sup>+</sup>	Sodium
PKC	Phosphokinase C
Pt	Phlorétine
PtdIns	Phosphatidylinositols
Pz	Phlorizine

SGLT	«Sodium-dependent glucose cotransporters» ou co-transporteur de MI dépendant d'un gradient d'ions sodium
SMIT1	«Sodium- <i>myo</i> -inositol transporter 1» ou co-transporteur 1 de MI dépendant d'un gradient d'ions sodium
SMIT2	«Sodium- <i>myo</i> -inositol transporter 2» ou co-transporteur 2 de MI dépendant d'un gradient d'ions sodium
SNC	Système nerveux central
TonEBP	«Tonicity-responsive enhancer binding protein»

## REMERCIEMENTS

Poursuivre des études de maîtrise et procéder à la rédaction du mémoire qui va avec est un processus très formateur qui implique, dans mon cas du moins, bien plus que la seule personne qui le rédige. Il y a bien sûr mon directeur de recherche, le Dr Jean-Yves Lapointe, sans qui cette opportunité ne se serait jamais présentée, mais il y a surtout le soutien constant de toute une équipe. Je tiens à remercier mes collègues de laboratoire et mon superviseur. L'écoute de Sandra, l'humour décapant d'Alex et l'équilibre que Yoann apporte au groupe ont été de véritables atouts au cours de ces deux années de maîtrise. Merci Pierre de t'être intéressé à la petite étudiante que je suis. Les autres membres du GÉPROM ne sont pas en reste et je tiens à les remercier tout un chacun, bien entendu madame Loulou (Louise Lefort) en fait largement partie. Le rire contagieux de Bernadette et les carrés aux dattes de Julie sont des soutiens moraux dont on ne soupçonne pas l'efficacité au premier abord. Je voudrais également remercier Pierrette Fournelle qui est une véritable mère pour les étudiants du département. Merci Michel qui nous a si souvent sauvé la vie en retapant un ordi malade, en récupérant des données envolées ou encore en échafaudant un montage artisanal selon les règles très éthérées du système D (D pour débrouillard) pour améliorer le sort d'un petit expérimentateur. Et puis finalement j'aimerais exprimer toute, mais alors là vraiment toute ma gratitude à Marc-Olivier pour les heures passées à m'écouter râler, à me relire, à me corriger, à me conseiller, à me suggérer une voie de réflexion pour mon mémoire comme pour ma vie. Un gros merci parce que sans ton soutien ce mémoire n'aurait peut-être jamais vu le bout du tunnel et moi non plus d'ailleurs.

## **CHAPITRE I- INTRODUCTION**

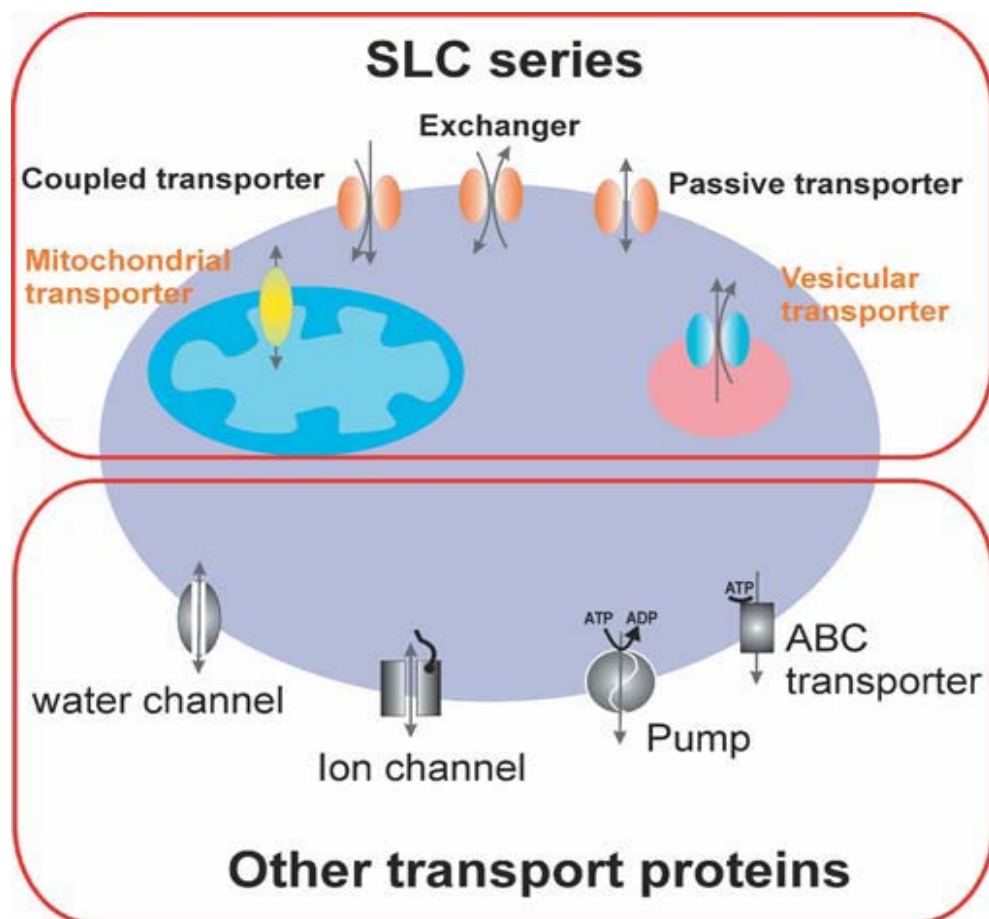
Les cellules sont les unités fondamentales des organismes complexes. Même si ces cellules servent un tout, chacune d'elle est une entité qui possède son propre fonctionnement et qui s'isole de son milieu par sa membrane plasmique. La séparation entre la cellule et son entourage est la fonction la plus apparente de cette membrane biologique. Cependant, cette dernière joue également un rôle primordial dans la communication de la cellule avec son environnement. Par exemple, elle est responsable de l'ancrage de la cellule aux cellules adjacentes, concept à la base de la formation des tissus. Elle est aussi responsable de la détection de signaux chimiques provenant de l'extérieur. Cela dit, sa fonction la plus universelle est de servir de barrière sélective au passage des molécules en régulant l'entrée et la sortie de différentes substances selon les besoins de la cellule. Comment la membrane plasmique fait-elle pour tenir ces divers rôles? La réponse réside dans sa structure. La membrane plasmique est constituée d'une bicouche lipidique dans laquelle s'insèrent des protéines. Ces protéines membranaires sont des médiateurs entre les milieux extracellulaire et intracellulaire. Elles peuvent être, entre autre chose, des transporteurs qui sont de véritables portes d'entrées pour une cellule et ses organelles. Ils gèrent l'efflux et l'influx des composants vitaux comme les sucres, les acides aminés, les nucléotides et les ions.

## **1- LE TRANSPORT MEMBRANAIRE**

Le passage des molécules à travers les membranes des cellules s'effectue selon deux grands principes. Le premier est la **diffusion simple**. Pour certaines molécules liposolubles, le passage à travers la bicouche lipidique est possible. La seconde voie est celle des **transporteurs membranaires** qui fait appel aux protéines insérées dans la membrane pour augmenter la vitesse et la sélectivité du transport. Il existe plusieurs types de transport membranaire dont le premier est la **diffusion facilitée**. Elle permet de transporter une molécule en respectant son



gradient de concentration chimique ou électrochimique et ne nécessite aucune source d'énergie externe pour activer le transport, car il y a une dissipation d'énergie lorsqu'un soluté passe d'un milieu concentré vers un milieu dilué. (Hediger et al. 2004). On pense notamment aux différents GLUTs, transporteurs du glucose. Les canaux ioniques, les transporteurs de substrats organiques ou d'ions uniport, les pores membranaires et ionophores sont aussi englobés par cette catégorie.



**Figure 1.** Illustration des différents mécanismes de transport passif et actif exprimés au niveau de la membrane plasmique ou de la membrane des organelles intracellulaires. Tirée de Hediger *et al* (2004).

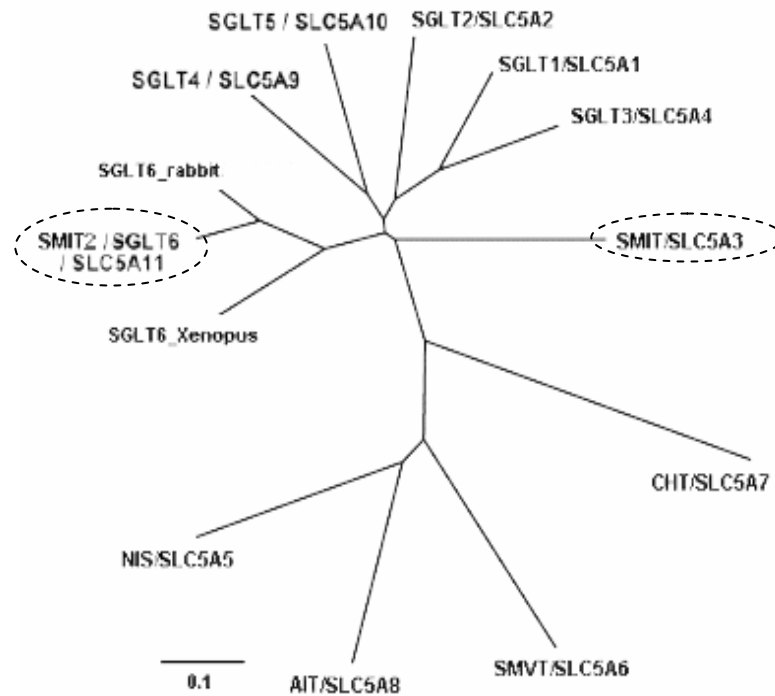
Certaines autres molécules sont transportées à l'encontre de leur gradient chimique ou électrochimique grâce à des transporteurs qui nécessitent une source d'énergie pour exercer leurs fonctions. La source motrice en question peut-être de nature chimique, ionique ou photonique. Ce second type de transport est nommé le **transport actif**. Il est qualifié de **primaire** si les transporteurs utilisent eux-mêmes l'ATP. C'est le cas des ATPases (pompes). Si les transporteurs utilisent l'énergie contenue dans un gradient électrochimique (ionique), dont l'existence est le résultat d'un transport actif primaire, alors le transport est dit **secondaire** (Hediger et al. 2004). C'est le cas des systèmes de transport couplé comme SGLT1 ou SMIT2 qui se servent de la force motrice du gradient de sodium pour faire pénétrer dans la cellule leurs substrats respectifs. Ces deux transporteurs font partie de la famille des SLC5 (SoLute Carrier 5).

## **2- LA FAMILLE DES SLC5**

Le groupe des SLC est un vaste regroupement de transporteurs membranaires qui englobe 298 membres organisés en 43 familles (Hediger et al. 2004). Pour ce qui est de leur structure moléculaire, ceux-ci sont habituellement constitués de nombreuses hélices alpha hydrophobes (8 à 14 par transporteur) et transmembranaires, liées les unes aux autres par des boucles hydrophiles intra- et extracellulaires (Hediger et al. 2004; Kanai and Hediger 2003). Malgré une certaine similitude, ces protéines sont capables de transporter une variété étonnante de solutés chargés ou neutres (Hediger et al. 2004).

La sous-famille SLC5, par exemple, est celle des co-transporteurs sodium/glucose. Toutes espèces confondues (animales et bactériennes), cette famille possède à elle seule 220 membres. Parmi ces derniers, 11 gènes humains correspondant à des transporteurs s'exprimant dans divers tissus sont déjà identifiés et neuf d'entre eux possèdent des fonctions connues (Wright et al. 2004).

Par exemple, SLC5A4 est un transporteur ionique activé par le glucose. SLC5A5, lui, est un transporteur d'anions et SLC5A7 est un transporteur de  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ /choline. Les six autres sont des transporteurs de type  $\text{Na}^+$ /substrat comme les transporteurs du glucose (SGLTs) ou ceux du *myo*-inositol (SMITs) (Wright and Turk 2003).



**Figure 2.** L'arbre phylogénique des 11 membres humains de la famille des transporteurs SLC5. Adaptée de Wright et Turk (2003).

Malgré toutes les études entreprises sur la large famille des SLC5, il subsiste encore quelques transporteurs dont les rôles sont inconnus. En 2002, le laboratoire du Dr Lapointe a identifié la fonction de l'un d'entre eux : rkST1.

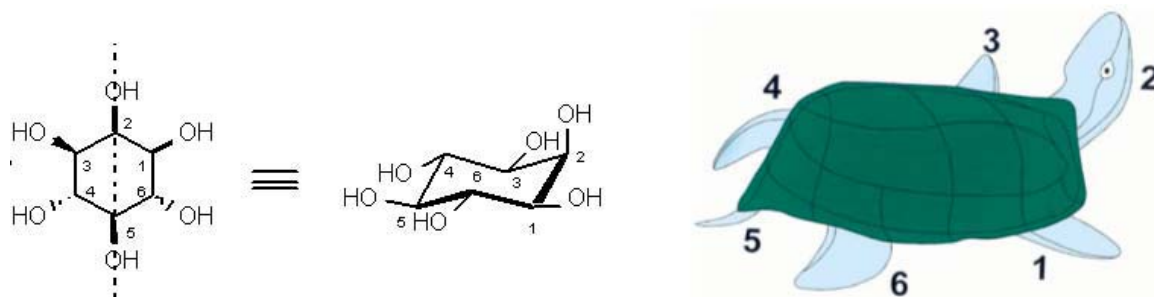
L'ADNc de rkST1, jusque là orphelin, a été exprimé dans des ovocytes de grenouille, *Xenopus laevis*, pour en tester le transport en voltage-clamp en présence de plusieurs substrats potentiels. Il a ainsi été démontré que ce

transporteur est spécifique au *myo*-inositol. Pour cette raison, il a été nommé Sodium *Myo*-inositol Transporter 2 ou SMIT2 (Coady et al. 2002).

### 3- LE *myo*-INOSITOL

#### 3.1- Historique et structure

En 1850, Scherer isole, à partir d'un tissu musculaire, un composé dont la formule empirique est celle d'un sucre ( $C_6H_{12}O_6$ ) (Fisher et al. 2002; Moris 2006; Scherer 1850). Quelques années plus tard, Bouveault établit que ce composé fait partie des neuf stéréoisomères possibles de cyclohexanehexol (Bouveault 1894; Moris 2006). Cette substance, aujourd'hui connue sous le nom de *myo*-inositol (MI), est le membre de la famille des inositols le plus répandu dans l'organisme humain. Le *myo*-inositol est constitué d'un cycle de six carbones et possède cinq hydroxyles en position équatoriale et un dernier en position axiale (Fig. 3). Sa similarité structurelle avec le glucose lui vaut d'être considéré comme pseudo-sucre (Moris 2006). Seulement contrairement au glucose, le MI ne possède pas de cycle héli-acétalique (pas d'oxygène à l'intérieur de la structure cyclique) (Moris 2006).



**Figure 3.** Structure du *myo*-inositol (1) plan de symétrie traversant les carbones 2 et 5, (2) conformation chaise du *myo*-inositol et (3) la tortue d'Agranoff.

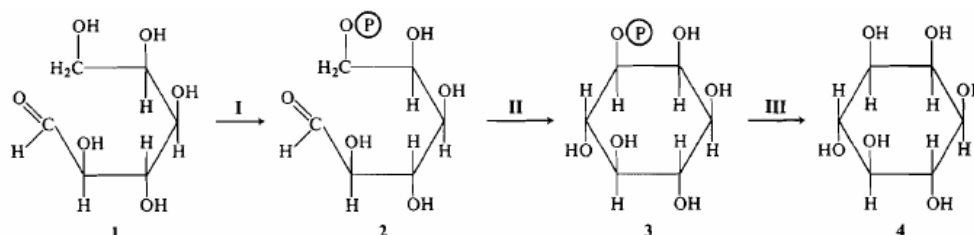
Les autres membres de la famille des inositols apparaissent dans la nature sous forme d'esters et peu d'entre eux existent dans l'organisme des mammifères. On estime la concentration du *scyllo*-inositol dans le cerveau humain à environ 400  $\mu\text{M}$  (Lien et al. 1994). On retrouve également dans le corps humain le *D-chiro*-inositol, mais il n'est présent qu'à l'état de traces (moins de 100nM) (Ostlund et al. 1993).

### 3.2- Origine

Le MI présent dans l'organisme tire sa provenance de trois sources : la biosynthèse, le recyclage et l'alimentation.

#### **3.2.1- La biosynthèse du *myo*-inositol**

On peut aisément obtenir du *myo*-inositol à partir de la cyclisation du glucose (Daughaday et al. 1955). Plus précisément, la synthèse *de novo* du *myo*-inositol se fait à partir du glucose-6-phosphate (G6P) et comporte deux étapes majeures (Hoffmann-Ostenhof O. and Pittner F. 1982). La première consiste en la condensation du G6P en cycle aldol. Catalysée par la *D*-inositol-3-phosphate synthétase, cette réaction a pour produit le *D*-inositol-3-phosphate (Ins3P). L'Ins3P est ensuite déphosphorylé par une autre enzyme, l'inositol monophosphatase (IMPase) pour obtenir le MI (Fisher et al. 2002). Il est à noter que cette dernière réaction est sensible au lithium (Lubrich et al. 2000).



**Figure 4.** Synthèse du *myo*-inositol à partir du *D*-glucose. L'Enzyme I est une hexokinase, l'enzyme II est la *myo*-inositol-1-phosphate synthétase et l'enzyme III est une phosphatase. Tirée de Hoffmann-Ostenhof et Pittner (1982).

La biosynthèse du *myo*-inositol a essentiellement été observée dans le foie, les testicules, le cerveau et les reins (Hauser and Finelli 1963). Ces derniers peuvent d'ailleurs en synthétiser jusqu'à 4g par jour (Fisher et al. 2002).

### **3.2.2- Le recyclage**

On peut obtenir le *myo*-inositol à partir des dérivés dont il est lui-même l'origine. Ainsi, une enzyme, l'inositol monophosphoestérase, peut produire du MI à partir des inositol-1-phosphate, inositol-3-phosphate, inositol-4-phosphate et inositol-6-phosphate (Moris 2006).

Le *myo*-inositol peut également être produit à partir des phospholipides ou à partir de l'acide phytique, aussi nommé pinitol, un équivalent phosphorylé du MI très abondant chez les plantes (Garcia-Perez and Burg 1991).

### **3.2.3- L'alimentation**

Environ 1g du *myo*-inositol quotidien présent dans l'organisme humain est d'origine alimentaire (Fisher et al. 2002; Holub 1986). Il est extrêmement rare qu'un individu soit atteint d'une carence de *myo*-inositol puisque son alimentation en est riche. Le MI est abondant dans les agrumes, les noix, le riz, les haricots, les germes de blé et bien d'autres plantes. L'inositol qui provient des plantes se présente souvent sous forme d'acide phytique ou phytate. Le phytate est un hexakisphosphate dérivant du *myo*-inositol dont la fonction principale chez les plantes est celle de ligand de métaux (Holub 1986). Une fois dans l'intestin, il est dégradé par des phytases (ingérées ou présentes dans la muqueuse intestinale) pour absorption. Autrement, le MI qui provient des poissons, viandes et produits laitiers est souvent sous forme de sucre libre (Empson KL et al. 1991; Nielsen et al. 2004).

### 3.3- Concentration et localisation

Les fonctions ubiquitaires du *myo*-inositol forcent les cellules de plusieurs organes à accumuler cette molécule. On pense par exemple aux cellules du foie, de la rate ou de la thyroïde comme le prouve des expériences d'injection intrapéritonéale de MI radioactif entreprises sur le rat (Garcia-Perez and Burg 1991; Lewin et al. 1976). Cela dit, chez l'homme, les concentrations les plus élevées de *myo*-inositol sont observées dans le cristallin, les reins et le système nerveux central. Dans le cerveau, on estime la concentration de MI à environ 6 mM (Kim et al. 2005). Il est à noter qu'en plus de ses transporteurs spécifiques, on retrouve dans le cerveau tout ce qui est nécessaire afin de procéder à la synthèse de ce carbohydrate (Fisher et al. 2002). Cette synthèse *de novo* a précisément lieu dans les péricytes des capillaires du cerveau (Berry et al. 1995). La concentration du MI dans le plasma est dérisoire et semble osciller entre 30 et 70  $\mu$ M (Beck et al. 1998; Burg 1997; Burger-Kentischer et al. 1998; Dolhofer and Wieland 1987; Handler and Kwon 1996) alors que sa concentration cytoplasmique dans la plupart des cellules de mammifère est de 5 à 500 fois plus importante que dans le fluide extracellulaire (Berry et al. 1995). Par exemple, elle va jusqu'à 30 mM dans les neurones ou les cellules de la médullaire rénale (Dolhofer and Wieland 1987; Fisher et al. 2002; Novak et al. 1999). On sait également que sa concentration dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) est pratiquement 10 fois plus élevée que sa concentration plasmatique (Spector and Lorenzo 1975) soit environ 400  $\mu$ M (Lubrich et al. 2000; Spector 1976). Ceci est loin d'être une liste exhaustive des organes et tissus où l'on retrouve le MI, mais elle donne un aperçu de l'ordre des concentrations dans différents types cellulaires et les fonctions de ce pseudo-sucre expliquent, dans une certaine mesure, les variations.

### 3.4- Rôles physiologiques du *myo*-inositol

La majeure partie des cellules eucaryotes privées de *myo*-inositol ne peuvent survivre, ce qui souligne la portée de cette petite molécule dans l'organisme (Eagle et al. 1960; Holub 1982; Ju et al. 2004; Moris 2006; Shaltiel et al. 2004). Quelques uns des rôles du MI qui démontrent son importance seront abordés dans les paragraphes suivants, mais bien d'autres fonctions restent à être déterminées.

#### **3.4.1- Osmolyte compatible**

Le rôle d' « osmolyte compatible » du *myo*-inositol est bien connu. En tant que molécule organique non chargée, le *myo*-inositol est utilisé par les cellules soumises à un choc hypertonique pour contrôler leur volume et rétablir l'équilibre osmotique sans altérer leur fonctionnement. Contrairement à une accumulation d'ions qui dérèglerait l'activité des enzymes et le potentiel membranaire, le *myo*-inositol protège les cellules sans en perturber la machinerie métabolique. On observe particulièrement la fonction d'osmolyte du MI dans les cellules du cerveau qui ont besoin de réguler leur volume avec précision et dans la médullaire rénale où les cellules sont sujettes à de grandes variations d'osmolarité (Burg 1997).

#### **3.4.2- Chaperon chimique**

Le *myo*-inositol lorsqu'il est présent à de fortes concentrations (de l'ordre de 100 mM et plus) stabilise les liens hydrophobes (Back et al. 1979; Gekko 1981). Cette stabilisation peut aider certaines protéines mutantes à passer le processus de « contrôle de qualité » qui dirige les protéines mal repliées vers le protéasome et la dégradation. Ainsi, le canal CFTR («cystic fibrosis transmembrane regulator») atteint de la mutation  $\Delta F508$  serait un exemple de



protéine bénéficiant de ce sauvetage, mais uniquement dans le rein où beaucoup d'osmolytes dont le MI sont présents (Howard et al. 2003).

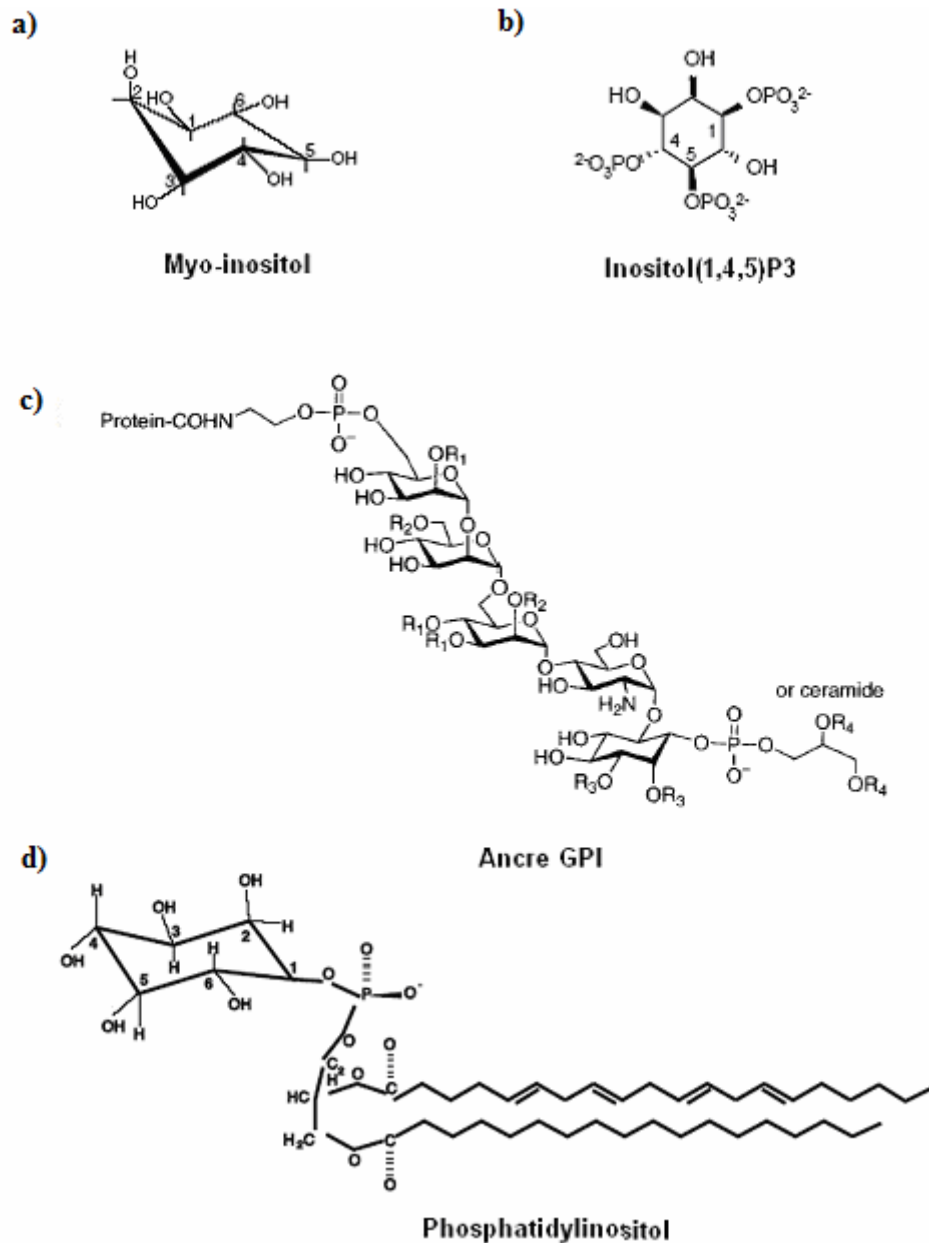
### 3.4.3- Précurseur de molécules vitales

Le *myo*-inositol est à l'origine de tous les composés contenant de l'inositol dans l'organisme. Ces nombreux dérivés sont d'une diversité structurelle qui suggère une grande variété de fonctions biologiques.

Phosphorylé, le *myo*-inositol donne naissance au groupe des inositols phosphates (InsP). Cette large famille est impliquée, entre autres, dans la communication cellulaire par le biais des mécanismes de transduction du signal et de la signalisation intracellulaire. Le *D-myo*-inositol 1,4,5-tri(phosphate) ou Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, par exemple, a un rôle de second messenger responsable de la libération du calcium séquestré dans le réticulum endoplasmique (Colodny and Hoffman 1998; Streb H 1983). Dans le noyau, les InsP servent de médiateurs à des facteurs de croissance et contribuent ainsi à la régulation de l'expression génique (Cocco et al. 2004; Ju et al. 2004). Il existe également des dérivés hyperphosphorylés comme les polyphosphates de diphosphoinositol. Synthétisé dans le système nerveux central (SNC), ce composé semble capable de réguler plusieurs processus biologiques tels l'apoptose, le trafic vésiculaire, la transcription ainsi que la réparation d'ADN (Choi et al. 2005).

Couplé à un acide gras et à une molécule de glycérol, le *myo*-inositol donne naissance aux phosphatidylinositols (PtdIns). Les PtdIns entrent dans la composition de la membrane plasmique (Ju et al. 2004; Michell 2008), mais sont aussi très impliqués dans la transmission du signal au niveau du SNC (Fisher et al. 2002). Certains d'entre eux, comme le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>, sont induits par la cellule en réponse au stress hyperosmotique (Dove et al. 1997). D'autres PtdIns permettent la régulation du trafic membranaire pour les voies sécrétoires (Michell 2008). Le

PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> est utilisé, quant à lui, pour l'endocytose, l'exocytose et aide au maintien de l'intégrité du cytosquelette (Michell 2008). Les phospholipides issus de l'inositol semblent même être capables de restaurer l'activité de la Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase lorsque celle-ci est réduite par un processus d'activation endogène (Garcia-Perez and Burg 1991; Mandersloot et al. 1978).



**Figure 5.** Structures du (a) myo-inositol, de (b) l'Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, (c) de l'ancre GPI et du PtdIns.

Aussi, les PtdIns et les IP sont nécessaires à d'autres processus biologiques comme la phagocytose, la pinocytose ou encore la liaison et l'activation des protéines qui rattachent le cytosquelette à la membrane plasmique (Czech 2000; Janmey and Lindberg 2004; Sechi and Wehland 2000; Takenawa and Itoh 2001).

Couplé aux sucres, le *myo*-inositol donne naissance à plusieurs types de molécules en fonction des additions impliquées. L'exemple le plus connu est sans doute le glycoposphatidyl inositols (GPI) qui sert de point d'ancrage (ancre GPI) à certaines protéines membranaires (Lindberg et al. 2002). Ces ancras peuvent aussi agir comme signaux transmembranaires ou intracellulaires (Colodny and Hoffman 1998).

Les différents rôles tenus par le MI et ses dérivés démontrent à quel point ce constituant est fondamental pour les cellules. Les maladies qui découlent du dérèglement du métabolisme du *myo*-inositol constituent une autre preuve de son importance.

### 3.5- Pathologies

Tout changement de disponibilité de MI dans le SNC peut altérer la signalisation cellulaire et, par extension, mener au développement de désordres neurologiques (Colodny and Hoffman 1998). En effet, un nombre conséquent d'études suggère qu'il existe une corrélation entre des fluctuations du taux de *myo*-inositol dans le cerveau et la physiopathologie de certaines maladies psychiatriques comme les troubles bipolaires, la schizophrénie (Kim et al. 2005), l'encéphalopathie hépatique (Tandon 2003) et la maladie d'Alzheimer au cours de laquelle les taux de PtdIns changent de manière significative (Stokes and Hawthorne 1987).

On sait depuis longtemps (1949) que les sels de lithium ont un effet thérapeutique sur les personnes atteintes de troubles bipolaires (Marmol 2008). Le MI peut être impliqué dans ce type de maladie puisque le lithium a un rôle à jouer dans le métabolisme des inositols (Vaden et al. 2001; Williams and Harwood 2000). D'ailleurs l'hypothèse retenue quant au mode d'action du  $\text{Li}^+$  est que celui-ci inhiberait plusieurs phosphatases, dont l'IMPase et l'inositol polyphosphatase (Manji et al. 2001). Cela aurait pour effet de réduire le taux de *myo*-inositol dans le lobe frontal et de diminuer significativement la sévérité de la phase dépressive des patients (Moore et al. 1999). Plus précisément, la conséquence qui semble découler de cette réduction est la baisse de l'activation trop grande des voies de signalisation IP qui semblent dérégulées dans ce type de pathologie (Lubrich and van Calker 1999).

La localisation du gène codant pour SMIT1 sur le chromosome 21 explique la surexpression de ce transporteur dans le cas de la trisomie 21 (Berry et al. 1995). C'est probablement par ce mécanisme que le flux de MI dans le cerveau est anormalement augmenté (Shetty et al. 1999). D'ailleurs, les souris Ts65Dn, un modèle génétique pour le syndrome de Down, présentent un taux de MI clairement plus élevé dans la partie frontale du cortex, dans l'hippocampe et dans la pédoncule cérébrale (Shetty et al. 1999). Il semble également clair que cette augmentation touche le liquide céphalo-rachidien (LCR) et qu'elle provoque des perturbations du potentiel membranaire causées par l'entrée excessive de sodium par le biais du transport actif secondaire du MI (Berry et al. 1995). Acevedo *et al* (1997), pour leur part, avancent la possibilité que la concentration de MI dans le cerveau et le LCR du fœtus atteint soit plus élevée de 50% par rapport à la normale (Acevedo et al. 1997). Le taux élevé de MI semble jouer un rôle dans le retard mental observé chez les sujets trisomiques (Shetty et al. 1999). Il apparaît même que l'étendue de la hausse de MI dans le cerveau de jeunes adultes trisomiques est liée à l'altération des performances cognitives (Shetty et al. 1999). On pense par ailleurs qu'une partie de la pathogénèse du syndrome de Down (trisomie 21) est

liée au rôle d'osmolyte du *myo*-inositol dans le système nerveux (Fisher et al. 2002). Il est à noter que le cerveau n'est cependant pas le seul organe touché. Le foie et le muscle squelettique présentent également une accumulation excessive de MI (Shetty et al. 1999). Fruen et Lester (1990) ont aussi constaté que le transport de MI dépendant du sodium était augmenté dans les fibroblastes de la peau des patients trisomiques (Fruen and Lester 1990).

En plus des problèmes psychiatriques, d'autres conditions pathologiques comme les œdèmes cérébraux ou bien l'hypernatrémie sont associés à une augmentation du taux de *myo*-inositol dans le cerveau. On constate une hausse de 65% du MI chez les rats atteints d'hypernatrémie sévère ou chronique (Lien et al. 1990, 1991; Yamashita et al. 1997).

Le cerveau n'est pas le seul organe touché par ces dérèglements et il est à noter qu'une baisse du taux de MI peut s'avérer aussi problématique qu'un excès. En effet, une étude menée sur des gerbilles suggère qu'une alimentation dépourvue de MI est associée à certaines conditions pathologiques telle la lipodystrophie de l'intestin grêle (Chu and Hegsted 1980) due à la perturbation du métabolisme hépatique des triglycérides (Holub 1982). On soupçonne également que, lors d'une lipodystrophie, le transport lymphatique des lipides par la muqueuse intestinale est défectueux, car on observe la baisse du taux de chylomicrons dans le plasma (Chu and Hegsted 1980). Il est possible qu'une réduction du taux de MI en menant à la baisse de la synthèse d'InsP soit responsable de la baisse de l'assemblage et de la sécrétion des chylomicrons (Holub 1986).

Le *myo*-inositol pourrait aussi tenir un rôle dans les complications secondaires au *diabetes mellitus* telles les neuropathies et les néphropathies diabétiques (Hansen 2001; Hotta 1997). En effet, il semblerait que le dérèglement du métabolisme de l'inositol, en affectant les activités de la phosphokinase C (PKC) et de la pompe à sodium et à potassium ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase), ait un effet

pathogène lié aux néphropathies diabétiques (Chau et al. 2005). Cela dit, les détails du mécanisme d'action sont encore inconnus (Chau et al. 2005). On constate également des modifications de ce métabolisme dans la sclérose en plaques (Fernando et al. 2004). Pour un aperçu plus complet des troubles liés à la fluctuation du taux des inositols, consultez la revue élaborée par Pendaries (Pendaries et al. 2003).

Aujourd'hui, on explore les voies thérapeutiques offertes par le *myo*-inositol. L'administration d'inositol à des rats semble augmenter la concentration de ces composés dans le cerveau (Kim et al. 2005; Patishi et al. 1996), donnant un espoir pour palier aux troubles dus à un manque de ces molécules. Pour ce qui est de l'homme, l'administration d'inositol semble améliorer les symptômes des dépressifs et des personnes souffrant de troubles de panique (Kim et al. 2005). De plus, des études évaluant l'effet thérapeutique de l'inositol indiquent qu'il peut être efficace pour le traitement de l'Alzheimer, des troubles de panique, des troubles obsessionnel-compulsif, de l'autisme ainsi que des troubles de stress post-traumatique (Colodny and Hoffman 1998). Donner par voie orale un stéréoisomère du MI à des souris servant de modèle pour la maladie d'Alzheimer a permis de constater la diminution significative de l'agrégation du peptide  $\beta$ -amyloïde et de certains phénotypes de la maladie (McLaurin et al. 2006). Il est également démontré qu'un supplément alimentaire en MI pouvait contrecarrer le diabète embryopathique (Reece et al. 1998; Wentzel et al. 2001). Aussi, l'utilisation du MI pour soulager ou réduire les réactions secondaires causées par le traitement au  $\text{Li}^+$  est prometteuse (Colodny and Hoffman 1998).

## **4- TRANSPORTEURS**

La concentration de MI intracellulaire dans les cellules de mammifères peut atteindre jusqu'à 500 fois celle de sa concentration plasmatique (30 $\mu$ M) (Fisher et al. 2002; Shetty et al. 1995). Par exemple, dans les cellules de Purkinje du cervelet du chat, la concentration cytoplasmique de MI approche les 10-20 mM (Fisher et al. 2002; Godfrey et al. 1982). Ces valeurs sont assez similaires à celles obtenues avec des cultures cellulaires de neurones humains de la lignée NT2-N (Novak et al. 1999). Pour rendre possible le transfert de quantités aussi importantes de MI vers l'intérieur de la cellule, des mécanismes de transport actif sont absolument nécessaires. Comme de fait, l'importation du *myo*-inositol à l'intérieur de la cellule est assurée par trois transporteurs. Deux d'entre eux sont des co-transporteurs liés au transport du sodium (SMIT1 et SMIT2) et le troisième (HMIT) est lié au transport de protons.

### **4.1- SMIT1**

Le « Sodium-*myo*-inositol transporter » appelé SMIT ou SMIT1 est le premier système de transport du MI mis en évidence. Il a été isolé à partir d'une lignée cellulaire rénale, les Madin-Darby canine kidney (MDCK), et on doit son identification à Kwon *et al* en 1992. Selon leur étude, la protéine possède 718 acides aminés avec une masse relative de 79,5 kDa et comprendrait 14 domaines transmembranaires. Le gène qui code pour cette protéine se situe sur le locus q22 du chromosome 21 (Berry et al. 1995). Aujourd'hui on sait que le SMIT1 canin est fortement similaire au SMIT1 humain (Berry et al. 1995; Fisher et al. 2002) et présente une homologie de séquence de 46% avec le co-transporteur Na<sup>+</sup>/glucose humain SGLT1 (Kwon et al. 1992). Il fait partie de la famille des SLC5 en tant que SLC5A3 et, comme beaucoup de membres de cette famille de transporteur, il se sert du gradient sodium selon une stœchiométrie de 2Na<sup>+</sup> / 1MI pour remplir ses

fonctions. Quoique le *myo*-inositol soit son substrat préférentiel (ovocytes,  $K_m = 33 \mu\text{M}$  et  $V_{\text{max}} = 1,170 \text{ fmol/min/ovocyte}$ ) (Kwon et al. 1992), SMIT1 est capable de transporter le D-glucose, le L-glucose ainsi que le L-fucose (Hager et al. 1995). Selon toute vraisemblance, son rôle physiologique est d'assurer l'osmorégulation par l'accumulation de MI dans la cellule en cas d'hyperosmolarité (Fisher et al. 2002).

Un certain nombre de facteurs peuvent réguler l'activité et l'expression de SMIT1; le mieux décrit d'entre eux est le stress osmotique. En effet, l'hypertonicité provoque l'augmentation du taux d'une protéine nucléaire, la «tonicity-responsive enhancer binding protein» (TonEBP) (Rim et al. 1998). Celle-ci peut se lier à cinq régions activatrices («enhancers») en amont du promoteur du gène codant pour SMIT1. Elle mène ainsi à l'augmentation de la transcription du gène en question et, par extension, au nombre de transporteurs effectifs. Ce type de régulation est particulièrement important dans la médullaire rénale où l'osmolarité interstitielle fluctue entre l'isotonicité (300 mOsm) et des valeurs pouvant atteindre 1200 mOsm chez l'homme (Marieb 1999). Dans certains tissus, SMIT1 semble aussi être régulé par l'inositol alors que dans d'autres il lui reste insensible. Des cultures d'astrocytes provenant de différentes régions du cerveau (cortex, diencéphale cervelet, hippocampe, tegmentum) le prouvent. Les astrocytes affichent tous une baisse de transport de MI lorsqu'ils ont subi une exposition chronique à des concentrations croissantes d'inositol sauf ceux issus du diencéphale (Lubrich et al. 2000). Il est peut-être également régulé par la PKC, car l'activation de celle-ci semble provoquer l'inhibition du transporteur dans les astrocytomes humains (Novak et al. 2000). Par ailleurs, SMIT1 est pH-dépendant et s'inhibe progressivement avec une baisse de pH (Matskevitch et al. 1998).

Pour ce qui est de sa localisation, il n'existe malheureusement pas de bon anticorps commercial contre SMIT1. C'est par la technique d'immunobuvardage Northern (Northern blot), en utilisant l'ADNc de SMIT1 comme sonde, qu'on a pu



identifier plusieurs transcrits de taille variable (1 à 13,5kb d'ARN) dans différentes régions. SMIT1 a ainsi été identifié dans les lentilles oculaires, les cellules endothéliales et au niveau du SNC (Gamba 2001). Toujours grâce à l'immunobuvardage Northern, il a également été détecté dans les membranes basolatérales de cellules épithéliales rénales (Yamauchi et al. 1991). Par hybridation *in situ*, on a pu déterminer que dans le rein, SMIT1 était surtout présent dans la médullaire rénale, la partie ascendante de l'anse de Henlé puis, en plus faible quantité, dans la partie médullaire du tubule collecteur (Bissonnette et al. 2004; Yamauchi et al. 1995).

#### 4.2- HMIT

Le «H<sup>+</sup>-*myo*-inositol transporter» ou HMIT, est un transporteur de type symport identifié par Uldry *et al.* en 2001. C'est une protéine de 618 acides aminés, comprenant 12 domaines transmembranaires et une masse variant entre 75 et 90 kDa selon le degré de glycosylation (Fisher et al. 2002). Malgré son action en tant que co-transporteur, il semble avoir la même topologie que les transporteurs facilités du glucose, les GLUTs. On l'associe souvent comme homologue à cette famille d'autant plus que les motifs de séquence importants pour le transport du glucose que l'on retrouve dans les GLUTs y sont conservés (Uldry et al. 2001). Malgré cette ressemblance, HMIT ne transporte pas le glucose (Uldry et al. 2001). Contrairement à SMIT1, avec lequel il ne semble avoir aucune homologie de séquence, HMIT atteint l'apogée de son activité à bas pH (pH 5) (Uldry et al. 2001). Quoique sa fonction physiologique ne soit pas encore clairement définie, il est possible qu'il serve de mécanisme supplémentaire pour le maintien de l'homéostasie du *myo*-inositol. Il apparaît qu'en fonction des conditions de pH et d'osmolarité, c'est soit HMIT, soit ses homologues de fonction SMITs (dans les tissus où il y a co-localisation) qui prélèvent le MI du milieu extracellulaire (Uldry et al. 2001). L'expression de HMIT est dépendante

de l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium, de la dépolarisation cellulaire et de l'activation de la PKC (Uldry et al. 2004).

On retrouve HMIT essentiellement dans le cerveau et il est détecté autant dans les neurones que dans les astrocytes (Uldry et al. 2001). La localisation de ce transporteur est principalement intracellulaire. Entreposé dans des vésicules, HMIT est rapidement libéré à la surface des membranes cellulaires à la suite d'une des stimulations citées plus haut telle la dépolarisation cellulaire (Uldry et al. 2004).

#### 4.3- SMIT2

C'est en essayant de caractériser des gènes de transporteurs qui n'ont pas déjà été clonés que Hitomi et Tsukagoshi (1994) ont entrepris le clonage de l'ADNc de rkST1. Ils ont procédé par PCR en utilisant des amorces dégénérées reconnaissant des motifs de séquence conservés chez les transporteurs de la famille  $\text{Na}^+$ /glucose (SLC5). Pourtant, ce n'est qu'en 2002 que la fonction de ce fragment de gène orphelin a été établie par Coady *et al* (2002). rkST1 code pour un co-transporteur de *myo*-inositol dépendant du sodium que Coady *et al* (2002) ont nommé SMIT2. Ce transporteur est également connu sous les noms SGLT6 ou encore SLC5A11 (Wright and Turk 2003). Le SMIT2 cloné à partir du rein de lapin présente une similitude de séquence de 43% avec le SMIT1 canin et une homologie de 49% avec le SGLT1 de lapin (Coady et al. 2002). Les analyses de séquences suggèrent que cette protéine comporte 674 acides aminés ainsi que 12 à 14 passages transmembranaires. Comme SMIT1, SMIT2 est électrogénique et transporte deux ions  $\text{Na}^+$  pour une molécule de *myo*-inositol vers l'intérieur de la cellule ( $2\text{Na}^+/1\text{MI}$ ) (Bourgeois et al. 2005). SMIT2 fait preuve de stéréospécificité en ne transportant que les isomères D. On a pu détecter son ARN<sub>m</sub> chez l'humain, dans le cerveau, le cœur, le muscle squelettique, le foie, le placenta, les leucocytes, les poumons et la rate (Barak et al. 1996; Hitomi and Tsukagoshi 1994; Poppe et al. 1997). Il est également présent dans le rein, plus particulièrement au niveau du

cortex rénal (Bissonnette et al. 2004; Lahjouji et al. 2007). Jusqu'à présent, on croyait SMIT2 absent de l'intestin (Kwon et al. 1992; Uldry et al. 2001), mais notre présente étude contredit cette information.

## **5- LA PRÉSENTE ÉTUDE**

### 5.1- OBJECTIF

La découverte du second co-transporteur  $\text{Na}^+/\text{myo-inositol}$  (SMIT2) explique l'hétérogénéité rapportée quant aux résultats des études de transport de ce composé. Il est vrai que SMIT1 et SMIT2 partagent quelques similitudes fonctionnelles. Ainsi, ils possèdent tous les deux une grande affinité pour le *myo*-inositol et sont tous deux dépendants du sodium pour le transport du MI selon une stœchiométrie de  $2\text{Na}^+/1\text{MI}$ . Cependant, certaines différences les distinguent. Dans le rein de lapin, SMIT1 est majoritairement exprimé dans la médulla, alors que SMIT2 est surtout retrouvé dans le cortex. On sait aussi que seul SMIT2 transporte le *D-chiro*-inositol alors que seul SMIT1 peut transporter le L-fucose. Grâce à cette spécificité différentielle, il nous est possible de discriminer la part du transport effectuée par chacun des deux transporteurs.

Alors que SMIT1 est connu depuis un certain moment et qu'il est largement étudié, la découverte de SMIT2 est relativement récente et bien des aspects de sa physiologie restent encore à élucider. Ce travail vise à caractériser le co-transporteur SMIT2 *in situ* dans les membranes en bordure en brosse (BBMv) d'intestin de rat et de rein de lapin. Cette caractérisation consiste en la définition de certains paramètres cinétiques ( $V_{\max}$ ,  $K_m$ ,  $K_i$ ) qui sont spécifiques au transporteur. Une partie de ce projet prolonge la caractérisation de SMIT2 dans un autre modèle d'étude, les ovocytes de grenouille. Cette étape supplémentaire apporte, d'une part, la confirmation des valeurs obtenues sur BBMv et, d'autre

part, permet d'approcher d'une nouvelle façon le cas particulier de l'inhibition qu'exerce le glucose sur le transport de MI par SMIT2.

### 5.2- STRATÉGIE ET PARAMÈTRES CINÉTIQUES

Des études antérieures ont déjà porté sur la mesure du transport de MI dans les BBMv (Hammerman et al. 1980; Scalera et al. 1991), mais la méconnaissance de la dualité des transporteurs de MI à cette époque ne nous permet pas aujourd'hui d'en identifier les acteurs réels. L'une des idées directrices de ce projet est d'exploiter la possibilité d'inhiber chacun des transporteurs pour évaluer la place de chacun dans les deux tissus.

Lors de l'étude d'une fonction de transport, et donc du transporteur membranaire responsable, il est très utile d'établir les paramètres cinétiques de ce système, car ceux-ci peuvent se révéler un très bon indicateur du rôle physiologique de la protéine concernée. Les principes de base de la cinétique des transporteurs sont les mêmes que ceux des enzymes. Dans le cas présent, il s'agit donc de fixer les valeurs de  $K_m$  et de  $V_{max}$  correspondant à SMIT2. Il faut pour cela entreprendre diverses études cinétiques en établissant au départ des conditions de vitesse initiale qui nous permettront de quantifier le transport en suivant les concepts de la cinétique michaelienne. En pratique, ceci se traduit par une période linéaire initiale sur un graphique d'accumulation du substrat en fonction du temps.

Les différents paramètres cinétiques sont mis en relation par l'équation de Michaelis-Menten :

$$V_i = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

- $V_i$  : Vitesse (en  $\mu\text{mol}/\text{min}$ )
- $V_{max}$  : Vitesse maximale (en  $\mu\text{mol}/\text{min}$ )

- $[S]$  : Concentration en substrat (en mol/L)
- $K_m$  : Constante de Michaelis spécifique du transporteur

La vitesse maximale, symbolisée par  $V_{max}$ , est une valeur qui définit l'efficacité du transporteur. Elle exprime la vitesse de transport d'un substrat lorsque celui-ci est en condition saturante. Comme la concentration de substrat dépasse largement l'affinité du transporteur pour celui-ci, le transport atteint une valeur maximale et ne peut aller au-delà.

$K_m$  est la constante de Michaelis et représente la concentration de substrat qui génère un taux de transport équivalent à la moitié de la vitesse maximale ( $v_i = V_{max}/2$ ). Elle traduit l'affinité du transporteur pour son substrat. Ainsi, plus la valeur de  $K_m$  est petite, plus l'affinité du transporteur pour son substrat est grande.

### 5.3- SUBSTRATS ET INHIBITEURS UTILISÉS

Pour pousser plus avant la caractérisation d'un transporteur, en apprendre davantage sur son fonctionnement et espérer déduire son rôle physiologique, il est utile de le confronter à divers substrats ou inhibiteurs potentiels. On peut, selon le même principe que le  $K_m$ , calculer la constante d'inhibition  $K_i$  qui reflète l'affinité d'un inhibiteur pour le transporteur. Dans le cas d'une inhibition compétitive, le  $K_i$  est plus précisément la concentration à laquelle un inhibiteur réduit de deux fois l'affinité d'un substrat. En termes pratiques, c'est aussi la concentration d'inhibiteur, en absence de substrat, pour laquelle la moitié des transporteurs sont occupés. Ainsi, plus la valeur de  $K_i$  est petite, plus l'affinité de l'inhibiteur pour son transporteur est grande. Comme il s'agit d'une concentration, la valeur de  $K_i$  est exprimée en mole par litre (mol/L). La section suivante présente les substrats et inhibiteurs potentiels utilisés dans cette étude ainsi que les explications quant au choix de ceux-ci.

Le **myo-inositol (MI)** est le substrat spécifique et commun à SMIT1 et SMIT2. Une concentration croissante de MI non-radioactif (froid) exercera une inhibition compétitive progressive sur le transport de MI radioactif. Le type de courbe qui en découle permet de calculer le  $K_m$  et donc d'évaluer l'affinité d'un transporteur pour son substrat.

La **phlorizine (Pz)** est un inhibiteur spécifique bien connu de SGLT1 (Diedrich 1965). Outre son action sur SGLT1, nous cherchons à constater l'effet qu'elle peut avoir sur les transporteurs relativement homologues que sont les SMITs.

L' **$\alpha$ -méthylglucose (AMG ou  $\alpha$ MG)** est un substrat spécifique à SGLT1 (Hager et al. 1995; Lee et al. 1994). Contrairement au glucose, ce composé n'est pas reconnu par SMIT1 et SMIT2 (Coady et al. 2002; Hager et al. 1995). Ainsi, l'utilisation d'une grande concentration d'AMG froid n'aura qu'un seul objectif, permettre d'occuper complètement SGLT1 afin d'en évaluer la contribution éventuelle au transport de MI.

Le **D-chiro-inositol (DCI)** est un épimère du *myo*-inositol. Il est également un substrat spécifique de SMIT2 qui n'est pas transporté par SMIT1. Cette particularité nous permettra de l'utiliser pour inhiber le transport de MI chaud effectué par SMIT2 et estimer la part de transport effectué par SMIT1 dans un tissu donné.

Le **L-fucose (Fuc)**, à l'opposé du DCI, est un substrat spécifique de SMIT1 non transporté par SMIT2. Il servira de contrôle pour confirmer les résultats obtenus par inhibition de SMIT2 au DCI

Le **L-chiro-inositol (LCI)** est un stéréoisomère du DCI qui n'est pas transporté par SMIT2 puisque ce dernier est stéréospécifique aux formes D.

Le **D-glucose (Glc)** est le substrat physiologique de SGLT1 et semble être aussi transporté par SMIT2 (Coady et al. 2002). Il peut être intéressant d'investiguer la relation d'inhibition ambiguë que celui-ci entretient avec le transporteur du MI.

Le **2-déoxy-D-glucose (2DG)** est un substrat spécifique aux GLUTs. L'utilisation de grandes concentrations de 2DG froid permettra d'inhiber ces voies de transport (Rand et al. 1993) et ainsi évaluer l'implication possible de ceux-ci dans le transport de MI.

La **phlorétine (Pt)** est un inhibiteur spécifique des systèmes de transport facilité du glucose (GLUTs).

Le **potassium ( $K^+$ )** : le sodium est nécessaire à SMIT2 et SMIT1 pour le transport du MI à travers la membrane. Si l'on remplace le sodium par le potassium dans le milieu externe, on perd la force motrice des deux co-transporteurs. Ceci nous permet d'évaluer la part de transport effectuée autrement que par les transporteurs SMIT1 ou SMIT2.

#### 5.4- MODÈLES À L'ÉTUDES

Pour ces expériences, deux modèles d'étude se sont imposés à nous. Les ovocytes de Xénope et les vésicules de membranes en bordure en brosse ou les BBMv.

##### **5.4.1- Les ovocytes et l'électrophysiologie**

La méthode de choix pour étudier une protéine membranaire est d'injecter l'ARN<sub>m</sub> qui l'encode dans des ovocytes de grenouilles (*Xenopus laevis*). Les œufs en question ont la capacité de produire les protéines exogènes en surabondance et ces dernières étant membranaires, elles iront se loger à la surface de l'ovocyte.

Comme notre transporteur est électrogénique, il sera possible d'en étudier les courants  $\text{Na}^+$  macroscopiques grâce à la méthode du voltage imposé à deux électrodes. Chaque fois que la protéine laisse passer un substrat, elle génère un courant  $\text{Na}^+$  associé facile à mesurer. À partir de ces courants, on peut extraire des courbes courant-voltage (I/V) qui sont propres à chaque transporteur électrogène et permettent d'en caractériser la fonctionnalité.

#### **5.4.2- Les vésicules de membrane en bordure en brosse**

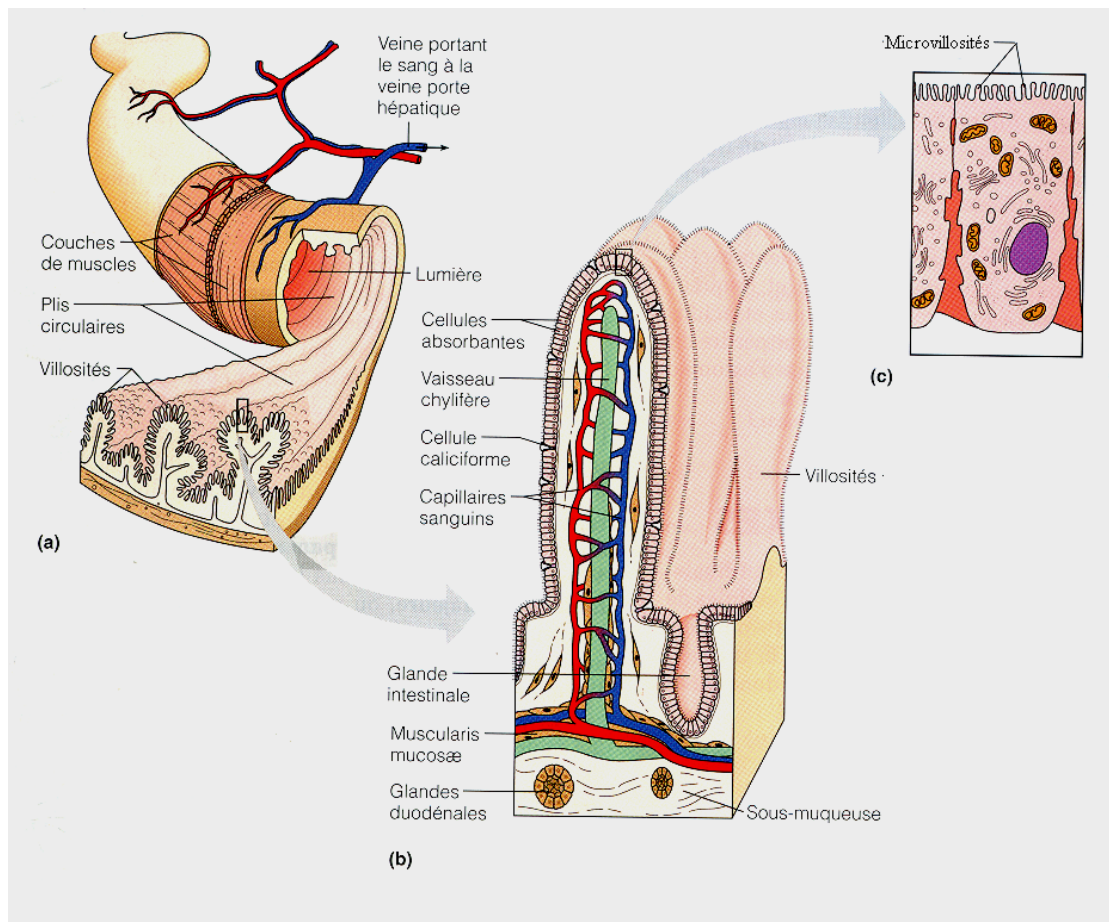
En 1965, Hauser parvient à mesurer le transport actif du MI sur des coupes de cortex de rein (Hauser 1965). Cinq années plus tard, Caspary et Crane détectent l'existence d'un mécanisme du même genre dans l'intestin grêle de hamster (Caspary and Crane 1970a, 1970b). Ainsi, la littérature existante laisse entendre que le MI doit être absorbé de l'alimentation au niveau de l'intestin et réabsorbé du filtrat glomérulaire dans le rein. D'ailleurs le MI est d'ordinaire pratiquement absent de l'urine et sa présence y est plutôt un signe pathologique. Les cellules responsables de cette absorption dans le rein et dans l'intestin disposent de membranes en bordure en brosse à leur pôle apical pour augmenter leur efficacité. Ce sont ces membranes, les BBM, qui nous servent de principal modèle d'étude. Pour les obtenir, il suffit d'isoler la muqueuse intestinale ou le cortex rénal. On les soumet à un broyage mécanique dans un tampon d'homogénéisation spécifique pour briser les tissus et les cellules (voir les articles pour plus de détails). À l'homogénat obtenu on rajoute du  $\text{MgCl}_2$  (ou du  $\text{CaCl}_2$ ). Les ions divalents interagissent avec toutes les membranes biologiques qui sont chargées négativement et permettent leur précipitation. Seules les BBM qui n'ont pas de charge font exception. Il suffit ensuite d'une série de centrifugations pour séparer les BBM des autres membranes et obtenir une fraction ne contenant que des vésicules apicales en bordure en brosse (BBM) des tissus visés. Cette méthode qui a fait ses preuves permet d'obtenir des fractions relativement pures de BBM (Biber



et al. 1981). Pour mieux visualiser la provenance de ces BBMv, il faut se pencher sur l'anatomie intestinale et rénale.

#### 5.4.2.1- L'anatomie intestinale

C'est dans l'intestin grêle que la majorité des nutriments apportés par l'alimentation sont absorbés. Pour mieux servir cette fonction d'absorption, l'intestin comporte trois modifications structurales : les plis circulaires, les villosités intestinales et les microvillosités.



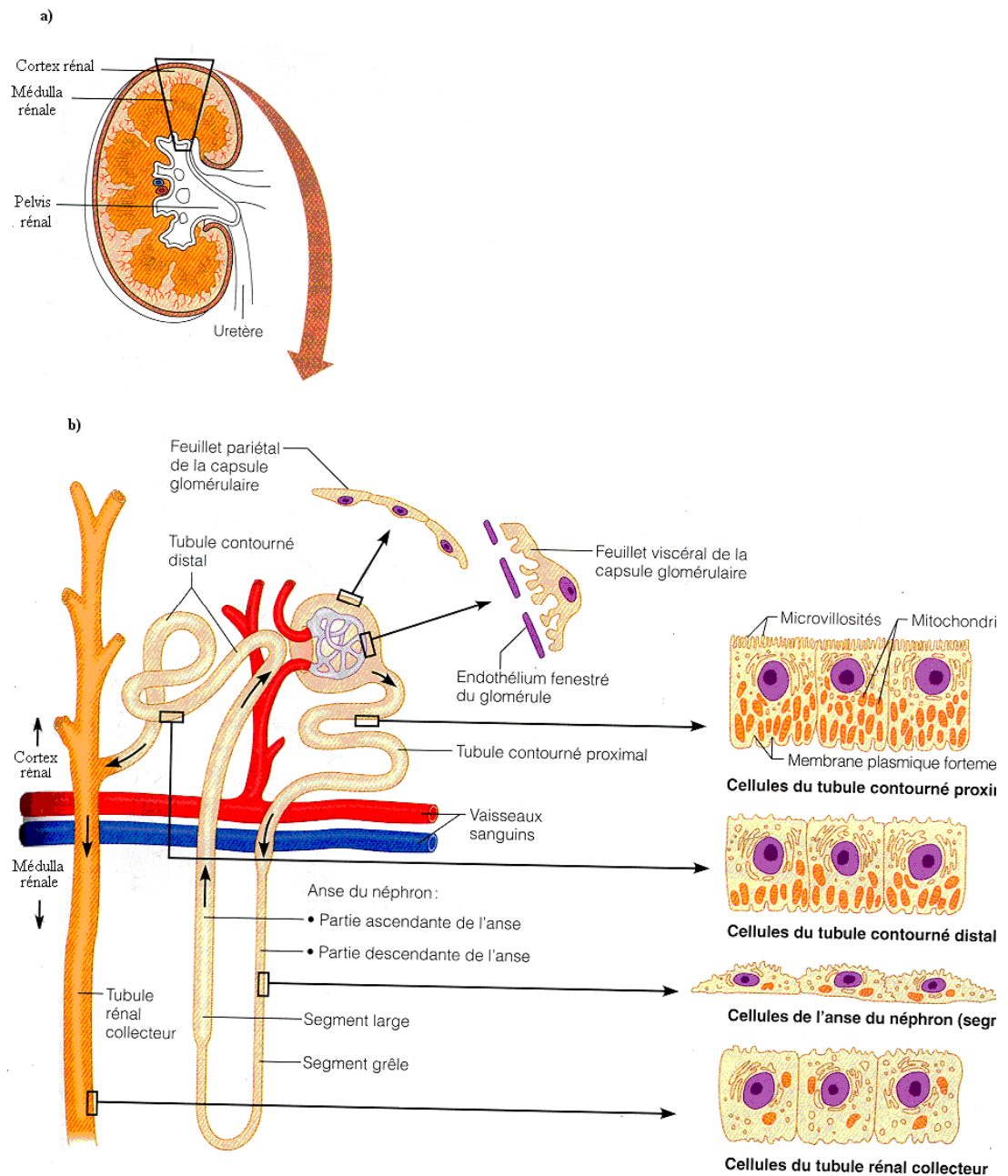
**Figure 6.** Schéma de l'anatomie intestinale et les différents niveaux de structure de l'intestin : (a) les plis circulaires, (b) les villosités intestinales et (c) les microvillosités situées sur la face apicale des anthérocytes. Figure tirée d Marieb (1999), p. 880.

Les plis circulaires sont des replis de la muqueuse et de la sous-muqueuse. Plus avant, cette muqueuse présente elle-même un autre niveau de repliement, les villosités intestinales, des digitiformes d'un millimètre de long qui font saillie sur les plis circulaires. Chaque villosité est composée d'un épithélium contenant plusieurs types cellulaires. Une certaine proportion de ces cellules sont polarisées (entérocytes) et leur partie apicale, qui donne sur la lumière, est formée de minuscules digitations nommées microvillosités. L'ensemble de ces microvillosités qui donne à la surface de la muqueuse un aspect duveteux est appelé la bordure en brosse. C'est de cette membrane de bordure en brosse que sont constituées les BBMv d'intestin.

#### 5.4.2.2- L'anatomie rénale

Le rein, en coupe frontale, possède trois parties différentes : le pelvis, la médulla ou médullaire et le cortex. Le cortex est la partie la plus externe, de couleur pâle, elle enrobe la médulla. Celle-ci, de couleur rouge brun, présente des morceaux de tissu coniques : les pyramides rénales. Les pyramides sont formées d'une multitude de tubules microscopiques. Le pelvis rénal, ou bassinnet, est un tube plat en forme d'entonnoir qui reçoit l'urine et la conduit à l'uretère qui mène à la vessie.

Chaque rein renferme plus d'un million de petites unités de filtration, les néphrons. C'est dans ces minuscules chambres que se produit la filtration du sang, processus menant à la formation d'urine. Chacun d'eux est constitué d'un corpuscule rénal lié à un tubule rénal. Le corpuscule est une vésicule formée d'une capsule glomérulaire rénale qui recouvre le glomérule (bouquet de capillaires artériels). La capsule glomérulaire, quant à elle, comporte deux feuillets. Le feuillet pariétal est externe et n'a qu'une fonction de structure. Le feuillet viscéral, pour sa part, participe à la formation du filtrat glomérulaire, le liquide dérivé du plasma à partir duquel les tubules rénaux produisent l'urine.



**Figure 7.** Schéma de l'anatomie du rein ainsi que de (a) la localisation du néphron dans le rein et (b) une vue schématique du néphron et les caractéristiques structurales des tissus formant ses principales parties. Figure tirée de Marieb (1999), p.977.

Le reste du tubule rénal a trois parties nommées en fonction de leur proximité au glomérule. Le tubule contourné proximal (TCP), sinueux, succède à la capsule glomérulaire. Il est constitué de cellules polarisées dont le pôle apical présente des microvillosités en bordure en brosse, à l'image des structures intestinales. Ces bordures en brosse, d'où l'on tire nos BBMv de rein, augmentent la surface de contact avec le filtrat glomérulaire et multiplient ainsi considérablement la capacité des cellules à réabsorber l'eau et les solutés du liquide. Le tubule plonge ensuite profondément dans la médullaire et devient l'anse de Henlé. Finalement, il remonte vers le cortex et prend le nom de tubule contourné distal (TCD). Celui-ci se déverse dans un tubule rénal collecteur qui récolte l'urine de plusieurs néphrons, franchit la pyramide, fusionne avec d'autres tubules collecteurs et plonge dans le pelvis.

**CHAPITRE II- ARTICLE 1**

***Expression and functionality of the Na<sup>+</sup>/myo-inositol  
cotransporter SMIT2 in rabbit kidney***

Karim Lahjouji<sup>a</sup>, Rym Aouameur<sup>a</sup>, Pierre Bissonnette<sup>a</sup>, Michael J. Coady<sup>a</sup>, Daniel  
G. Bichet<sup>a, c</sup> and Jean-Yves Lapointe<sup>a, b</sup>,

*Biochimica et Biophysica Acta* 1768 (2007) 1154–1159

<sup>a</sup>Groupe d'Étude des Protéines Membranaires (GÉPROM), département de Physiologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3T 1J4

<sup>b</sup>Département de Physique, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3T 1J4

<sup>c</sup>Centre de recherche Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal 5400, boul. Gouin Ouest, Montréal, Québec, Canada H4J 1C5

Received 15 September 2006; revised 14 December 2006; accepted 10 January 2007.

**ABSTRACT**

*Myo*-inositol (MI) is involved in several important aspects of cell physiology including cell signaling and the control of intracellular osmolarity i.e. by serving as a “compatible osmolyte”. Currently, three MI cotransporters have been identified: two are Na<sup>+</sup>-dependent (SMIT1 and SMIT2) and one is H<sup>+</sup>-dependent (HMIT) and predominantly expressed in the brain. The goal of this study was to characterize the expression of SMIT2 in rabbit kidney and to compare it to SMIT1. First, we quantified mRNA levels for both transporters using quantitative real-time PCR and found that SMIT1 was predominantly expressed in the medulla while SMIT2 was mainly in the cortex. This distribution of SMIT2 was confirmed on Western blots where an antibody raised against a SMIT2 epitope specifically detected a 75 kDa protein in both tissues. Characterization of

MI transport in brush-border membrane vesicles (BBMV), in the presence of d-*chiro*-inositol and l-fucose to separately identify SMIT1 and SMIT2 activities, showed that only SMIT2 is expressed at the luminal side of proximal convoluted tubules. We thus conclude that, in the rabbit kidney, SMIT2 is predominantly expressed in the cortex where it is probably responsible for the apical transport of MI into the proximal tubule.

**Keywords:** Myo-inositol transport; Membrane transport; SMIT2; Rabbit renal BBMV

## **1- INTRODUCTION**

*Myo*-inositol (MI), a cyclic polyol, is the most biologically abundant stereo-isomer of the inositols which serve as precursors to molecules involved in cell signaling via the inositol phosphate pathways [1] and [2]. MI is also used as a “compatible osmolyte” allowing renal cells, amongst others, to function under hypertonic conditions [3]. The MI plasma concentration is approximately 50  $\mu$ M and originates from both dietary intake and synthesis from glucose [4]. Its metabolism is highest within the kidney [3] and [5] where most of the MI transported at the apical membrane is oxidatively cleaved to yield d-glucuronic acid in proximal tubule cells. Cellular concentrations of MI can reach up to 30 mM, relying essentially on the activity of secondary active cotransporters [6]. To date, three MI transporters have been identified: two are Na<sup>+</sup>-dependent, SMIT1 and SMIT2, while the third is H<sup>+</sup>-dependent and is called HMIT.

SMIT1 was first isolated from Madin–Darby canine kidney (MDCK) cells using expression cloning in *Xenopus* oocytes [7]. In rats, mRNA encoding this transporter has been detected in kidney medulla, cortex, and brain using Northern blot analysis [7]. *In situ* hybridization showed that SMIT1 is predominantly

present in the medullary and cortical thick ascending limb (TAL) and, to a lesser extent, in the inner medullary-collecting duct (IMCD) [8]. Mice in which SMIT1 was genetically removed demonstrated the critical importance of MI transporter during development as the mice died soon after birth due to respiratory failure, although neonatal lethality could be prevented by prenatal maternal MI supplement [9] and [10]. Altered transport and metabolism of MI are associated with several pathological conditions including Down's syndrome, Alzheimer's disease [11] and several psychiatric disorders such as panic disorders, obsessive compulsive disorder and manic depression, for which clinical trials based on inositol treatments are being pursued.

A second  $\text{Na}^+$ -MI transporter, SMIT2, has an apparent  $K_m$  of  $120 \mu\text{M}$  based on measurements in oocytes expressing the protein [12]. In human tissues, SMIT2 was shown to be highly expressed in kidney, heart, skeletal muscle, liver and placenta with weak expression in the brain [13] while in rabbit, Hitomi and Tsukagoshi [14] showed that rat SMIT2 is expressed only in kidney and brain. SMIT2 transports *d-chiro*-inositol (DCI) equally well as MI but does not transport *l*-fucose, while SMIT1 transports *l*-fucose but not DCI [12] and [15]. When heterologously expressed in the MDCK renal cell line, SMIT2 is clearly targeted to the apical domain [16]. The third MI transporter, HMIT, is  $\text{H}^+$ -dependent and is predominantly expressed in the brain but very weakly elsewhere [17] and [18].

Only one study of MI transport in renal BBM has been published, more than 25 years ago [19] and it concluded that MI is transported *via* a sodium-coupled transporter. Transport was characterized with an apparent  $K_m$  of  $94 \mu\text{M}$  and the uptake was inhibited by *d*-glucose. No functional assessment of individual MI cotransporters in kidney has yet been published.

The goal of the present study is to characterize the expression of SMIT2 in rabbit kidney and to compare it to SMIT1. We show that SMIT1 is predominantly found in the renal medulla whereas SMIT2 is present in much greater amount in



renal cortex. Analysis showed that SMIT2 is present both in kidney cortex and medulla, and is specifically enriched in BBMV. Functionality studies using purified BBMV extend earlier work and establish that SMIT2 is responsible for MI transport through the apical membrane.

## **2- MATERIALS AND METHODS**

### **2.1- Materials**

Radiolabelled  $^3\text{H}$ -*myo*-inositol was purchased from Perkin Elmer (Boston, MA, USA) and nitrocellulose filters for uptake assays were from Millipore (Billerica, MA, USA). Trizol reagent and DNA primers for quantitative real time PCR (q-RT-PCR) were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) and PNGase F enzyme was obtained from New England BioLabs (Ipswich, MA, USA). Routine biochemicals were purchased either from Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada) or Sigma (Oakville, ON, Canada). Rabbits (New Zealand white male) weighing about 2 kg were provided by Charles River's Laboratories (St-Constant, QC, Canada). All animal experimentations were performed in accordance with the Canadian guidelines and with the Ethics Committee of the Université de Montréal.

### **2.2- Kidney Brush-border membrane vesicles isolation and MI transport procedure**

Rabbit kidneys were excised, the capsules were removed and the outer cortex manually separated from the medulla using a scalpel. Brush border membrane vesicles (BBMV) were prepared using the magnesium precipitation technique [16] from fresh renal cortex only, since preparations made from frozen tissue exhibited a significantly decreased rate of MI transport. The intravesicular

composition was 400 mM mannitol, 0.1 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM HEPES–Tris, pH 7. BBMVs were either used immediately or frozen in liquid nitrogen until use. Transport media (150 mM NaCl, 100 mM mannitol or l-fucose, 0.1 mM MgSO<sub>4</sub> and 50 mM HEPES–Tris pH 7) contained tracer quantities of <sup>3</sup>H MI (specific activity 685 GBq/mmol) along with 50 nM cold substrate, unless otherwise specified in legends. l-fucose DCI, and alpha-methyl-d-glucose (αMG) were added to the transport media as equimolar replacements for mannitol. Transport of <sup>3</sup>H *myo*-inositol by renal BBMVs was initiated by the addition of 50 μl BBMVs to 950 μl transport medium at room temperature and, at given times, aliquots of 100 μl were filtered onto 0.65 μm nitrocellulose filters and immediately rinsed with 5 ml ice-cold substrate-free transport media. Filters were dissolved in scintillation cocktail (BetaBlend, ICN Biochemicals Inc., CA, USA) and tritium activity measured using a Beckman LS6000SC scintillation counter.

### **2.3- Quantitative-real-time PCR**

Quantification of both SMIT1 and SMIT2 mRNA was performed using LUX technology along with the SuperScript™ III Platinum® one-step qRT-PCR System kit (Invitrogen). Total RNA was isolated from rabbit renal cortex and medulla using Trizol reagent (Life Technologies, Invitrogen). Primers and probes were designed using Primer software for LUX technology (<https://orf.invitrogen.com/lux/>). Quantifications were performed on 0.5 μg total RNA samples using the DNA Engine Opticon 2 PCR apparatus (MJ Research Inc, Waltham, MA, USA). Standards consisted of pure *in vitro* transcribed mRNA for either SMIT1 or SMIT2. The qRT-PCR protocol was: 50 °C (30 min) for reverse transcription, then 95 °C (2 min) followed by 50 cycles at 95 °C (15 sec) and 59 °C (30 sec). All reactions were run in triplicates and the quality of the PCR procedure monitored through melting curve analysis. The abundance of the target mRNAs was calculated according to a standard mRNA curve for both SMIT1 and SMIT2. Since the rabbit SMIT1 sequence is still unknown, primer's sequences were chosen from conserved regions in the SMIT1 sequences from other known

species (rat, human and mouse). Primers used for SMIT1 were: CGG CTG AGT GGA TAC TTC CTG GCG (forward) and TCA CAA ACA GAG AGG CAC CAA T (reverse). For SMIT2, the primers sequences used were: CGC CGA CTG CTG AAT AAA GAT GGG (forward) and ATC ACC CTG GCC GTC CTC TAC (reverse).

#### **2.4- Antibody production and Western blots**

An anti-SMIT2 antibody was raised in rabbits (Biotechnology Research Institute, Montreal, QC, Canada; <http://www.irb.cnrc.gc.ca>) against a conserved amino acid sequence from the SMIT2 protein of rabbit, rat and human aligned using ClustalW software. The epitope contained 16 amino acid residues (FLALASNRSENSSCGL; amino acids 238 to 253 localized in the predicted intracellular loop between the predicted fifth and the sixth transmembrane domains. Care was taken to avoid sequence regions containing significant similarities to sequences of related transporters such as SMIT1 or to any SGLT sequences. The crude serum was tested on rabbit renal cortex, medulla and purified BBMV. The pre-immune serum was used as a negative control, and the specificity of the crude serum checked by peptide displacement assay.

Western blots were performed as described [16]. Briefly, samples were electrophoresed on a 7.5% polyacrylamide gel and transferred onto nitrocellulose membranes. The efficiency of the overall procedure was monitored by Ponceau red staining. The membranes were blocked with 5% non-fat milk in TBS-T (TBS + Tween 20, 0.1%), probed with the specific antibody at 1/500 dilution followed by probing with an HRP-linked goat anti-rabbit secondary antibody (Santa Cruz Biotech, CA) at 1/5000 dilution. All incubations with antibodies were performed in TBS-T with milk. Membranes were rinsed adequately between every step with TBS-T and revealed using enhanced chemiluminescence detection (Super-Signal®, Pierce, Canada).

### **2.5- PNGase assay**

N-glycosylation was assayed using the PNGase F enzyme. Rabbit renal BBMVs were subjected to PNGase treatment according to the manufacturer's procedure. The reaction mix was incubated for 3 h (or overnight) and proteins analyzed by Western blot as described above.

### **2.6- Statistical analysis**

Values shown for transport studies represent means  $\pm$  SE of triplicates and are expressed in nanomoles per mg protein. Protein content was determined using the BCA assay (Pierce). Determination of kinetic parameters of MI transport was performed by fitting data to the Michaelis–Menten equation containing a non-specific component of uptake using Origin 6.1 software (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA). Evaluation of the  $K_i$  value for DCI was performed using a competitive inhibition equation containing a non-specific component of uptake [20], also using Origin software. All uptake experiments, quantitative real-time PCR and Western blot analysis were performed on at least three separate occasions with comparable results. Data presented are from representative sets of experiments.

## **3- RESULTS**

### **3.1- Quantitative real-time PCR**

In a first attempt to evaluate the relative levels of both SMIT1 and SMIT2, we quantified specific mRNA levels through qRT-PCR for both transporters SMIT1 and SMIT2 in total RNA extracted from renal cortex and medulla. As shown in Fig. 1, SMIT1 is predominantly found in the medulla ( $2.9 \pm 0.7 \times 10^3$  copies/ $\mu$ g total RNA vs.  $0.8 \pm 0.04 \times 10^3$  copies/ $\mu$ g total RNA in cortex) whereas

SMIT2 is present in greater amounts in cortex ( $5.1 \pm 0.8 \times 10^3$  copies/ $\mu\text{g}$  total RNA vs.  $0.8 \pm 0.2 \times 10^3$  copies/ $\mu\text{g}$  total RNA) than in medulla.

### **3.2- Western blot analysis**

In order to establish the renal distribution of SMIT1 and SMIT2 at the protein level, tissues from cortex and from medulla were studied using specific antibodies against SMIT2. In rabbit kidney tissues (Fig. 2), the antibody reveals a specific 75 kDa band in both cortex and medulla, one which appears to be highly enriched in BBMVs. As shown in Fig. 2, we noticed that fainter bands with reduced molecular weight (MW) can occasionally be observed. This presumably represents some degradation products of SMIT2. As shown in this figure, all of the specific signals seen in the presence of the anti-SMIT2 antibody (immune) are absent when treated with the pre-immune serum fraction and are displaced by peptide preadsorption of antibody. PNGase F treatment was also performed in order to test the possibility that the 75 kDa protein is a glycosylated protein. As seen in Fig. 2, assays performed on purified BBMVs show no reduction of MW, indicating that SMIT2 is not N-glycosylated in these tissues. Even after 16 h incubation in the presence of PNGase F, no alterations in MW were detected (not shown).

### **3.3- MI transport in purified BBMVs**

Although an MI transport system(s) in renal BBMVs has already been reported [16], the molecular identity of the transporter(s) involved has not yet been determined. The activity of SMIT1 can be distinguished from the activity of SMIT2 by using l-fucose which is specifically transported by SMIT1 and DCI which is specifically transported by SMIT2. Fig. 3 illustrates the uptake of  $^3\text{H}$ -MI (in the presence of 50 nM unlabelled MI) into renal BBMVs as a function of time, either alone or in the presence of a saturating concentration of either DCI (1 mM) or l-fucose (100 mM) to selectively inhibit SMIT2 and SMIT1 respectively, or in the presence of saturating unlabelled MI to inhibit all MI-specific transport

systems. Total MI transport (●) displayed linearity for 2–3 min and the uptake curve demonstrates a typical overshoot indicative of secondary active transport systems ( $\text{Na}^+$  dependent, in this case). In the presence of 100 mM l-fucose (■), the specific rate of radiolabelled MI transport is reduced by 35% while in presence of a saturating concentration of MI (▲), the uptake is reduced to 80%. When the transport assay is performed in the presence of 1 mM DCI (▲), MI uptake is also reduced by 80%.

Since DCI and l-fucose inhibitions should be complementary with respect to the overall profile of MI transport, the partial inhibition induced by l-fucose was somewhat inconsistent with the similar uptake levels seen in the presence of DCI and MI. We thus further investigated the inhibitory profile of MI transport on BBMV by using increasing concentrations of l-fucose, DCI or MI. As shown in Fig. 4, both MI and DCI induced a considerable inhibition of radiolabelled MI uptake with comparable efficiencies. On the other hand, l-fucose still only partially impeded the uptake of MI (38% reduction at 100 mM). This inhibition was however incompatible with a competitive effect displaying a  $K_i$  of  $4.7 \pm 1.0$  mM as is seen with MDCK cells [16]. *l-chiro*-inositol (LCI, 1 mM), a non-inhibitory stereo-isomer of DCI, showed no significant inhibition of MI transport, as  $\alpha$ -methyl-glucose ( $\alpha$ MG, 1 mM), specific substrate of the  $\text{Na}^+$ /glucose transporter SGLT1. This indicates that these compounds do not interfere with the BBMV MI transport.

Fig. 5 shows a typical example of MI transport measurements at different MI concentrations, performed in the absence of l-fucose. The data were analysed with an equation representing a single site + passive diffusion. The kinetic parameters determined for the saturable component were  $57 \pm 14$   $\mu\text{M}$  for  $K_m$  and  $221 \pm 24$   $\text{nmol/mg protein}^{-1} \times 2 \text{ min}^{-1}$  for  $V_{\text{max}}$ . Transposition of the saturable portion of the uptake experiment as Eadie–Hofstee plot is shown in the inset. By using these kinetic parameters and equation for competitive inhibition [21], we

were able to determine a  $K_i$  value of  $63 \pm 17 \mu\text{M}$  for DCI inhibition of MI uptake for the data presented in Fig. 4.

#### **4- DISCUSSION**

To date, three MI transport systems have been identified; SMIT1, SMIT2 and HMIT, but their individual physiological functions have not yet been well delineated. For this reason, this study aimed to examine the relative contributions of SMIT1 and SMIT2 to MI transport in the rabbit kidney. Although HMIT was shown to be weakly expressed in the rat kidney, its involvement in MI transport through rabbit renal BBMVs can be ruled out since the uptake observed is totally  $\text{Na}^+$ -dependent [19] while HMIT transports MI in a  $\text{H}^+$ -dependent manner and is largely inefficient at neutral pH levels ( $\geq 7.0$ ) [17] and [18]. In the present study, using qRT-PCR evaluation, we demonstrated the presence of both SMIT1 and SMIT2 in rabbit kidney, and found that they exist in different proportions in cortex vs. medulla. These are the first quantitative data concerning renal expression of the SMIT proteins and they are in agreement with Northern blot analysis previously published for rabbit SMIT2 [14] which determined that SMIT2 is expressed only in the brain and the kidney, although the latter was not further investigated for cortex and medulla subdistribution. In human, also using Northern blot, Roll et al. [13] have found a broader distribution for SMIT2 expression including heart, skeletal muscle, kidney, liver, and placenta while weaker expressions were found in brain and several other tissues. We do not know if the differences between these results are due to species differences or to methodology. Unfortunately, these discrepancies were not discussed in the study [13]. Quantization of mRNA through qRT-PCR represents an advantage over Northern blots in terms of evaluating mRNA distribution in tissues. Data on SMIT1 and SMIT2 evaluation by qRT-PCR have not yet been reported for other species. The fact that SMIT1 and SMIT2 have different distributions within the kidney, SMIT1 being more abundant in medulla

while SMIT2 mainly being expressed in cortex, suggests tissue-specific functions for each transporter. A major difference between these two transporters is their polarized location within epithelial cells, since SMIT1 is usually detected at the basolateral membrane while SMIT2 is rather found at the apical domain of these cells [16]. In a previous report from our laboratory [16], the characterization of MI transport in BBMV has shown that the presence of 100 mM l-fucose inhibits MI transport by about 30% suggesting the presence of some SMIT1 at this membrane. In the present study, we have performed a more complete inhibition study using both l-fucose, a specific inhibitor of SMIT1, and DCI which specifically inhibits SMIT2 in order to better distinguish the two systems. The results obtained (Fig. 4) confirmed the partial effect of l-fucose previously reported but appear to be inconsistent with the total effect of DCI. Indeed, the partial inhibition by l-fucose suggests the presence of both SMIT1 and SMIT2 while the complete inhibition achieved with DCI, clearly indicates that only SMIT2 is found in rabbit BBMV. Unfortunately, no anti-SMIT1 antibodies are presently available to allow a direct detection of SMIT1 by Western blot or immunofluorescence. Still, while 1 mM DCI is sufficient to attain complete MI transport inhibition, 100 mM l-fucose is necessary to induce partial inhibition, one that has not even reached statistical significance at 50 mM. Such a linear inhibition profile is incompatible with the l-fucose-mediated inhibition of SMIT1 in normal MDCK cells, for which a  $K_i$  value of  $4.8 \pm 1.0$  mM was observed [16]. Instead, the large concentrations of l-fucose may reduce MI transport indirectly through an effect on the  $\text{Na}^+$  electrochemical gradient. The linear Eadie–Hofstee plot displayed in the insert of Fig. 5, showing a  $K_m$  value compatible with that found by Hammerman et al. [19], cannot be used to rule out the presence of a second transport site since both SMIT1 and SMIT2 share similar  $K_m$  values. A possible contribution of the  $\text{Na}^+$ /glucose cotransporter SGLT1 to MI transport in BBMV was ruled out by evaluation of MI uptake in the presence of a saturating concentration of a substrate for SGLT1 ( $\alpha$ MG) which is not recognized by either SMIT1 nor SMIT2 [12] and [22]. We thus conclude that the effect of 100 mM l-fucose on MI transport is indirect and that SMIT2 is the



only MI transport system in the apical membrane of the proximal convoluted tubule cells as shown by the complete inhibition of MI uptake by DCI. This conclusion would suggest a cellular model where SMIT1 and SMIT2 are restricted to the basolateral and apical membranes, respectively.

In addition to the first anti-SMIT2 antibody previously used in our laboratory [16], a second SMIT2-specific antibody was raised, this time against a new epitope. This antibody, used throughout the present work, recognizes in kidney tissues a 75 kDa band which closely corresponds to the expected MW for this protein according to the deduced amino acid sequence ( $\approx 74$  kDa). The faint lower MW bands seen in all lanes of Fig. 2 are most probably degradations of this protein and are not believed to represent specific variants of SMIT2. This 75 kDa band was found to be more abundant in renal cortex (lane 2) than in renal medulla (lane 3) and was further enriched in purified BBMVs (lane 1). This is in accordance with the data obtained by qRT-PCR from the same tissues. In all cases, both these bands were found to be specific as they are absent when detected with pre-immune serum and are displaced by preadsorption of antibody with peptide. Since SMIT2 possesses an N-glycosylation motif, the possibility that the 75 kDa is a glycosylated form of the protein was investigated. As shown in Fig. 2, PNGase F treatment performed on BBMVs showed no reduction of MW when compared to controls. It should be noted that PNGase assays were also prolonged for up to 16 h in order to confirm this finding. The absence of glycosylation is not surprising since proteins which do not contain a signal peptide, as is the case for SMIT2, are less inclined to acquire such residues even though they have adequate N-glycosylation motifs. Also, it is worth mentioning that the specific 75 kDa band was also evidenced in other rabbit tissues such as brain and lung (not shown).

Although the glucose content (5.5 mM) in ultrafiltrate is much higher than that of MI (50  $\mu$ M), the affinity of SMIT2 for glucose is remarkably lower ( $\approx 40$  mM, [12]) than that for MI (57  $\mu$ M). Physiologically, under such conditions where the MI concentration is equivalent to its  $K_t$  while the concentration of

glucose is eight times lower than its  $K_t$ , MI would be the predominant substrate for the transporter. Furthermore, since glucose is efficiently reabsorbed through SGLT proteins along the proximal tubule, the substrate competition for SMIT2 will rapidly drop in favour of MI. For these reasons, we believe that glucose represents only a small hindrance to MI uptake through SMIT2 along the proximal tubule.

## **5- CONCLUSION**

In conclusion, our results reveal that the rabbit kidney expresses both SMIT1 and SMIT2, but in opposing proportions in cortex and medulla. SMIT2 is predominantly expressed in the cortex where it probably serves as the unique MI transporter across the apical membrane of the proximal tubule. On the other hand, SMIT2 is also expressed, albeit at a lower level in the medulla but its specific role remains to be elucidated.

## **6- ACKNOWLEDGMENT**

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), grant #MOP-67038.

## 7- REFERENCES

1. **C.P. Downes and C.H. Macphee.** myo-inositol metabolites as cellular signals. *Eur. J. Biochem.* **193** (1990), pp. 1–18.
2. **S.K. Fisher, J.E. Novak and B.W. Agranoff.** Inositol and higher inositol phosphates in neural tissues: homeostasis, metabolism and functional significance, *J. Neurochem.* **82** (2002), pp. 736–754.
3. **M.B. Burg.** Renal osmoregulatory transport of compatible organic osmolytes, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **6** (1997), pp. 430–433.
4. **F.X. Beck, A. Burger-Kentischer and E. Muller.** Cellular response to osmotic stress in the renal medulla, *Pflugers Arch.* **436** (1998), pp. 814–827.
5. **J.S. Handler and H.M. Kwon,** Regulation of the myo-inositol and betaine cotransporters by tonicity, *Kidney Int.* **49** (1996), pp. 1682–1683.
6. **R. Dolhofer and O.H. Wieland,** Enzymatic assay of myo-inositol in serum, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **25** (1987), pp. 733–736.
7. **H.M. Kwon, A. Yamauchi, S. Uchida, A.S. Preston, A. Garcia-Perez, M.B. Burg and J.S. Handler,** Cloning of the cDNA for a Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter, a hypertonicity stress protein, *J. Biol. Chem.* **267** (1992), pp. 6297–6301.
8. **A. Yamauchi, A. Miyai, S. Shimada, Y. Minami, M. Tohyama, E. Imai, T. Kamada and N. Ueda,** Localization and rapid regulation of Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter in rat kidney, *J. Clin. Invest.* **96** (1995), pp. 1195–1201.
9. **G.T. Berry, S. Wu, R. Buccafusca, J. Ren, L.W. Gonzales, P.L. Ballard, J.A. Golden, M.J. Stevens and J.J. Greer,** Loss of murine Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter leads to brain myo-inositol depletion and central apnea, *J. Biol. Chem.* **278** (2003), pp. 18297–18302.
10. **J.F. Chau, M.K. Lee, J.W. Law, S.K. Chung and S.S. Chung,** Sodium/myo-inositol cotransporter-1 is essential for the development and function of the peripheral nerves, *FASEB J.* **19** (2005), pp. 1887–1889.

11. **J.E. Nestler, D.J. Jakubowicz, P. Reamer, R.D. Gunn and G. Allan,** Ovulatory and metabolic effects of d-*chiro*-inositol in the polycystic ovary syndrome, *N. Engl. J. Med.* **340** (1999), pp. 1314–1320.
12. **M.J. Coady, B. Wallendorff, D.G. Gagnon and J.Y. Lapointe,** Identification of a novel Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter, *J. Biol. Chem.* **277** (2002), pp. 35219–35224.
13. **P. Roll, A. Massacrier, S. Pereira, A. Robaglia-Schlupp, P. Cau and P. Szepetowski,** 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** (2002), pp. 141–148.
14. **K. Hitomi and N. Tsukagoshi,** cDNA sequence for rkST1, a novel member of the sodium ion-dependent glucose cotransporter family, *Biochim. Biophys. Acta* **1190** (1994), pp. 469–472.
15. **R.E. Ostlund Jr., R. Seemayer, S. Gupta, R. Kimmel, E.L. Ostlund and W.R. Sherman,** A stereospecific myo-inositol/d-*chiro*-inositol transporter in HepG2 liver cells. Identification with d-*chiro*-[3-<sup>3</sup>H]inositol, *J. Biol. Chem.* **271** (1996), pp. 10073–10078.
16. **P. Bissonnette, M.J. Coady and J.Y. Lapointe,** Expression of the sodium-myoinositol cotransporter SMIT2 at the apical membrane of Madin–Darby canine kidney cells, *J. Physiol.* **558** (2004), pp. 759–768.
17. **M. Uldry, M. Ibberson, J.D. Horisberger, J.Y. Chatton, B.M. Riederer and B. Thorens,** Identification of a mammalian H<sup>(+)</sup>-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain, *EMBO J.* **20** (2001), pp. 4467–4477.
18. **M. Uldry, P. Steiner, M.G. Zurich, P. Beguin, H. Hirling, W. Dolci and B. Thorens,** Regulated exocytosis of an H<sup>+</sup>/myo-inositol symporter at synapses and growth cones, *EMBO J.* **23** (2004), pp. 531–540.
19. **M.R. Hammerman, B. Sacktor and W.H. Daughaday,** myo-Inositol transport in renal brush border vesicles and its inhibition by d-glucose, *Am. J. Physiol.* **239** (1980), pp. F113–F120.

20. **P. Bissonnette, H. Gagne, M.J. Coady, K. Benabdallah, J.Y. Lapointe and A. Berteloot**, Kinetic separation and characterization of three sugar transport modes in Caco-2 cells, *Am. J. Physiol.* **270** (1996), pp. G833–G843.
21. **P. Bissonnette, J. Noel, M.J. Coady and J.Y. Lapointe**, Functional expression of tagged human Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes, *J. Physiol.* **520** (1999) (Pt. 2), pp. 359–371.
22. **K. Hager, A. Hazama, H.M. Kwon, D.D. Loo, J.S. Handler and E.M. Wright**, Kinetics and specificity of the renal Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes, *J. Membr. Biol.* **143** (1995), pp. 103–113.

## **8- LEGENDS AND FIGURES**

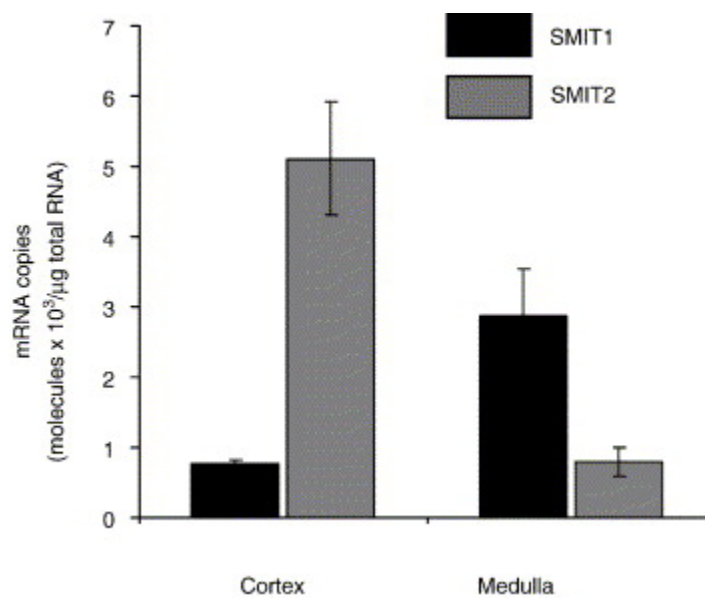
**Figure 1.** Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) determination of mRNA for SMIT1 and SMIT2 transporters. qRT-PCR was performed using primers that are specific for SMIT1 or SMIT2 (see Materials and methods) using 0.5  $\mu\text{g}$  total RNA as template. Absolute quantification (molecules/ $\mu\text{g}$  total RNA) is made possible by interpolation of standard curves for both mRNA using pure cRNA for both species. Bars are mean  $\pm$  SEM from three independent experiments, each performed in triplicates.

**Figure 2.** Identification of SMIT2 protein in rabbit renal tissues using Western blot detection. SDS-PAGE and transfer on nitrocellulose were performed as described in Materials and methods. Membranes were blotted either against pre-immune sera or against anti-SMIT2 antibody (both at 1/500) either with (peptide) or without (immune) pre-adsorption to specific SMIT2 peptide on rabbit tissues: purified rabbit brush-border membrane vesicles (BBMV) (lane 1, 2  $\mu\text{g}$  protein per lane), kidney homogenates (100  $\mu\text{g}$  per lane) from cortex (lane 2) or medulla (lane 3). A 75-kDa specific band is detected. The right hand panel shows the evaluation of SMIT2 N-glycosylation in purified BBMV. Homogenates (2  $\mu\text{g}$  protein per lane) were treated (+) or not (-) with PNGase for 3 h prior Western blot analysis. In both cases, a similar 75 kDa protein is detected.

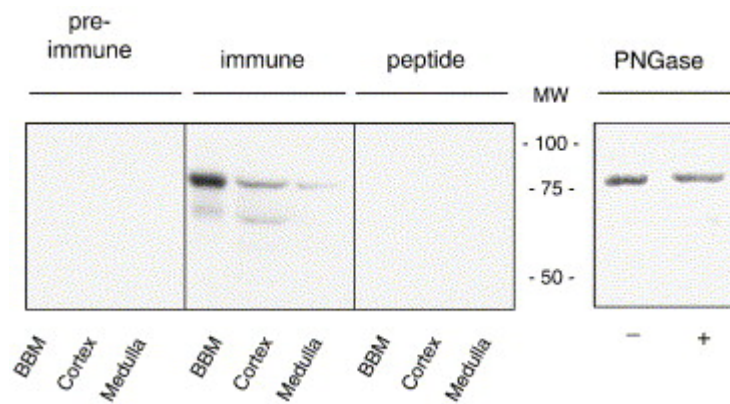
**Figure 3.** Time course of MI transport into rabbit BBMV. Rabbit BBMV (50  $\mu\text{l}$ ) were incubated with 950  $\mu\text{l}$  transport media containing 50 nM MI along tracer (see Materials and methods for composition of transport media). Uptakes were performed either in absence ( $\bullet$ ) or presence of saturating l-fucose (100 mM,  $\blacksquare$ ), MI (1 mM,  $\triangle$ ) or DCI (1 mM,  $\blacktriangle$ ). Addition of l-fucose was performed in equimolar replacement with mannitol. Aliquots of 100  $\mu\text{l}$  were taken for each sample. Data are mean  $\pm$  SEM of triplicates. When not shown, error bars are smaller than symbol.

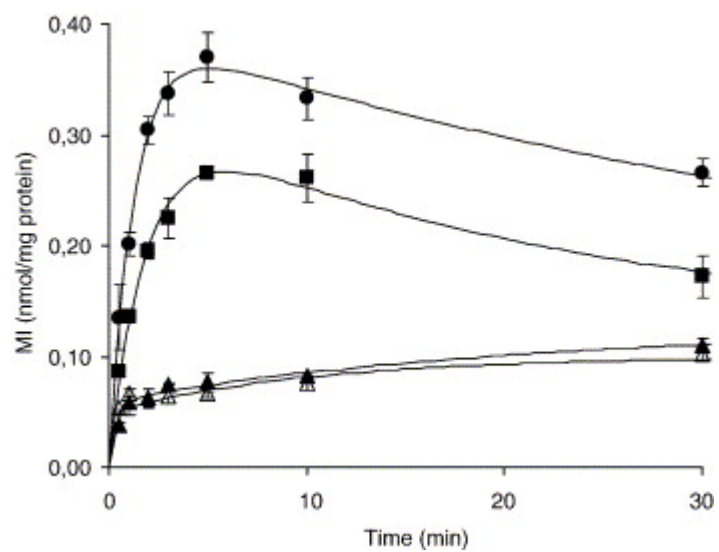
**Figure 4.** Initial rate of MI transport in absence or presence of potential inhibitors,  $\alpha$ -methyl-glucose or l-fucose, DCI, LCI, or MI. Inhibition studies of initial rate uptakes (2 min) of 50 nM MI by various effectors on rabbit BBMV were performed as described in this figure and Materials and methods. Inhibitors used were  $\alpha$ MG (10 mM, ▲), DCI (up to 1 mM, △), l-*chiro*-inositol (1 mM, □), l-fucose (up to 100 mM, ●) and MI (up to 1 mM, ▴). Data are mean  $\pm$  SEM of triplicates. When not shown, error bars are smaller than symbol.

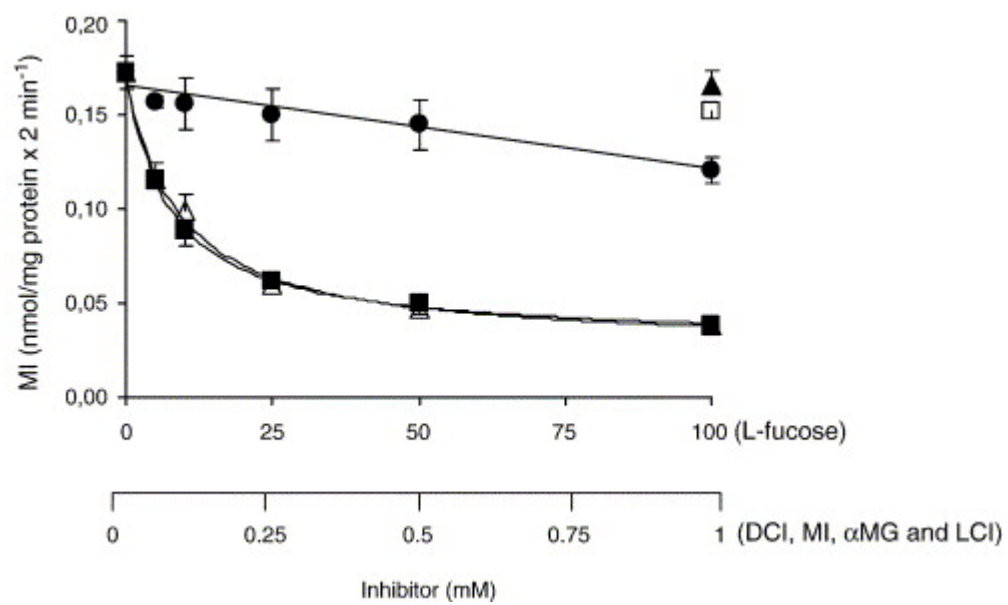
**Figure 5.** Determination of kinetic parameters for MI transport in renal rabbit BBMV. 2 min uptakes were performed with increasing concentrations of MI (up to 1 mM). Aliquots of 100  $\mu$ l were taken for each sample. Data are mean  $\pm$  SEM of triplicates. When not shown, error bars are smaller than symbol. Inset presents Eadie–Hofstee transformation of total uptake to which was subtracted non-specific fraction (Kd component). Kinetic parameters determined were  $221 \pm 26 \text{ nmol} \times \text{mg protein}^{-1} \times 2 \text{ min}^{-1}$  for Vmax,  $57 \pm 14 \text{ } \mu\text{M}$  for Km and  $0.92 \pm 0.03 \text{ nmol/mg protein}^{-1} \times 2 \text{ min}^{-1}$  for the non-specific Kd value.

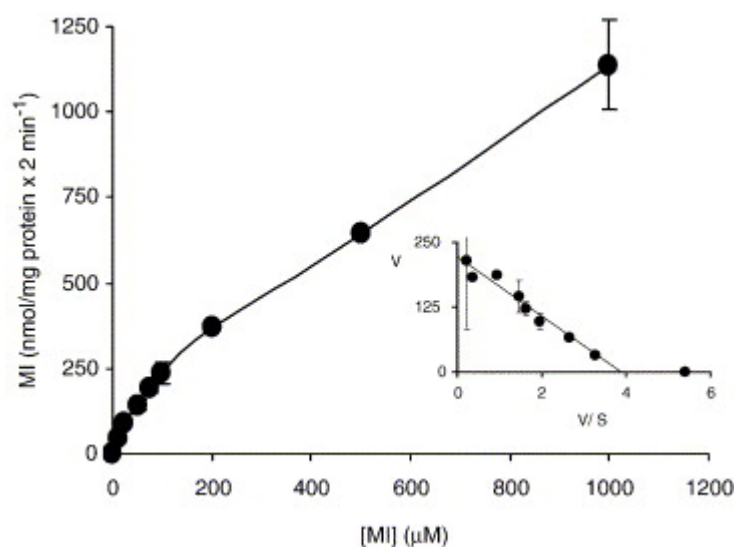
**FIGURE 1:**



**FIGURE 2:**

**FIGURE 3:**

**FIGURE 4:**

**FIGURE 5:**

**CHAPITRE III- ARTICLE 2**

***SMIT2 mediates all myo-inositol uptake in apical  
membranes of rat small intestine***

Rym Aouameur,<sup>1</sup> Sandra Da Cal,<sup>1</sup> Pierre Bissonnette,<sup>1</sup> Michael J. Coady,<sup>1</sup> and  
Jean-Yves Lapointe<sup>1,2</sup>

*Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293: G1300-G1307, 2007. First published October 11, 2007

<sup>1</sup>Groupe d'étude des protéines membranaires (GÉPROM), Département de Physiologie and  
<sup>2</sup>Département de Physique, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada Submitted 18  
September 2007 ; accepted in final form 11 October 2007

Submitted 18 September 2007 ; accepted in final form 11 October 2007

**ABSTRACT**

This study presents the characterization of myo-inositol (MI) uptake in rat intestine as evaluated by use of purified membrane preparations. Three secondary active MI cotransporters have been identified; two are Na<sup>+</sup> coupled (SMIT1 and SMIT2) and one is H<sup>+</sup> coupled (HMIT). Through inhibition studies using selective substrates such as D-chiro-inositol (DCI, specific for SMIT2) and L-fucose (specific for SMIT1), we show that SMIT2 is exclusively responsible for apical MI transport in rat intestine; rabbit intestine appears to lack apical transport of MI. Other sugar transport systems known to be present in apical membranes, such as SGLT1 or GLUT5, lacked any significant contribution to MI uptake. Functional analysis of rat SMIT2 activity, via electrophysiological studies in *Xenopus* oocytes, demonstrated similarities to the activities of SMIT2 from other species (rabbit and human) displaying high affinities for MI ( $0.150 \pm 0.040$  mM), DCI ( $0.31 \pm 0.06$  mM), and phlorizin (Pz;  $0.016 \pm 0.007$  mM); low affinity for glucose ( $36 \pm 7$  mM); and no affinity for L-fucose. Although these functional

characteristics essentially confirmed those found in rat intestinal apical membranes, a unique discrepancy was seen between the two systems studied in that the affinity constant for glucose was ~40-fold lower in vesicles ( $K_i = 0.94 \pm 0.35$  mM) than in oocytes. Finally, the transport system responsible for the basolateral efflux transporter of glucose in intestine, GLUT2, did not mediate any significant radiolabeled MI uptake in oocytes, indicating that this transport system does not participate in the basolateral exit of MI from small intestine.

**Keywords:** Brush border; glucose; transport; oocytes; phlorizin

## **1- INTRODUCTION**

The physiological importance of myo-inositol (MI) is generally considered to reflect its role in signal transduction as a precursor to phosphoinositides and inositol phosphates. In addition, MI acts as a "compatible osmolyte" in specific tissues, such as brain and kidney medulla, where variations in milieu osmolarity may threaten normal cell function. In response to an increase in osmolarity, intracellular MI concentration may rise up to 500-fold above its plasma concentration of ~30  $\mu$ M (9, 11, 12), where it prevents the accumulation effects of high ionic concentrations, which leads to DNA degradation (11a). This has been well documented in brain where conditions such as trauma (30), edema and hypernatremia (26, 27, 38) have been shown to increase MI levels. To reach such high intracellular concentrations, secondary active transport systems are required for MI.

Three such MI cotransport systems have been identified, two of which are sodium dependent (SMIT1 and SMIT2) whereas the third is proton dependent (HMIT) (36). SMIT1, the first MI transport system identified, is primarily expressed in brain and renal medulla (22). In the kidney (where MI transport has

been most extensively studied), the protein is located at the basolateral membranes of epithelial cells (2, 39) and its activity is tightly regulated by osmotic variations through a tonicity-responsive system (16, 20). This regulation is most important in renal medulla where the interstitial osmolarity fluctuates drastically according to hydration status.

More recently, our laboratory has identified a second sodium-dependent transporter SMIT2 (10). Like SMIT1, SMIT2 is expressed in the brain, intestine, and kidney, and, although both systems share remarkable functional similarities (high affinities for MI, overall substrate and inhibitor specificities, and 2:1 Na<sup>+</sup>-MI stoichiometry), some differences distinguish the two transport systems: unlike SMIT1, which is highly expressed in the kidney medulla, SMIT2 is predominantly found in kidney cortex where it is expressed at the apical domains of proximal tubule cells (2, 23). With this cellular location, SMIT2 is believed to be responsible for the reabsorption of MI from the glomerular filtrate, a conclusion that has been supported by MI uptake studies performed both on purified rabbit kidney brush border membrane vesicles (BBMv) (23) and on a stably SMIT2-transfected cell line (MDCK-SMIT2) (2). As well, there is no evidence that SMIT2 is regulated by osmolarity conditions, which is in accordance with its cortical location in kidney. A significant difference between the two SMIT transport systems concerns D-chiro-inositol (DCI), a MI epimer that is transported by SMIT2 with high affinity but is not transported by SMIT1 (10). In contrast, L-fucose is transported by SMIT1 but not by SMIT2. For these reasons, DCI and L-fucose can be used to functionally discriminate the two systems in tissues where they coexist (2).

A study performed on purified rat intestinal BBMv prior to the molecular identification of SMIT1 suggested the existence of a sodium-dependent MI transport system (34). In agreement with this conclusion, the dietary requirement for MI was first established by using gerbils, linking an MI-free diet to pathological conditions such as lipodystrophy of the small intestine, presumably because of failure in lipid absorption through chylomicrons (7, 18), and



dysregulation of triglyceride metabolism in the liver (19). Using purified BBMv, we now demonstrate through extensive characterization that, in the rat, SMIT2 is present in the apical membranes of enterocytes and is responsible for all MI absorption. This is in contrast to a recently published hypothesis that SMIT2 may play a significant role in glucose uptake in intestine (37).

## **2- MATERIALS AND METHODS**

### **2.1- Materials**

Radiolabeled [<sup>3</sup>H]2-MI and [<sup>3</sup>H]6-glucose were purchased from Perkin-Elmer (Boston, MA) and nitrocellulose filters for uptake assays were from Millipore (Billerica, MA). Trizol reagent, DNA primers, and Superscript III Platinum One-Step kit for quantitative real-time PCR (qRT-PCR) were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). Other biochemicals were purchased from either Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada) or Sigma (Oakville, ON, Canada). Rats (Sprague-Dawley, 150–200 g) and rabbits (New Zealand White male, 2 kg) were purchased from Charles River Laboratories (St-Constant, QC, Canada). All animal manipulations were performed in accordance with the Canadian guidelines and were approved by the ethics committee of the Université de Montréal.

### **2.2- Isolation of Purified Brush Border Membranes**

Brush border membranes from rat and rabbit intestinal mucosal scrapings were purified as described earlier for rabbit kidney (2). The membranes were prepared in batches using 6–10 rats (or 2–3 rabbits) and used fresh or kept frozen in liquid nitrogen until use (stored <4 wk). The composition of the intravesicular medium consisted of (in mM) 200 KCl, 0.1 MgSO<sub>4</sub>, 300 mannitol, and 50 HEPES-Tris pH 7.0.

### **2.3- Cloning of Rat SMIT2 Coding Sequence**

Rat SMIT2 cDNA was obtained by performing reverse transcription of rat renal mRNA with Superscript II according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) followed by PCR using Phusion Polymerase (Fermentas, Burlington, ON, Canada). The oligonucleotides used were GATCTGCAGACCGACTGAGAAGTCATTCAG for the 5' primer and CTAGTAAACACACAGCTTTATTATCGTTTCCTGG for the 3' primer. The PCR product was treated with Exonuclease III (21) and inserted into the vector pT7TS, which had previously been cleaved with *Bgl* II and *Spe* I. After cloning, the recombinant vector was purified and then cleaved with *Eco*R I; mRNA was transcribed by using the T7 mMessage mMachine kit from Ambion (Austin, TX).

### **2.4- Oocyte Preparation, Injection of cRNA, and Incubation**

Procedures for oocytes isolated from *Xenopus laevis* were as previously described (2). On the day following isolation, oocytes were injected with either 46 ng human GLUT2 mRNA (46 nl at 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) (13) for 2-deoxyglucose (2DG) uptake assays or 4.6 ng rat SMIT2 mRNA (46 nl at 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) for electrophysiology studies and incubated in Barth's solution supplemented with 5% horse serum, 2.5 mM Na pyruvate, and antibiotics (penicillin, streptomycin, and kanamycin) for 5–7 days prior to assay.

### **2.5- Electrophysiology**

Oocyte currents were measured with a two-microelectrode voltage-clamp technique as previously described (4). Current and voltage electrodes were filled with 1 M KCl, and resistances were between 4 and 14 M $\Omega$ . The bath reference and current electrodes were Ag/AgCl pellets. The oocyte bath was continuously perfused with a modified low-sodium Barth's solution (65 mM NaCl instead of 90 mM along with 50 mM mannitol to maintain osmolarity). Only oocytes with

resting potentials more negative than  $-30$  mV were employed. The pulse protocol consisted of eight successive pulses of 250 ms separated by 500-ms periods at the resting potential ( $-50$  mV), covering a voltage range of  $+50$  to  $-125$  mV in 25-mV increments. Current and voltage data were analyzed by averaging values in a 25-ms window starting at 210 ms after initiation of the pulse. For determination of kinetic parameters, MI and DCI were added to low-sodium Barth's solution in varying concentrations (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, and 1 mM). The media used for kinetic evaluation of glucose employed glucose concentrations up to 50 mM by performing equimolar replacement of mannitol. For determination of phlorizin (Pz) affinity, the inhibitor was present in concentrations up to 1 mM.

## **2.6- Transport Studies**

*On BBMv.* Uptake of radiolabeled MI was performed as described elsewhere by a standard filtration technique (23). Transport was initiated by mixing freshly thawed BBMv with transport media in a 1:10 ratio (in mM: 200 NaCl, 0.1 MgSO<sub>4</sub>, 300 mannitol, 50 HEPES-Tris pH 7, and 1  $\mu$ Ci/ml [<sup>3</sup>H]MI) at room temperature. When required for osmolarity balance (variations  $>5$  mM), addition of substrates was compensated by removal of equivalent molar quantities of mannitol. After set intervals, 50- $\mu$ l samples were rapidly filtered on 65- $\mu$ m nitrocellulose filters and rinsed with 5 ml of ice-cold substrate-free transport media. Alternatively, a Fast Sampling, Rapid Filtration apparatus was used to perform very brief uptakes (1). Filters were then dissolved in 5 ml of scintillation cocktail (Betablend, ICN Biochemicals), and radioactivity was monitored with a Beckman LS6000 SC scintillation counter.

*On oocytes.* Uptakes were performed as already described (2). Control or GLUT2-injected oocytes were tested for both 2DG and MI uptake. Oocytes were incubated in Barth's solution containing tracer amount of substrate (1  $\mu$ l/ml [<sup>3</sup>H]MI or [<sup>3</sup>H]2DG) with or without saturating cold substrate (10 mM MI or 2DG) to separate specific and nonspecific uptake.

### **2.7- qRT-PCR**

Quantification of SMIT2 mRNA was performed by using LUX technology employing a SuperScript III Platinum one-step qRT-PCR system kit (Invitrogen). Total RNA was isolated from kidney cortices and intestinal mucosa from rats and rabbits by the Trizol extraction procedure. Both rabbit and rat SMIT2 mRNA were used as standards for quantification of specific mRNAs by procedures described elsewhere (23).

### **2.8- Data Analysis**

Determination of kinetic parameters was performed by using Origin 6.1 software (OriginLab, Northampton, MA). For radiolabeled uptakes into BBMv, values are presented as pmol/mg protein for various time intervals.  $K_m$  values for MI were determined by use of a tracer inhibition equation described elsewhere (28) whereas  $K_i$  values for DCI and D-glucose were performed by using the classical competitive inhibition equation with predetermined  $K_m$  and  $V_{max}$  values for MI set as constant parameters. For electrophysiological studies, determination of kinetic parameters for MI, DCI, and glucose was performed by fitting data to the Michaelis-Menten equation without a nonspecific component. Evaluation of the  $K_i$  value for Pz was performed by fitting data to a competitive inhibition equation using  $K_m$  and  $I_{max}$  values for MI as constant parameters. The uncertainties described for the calculated parameters represent the accuracy of the fitting procedure as determined by the software. All experiments were performed at least three times using three different BBMv or oocyte preparations. Figures represent typical results.

### **3- RESULTS**

#### **3.1- MI Transport in Intestinal BBMv**

Past studies of transporters using BBMv purified from both intestine and kidney were often performed using rabbits because they provide large quantities of material and a high degree of purification. In a previous paper from our laboratory, BBMv purified from rabbit kidney were successfully used to characterize the luminal transport of MI (23). A similar set of experiments was thus performed to investigate MI uptake processes in the rabbit intestine. Figure 1A depicts uptake-time curves for MI in BBMv in either the presence (○) or absence (●) of saturating amounts of cold substrate (10 mM). To our surprise, all experiments using rabbit intestine (8 assays) failed to show typical uptake curves comprising overshoot and rapid settling back to equilibrium level, although two assays did present a twofold increase of tracer MI uptake over that seen under saturating conditions. On the other hand, BBMv purified from rat small intestine (Fig. 1B) showed high levels of specific MI uptake. As shown, a typical overshoot indicative of secondary active transport systems is found under tracer conditions whereas simple equilibration is achieved if 10 mM cold MI is present in the uptake media. The overshoot was observed for the first minute of uptake and the amount of intravesicular, radiolabeled MI attained over four times the equilibrium level, which was reached within 10 min. Such a clear distinction between the MI uptake seen with rabbit and rat led us to quantify the presence of SMIT2 transporters in kidney and intestine for both rat and rabbit. As shown in Fig. 2, quantification of SMIT2 mRNA through qRT-PCR shows equivalent expression levels in rat for both kidney and intestine whereas in rabbit only the kidney expresses SMIT2 mRNA with barely any SMIT2 detection in intestine.

### **3.2- Characterization of MI Transport in Purified Rat BBMv**

Because rabbit intestine lacked any specific MI uptakes, we used rat BBMv to clearly identify the nature of the transporter(s) involved and to define the kinetics of MI transport activities. Descriptive characterization of MI transport was achieved by performing initial MI uptakes (15 s) in the presence of known substrates and/or inhibitors of the two SMIT subtypes. This complete characterization is presented in Fig. 3. Initial uptakes of radiolabeled MI (0.16 pmol/mg protein x 15 s) were challenged by different concentrations of the following agents: cold MI and glucose (up to 2 mM), DCI and Pz (up to 1 mM). The initial uptake (Ctrl) was also performed in the absence of sodium ( $K^+$  replacement) to identify any possible  $Na^+$ -independent pathway for MI in BBMv. In addition, MI uptake was tested with the glucose facilitated transport inhibitor phloretin (Pt, 1 mM), L-fucose (100 mM), the GLUT-specific substrate 2DG (10 mM) and with the SGLT1-specific substrate  $\alpha$ -methylglucose (AMG, 10 mM).

As expected, all MI accumulation within the BBMv was completely  $Na^+$  dependent given that uptake in the absence of sodium was similar to that found in the presence of excess cold MI. Furthermore, since increasing amounts of DCI completely inhibited specific MI uptake whereas 100 mM L-fucose failed to reduce uptake significantly, it can be concluded that there is no evidence for any SMIT1 activity in rat BBMv whereas SMIT2 (the DCI-sensitive transporter) appeared to be responsible for all MI transport observed. As expected from the properties of rabbit SMIT2 (28), 50  $\mu$ M Pz was efficient in inhibiting MI uptake whereas Pt was without effect. Furthermore, the SGLT1 and GLUT transport systems showed no evidence of being involved in BBMv MI transport since high concentrations of their specific substrates (AMG and 2DG, respectively) failed to alter initial uptake of 0.36 nM MI. It is interesting that 1 mM D-glucose is effective in reducing the level of MI transport whereas 10 mM AMG fails to inhibit MI transport significantly. This is consistent with the reported properties of rabbit SMIT2 in which 50 mM AMG did not stimulate a cotransport current but 50

mM D-glucose did (10). We thus conclude that, in rat intestine, SMIT2 is the only transport system involved in the apical uptake of MI.

In the next set of experiments, inhibition curves were used to evaluate kinetic parameters using an analysis technique based on the competitive inhibition of tracer uptake either by its own substrate or by true competitive inhibitors (28).  $K_m$  and  $V_{max}$  values were thus first determined for MI and were then set as constant parameters for the evaluation of  $K_i$  values for all other effectors (DCI, glucose, and Pz). Figure 4 presents a typical displacement curve of radiolabeled MI (0.36 nM) uptake by increasing concentrations of cold substrate (up to 2 mM). Data can be satisfactorily fitted to a single-site equation, as is shown by the linearity of an Eadie-Hofstee plot presented in the inset ( $K_m$  value of  $0.12 \pm 0.05$  mM and  $V_{max}$  of  $98 \pm 36$  pmol/mg protein  $\times$  15 s). Efforts to fit kinetic data to a two-site equation failed to identify a credible secondary system, consistent with the existence of a single transport system for MI in these vesicles. Kinetic analysis was performed for 7 independent experiments, generating similar MI  $K_m$  values spanning between 67 and 283  $\mu$ M with an average of  $150 \pm 40$   $\mu$ M. Experiments similar to those shown in Fig. 3 were used to determine affinities for DCI, glucose, and Pz. As experiments were performed under the same conditions as those for MI, the kinetic constants determined for MI in each experiment (see Fig. 4) were used as constants here. As seen in Table 1 DCI exhibits a  $K_i$  value ( $146 \pm 9$   $\mu$ M) similar to that of MI whereas the glucose  $K_m$  is sixfold higher ( $0.93 \pm 0.35$  mM). On the other hand, Pz is a potent inhibitor with a  $K_i$  of  $15 \pm 6$   $\mu$ M.

### **3.3- Characterization of Rat SMIT2 Expressed in Xenopus Oocytes**

Rat SMIT2 was expressed in *Xenopus* oocytes to assess kinetic parameters for substrates (MI, DCI, and glucose) and an inhibitor (Pz) specifically for the rat SMIT2 protein, as determined in a heterologous system, and compare them to values obtained from rat intestinal BBMv. Figure 5A depicts current-voltage curves generated by plotting the oocyte current caused by the addition of MI (0–1

mM) at different membrane potentials. The currents elicited by MI at a given membrane potential were then plotted against the corresponding MI concentrations to determine the affinity for this substrate (Fig. 5B). The same approach was used to determine the affinities for the two other substrates: DCI (up to 1 mM) and glucose (up to 50 mM). Similarly, the  $K_i$  value for Pz was determined by fitting the currents induced by 0.1 mM MI in the presence of different Pz concentrations. For this purpose, the kinetic values ( $K_m$  and  $I_{max}$ ) determined for MI (see Fig. 5B) were used as constants in a competitive inhibition equation to properly evaluate the  $K_i$  value of Pz. The  $K_m$  values remained fairly constant at different membrane potentials (see Fig. 5C). All kinetic parameters determined on oocytes are presented in Table 1 along with those already determined in BBMv. The kinetic parameters evaluated in oocytes showed similar affinities for MI ( $270 \pm 19 \mu\text{M}$ ), DCI ( $310 \pm 56 \mu\text{M}$ ) and Pz ( $16 \pm 7 \mu\text{M}$ ) to those measured in BBMv whereas the glucose affinity constant in oocytes is remarkably high ( $35.5 \pm 7.3 \text{ mM}$ ), ~40 times higher than that seen with BBMv.

### **3.4- Comparing Glucose and MI Transport in Purified Rat BBMv**

To compare the activity levels of SMIIT2 and SGLT1 in rat BBMv, tracer MI uptakes were compared with tracer glucose uptakes using the same vesicle preparations and the fast sampling rapid filtration apparatus. Figure 6 presents initial uptakes (up to 10 s) for both MI (●) and glucose (○) set at 0.4 nM along with linear regression analysis performed on the data to evaluate initial uptake capacities. As seen in this figure, tracer glucose uptake (0.0185 pmol/min) is sixfold higher than that found with MI (0.0033 pmol/min). Very similar ratios were found within all assays performed ( $n = 5$ ). Given the low substrate concentrations used, the affinities of the two transporters for their substrates are unimportant and the data represent the true relative amounts of transport activity.



### **3.5- GLUT2 as a Basolateral Exit Pathway for MI**

Because nutrients absorbed by enterocytes usually leave the cell through specific basolateral transport systems, we tested the possibility that GLUT2, the only basolateral pathway for glucose, could mediate the exit of MI. The human GLUT2 transporter was thus expressed in *X. laevis* oocytes and tested for the specific uptake of radiolabeled MI. As seen in Fig. 7, GLUT2 is unable to mediate MI transport, because barely any specific accumulation of MI is observed. On the other hand, 2DG, a specific substrate for GLUT2, was transported with great efficacy, as shown by the 67-fold increase in uptake of radiolabeled substrate in GLUT2-injected oocytes over that for control oocytes.

## **4- DISCUSSION**

In a previous report (24), we presented a complete characterization of MI transport in purified BBMV isolated from rabbit kidney in which we concluded that SMI2 is responsible for the reuptake of MI from the kidney ultrafiltrate. Extending this study to intestinal tissue was a logical step because both tissues share obvious functional similarities. Initial studies performed on rabbit intestinal BBMV did not, however, show any evidence for the existence of a MI transport system, as shown in Fig. 1A. This difference between rabbit and rat can tentatively be explained by the fact that almost all of the rabbit dietary MI is found as phytate, a hexakisphosphate derivative of MI which essentially functions as a metal ligand in plants (17, 18). In contrast, free MI is by far the major form of inositol found in the rat diet (19). It was thus not surprising to find MI transport in intestinal BBMV isolated from rat, as seen in Fig. 1B, and no corresponding uptake in rabbit vesicles (Fig. 1A). However, a study showing the existence of a Na<sup>+</sup>-dependent MI transport system in an herbivorous fish indicates that herbivores do not always lack Na<sup>+</sup>/MI cotransport (35). Figure 1B demonstrates a classical overshoot of MI

uptake that rapidly subsides within a few minutes, indicative of secondary active MI uptake. A similar assay performed in the presence of saturating MI (○) only showed equilibration of the substrate. This data is very similar to that already observed with BBMv purified from rabbit kidney (24). This species difference for SMIT2 expression in intestine is corroborated by qRT-PCR data (Fig. 2) indicating that SMIT2 transcripts are essentially absent from rabbit enterocytes and are not simply located in other cellular compartments (as is seen with GLUT4, which is located within intracellular stores when not needed) (31). In fact, the existence of a Na<sup>+</sup>-dependent MI transport system in the rat intestine had already been demonstrated in purified BBMv (34), although without extensive characterization of the transport system(s) involved. We further pursued this investigation in rat BBMv to better characterize this activity in regards to its molecular identity and transport properties.

Characterization of MI transport performed through inhibition assays (Fig. 3) enabled us to identify the transport protein involved in this process. Using DCI and L-fucose as discriminating substrates for the two SMITs, we showed that only SMIT2 mediates MI transport in rat intestinal BBMv (Fig. 3), because DCI completely inhibited transport whereas 100 mM L-fucose failed to significantly alter MI uptake. Although complete inhibition of mediated MI transport by DCI is sufficient to identify SMIT2 as the unique transport system in this tissue, two other sugar transport systems that are present in the BBMv were also considered. First, the possible involvement of the fructose-specific transporter GLUT5 in MI transport was refuted since 2DG, a specific substrate for GLUTs including rat GLUT5 (32), did not alter the uptake of tracer MI even at 10 mM (Fig. 3, *bottom*). Also, because all MI transport was Na<sup>+</sup> dependent, as seen by the complete dissipation of mediated uptake when Na<sup>+</sup> is replaced by isosmolar K<sup>+</sup> (0 Na<sup>+</sup>), any involvement of GLUT proteins or HMIT could be excluded since they all are Na<sup>+</sup> independent. The second system considered, the Na<sup>+</sup>-glucose transporter SGLT1, was also ruled out since 10 mM AMG failed to significantly inhibit tracer MI

uptake. The use of 10 mM AMG as a specific condition for evaluating the possible contribution of SGLT1 to MI uptake was justified by the fact that this concentration is much higher than the  $K_m$  of this specific substrate for SGLT1 (0.4 mM; Ref. 25) yet it does not appear to affect cloned rabbit SMIT2 (10). In addition, rat SMIT2 has even less affinity for AMG than does the rabbit protein since AMG superfusion could not elicit any current in oocytes expressing rat SMIT2, even at 50 mM (R. Aouameur, unpublished observation). Finally, as expected for a  $\text{Na}^+$ -dependent sugar transport system, SMIT2 shows great affinity toward Pz ( $15 \pm 6 \mu\text{M}$ ). The  $K_m$  value found for MI with rat BBMv ( $150 \pm 40 \mu\text{M}$ ) is comparable to that found by Scalera et al. on a similar preparation (34) or to that found using rabbit kidney BBMv (15, 24).

When comparing the various kinetic parameters described for SMIT2 between the oocyte expression system and BBMv, the single noteworthy difference concerns the affinity for glucose. Although the glucose affinity found for rat SMIT2 expressed in oocytes (mean  $K_m$  value of 4 assays =  $35.5 \pm 7.3 \text{ mM}$ ) is compatible with the affinities previously reported for rabbit SMIT2 (10), the  $K_i$  values found in BBMv assays are remarkably lower (mean value of 4 assays =  $0.93 \pm 0.35 \text{ mM}$ ). A possible role for SGLT1 activity in affecting measurements of glucose inhibition of SMIT2, such as rapid dissipation of sodium gradient or reduced membrane potential, is unlikely since a high concentration of AMG (10 mM) did not significantly alter tracer uptake of MI. Also, as seen in Fig. 5C, the  $K_m$  for SMIT2 is not influenced by more positive membrane potentials, indicating that a change in membrane potential should not reduce MI uptake. We cannot rule out the possibility that SGLT1 is involved in the unusually low  $K_i$  value for glucose inhibition of SMIT2, but any actual mechanism must be more complex than simple competitive inhibition. To sum up the comparisons, although MI and DCI compete the transport of radiolabeled MI with  $K_i$  values that are consistent with their measured  $K_m$  in oocytes and Pz inhibits radiolabeled MI uptake in BBMv with a  $K_i$  value that is also observed in electrophysiological experiments,

the observed  $K_m$  value for D-glucose-induced current is 40 times larger than the  $K_i$  observed in BBMVs. This indicates that the mechanism used for inhibition is different from the mechanism used for transport. The difference maybe that in oocyte SMIT2 is alone but in BBMv, the activity of SMIT2 is measured in the presence of an intense transport activity mediated by SGLT1. Inhibition of SMIT2 must involve a site separate from that required for cotransport, which may be inside or outside the membrane, and will require future study. Our data appear to be in agreement with the study from Scalera et al. (34) evaluating MI uptake in rat BBMv, where glucose was shown to be an inhibitor with mixed-type mechanism and with very weak transport efficiency.

Many reports have stressed the dietary need for MI. Studies in gerbils have linked intestinal MI uptake to lipid metabolism and chylomicron synthesis because its removal from the diet was shown to generate pathological conditions such as intestinal lipodystrophy and liver dysfunction of lipid metabolism (5–8, 18, 19). Because MI metabolism seems to occur within enterocytes (19), the existence of a basolateral pathway for its exit may not be required as it is for other absorbed nutrients such as glucose although there is evidence of ingested MI appearing in both mouse and human plasma (3, 14). In fish, however, there is a single report presenting data for a basolateral pathway for MI (33) and, as expected, this transport is diffusive ( $\text{Na}^+$  independent). In mammals, on the other hand, GLUT2 is the basolateral pathway responsible for the exit of glucose from enterocytes and proximal convoluted tubule (kidney) cells. Consequently, we examined the possibility that this sugar transporter could mediate MI transport but no specific uptake was observed when this transporter was expressed in oocytes (Fig. 7). Assays using purified basolateral membranes to identify a specific pathway for MI exit are presently underway in our laboratory.

Comparing the uptake of glucose and MI into BBMv shows that SGLT1 activity is about six times stronger than SMIT2 activity (Fig. 6). When considering that the  $K_m$  value for intestinal glucose transport on SGLT1 (140  $\mu\text{M}$ ; Ref. 29) is

very similar to that for MI determined on SMIT2 (150  $\mu$ M, herein), it can be concluded that SGLT1 glucose transport activity should be six times larger than that of SMIT2 in the rat intestine for equimolar concentrations of glucose and MI. With its very weak affinity for glucose, a significant participation of SMIT2 in intestinal glucose uptake seems unlikely. This is corroborated by the glucose-galactose malabsorption syndrome in humans, characterized by a deficit in SGLT1 function, which is not obviously compensated for by the presence of SMIT2. Evaluation of competition between the two substrates for SMIT2 transport is largely meaningless in the absence of fixed luminal glucose and MI concentrations. In kidney, where both transporters are also found and glucose and MI concentrations are stable, such consideration becomes relevant but will depend on the specific intranephronic location of MI and glucose cotransporters (24).

## **5- CONCLUSION**

In conclusion, we have presented evidence for SMIT2-dependent uptake of MI in the apical domain of rat enterocytes similar to those already determined in rabbit kidney (24).

## **6- ACKNOWLEDGMENT**

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), grant #MOP-67038.

## **7- REFERENCES**

1. **Berteloot A, Malo C, Breton S, Brunette M.** Fast sampling, rapid filtration apparatus: principal characteristics and validation from studies of D-glucose transport in human jejunal brush-border membrane vesicles. *J Membr Biol* 122: 111–125, 1991.
2. **Bissonnette P, Coady MJ, Lapointe JY.** Expression of the sodium-myoinositol cotransporter SMIT2 at the apical membrane of Madin-Darby canine kidney cells. *J Physiol* 558: 759–768, 2004.
3. **Chau JF, Lee MK, Law JW, Chung SK, Chung SS.** Sodium/myo-inositol cotransporter-1 is essential for the development and function of the peripheral nerves. *FASEB J* 19: 1887–1889, 2005.
4. **Chen XZ, Coady MJ, Jalal F, Wallendorff B, Lapointe JY.** Sodium leak pathway and substrate binding order in the Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter. *Biophys J* 73: 2503–2510, 1997.
5. **Chu SH, Geyer RP.** Myo-inositol action on gerbil intestine: reversal of a diet-induced lipodystrophy and change in microsomal lipase activity. *Biochim Biophys Acta* 664: 89–97, 1981.
6. **Chu SH, Geyer RP.** Tissue content and metabolism of myo-inositol in normal and lipodystrophic gerbils. *J Nutr* 113: 293–303, 1983.
7. **Chu SH, Hegsted DM.** Myo-inositol deficiency in gerbils: comparative study of the intestinal lipodystrophy in *Meriones unguiculatus* and *Meriones libycus*. *J Nutr* 110: 1209–1216, 1980.
8. **Chu SW, Geyer RP.** myo-Inositol action on gerbil intestine. Association of phosphatidylinositol metabolism with lipid clearance. *Biochim Biophys Acta* 710: 63–70, 1982.
9. **Clements RS Jr, Diethelm AG.** The metabolism of myo-inositol by the human kidney. *J Lab Clin Med* 93: 210–219, 1979.
10. **Coady MJ, Wallendorff B, Gagnon DG, Lapointe JY.** Identification of a novel Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter. *J Biol Chem* 277: 35219–35224, 2002.

11. **Dawson RM, Freinkel N.** The distribution of free mesoinositol in mammalian tissues, including some observations on the lactating rat. *Biochem J* 78: 606–610, 1961.
12. **Dmitrieva NI, Burg MB.** Osmotic stress and DNA damage. *Methods Enzymol* 428: 241–252, 2007.
13. **Dolhofer R, Wieland OH.** Enzymatic assay of myo-inositol in serum. *J Clin Chem Clin Biochem* 25: 733–736, 1987.
14. **Gagnon MP, Bissonnette P, Deslandes LM, Wallendorff B, Lapointe JY.** Glucose accumulation can account for the initial water flux triggered by  $\text{Na}^+$ /glucose cotransport. *Biophys J* 86: 125–133, 2004.
15. **Groenen PM, Merkus HM, Sweep FC, Wevers RA, Janssen FS, Steegers-Theunissen RP.** Kinetics of myo-inositol loading in women of reproductive age. *Ann Clin Biochem* 40: 79–85, 2003.
16. **Hammerman MR, Sacktor B, Daughaday WH.** myo-Inositol transport in renal brush border vesicles and its inhibition by D-glucose. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 239: F113–F120, 1980.
17. **Handler JS, Kwon HM.** Regulation of renal cell organic osmolyte transport by tonicity. *Am J Physiol Cell Physiol* 265: C1449–C1455, 1993.
18. **Haydon MJ, Cobbett CS.** Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytol* 174: 499–506, 2007.
19. **Holub BJ.** Metabolism and function of myo-inositol and inositol phospholipids. *Annu Rev Nutr* 6: 563–597, 1986.
20. **Holub BJ.** The nutritional significance, metabolism, and function of myo-inositol and phosphatidylinositol in health and disease. *Adv Nutr Res* 4: 107–141, 1982.
21. **Ibsen L, Strange K.** In situ localization and osmotic regulation of the  $\text{Na}^+$ -myo-inositol cotransporter in rat brain. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 271: F877–F885, 1996.
22. **Kaluz S, Kolble K, Reid KB.** Directional cloning of PCR products using exonuclease III. *Nucleic Acids Res* 20: 4369–4370, 1992.

23. **Kwon HM, Yamauchi A, Uchida S, Preston AS, Garcia-Perez A, Burg MB, Handler JS.** Cloning of the cDNA for a Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter, a hypertonicity stress protein. *J Biol Chem* 267: 6297–6301, 1992.
24. **Lahjouji K, Aouameur R, Bissonnette P, Coady MJ, Bichet DG, Lapointe JY.** Expression and functionality of the Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter SMIT2 in rabbit kidney. *Biochim Biophys Acta* 1768: 1154–1159, 2007.
25. **Lahjouji K, Aouameur R, Bissonnette P, Coady MJ, Bichet DG, Lapointe JY.** Expression and functionality of the Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter SMIT2 in rabbit kidney. *Biochim Biophys Acta* 1768: 1154–1159, 2007.
26. **Lee WS, Kanai Y, Wells RG, Hediger MA.** The high affinity Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. Re-evaluation of function and distribution of expression. *J Biol Chem* 269: 12032–12039, 1994.
27. **Lien YH, Shapiro JI, Chan L.** Effects of hypernatremia on organic brain osmoles. *J Clin Invest* 85: 1427–1435, 1990.
28. **Lien YH, Shapiro JI, Chan L.** Study of brain electrolytes and organic osmolytes during correction of chronic hyponatremia. Implications for the pathogenesis of central pontine myelinolysis. *J Clin Invest* 88: 303–309, 1991.
29. **Malo C, Berteloot A.** Analysis of kinetic data in transport studies: new insights from kinetic studies of Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransport in human intestinal brush-border membrane vesicles using a fast sampling, rapid filtration apparatus. *J Membr Biol* 122: 127–141, 1991.
30. **Mate A, Barfull A, Hermosa AM, Gomez-Amores L, Vazquez CM, Planas JM.** Regulation of sodium-glucose cotransporter SGLT1 in the intestine of hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: R760–R767, 2006.
31. **Pascual JM, Solivera J, Prieto R, Barrios L, Lopez-Larrubia P, Cerdan S, Roda JM.** Time course of early metabolic changes following diffuse traumatic brain injury in rats as detected by (1)H NMR spectroscopy. *J Neurotrauma* 24: 944–959, 2007.



32. **Pessin JE, Bell GI.** Mammalian facilitative glucose transporter family: structure and molecular regulation. *Annu Rev Physiol* 54: 911–930, 1992.
33. **Rand EB, Depaoli AM, Davidson NO, Bell GI, Burant CF.** Sequence, tissue distribution, and functional characterization of the rat fructose transporter GLUT5. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 264: G1169–G1176, 1993.
34. **Reshkin SJ, Vilella S, Ahearn GA, Storelli C.** Basolateral inositol transport by intestines of carnivorous and herbivorous teleosts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 256: G509–G516, 1989.
35. **Scalera V, Natuzzi D, Prezioso G.** myo-inositol transport in rat intestinal brush border membrane vesicles, and its inhibition by D-glucose. *Biochim Biophys Acta* 1062: 187–192, 1991.
36. **Vilella S, Reshkin SJ, Storelli C, Ahearn GA.** Brush-border inositol transport by intestines of carnivorous and herbivorous teleosts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 256: G501–G508, 1989.
37. **Wood IS, Trayhurn P.** Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* 89: 3–9, 2003.
38. **Wright EM, Hirayama BA, Loo DF.** Active sugar transport in health and disease. *J Intern Med* 261: 32–43, 2007.
39. **Yamashita T, Shimada S, Yamauchi A, Guo W, Kohmura E, Hayakawa T, Tohyama M.** Induction of Na<sup>+</sup>/myo-inositol co-transporter mRNA after rat cryogenic injury. *Brain Res Mol Brain Res* 46: 236–242, 1997.
40. **Yamauchi A, Kwon HM, Uchida S, Preston AS, Handler JS.** Myo-inositol and betaine transporters regulated by tonicity are basolateral in MDCK cells. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 261: F197–F202, 1991.

## **8- LEGENDS AND FIGURES**

**Figure 1.** Uptake of tracer myo-inositol (MI) into purified brush border membrane vesicles (BBMv). Tracer MI (0.36 nM) with (○) or without (●) saturating cold substrate (10 mM MI) was incubated with BBMv purified from rabbit (A) or rat (B) small intestine. Data represent means  $\pm$  SE of triplicates.

**Figure 2.** Quantification of SMIT2 mRNA in kidney and intestine. mRNA purified from kidney (solid bar) and intestine (open bar) from both rat and rabbit were quantified for SMIT2 by quantitative real-time PCR (qRT-PCR; see MATERIALS AND METHODS). Data represent means  $\pm$  SE of triplicates from 3 individuals.

**Figure 3.** Inhibition profile of tracer MI uptake on purified rat BBMv. Purified BBMv were incubated for 15 s with tracer MI (0.36 nM) in the presence of different concentrations of various agents [MI, glucose, D-chiro-inositol (DCI), and phlorizin (Pz)] and uptakes are shown as displacement curves. Also, similar inhibition assays were performed by using single concentrations of other agents [0 mM Na<sup>+</sup>, 1 mM phloretin (Pt), 100 mM L-fucose, 10 mM 2-deoxyglucose (2DG), 10 mM  $\alpha$ -methyl-glucose (AMG)] and are presented in a bar graph. Data represent means  $\pm$  SE of triplicates. \* $P < 0.05$  with respect to MI uptake in the absence of competitor (Ctrl).

**Figure 4.** Kinetic determination of MI transport into purified rat BBMv. Purified BBMv were incubated for 15 s with tracer MI (0.36 nM) in the presence of different concentrations of cold MI (up to 2 mM). Data were fitted according to Malo and Berteloot (28) using a tracer inhibition equation to obtain  $K_m$  and  $V_{max}$  values. The *inset* presents Eadie-Hofstee transformation of the data according to kinetic evaluation [nonspecific fraction of uptake ( $K_d$ ) was removed] where V represents uptakes in pmol/mg protein  $\times$  15 s. Data are means  $\pm$  SE of 4 determinations.

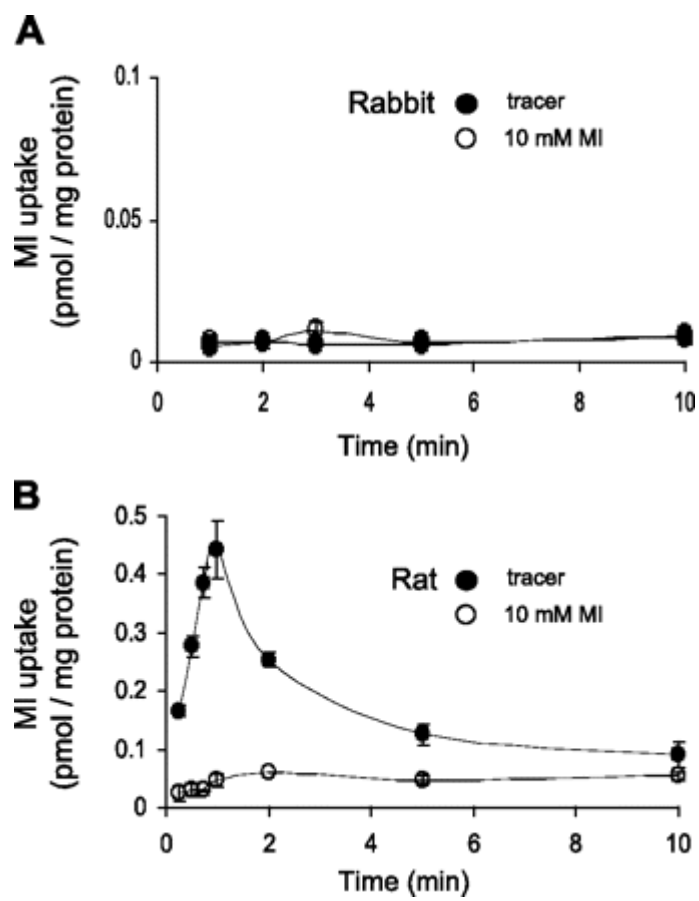
**Figure 5.** Kinetic determination of MI transport into SMIT2-expressing oocytes. Oocytes were injected with 4.6 ng rat SMIT2 cRNA and tested for MI-specific currents after 5–7 days of incubation. *A*: *I*-*V* curves presenting currents (*I*) elicited by the addition of different concentrations of MI (0–1 mM) at membrane potentials spanning from +50 to –125 mV. Data presented are from a representative oocyte. *B*: current-vs.-MI concentration plot with values extracted from *A* at –50 mV. Data were used for the determination of kinetic parameters  $K_m = 0.34 \pm 0.05$  mM,  $I_{max} = 495 \pm 27$  nA. Data presented are from a unique oocyte. *C*: currents depicted in *A* were used to determine  $K_m$  values (as in *B*) at varying membrane potentials from –125 mV to 0 mV. The dashed line represents the mean of all  $K_m$  values for this oocyte.

**Figure 6.** Rapid MI uptake into purified BBMv. Purified rat BBMv were incubated for short time periods (up to 10 s) with tracer quantities of MI (●) or glucose (○). Initial uptake rates were determined from linear regression of the data for both MI (0.0033 pmol/min) and glucose (0.0185 pmol/min). Data represent means  $\pm$  SE of triplicates.

**Figure 7.** MI and 2DG uptakes in GLUT2-expressing oocytes. Oocytes were injected with 46 ng of human GLUT2 cRNA and tested for both 2DG-specific (solid bars) and MI-specific (open bars) uptakes after 5–7 days of incubation. For both MI and 2DG, oocytes were incubated for 30 min in presence of either tracer alone or tracer with excess cold substrate (10 mM). The values represent the specific fraction of uptake as calculated by subtracting uptakes under saturating conditions to those determined with tracer alone. Data represent means  $\pm$  SE of 6–10 oocytes per condition. Control oocytes were not injected.

**Table I.** Kinetic parameters for MI uptake in rat BBMv and rat SMIT2-expressing oocytes

FIGURE 1:



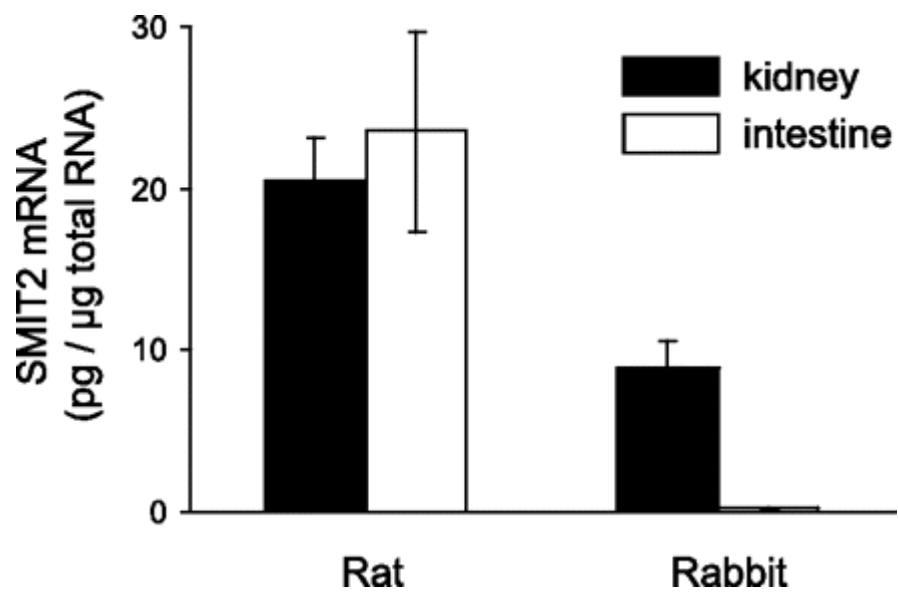
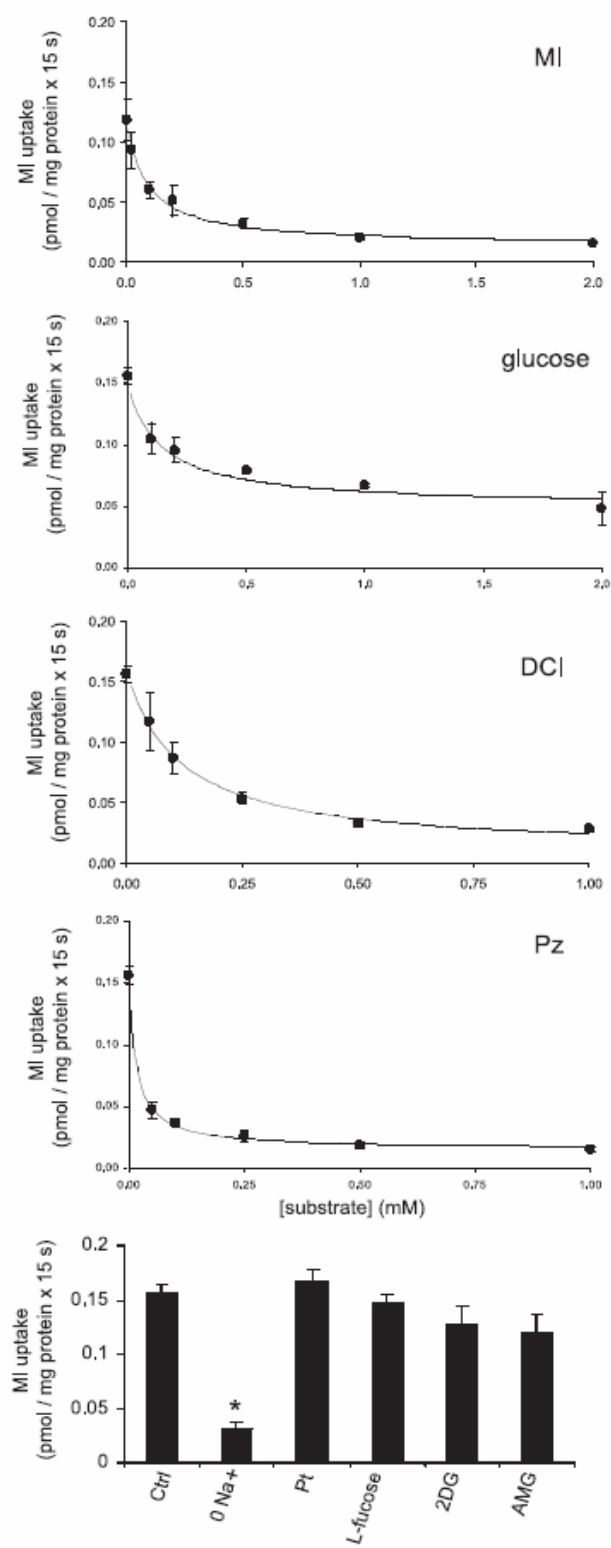
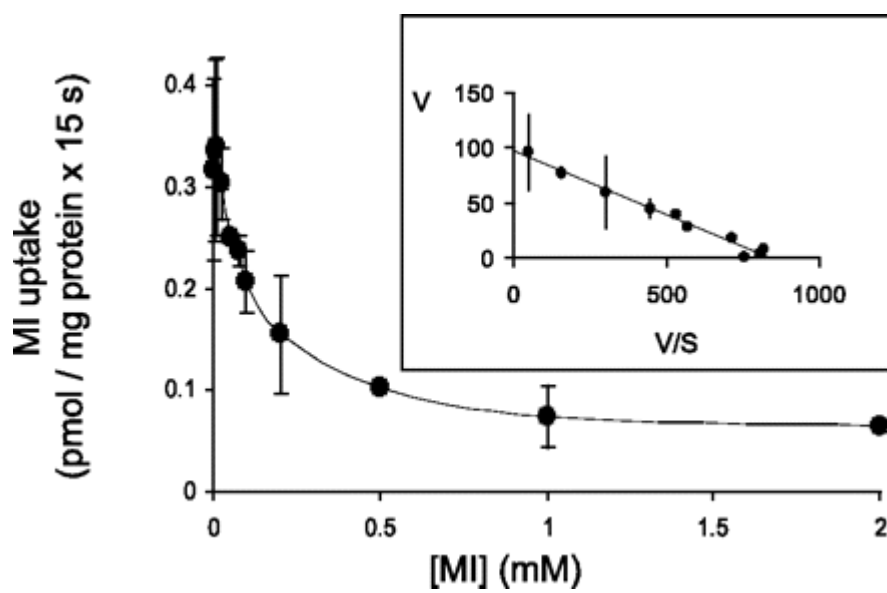
**FIGURE 2:**

FIGURE 3:



**FIGURE 4:**

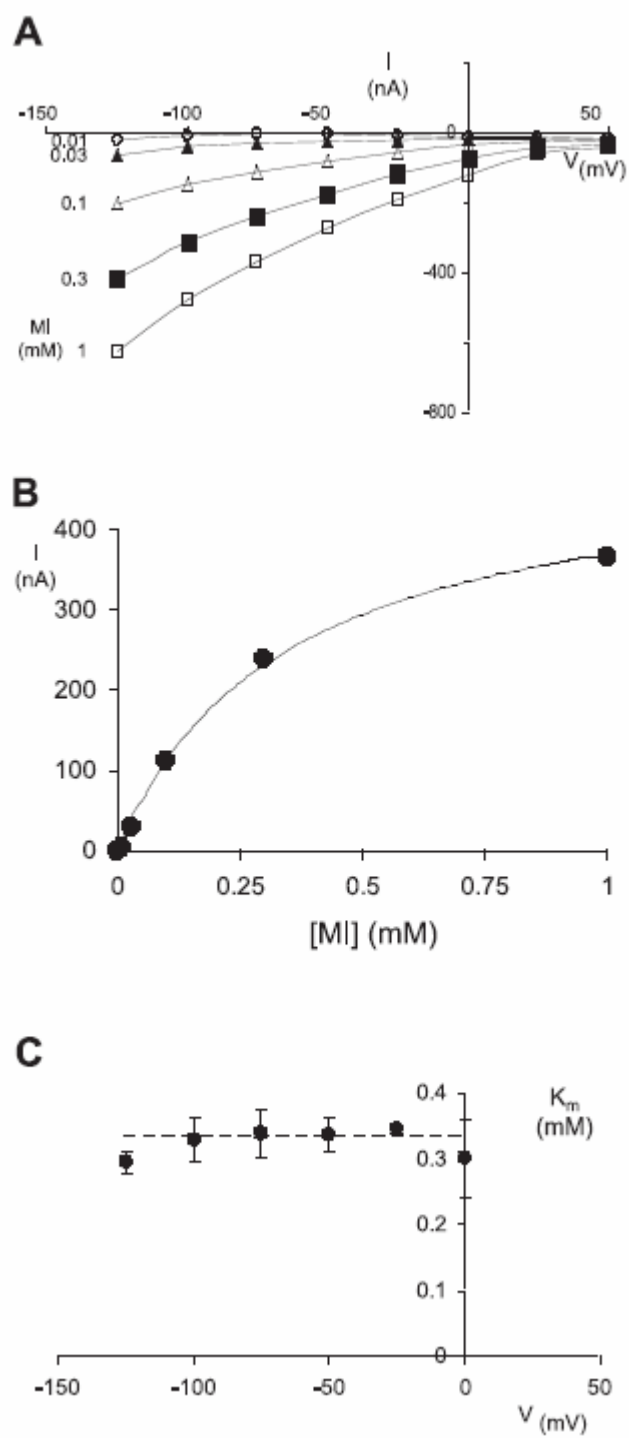
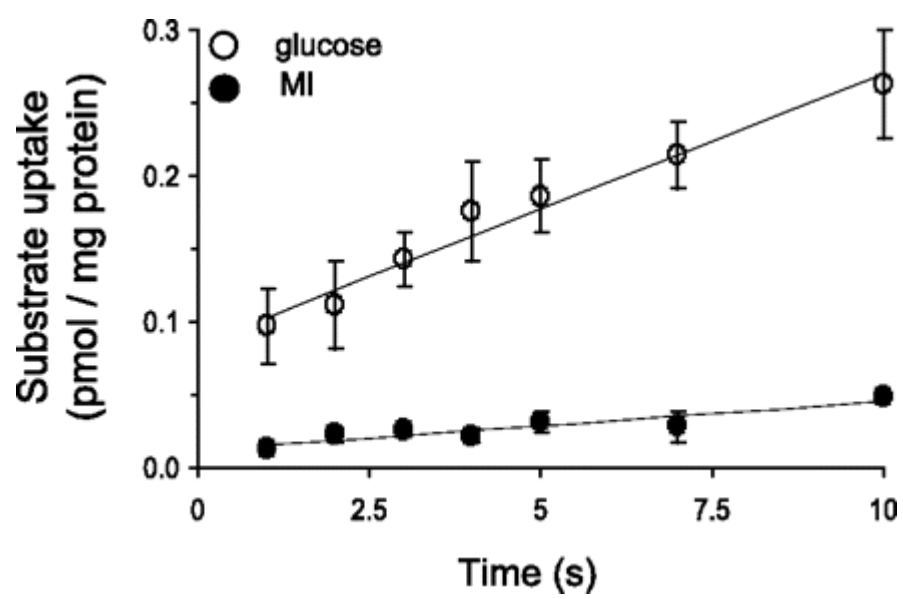
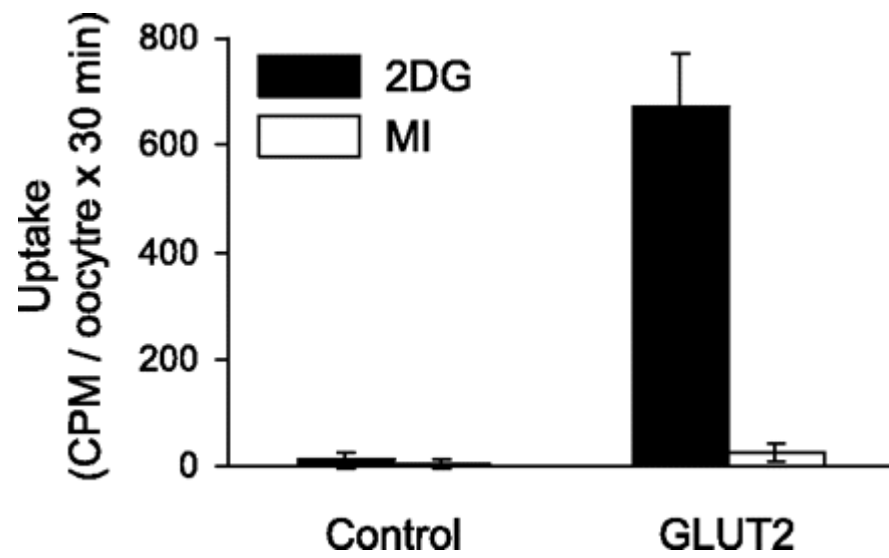
**FIGURE 5:**



FIGURE 6:



**FIGURE 7:**

**TABLE I:**

	BBMv	Oocytes
MI	150 ± 40 $\mu$ M	270 ± 19 $\mu$ M
DCI	146 ± 9 $\mu$ M	310 ± 56 $\mu$ M
Glucose	930 ± 350 $\mu$ M	35,500 ± 7,300 $\mu$ M
Pz	15 ± 6 $\mu$ M	16 ± 7 $\mu$ M

Values are means  $\pm$  SE. Kinetic parameters ( $K_m$ ) were determined for various substrates [myo-inositol (MI), D-chiro-inositol (DCI), glucose] and an inhibitor [phlorizin (Pz)] using brush border membrane vesicles (BBMv) as well as *Xenopus laevis* oocytes. Evaluation of uptake into BBMv were performed as previously described (28) whereas oocytes currents were analyzed by classical equations (Michaelis-Menten and competitive inhibition).

## **CHAPITRE IV- DISCUSSION**

Les fonctions ubiquitaires du *myo*-inositol et de ses dérivés ainsi que leur implication dans de nombreuses pathologies donnent tout son sens à l'étude de ce pseudo sucre et de son transport. Même s'il n'est pas toujours évident que les maladies perturbant les taux physiologiques de MI impliquent ses transporteurs, les nouvelles voies thérapeutiques liées à cet hydrate de carbone peuvent profiter d'une meilleure compréhension des mécanismes qui régissent son transport. Par ailleurs, une caractérisation approfondie d'un autre transporteur de la famille des SLC5 (après SGLT1) peut nettement affiner les connaissances que l'on possède quant au fonctionnement des co-transporteurs couplés au sodium. Vu les rôles physiologiques importants du MI, il est primordial que son absorption soit efficace au niveau du tractus intestinal et tout aussi performante au niveau des tubules rénaux. Pour assurer cette efficacité, trois systèmes de transport actif secondaire existent : HMIT, SMIT1 et SMIT2. Cette étude s'intéresse plus particulièrement à la caractérisation du co-transporteur SMIT2 dans les deux tissus où le prélèvement de MI est obligatoirement présent : l'intestin et le rein. La caractérisation dont il est question a d'abord consisté en l'évaluation de la fraction du transport de MI dont SMIT2 est responsable dans les membranes apicales des cellules épithéliales de ces deux tissus. Pour y parvenir, le principal modèle d'étude choisi consiste en des vésicules de bordure en brosse purifiées à partir de l'intestin de rat et du cortex rénal de lapin. Par la suite, nous avons établi les paramètres cinétiques les plus importants, soit les valeurs de  $K_m$  et de  $V_{max}$ , et vérifié la sensibilité du transporteur à certains inhibiteurs potentiels, tels le DCI, le L-fucose, le D-glucose et la phlorizine. Il s'agissait également d'examiner si d'autres transporteurs pouvaient servir à prélever le MI du milieu où baignent les vésicules. Ce n'est pas la première fois que ce type d'évaluation est entrepris (Hammerman et al. 1980; Scalera et al. 1990). Cependant, la méconnaissance à l'époque des deux isoformes SMIT1 et SMIT2 ne permettait pas d'identifier correctement les mécanismes physiologiques réels, ce qu'ont permis les études présentées dans ce mémoire. Nos recherches n'ont pas simplement permis de caractériser le transport du MI. Elles

ont aussi permis d'examiner les fonctions physiologiques spécifiques à l'un de ses transporteurs (SMIT2).

## **1- LA CARACTÉRISATION DE SMIT2 DANS LES BBMv DE REIN**

Notre caractérisation du co-transporteur  $\text{Na}^+/\text{myo}$ -inositol SMIT2 débute dans les vésicules de membranes en bordure en brosse issues du cortex de rein de lapin (Lahjouji et al. 2007). Nous pouvons d'emblée écarter la participation de HMIT au transport du MI dans le cadre de cette étude pour plusieurs raisons. Le premier argument est que pour être fonctionnel de façon optimale, ce transporteur doit être soumis à des pH assez acides (environ 5). Or ici, nous travaillons dans des conditions de pH physiologique aux alentours de 7, pH auquel l'efficacité de HMIT est nettement réduite (six fois plus élevée à pH 5) (Uldry et al. 2001). De plus, Hammerman *et al* (1980) ont prouvé que la totalité du transport dans les BBMv de rein de lapin est dépendant du sodium. Ainsi, l'activité de HMIT, dont le fonctionnement est dépendant d'un gradient de protons, est fort probablement négligeable dans ces BBMv. Ces arguments fonctionnels confirment la distribution tissulaire de HMIT obtenue par hybridation *in situ* (Uldry et al. 2001). En effet, selon cette étude, très peu de HMIT serait exprimé dans le rein.

Avant d'entreprendre l'étude de SMIT2 dans le rein, il était important d'évaluer les niveaux de SMIT1 et de SMIT2 dans les deux tissus majeurs du rein (médulla et cortex) afin de cibler une région en particulier lors de la caractérisation. Cette quantification entreprise par qRT-PCR, en mesurant la quantité d'ARN<sub>m</sub> correspondant à chaque transporteur, est une information unique dans la littérature (Fig.1, Chap. II, p.50). Il a ainsi été démontré que les deux transporteurs existent en différentes proportions dans le cortex et dans la médulla

du rein de lapin. On constate que SMIT1 est significativement plus abondant dans la médulla. Pour SMIT2, c'est exactement le phénomène inverse, il se retrouve davantage dans le cortex. Cette distribution différentielle des deux transporteurs dans le rein évoque la possibilité d'une fonction spécifique à chacun d'eux dans le même organe. Cette idée est d'ailleurs appuyée par le fait que, dans les cellules épithéliales, SMIT1 est situé sur la membrane basolatérale alors que SMIT2 a une localisation apicale (Bissonnette et al. 2004).

Pour s'assurer que les taux d'ARN<sub>m</sub> correspondent à la distribution protéique, nous avons entrepris des expériences d'immunobuvardage grâce à un anticorps spécifique à SMIT2, sur des extraits de médullaire, de cortex et de BBMv (Fig. 2, Chap. II, p.51). Le Western blot présente une bande à 75 kDa qui concorde avec la masse estimée de SMIT2 (74 kDa). Comme prévu, cette bande est plus dense dans le cortex que dans la médulla, confirmant que SMIT2 est plus abondant dans le tissu externe du rein. Ce résultat corrobore les informations déduites par qRT-PCR. On constate également que les BBMv constituent une fraction particulièrement enrichie en SMIT2, ce qui justifie amplement le choix de poursuivre la caractérisation de ce transporteur dans ces vésicules. Il apparaît également sur les gels une bande un peu plus effacée, de poids moléculaire inférieur. Pensant qu'il pouvait s'agir d'une forme non glycosylée, nous avons soumis les BBMv à une dégradation par la PNGase F, une enzyme pouvant cliver de façon spécifique tout résidu N-glycosylé. Ce traitement n'ayant pas permis d'obtenir la bande de masse réduite, nous en avons déduit que SMIT2 n'est pas N-glycosylé. Cependant, d'autres motifs de glycosylation existent. En effet, si l'arbre de glycosylation se lie sur le groupement NH<sub>2</sub> d'un résidu asparagine alors la protéine est N-glycosylée. Par contre, si l'arbre s'attache au groupement OH d'un résidu sérine ou thréonine, on dit que le sucre est O-lié. Il se peut donc que l'arbre de glycosylation soit lié autrement qu'en N, ou encore, que celui-ci ne soit pas glycosylé du tout. Ce dont on peut tout de même être convaincu, c'est que la bande, qu'elle soit réduite ou non, est spécifique puisqu'elle est déplacée par le

peptide et est absente du sérum pré-immun. L'hypothèse la plus probable à ce moment est que la bande de poids inférieur correspond à un produit de dégradation de SMIT2.

La courbe du transport du MI radioactif en fonction du temps affiche un profil typique des transports actifs secondaires (Fig.3, chap.II, p.52). Ce tracé caractéristique que l'on nomme «overshoot» consiste en une ascension rapide qui, dans ce cas précis, atteint son apogée environ 5 min après le début de la réaction. On constate ensuite un efflux abrupt du traceur qui lui permet d'accéder à son état d'équilibre.

Des concentrations saturantes de L-fucose et de DCI inhibent respectivement SMIT1 et SMIT2 et nous permettent ainsi de distinguer la partie de transport effectuée par chacun des deux co-transporteurs. Une concentration saturante de MI non-radioactif permet à son tour d'inhiber tout le transport spécifique et revient, dans ce cas précis, à une suppression de 80% du transport de MI radioactif. 100 mM de L-fucose semblent diminuer d'environ 35% le transport de  $^3\text{H}$ -MI. Ceci suggère qu'une partie du transport est effectué par SMIT1. On s'attendrait, dans une telle condition, à ce que l'inhibition par le DCI soit complémentaire au 35% observé et que l'addition des deux donne le profil d'inhibition obtenu par le MI froid. Or 1mM de DCI suffit à réduire de 80% le transport du MI marqué au même titre qu'une concentration saturante de MI froid. Ceci indiquerait plutôt que tout le transport spécifique de MI est dirigé par SMIT2.

Pour élucider cette incohérence, nous avons entrepris d'établir les profils d'inhibition de chacun de ces produits (MI froid, DCI, L-fucose) (Fig. 4, chap.II, p.53). Le principe de ces expériences est simple; il s'agit d'une inhibition compétitive qui consiste à concurrencer le transport du MI radioactif par des concentrations croissantes d'inhibiteur. On relève que les courbes de MI froid et



de DCI se chevauchent parfaitement. Ces deux composés inhibent au même niveau, de façon très significative et à partir de petites concentrations de substrat le transport du  $^3\text{H-MI}$ . Pour sa part, le L-fucose inhibe toujours partiellement ce transport au même taux (environ 38%), mais en utilisant une concentration très élevée (100mM). Aussi à 50mM, le L-fucose ne semble toujours pas inhiber de façon significative le transport de  $^3\text{H-MI}$ . D'une part cette inhibition est incompatible avec l'inhibition habituelle de SMIT1 par le L-fucose (Bissonnette et al. 2004). D'autre part, cette inhibition n'est pas compatible avec un  $K_i$  déjà établi pour ce produit ( $4,8 \pm 1,0$  mM) sur ce transporteur pour la lignée cellulaire des MDCK (Bissonnette et al. 2004). Nous nous expliquons difficilement ce phénomène. Peut-être la très grande concentration de L-fucose diminue-t-elle indirectement le transport du MI en affectant le gradient d'ions sodium d'une quelconque façon. Ainsi, nous en avons conclu que SMIT2 est le seul transporteur présent à la membrane apicale des cellules du tubule contourné proximal. Il serait donc responsable de la totalité de la réabsorption de MI présent dans le filtrat glomérulaire vers les cellules tubulaires. Ceci est d'ailleurs compatible avec les résultats obtenus par Hammerman *et al* (1980) puisque, sur le même modèle d'étude, ils ont détecté un transporteur de MI stéréospécifique ne transportant pas le L-glucose. Or, SMIT1 ne fait pas preuve de stéréospécificité et transporte les deux isomères du glucose (Hager et al. 1995). Pour confirmer nos résultats, l'idéal serait de diriger un anticorps spécifique contre la protéine SMIT1 afin d'en tester la présence à la surface des vésicules étudiées par immunobuvardage comme il a été fait pour SMIT2 (Fig. 2, Chap. II, p.51). Mais ceci n'est pas encore possible puisque, malgré le fait que l'on connaisse SMIT1 depuis 1991, aucun anticorps efficace n'est encore disponible pour ce co-transporteur.

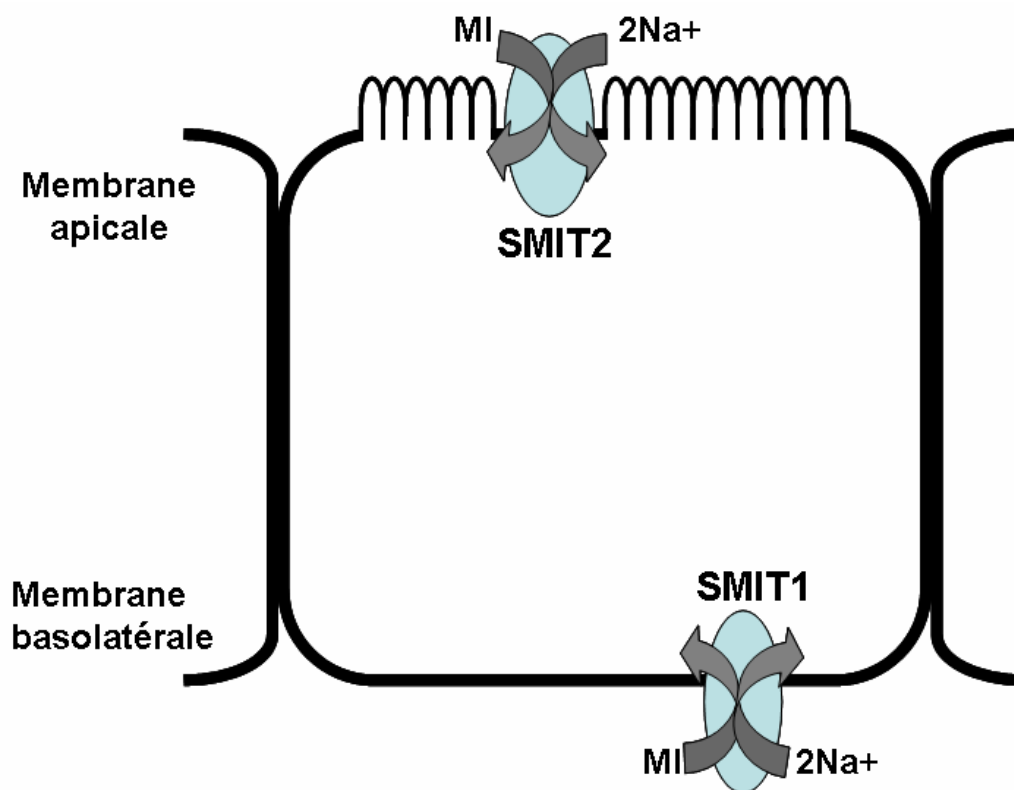
Une concentration saturante d'AMG, substrat spécifique de SGLT1, n'a pas pu inhiber le transport du MI radioactif. Nous savons de façon formelle que SMIT2 ne transporte pas l'AMG, ce dernier n'a pu donc agir que sur SGLT1 (Coady et al. 2002). Puisque dans notre étude le transport de MI n'est pas altéré

par la présence d'AMG, on en déduit que SGLT1 qui est exprimé à un très haut niveau dans ces vésicules n'intervient pas dans le transport du *myo*-inositol. Ce résultat concorde avec les études précédentes qui stipulaient que les transporteurs du glucose n'interagissaient pas avec le MI (Hammerman et al. 1980; Scalera et al. 1990).

Comme prévu, le LCI, stéréoisomère du DCI, non plus n'a eu aucun effet significatif. En effet, SMIT2 semble présenter une stéréospécificité pour les produits biologiques répandus de type D (D-glucose, D-chiro-inositol), ce qui est l'une de ses principales différences avec SMIT1 (Coady et al. 2002).

Grâce à la courbe du profil d'inhibition du MI radioactif par le MI froid (Fig. 5, chap.II, p.54), nous avons pu établir le paramètre cinétique le plus important, le  $K_m$ . Le  $K_m$  de SMIT2 pour le MI dans les BBMv de rein de lapin est de  $57 \pm 14 \mu\text{M}$  et sa vitesse maximale est de  $221 \pm 24 \text{ nmol/mg de protéine} \times 2 \text{ min}^{-1}$ .

Nous savons que la localisation de SMIT1 dans les MDCK est basolatérale. Notre étude sur BBMv suggère que SMIT2 est le seul transporteur de MI qui se retrouve à la surface apicale des cellules lumineales du tubule proximal contourné. Les deux transporteurs coexistent donc dans le rein, mais à des localisations différentes au sein d'une même cellule polarisée. Les résultats de cette étude semblent donc appuyer les précédentes recherches de notre laboratoire et de là se dessine un modèle cellulaire où SMIT1 serait basolatéral et SMIT2, apical.



**Figure 8.** Illustration du modèle cellulaire selon lequel SMIT1 (basolatéral) et SMIT2 (apical) cohabitent. Il est à noter que par soucis de clarté, les transporteurs ne sont pas dessinés à l'échelle.

Notre étude s'est concentrée sur le transport de MI à la surface apicale des cellules luminales du tubule contourné proximal (TCP). Nous savons cependant que SMIT2 est exprimé ailleurs dans le rein, notamment au niveau de la médulla. Silbernagl *et al* (2003) se sont intéressés à la localisation de la réabsorption tubulaire du MI autant dans le cortex que dans la médulla. C'est par une simple méthode de microinfusion de MI radioactif dans des segments de rein de rat en des sites spécifiques *in vivo* et *in situ* qu'ils ont parachevé leur étude. Ils ont ainsi établi que plus de 60% de la réabsorption du MI pouvait avoir lieu dans le TCP. Ils ont aussi prouvé qu'au-delà du segment grêle de l'anse de Henlé, il ne

semblait pas y avoir d'absorption de MI, pas plus qu'on n'en décelait dans le tubule collecteur. Par contre, la microinfusion de la partie ascendante de l'anse de Henlé présente une large absorption (environ la moitié) du MI radiomarqué. Les divers résultats de ces recherches suggèrent que le MI peut entrer dans les cellules médullaires à partir du sang, mais également à partir de la lumière tubulaire (Silbernagl et al. 2003). Le transporteur identifié par Silbernagl *et al.* (2003) responsable de l'absorption dans la partie ascendante de l'anse de Henlé semble être SMIT2 puisqu'il est sensible à la Pz, est inhibé par le DCI et, à une plus petite échelle, par le glucose (Silbernagl et al. 2003). Il apparaît donc clair que la réabsorption du MI existe au-delà du tubule contourné proximal et qu'elle est, au moins en partie, réalisée par SMIT2. Bien que le modèle animal ne soit pas le même, il y a de fortes chances que nous puissions extrapoler sans danger puisque nos propres expériences démontrent l'existence de SMIT2 dans la médullaire (Fig.2, Chap.II, p.51). Quoiqu'il en soit, le rôle de SMIT2 dans la médullaire rénale semble être sensiblement le même que celui dans le cortex. Seuls 1 à 2% du MI sont éliminés dans l'urine (Daughaday et al. 1954), donc la majorité de ce pseudo-sucre contenu dans le filtrat glomérulaire est réabsorbée dans les néphrons du rein. Pour que cette réabsorption soit optimale, il est tout à fait logique que la partie médullaire du rein contienne des transporteurs spécifiques au MI. SMIT2 est donc sans doute responsable de l'absorption du MI restant dans le filtrat glomérulaire après le passage de celui-ci dans le TCP.

## **2- LA CARACTÉRISATION DE SMIT2 DANS LES BBMv D'INTESTIN**

La fonction principale du rein est d'assurer la filtration du sang et la réabsorption des éléments importants à partir du filtrat glomérulaire. Ce rôle se rapproche étroitement de celui de l'intestin qui procède, quand à lui, à l'absorption

des nutriments vitaux à partir de l'alimentation. C'est donc très naturellement que nous avons prolongé la caractérisation aux BBMv d'intestin de lapin (Aouameur et al. 2007). En amorçant cette caractérisation, nous nous sommes heurtés à une absence de transport significatif du MI dans les BBMv d'intestin de lapin (Fig. 1A, Chap.III, p.78). Comme aucune preuve de transport spécifique n'est présente dans ce type de vésicule pour le lapin, il a donc fallu changer d'animal pour cette étude. Nous avons opté pour le rat. Contrairement aux vésicules de membranes apicales de lapin, les BBMv de rat présentent un transport de MI très clair (Fig. 1B, Chap. III, p.78). Comme prévu, on observe sur la courbe du transport de traceur ( $H^3$ -MI) en fonction du temps l'hyperaccumulation transitoire (overshoot) caractéristique des transports actifs secondaires et un retour rapide à l'équilibre.

Pour s'assurer de cette différence entre les deux espèces, nous avons quantifié par qRT-PCR l'ARN<sub>m</sub> de SMIT2 dans l'intestin et le rein du rat et du lapin (Fig. 2, Chap. III, p.79). Chez le rat, on constate une expression de SMIT2 autant dans l'intestin que dans le rein. Pour le lapin, par contre, seul le rein exprime SMIT2 qui n'est présent dans l'intestin qu'à l'état de traces. Le régime alimentaire différent de ces deux espèces peut expliquer ce phénomène. En effet, le rat est omnivore et l'essentiel de son apport en inositol est sous forme de MI libre (Holub 1982). Le lapin, par contre, est herbivore et il absorbe sa dose d'inositol sous forme de phytate, la forme de MI la plus abondante chez les plantes (Holub 1982). Ce type d'adaptation génétique aux habitudes alimentaires des animaux ayant déjà été observé dans les BBMv de poissons herbivores et carnivores (Reshkin et al. 1989), il n'est pas étrange d'observer un phénomène similaire chez le rat et le lapin.

Pour cette caractérisation, nous avons procédé de la même façon que pour le rein de lapin. La première étape consistait à vérifier si tout le transport de MI est effectué par un système énergisé par le gradient d'ions sodium. Afin d'y parvenir, il suffit de remplacer les ions sodium par des ions potassium dans le milieu de

transport pour que les transporteurs ne puissent plus bénéficier de la force motrice du gradient d'ions  $\text{Na}^+$  (Fig. 3, Chap.III, p.80). Le taux de transport dans cette condition est très faible et rejoint celui du transport en présence d'une concentration saturante de MI non radioactif. Nous en avons conclu donc que le transfert de MI dans les BBMv de rat est effectué par un transporteur dépendant du gradient d'ions sodium. Un transport énergisé est plus efficace qu'un système de diffusion facilité pour absorber un produit. De plus, il présente l'avantage de pouvoir prélever ce substrat même si celui-ci n'est présent qu'à des concentrations très faibles. Pour en être davantage convaincus, nous avons testé l'effet de la Pz, inhibiteur des systèmes de transport de glucose dépendants du sodium. À une concentration de seulement  $50\mu\text{M}$ , la Pz suffit à inhiber complètement le transport MI (Fig. 3, Chap.III, p.80). Il est à noter que la Pz inhibe SMIT2 dans les BBMv avec un  $K_i$  identique à celui observé dans les ovocytes (Tableau 1, Chap. III, p.85). Nous utilisons ici encore une fois le DCI et le L-fucose pour discriminer entre SMIT1 et SMIT2. Comme le montre la Figure 3 (Chap.III, p.80), le DCI inhibe la totalité du transport de traceur à travers les BBMv d'intestin alors que le L-fucose ne parvient pas à altérer significativement ce transport, même à une concentration aussi élevée que  $100\text{mM}$ . Nous en avons déduit que le seul transporteur spécifique au MI responsable de son transport dans ces membranes est SMIT2. Pour s'assurer que les autres transporteurs de sucre connus dans les BBMv issues des intestins ne soient pas impliqués, nous avons également décidé de tester le transport de MI marqué en présence des inhibiteurs spécifiques de ces transporteurs. Le 2DG ( $10\text{mM}$ ) et la Pt ( $1\text{mM}$ ), spécifiques aux transporteurs de glucose sodium-indépendants (GLUTs) ainsi que l'AMG ( $10\text{mM}$ ), spécifique au transporteur de glucose dépendant des ions sodium (SGLT1) ne parviennent pas à altérer le transport de MI (Fig.3, Chap.III, p.80). Nous concluons ainsi de cette expérience que ni les GLUTs (notamment GLUT5 qui est présent dans les BBMv d'intestin) ni SGLT1 ne sont impliqués dans le transport de MI. Ces résultats sont concordant avec ce que nous avons obtenu pour le rein.

Le glucose est capté des aliments par les entérocytes grâce à un transporteur spécifique présent dans la membrane apicale (SGLT1). Il est ensuite transféré de ces mêmes cellules vers la circulation sanguine grâce à un transporteur ancré dans la membrane basolatérale, GLUT2, protéine fonctionnant selon un mécanisme de diffusion facilitée. Nous avons voulu vérifier si GLUT2 pouvait également servir de voie de sortie au MI. Comme le montre la Figure 7 (Chap.III, p.84), GLUT2 ne semble pas être capable de transporter le MI et n'est donc pas le moyen par lequel cette molécule quitte les entérocytes. Lorsqu'une cellule est soumise à un choc hypertonique, elle accumule du MI. Cependant, lorsque la situation revient à la normale et que le milieu ambiant revient vers l'isotonie, le MI doit sortir de la cellule. Il est donc logique de considérer qu'il existe une porte de sortie qui est peut-être un autre transporteur comme le système de diffusion facilitée rapporté pour le poisson (Reshkin et al. 1989). D'ailleurs, on connaît l'existence d'un transporteur de faible affinité pour le MI qui semble responsable de l'efflux de celui-ci dans les neurones et les cellules gliales par un mécanisme de diffusion facilitée (Fisher et al. 2002; Jackson and Strange 1993). Souvent nommé «Volume-Sensitive Organic Osmolyte-Anion Channel» (VSOAC), ce transporteur apparaît comme un canal légèrement sélectif au chlore qui gère l'évacuation rapide d'une large variété de substrats organiques très différents comme les triéthylamines, les acides aminés et le MI (Fisher et al. 2002; Goldstein and Davis 1994; Jackson and Strange 1993). Ce transporteur est caractérisé par l'inhibition causée par les agents bloquant des canaux chlore, mais ses autres propriétés et sa localisation exacte restent à déterminer (Fisher et al. 2002). Peut-être agit-il ailleurs que dans le cerveau?

Certaines études rapportent qu'en cas de baisse de l'osmolarité extracellulaire, les cellules de l'épithélium rénal évacuent le *myo*-inositol cytoplasmique en excès du côté basolatéral de leur membrane (Grunewald et al. 2001). Un modèle d'une cellule rénale où les trois transporteurs cohabiteraient serait envisageable. On peut imaginer que SMIT2 serait de localisation apicale et

aurait pour rôle de prélever le MI du filtrat glomérulaire. SMIT1 et VSOAC se retrouveraient tous deux à la membrane basolatérale. La fonction de SMIT1 serait d'apporter à la cellule le MI dont elle a besoin pour répondre à un choc hypertonique. VSOAC aurait pour fonction de faire sortir le MI de la cellule lorsque l'osmolarité du milieu extracellulaire baisse. SMIT1 et VSOAC auraient donc des fonctions inverses pour permettre à la cellule de s'adapter aux variations d'osmolarité et de survivre à son milieu. On ne peut pas considérer ce cycle comme étant futile dans la mesure où l'activité de SMIT1 et du VSOAC seraient régulées en fonction du volume cellulaire de façon opposée.

Le catabolisme du MI qui a principalement lieu dans le rein (Chu and Geyer 1983) est une autre façon de faire disparaître ce pseudo sucre du cytoplasme de la cellule. La première étape de cette réaction est catalysée par la MI oxygénase ou MIOX et consiste en la transformation du MI en D-glucuronate. Les étapes qui suivent visent à transformer le D-glucuronate obtenu en D-xylulose-5-phosphate qui intègrera le cycle des pentoses phosphates. L'existence de MIOX a été rapportée dans le rein au niveau du cortex (Nayak et al. 2005) ainsi que dans la médullaire rénale externe (Hu et al. 2000). Cela dit, il serait assez remarquable que cette voie suffise à réguler la quantité de MI dans une cellule qui peut voir ce taux atteindre les 30mM. Pour cette raison, il semble nécessaire qu'un transporteur se charge de cette fonction.

La voie de sortie du MI dans l'intestin est peut-être différente de celle dans le rein. En effet, certaines études ont relié le transport du MI intestinal au métabolisme des lipides et à la synthèse de chylomicrons parce que son absence de la diète provoque certaines dysfonctions telle la lipodystrophie ou la perturbation du métabolisme des lipides dans le foie (Chu and Geyer 1983). Il semblerait que l'action du MI sur le métabolisme des lipides s'effectue à travers son rôle de substrat pour la biosynthèse des phosphatidylinositols (Chu and Geyer 1983). Ceci suggère que le métabolisme du MI dans les entérocytes est sans doute très actif et



qu'il ne nécessite peut-être pas un transporteur pour quitter ces cellules. Cela dit, des preuves du transport de MI alimentaire vers le plasma de l'homme et de la souris ont été obtenues (Chau et al. 2005; Groenen et al. 2003).

L'examen de la distribution de SMIT2 par des analyses de Northern blot a suggéré que SMIT2 était absent de l'intestin (tissu de chien et d'humain) (Kwon et al. 1992; Roll et al. 2002). Notre série d'expériences montre clairement que non seulement SMIT2 est présent dans l'intestin de rat, mais il semble même être l'unique protéine à la surface apicale des entérocytes responsable du transport de MI à partir du bol alimentaire. Pourquoi cela n'a-t-il pas été détecté par Northern? Peut-être les sondes de détection utilisées ne concordaient pas ou bien l'humain diffère-t-il tout simplement du rat. Notre laboratoire n'est pas le seul à soutenir l'existence de ce transport, Caspary *et al* (1970) l'avait démontré dans l'intestin de hamster. Simplement, avec cette série d'expériences, nous avons établi l'identité de la protéine responsable de ce transport (SMIT2).

### **3- LE CAS PARTICULIER DU GLUCOSE**

Un résultat surprenant a poussé ce projet vers une caractérisation plus approfondie du transporteur SMIT2 issu du rat dans les ovocytes de *Xenopus* afin de confirmer les valeurs des paramètres cinétiques obtenues. Cela dit, avant toute chose, il faut s'assurer que le modèle d'étude proposé peut être pertinent. En effet, on a déjà observé certains cas où les protéines n'entraînaient pas de courants suite à une stimulation par leurs substrats potentiels uniquement parce qu'elles n'étaient pas présentes à la surface des ovocytes suite à une expression hétérologue (Uldry et al. 2001). Avec SMIT2, on ne peut pas rencontrer ce problème puisqu'il a déjà été prouvé par Coady *et al* (2002) que notre transporteur parvenait à la surface des ovocytes. Ce modèle d'étude (les ovocytes), souvent utilisé pour l'investigation des protéines membranaires, est donc un outil tout à fait fiable. Le résultat

étonnant dont il était question concerne la disparité entre la forte capacité du glucose à inhiber le transport du MI dans les BBMv intestinales de rat ( $K_i = 0,93 \pm 0,35$  mM) et sa faible capacité d'inhibition lorsque SMIT2 de lapin a été testé après expression dans les ovocytes ( $K_m = 35,5 \pm 7,3$  mM) (Coady et al. 2002). Une différence d'efficacité de 40 fois n'est pas un fait négligeable. Il existe une distinction fondamentale entre les ovocytes et les BBMv qui permettrait d'expliquer cette divergence. À la surface des ovocytes que nous étudions, il n'y a que SMIT2 qui soit exprimé et qui domine les autres modes de transport endogènes alors que les BBMv possèdent tous les transporteurs apicaux des entérocytes, dont SGLT1. On serait tenté de penser que le passage du glucose par SGLT1, vu sa dépendance au sodium, donne lieu à une dissipation du gradient sodé lors des essais d'inhibition, entraînant ainsi l'arrêt du transport de MI. Ceci demeure peu plausible puisque l'AMG, un analogue du glucose transporté par SGLT1, est sans effet sur le transport de MI dans les BBMv alors qu'il exploite lui aussi le gradient sodium.

Il est souvent rapporté dans la littérature que le glucose ralentit le transport du MI. Certains pensent que cette relation est de l'ordre de l'inhibition compétitive (Hammerman et al. 1980). Cependant, avec une affinité aussi basse sur ovocyte, le glucose ne doit pas être efficacement transporté par SMIT2. On ne peut pas assumer qu'il fait compétition au MI. Le  $K_i$  40 fois supérieur dans les ovocytes (par rapport à celui des BBMv) nous porte plutôt à croire que le système de transport et le système d'inhibition ne constituent pas un seul et même mécanisme. On ne peut pas confirmer ou infirmer totalement la participation de SGLT1 à cette inhibition, mais il nous paraît évident qu'il doit s'agir d'un processus plus complexe qu'une simple inhibition compétitive. D'ailleurs, nos résultats sont compatibles avec les travaux de Scalera *et al* (1990) qui proposent une inhibition de type mixte (Scalera et al. 1990) ou avec ceux de Vilella *et al* (1989) qui proposent une liaison du D-glucose sur un site de régulation sur le transporteur du MI (Vilella et al. 1989). Ainsi, l'inhibition de SMIT2 par le glucose semble

comporter un site différent de celui utilisé lors du co-transport et ce site peut être externe ou même interne. D'ailleurs, on sait que le glucose est transporté dans les BBMv à une vitesse largement supérieure à celle du MI grâce à SGLT1 (Fig. 6, Chap.III, p.83). Le glucose se retrouve donc à l'intérieur des vésicules en concentrations appréciables pendant que le MI se fait transporter, ce qui constitue une différence majeure entre les deux modèles étudiés. Il est possible que le glucose interne soit l'agent inhibiteur du transport de MI. Cette hypothèse nécessite bien entendu de plus amples investigations. Une façon simple de vérifier l'effet du glucose interne sur notre transporteur est d'injecter des quantités croissantes de D-glucose dans un ovocyte surexprimant SMIT2 tout en suivant les courants induits par le MI externe dans de telles conditions. Le même lot d'expériences sera effectué en injectant du D-mannitol afin de s'assurer que les effets observés, s'il y a lieu, soient spécifiques au glucose. Il semble que l'hyperglycémie augmente l'élimination de MI dans l'urine en inhibant son absorption (Daughaday and Larner 1954; Garcia-Perez and Burg 1991; Molitoris et al. 1979). Éclaircir la relation d'inhibition qui existe entre le glucose et le MI peut apporter des réponses et permettre le développement d'approches thérapeutiques à l'inositolurie que l'on observe dans les cas de diabète.

Notons par ailleurs que, contrairement au glucose, les valeurs de  $K_m$  et de  $K_i$  obtenus pour le MI et le DCI sont similaires, qu'elles soient évaluées par expression en ovocytes ou encore sur BBMv. Nous prouvons également que la Pz est un inhibiteur efficace de SMIT2 autant dans les BBMv que dans les ovocytes.

#### **4- SMIT2**

SMIT2 possède des propriétés similaires assez évidentes dans le rein et dans l'intestin. Dans les deux cas, SMIT2 présente une grande affinité pour son substrat spécifique (MI) permettant ainsi son transport, même à de faibles concentrations. Les  $K_m$  déterminés dans le rein ( $57 \pm 14 \mu\text{M}$ ) et dans l'intestin (150

$\pm 40\mu\text{M}$ ) sont à peu près du même ordre. Ils ne sont pas exactement concordants certes, mais les deux modèles d'étude peuvent différer à plusieurs niveaux ce qui peut influencer les résultats de façon mineure. Par exemple, des propriétés comme la capacité à maintenir un gradient  $\text{Na}^+$  dans le temps, le volume des vésicules, la présence de certains autres mécanismes de transport en parallèle peuvent avoir influencé légèrement les valeurs obtenues. Cela dit, Scalera *et al* (1990) ont travaillé sur les BBMv d'intestin de rat et rapportent une valeur de  $K_m$  de  $160\ \mu\text{M}$ . Hammerman *et al* (1980), pour leur part, ont utilisé les BBMv de rein de lapin et obtiennent un  $K_m$  de  $94\ \mu\text{M}$ . Ces valeurs, assez proches de celles que nous avons calculées, nous confortent dans nos résultats. Il est intéressant de noter que SMIT2 prélève le MI avec un  $K_m$  qui se rapproche de la concentration de MI dans le plasma humain ( $70\mu\text{M}$ ) (Dolhofer and Wieland 1987) et en dessous de la concentration rapportée pour le liquide céphalo-rachidien ( $470\ \mu\text{M}$ ) (Spector and Lorenzo 1975). Autant dans le rein que dans l'intestin, on remarque que SMIT2 transporte le DCI avec la même affinité qu'il transporte le MI. Ceci peut s'avérer être un élément d'importance puisque le DCI semble être impliqué dans plusieurs phénomènes physiopathologiques dont le diabète (Larner 2001). Cependant, pour SMIT2, le transport du DCI est probablement un rôle physiologique mineur puisque celui-ci n'est présent dans le plasma qu'à une faible concentration (moins de  $100\ \text{nM}$ ) (Ostlund et al. 1993). Il y a également d'autres caractéristiques partagées par les SMIT2 des deux tissus. Par exemple, dans les deux cas, on sait que SMIT2 présente une stéréospécificité privilégiant les stéréoisomères D (ne reconnaît pas le LCI) et est inhibé par le D-glucose. Aussi, le rôle physiologique de SMIT2 dans le rein de lapin et l'intestin de rat semble très similaire. Cette mission semble se résumer à la capture de MI autant de l'alimentation que du filtrat glomérulaire. Les fonctions essentielles et ubiquitaires du MI à divers niveaux justifient largement qu'un système soit seulement axé sur son absorption afin d'éviter toute perte. Toutes ces caractéristiques communes nous mènent à conclure que le SMIT2 du rein et celui de l'intestin sont identiques et qu'il possède des fonctionnalités similaires dans les deux tissus. Le SMIT2 que nous avons étudié

est soupçonné de s'exprimer également dans la lignée de cellules hépatiques HepG2 (Ostlund et al. 1996). En effet, le transporteur étudié par Ostlund *et al.* (1996) présente les mêmes caractéristiques que SMIT2 : transport de MI et DCI avec la même affinité, un effet inhibiteur par le D-glucose, mais pas par le L-glucose (Ostlund et al. 1996). Ces lignées cellulaires expriment aussi SMIT1 indiquant que les deux protéines peuvent coexister (Ostlund et al. 1996). Il serait intéressant de vérifier la distribution des deux transporteurs dans ces cellules polarisées pour voir si le modèle que nous suggérons existe ailleurs que dans le rein.

Faisant partie de la même famille de transporteurs, il est normal de constater que SMIT2 partage plusieurs propriétés avec SGLT1, telle la sensibilité à la Pz ou une stœchiométrie de 1 molécule de substrat :  $2\text{Na}^+$ . Ces deux transporteurs partagent-ils en plus le glucose comme substrat? Il paraît peu probable que ce soit le cas selon cette étude. Cela dit, on ne peut nier l'effet inhibiteur du glucose sur le transport de MI. D'ailleurs, cette inhibition est un phénomène qui peut s'avérer hautement pertinent à étudier. Sachant qu'en cas de diabète le taux de MI dans l'urine augmente significativement, il serait vraiment intéressant de comprendre la responsabilité du glucose dans ce changement.

La découverte de SMIT2 a permis d'expliquer l'hétérogénéité rapportée dans les analyses antérieures du transport de MI. On sait que dans un même tissu, les deux co-transporteurs peuvent coexister. Bien sûr, SMIT1 et SMIT2 partagent certaines propriétés, mais ils possèdent aussi des caractéristiques qui nous permettent de les distinguer. Ces différences sont fondamentales à leurs physiologies respectives et la plus importante d'entre elles est probablement leur localisation baso-latérale (SMIT1) et apicale (SMIT2). Ces différences suggèrent aussi que les deux protéines ont des fonctions différentes. Il serait vraiment intéressant de comprendre pourquoi dans un même tissu ou dans une même cellule les deux protéines peuvent être présentes. Il est établi que SMIT1 est régulé par

l'osmolarité. Jusque là il n'existait aucune évidence de la réponse de SMIT2 à ce même mode de régulation, ce qui est en accord avec sa localisation corticale, région du rein qui subit moins les fluctuations de tonicité. Il semble cependant depuis peu que des conditions hyperosmotiques augmentent le transport de MI effectué par SMIT2 selon un processus nécessitant une synthèse protéique (Bissonnette et al. 2008). Même si SMIT1 et SMIT2 partagent un système de régulation similaire, il subsiste une différence entre les deux protéines. Dans le cas de SMIT2, l'augmentation de synthèse du transporteur n'est pas induite par le facteur de transcription TonEBP (Bissonnette et al. 2008). Investiguer davantage le mode de régulation de SMIT2 permettrait sans doute de mieux comprendre le fonctionnement du transporteur et de cerner davantage son rôle. Il est également à noter que SMIT2 possède une plus grande affinité pour le D-glucose que SMIT1 (Coady et al. 2002). Il est donc probablement davantage affecté par une augmentation du niveau de glucose dans le cas d'un diabète non traité.

Les perspectives de recherche sur ce sujet sont sans fin. Notre étude a permis de mettre en évidence des différences importantes dans l'expression de SMIT2 entre les espèces (herbivores et omnivores). Il serait très pertinent d'explorer les voies de transport du MI chez les herbivores et de faire une comparaison entre espèces pour prouver l'adaptation génétique à leur alimentation. Il serait également opportun d'investiguer la porte de sortie du MI dans les entérocytes, s'il en existe une. L'ARN<sub>m</sub> de SMIT2 a été identifié dans d'autres tissus; il serait intéressant d'étendre notre caractérisation à ces tissus pour vérifier si le transporteur n'adopte pas un mode de régulation particulier. De plus, l'anticorps développé contre SMIT2 peut être utilisé pour tester la présence de celui-ci dans plusieurs autres tissus pour lesquels sa présence n'est pas établie ou pour vérifier sa localisation précise. D'ailleurs, ce même anticorps pourrait éventuellement être utilisé en immunofluorescence pour détecter les segments du néphron où SMIT2 est exprimé. Le contrôle du transport de MI dans les cellules du SNC semble lié à plusieurs types de troubles psychiatriques; une meilleure

compréhension du fonctionnement du transfert de MI dans ces tissus pourrait peut-être apporter des solutions aux dérèglements. Mais dans ce cas, il faudrait compter avec un nouveau joueur encore très mal connu : HMIT. Il reste également tout l'aspect moléculaire à décortiquer, c'est-à-dire établir avec précision les acides aminés qui constituent le site actif de transport dans SMIT2 et identifier avec quels atomes du MI ils se lient pour permettre le transport grâce à une étude de structure aux rayons-X. Il s'agira également de comprendre le mode d'action des inhibiteurs pour s'en servir éventuellement dans l'élaboration de voies thérapeutiques. Peu d'informations sont disponibles là-dessus; on sait seulement que le 2-déoxy-D-glucose et le 3-O-méthyl-D-glucose n'inhibent pas le transport du MI, ce qui permet à Yorek *et al* (1991) de déduire que les hydroxyles des carbones 2 et 3 du D-glucose qui sont en conformation trans sont importants pour l'activité d'inhibition (Yorek et al. 1991).

Pour parachever la caractérisation de SMIT2 et saisir toute la portée de sa fonction physiologique, l'idéal serait de générer un modèle animal ayant subi la suppression génétique de cette protéine. C'est ce que l'on appelle un animal «knock-out» (KO). Bien entendu, l'animal KO n'est pas immédiatement accessible et les difficultés à surmonter pour l'obtenir sont nombreuses. On peut faire face à des cas où ces modifications sont létales et l'animal subit alors une mort précoce ou au contraire, observer une compensation par d'autres protéines qui vient obscurcir les rôles qui nécessite la présence de SMIT2. La littérature rapporte que les souris transgéniques KO SMIT1 meurent peu après leur naissance pour des raisons d'insuffisance respiratoire (Berry et al. 2003). Ces souriceaux ne peuvent survivre et atteindre l'âge adulte que si la souris (+/-) qui les porte et que les nouveau-nés eux-mêmes reçoivent un supplément alimentaire de MI qui compenserait pour les faibles concentrations tissulaires du MI (Chau et al. 2005). Or, selon les résultats de ma recherche, SMIT2 est le seul transporteur de MI présent dans l'intestin de rat et la parenté entre les deux modèles permet de penser qu'il en sera de même pour la souris. Des souris KO SMIT2 seraient

vraisemblablement incapables d'absorber le MI à partir de l'alimentation. Même si certains tissus peuvent synthétiser le MI à partir du glucose, cette synthèse, selon des études nutritionnelles sur des rats, des souris et des gerbilles, ne semble pas suffisante pour combler les besoins de l'organisme (Kuksis and Mookerjea 1978). Une diète sans MI imposée à ces animaux a provoqué chez eux certains dérèglements métaboliques qui se transforment en pathologie telle la lipodystrophie (Kuksis and Mookerjea 1978). Peut-être qu'un supplément en glucose permettrait d'alimenter cette synthèse, mais ceci est loin d'être une évidence. Par ailleurs, il n'est pas non plus dit que le MI sera transporté des organes où il est synthétisé vers toutes les cellules du corps et que ces cellules auront un autre moyen que SMIT2 pour le faire pénétrer au sein de leur cytoplasme. De plus, les organes qui produisent le MI semblent s'y soumettre davantage pour combler leur propre besoin, sachant que cette synthèse a souvent lieu dans des tissus où les cellules sont soumises à de grandes variations de volumes (stress osmotique) et ont besoin d'un mécanisme d'osmorégulation très fin et très efficace. Pour toutes ces raisons, une souris KO SMIT2 me paraît difficilement viable, mais il n'y a en réalité qu'un seul moyen de s'en convaincre avec certitude.



## **CHAPITRE V- CONCLUSION**

SMIT2 est un co-transporteur  $\text{Na}^+/\text{MI}$  dont l'identification est relativement récente et dont l'étude de fonctionnalité en est encore à ses débuts. Ce projet visait essentiellement à procéder à la caractérisation de ce co-transporteur dans les membranes en bordure en brosse d'intestin de rat et de rein de lapin. Il s'agissait d'abord d'évaluer la fraction de transport de MI prise en charge par SMIT2 dans les deux tissus. Il fallait ensuite établir l'affinité du transporteur pour le MI ainsi que sa sensibilité à d'autres substrats tels le DCI, le D-glucose et la phlorizine.

La quantification de l'ARN<sub>m</sub> de SMIT1 et de SMIT2 dans le rein nous a permis de constater que SMIT1 est principalement localisé dans la médullaire alors que SMIT2 est en grande majorité exprimé dans le cortex. Ce résultat a d'ailleurs été confirmé par immunobuvardage en utilisant un anticorps dirigé contre SMIT2 prouvant également que les BBMv constituent une fraction particulièrement riche en SMIT2. Le même type de quantification par qRT-PCR dans l'intestin a révélé des données très intéressantes. En effet, c'est de cette façon que nous nous sommes assurés de l'absence de transport de MI dans l'intestin du lapin, mais de sa présence très abondante dans celui du rat. Ainsi, la différence de régime alimentaire entre ces deux espèces est peut-être la cause d'une adaptation dont le résultat serait l'absence d'absorption de MI dans l'intestin de lapin vu que celui-ci consomme les inositols surtout sous forme de phytate.

SMIT2 possède des propriétés similaires dans le rein et dans l'intestin. Dans les deux cas, il présente une grande affinité pour son substrat spécifique (MI) et les  $K_m$  déterminés dans le rein ( $57 \pm 14 \mu\text{M}$ ) et dans l'intestin ( $150 \pm 40 \mu\text{M}$ ) sont à peu près du même ordre. Aussi, nous avons remarqué qu'il transporte le MI et le DCI avec la même affinité. Pour ce qui est de ses autres attributs, SMIT2 est sensible à la Pz et fait preuve de stéréospécificité privilégiant les isomères de type D. D'ailleurs, le transport de MI par SMIT2 est altéré par le D-glucose, mais suivant une relation plus compliquée qu'une inhibition compétitive. Selon toute

vraisemblance, le glucose se lie à SMIT2 sur un site différent du site de transport du MI. Les caractéristiques communes que partagent le SMIT2 de rein et celui d'intestin nous laissent penser qu'il s'agit là du même transporteur possédant dans les deux cas des fonctions identiques. Ses rôles semblent se résumer au prélèvement du MI du milieu externe. Dans le rein de lapin, SMIT2 est d'ailleurs responsable de la totalité de l'absorption du MI à partir du filtrat glomérulaire dans le tubule contourné proximal (TCP). Il est donc à priori le seul transporteur de MI présent à la surface apicale des cellules du TCP. Dans l'intestin de rat, SMIT2 est également le seul transporteur responsable de récolter le MI à partir de l'alimentation et serait ainsi le seul co-transporteur de MI présent au pôle apical des entérocytes.

Au cours de cette caractérisation, nous avons également examiné la possibilité que des transporteurs de sucre puissent servir à prélever le MI du milieu où baignent les vésicules. On apprend ainsi que le MI n'interagit ni avec SGLT1, ni avec GLUT5, car l'inhibition de ces derniers n'altère en rien le transport du MI radioactif. Nous soupçonnions GLUT2 d'être une voie de sortie basolatérale potentielle du MI à partir des entérocytes. Or GLUT2 est incapable de prélever le MI lorsqu'il est exprimé dans des ovocytes. Le MI posséderait donc une autre porte de sortie vers le sang et les autres cellules dont la nature exacte est encore inconnue et qui reste à découvrir.

À partir de ce projet et de la littérature déjà existante sur le sujet, un modèle où SMIT1 serait basolatéral et SMIT2 apical se précise. Cette localisation différentielle suggère que les fonctions de ces deux transporteurs ne sont pas les mêmes et ce constat est très intéressant d'un point de vue physiologique. À partir de cette étude, plusieurs voies peuvent maintenant être suivies. On pourrait par exemple poursuivre cette caractérisation dans différents tissus et l'étendre à l'humain.

## **CHAPITRE VI- RÉFÉRENCES**

- Acevedo LD, Holloway HW, Rapoport SI, Shetty HU (1997) Application of stable isotope tracer combined with mass spectrometric detection for studying myo-inositol uptake by cultured neurons from fetal mouse: effect of trisomy 16. *J Mass Spectrom* 32:395-400
- Aouameur R, Da Cal S, Bissonnette P, Coady MJ, Lapointe JY (2007) SMIT2 mediates all myo-inositol uptake in apical membranes of rat small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293:G1300-7
- Back JF, Oakenfull D, Smith MB (1979) Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. *Biochemistry* 18:5191-6
- Barak Y, Levine J, Glasman A, Elizur A, Belmaker RH (1996) Inositol treatment of Alzheimer's disease: a double blind, cross-over placebo controlled trial. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 20:729-35
- Beck FX, Burger-Kentischer A, Muller E (1998) Cellular response to osmotic stress in the renal medulla. *Pflugers Arch* 436:814-27
- Berry GT, Mallee JJ, Kwon HM, Rim JS, Mulla WR, Muenke M, Spinner NB (1995) The human osmoregulatory Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter gene (SLC5A3): molecular cloning and localization to chromosome 21. *Genomics* 25:507-13
- Berry GT, Wu S, Buccafusca R, Ren J, Gonzales LW, Ballard PL, Golden JA, Stevens MJ, Greer JJ (2003) Loss of murine Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter leads to brain myo-inositol depletion and central apnea. *J Biol Chem* 278:18297-302
- Biber J, Stieger B, Haase W, Murer H (1981) A high yield preparation for rat kidney brush border membranes. Different behaviour of lysosomal markers. *Biochim Biophys Acta* 647:169-76
- Bissonnette P, Coady MJ, Lapointe JY (2004) Expression of the sodium-myoinositol cotransporter SMIT2 at the apical membrane of Madin-Darby canine kidney cells. *J Physiol* 558:759-68
- Bissonnette P, Lahjouji K, Coady MJ, Lapointe JY (2008) Effects of hyperosmolarity on the Na<sup>+</sup>-myo-inositol cotransporter SMIT2 stably transfected in the Madin-Darby canine kidney cell line. *Am J Physiol Cell Physiol* 295:C791-9
- Bourgeois F, Coady MJ, Lapointe JY (2005) Determination of transport stoichiometry for two cation-coupled myo-inositol cotransporters: SMIT2 and HMIT. *J Physiol* 563:333-43
- Bouveault L (1894) De l'isométrie optique dans les corps à chaînes fermées. *Bull. de la Société Chimique de Paris* 11:44-147
- Burg MB (1997) Renal osmoregulatory transport of compatible organic osmolytes. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 6:430-3
- Burger-Kentischer A, Muller E, Neuhofer W, Marz J, Thureau K, Beck FX (1998) Expression of Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>/betaine and Na<sup>+</sup>/myo-inositol transporters, aldose reductase and sorbitol dehydrogenase in macula densa cells of the kidney. *Pflugers Arch* 436:807-9
- Caspary WF, Crane RK (1970a) Active transport of myo-inositol in hamster small intestine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 266:309-10

- Caspary WF, Crane RK (1970b) Active transport of myo-inositol and its relation to the sugar transport system in hamster small intestine. *Biochim Biophys Acta* 203:308-16
- Chau JF, Lee MK, Law JW, Chung SK, Chung SS (2005) Sodium/myo-inositol cotransporter-1 is essential for the development and function of the peripheral nerves. *FASEB J* 19:1887-9
- Choi K, Mollapour E, Shears SB (2005) Signal transduction during environmental stress: InsP8 operates within highly restricted contexts. *Cell Signal* 17:1533-41
- Chu SH, Geyer RP (1983) Tissue content and metabolism of myo-inositol in normal and lipodystrophic gerbils. *J Nutr* 113:293-303
- Chu SH, Hegsted DM (1980) Myo-inositol deficiency in gerbils: comparative study of the intestinal lipodystrophy in *Meriones unguiculatus* and *Meriones libycus*. *J Nutr* 110:1209-16
- Coady MJ, Wallendorff B, Gagnon DG, Lapointe JY (2002) Identification of a novel Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter. *J Biol Chem* 277:35219-24
- Cocco L, Manzoli L, Barnabei O, Martelli AM (2004) Significance of subnuclear localization of key players of inositol lipid cycle. *Adv Enzyme Regul* 44:51-60
- Colodny L, Hoffman RL (1998) Inositol-clinical applications for exogenous use. *Altern Med Rev* 3:432-47
- Czech MP (2000) PIP2 and PIP3: complex roles at the cell surface. *Cell* 100:603-6
- Daughaday WH, Larner J (1954) The renal excretion of inositol in normal and diabetic human beings. *J Clin Invest* 33:326-32
- Daughaday WH, Larner J, Hartnett C (1955) The synthesis of inositol in the immature rat and chick embryo. *J Biol Chem* 212:869-75
- Daughaday WH, Larner J, Houghton E (1954) The renal excretion of inositol by normal and diabetic rats. *J Clin Invest* 33:1075-80
- Diedrich DF (1965) In vitro evaluation of relative inhibitory potency of phlorizin and its congeners. *Am J Physiol* 209:621-6
- Dolhofer R, Wieland OH (1987) Enzymatic assay of myo-inositol in serum. *J Clin Chem Clin Biochem* 25:733-6
- Dove SK, Cooke FT, Douglas MR, Sayers LG, Parker PJ, Michell RH (1997) Osmotic stress activates phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate synthesis. *Nature* 390:187-92
- Eagle H, Agranoff BW, Snell EE (1960) The biosynthesis of meso-inositol by cultured mammalian cells, and the parabiotic growth of inositol-dependent and inositol-independent strains. *J Biol Chem* 235:1891-3
- Empson KL, Labuza TP, E G (1991) Phytic acid as a food anti-oxidant. *J. Food Sci.* 56:560-563
- Fernando KT, 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* 127:1361-9

- Fisher SK, Novak JE, Agranoff BW (2002) Inositol and higher inositol phosphates in neural tissues: homeostasis, metabolism and functional significance. *J Neurochem* 82:736-54
- Fruen BR, Lester BR (1990) Down's syndrome fibroblasts exhibit enhanced inositol uptake. *Biochem J* 270:119-23
- Gamba G (2001) Alternative splicing and diversity of renal transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 281:F781-94
- Garcia-Perez A, Burg MB (1991) Renal medullary organic osmolytes. *Physiol Rev* 71:1081-115
- Gekko K (1981) Mechanism of polyol-induced protein stabilization: solubility of amino acids and diglycine in aqueous polyol solutions. *J Biochem* 90:1633-41
- Godfrey DA, Hallcher LM, Laird MH, Matschinsky FM, Sherman WR (1982) Distribution of myo-inositol in the cat cochlear nucleus. *J Neurochem* 38:939-47
- Goldstein L, Davis EM (1994) Taurine, betaine, and inositol share a volume-sensitive transporter in skate erythrocyte cell membrane. *Am J Physiol* 267:R426-31
- Groenen PM, Merkus HM, Sweep FC, Wevers RA, Janssen FS, Steegers-Theunissen RP (2003) Kinetics of myo-inositol loading in women of reproductive age. *Ann Clin Biochem* 40:79-85
- Grunewald RW, Oppermann M, Schettler V, Fiedler GM, Jehle PM, Schuettert JB (2001) Polarized function of thick ascending limbs of Henle cells in osmoregulation. *Kidney Int* 60:2290-8
- Hager K, Hazama A, Kwon HM, Loo DD, Handler JS, Wright EM (1995) Kinetics and specificity of the renal Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J Membr Biol* 143:103-13
- Hammerman MR, Sacktor B, Daughaday WH (1980) myo-Inositol transport in renal brush border vesicles and its inhibition by D-glucose. *Am J Physiol* 239:F113-20
- Handler JS, Kwon HM (1996) Regulation of the myo-inositol and betaine cotransporters by tonicity. *Kidney Int* 49:1682-3
- Hansen SH (2001) The role of taurine in diabetes and the development of diabetic complications. *Diabetes Metab Res Rev* 17:330-46
- Hauser G (1965) Energy- and sodium-dependent uptake of inositol by kidney cortex slices. *Biochem Biophys Res Commun* 19:696-701
- Hauser G, Finelli VN (1963) The Biosynthesis of Free and Phosphatide Myo-Inositol from Glucose by Mammalian Tissue Slices. *J Biol Chem* 238:3224-8
- Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA (2004) The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Introduction. Pflugers Arch* 447:465-8

- Hitomi K, Tsukagoshi N (1994) cDNA sequence for rkST1, a novel member of the sodium ion-dependent glucose cotransporter family. *Biochim Biophys Acta* 1190:469-72
- Hoffmann-Ostenhof O., Pittner F. (1982) The biosynthesis of myo-inositol and its isomers. *Can. J. Chem.* 60:1863-71
- Holub BJ (1982) The nutritional significance, metabolism, and function of myo-inositol and phosphatidylinositol in health and disease. *Adv Nutr Res* 4:107-41
- Holub BJ (1986) Metabolism and function of myo-inositol and inositol phospholipids. *Annu Rev Nutr* 6:563-97
- Hotta N (1997) New concepts and insights on pathogenesis and treatment of diabetic complications: polyol pathway and its inhibition. *Nagoya J Med Sci* 60:89-100
- 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* 278:35159-67
- Hu E, Chen Z, Fredrickson T, Gellai M, Jugus M, Contino L, Spurr N, Sims M, Halsey W, Van Horn S, Mao J, Sathe G, Brooks D (2000) Identification of a novel kidney-specific gene downregulated in acute ischemic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F426-39
- Jackson PS, Strange K (1993) Volume-sensitive anion channels mediate swelling-activated inositol and taurine efflux. *Am J Physiol* 265:C1489-500
- Janmey PA, Lindberg U (2004) Cytoskeletal regulation: rich in lipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:658-66
- Ju S, Shaltiel G, Shamir A, Agam G, Greenberg ML (2004) Human 1-D-myo-inositol-3-phosphate synthase is functional in yeast. *J Biol Chem* 279:21759-65
- Kanai Y, Hediger MA (2003) The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications. *Eur J Pharmacol* 479:237-47
- Kim H, McGrath BM, Silverstone PH (2005) A review of the possible relevance of inositol and the phosphatidylinositol second messenger system (PI-cycle) to psychiatric disorders--focus on magnetic resonance spectroscopy (MRS) studies. *Hum Psychopharmacol* 20:309-26
- Kuksis A, Mookerjee S (1978) Inositol. *Nutr Rev* 36:233-8
- Kwon HM, Yamauchi A, Uchida S, Preston AS, Garcia-Perez A, Burg MB, Handler JS (1992) Cloning of the cDNA for a Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter, a hypertonicity stress protein. *J Biol Chem* 267:6297-301
- Lahjouji K, Aouameur R, Bissonnette P, Coady MJ, Bichet DG, Lapointe JY (2007) Expression and functionality of the Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter SMIT2 in rabbit kidney. *Biochim Biophys Acta* 1768:1154-9
- Larner J (2001) D-chiro-inositol in insulin action and insulin resistance-old-fashioned biochemistry still at work. *IUBMB Life* 51:139-48



- Lee WS, Kanai Y, Wells RG, Hediger MA (1994) The high affinity Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. Re-evaluation of function and distribution of expression. *J Biol Chem* 269:12032-9
- Lewin LM, Yannai Y, Sulimovici S, Kraicer PF (1976) Studies on the metabolic role of myo-inositol. Distribution of radioactive myo-inositol in the male rat. *Biochem J* 156:375-80
- Lien YH, Michaelis T, Moats RA, Ross BD (1994) Scyllo-inositol depletion in hepatic encephalopathy. *Life Sci* 54:1507-12
- Lien YH, Shapiro JI, Chan L (1990) Effects of hypernatremia on organic brain osmoles. *J Clin Invest* 85:1427-35
- Lien YH, Shapiro JI, Chan L (1991) Study of brain electrolytes and organic osmolytes during correction of chronic hyponatremia. Implications for the pathogenesis of central pontine myelinolysis. *J Clin Invest* 88:303-9
- Lindberg J, Ohberg L, Garegg PJ, Kondradsson P (2002) Efficient routes to glucosamine-myo-inositol derivatives, key building blocks in the synthesis of glycosylphosphatidylinositol anchor substances. *Tetrahedron* 58:1387-98
- Lubrich B, Spleiss O, Gebicke-Haerter PJ, van Calker D (2000) Differential expression, activity and regulation of the sodium/myo-inositol cotransporter in astrocyte cultures from different regions of the rat brain. *Neuropharmacology* 39:680-90
- Lubrich B, van Calker D (1999) Inhibition of the high affinity myo-inositol transport system: a common mechanism of action of antibipolar drugs? *Neuropsychopharmacology* 21:519-29
- Mandersloot JG, Roelofsen B, de Gier J (1978) Phosphatidylinositol as the endogenous activator of the (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>)-ATPase in microsomes of rabbit kidney. *Biochim Biophys Acta* 508:478-85
- Manji HK, Moore GJ, Chen G (2001) Bipolar disorder: leads from the molecular and cellular mechanisms of action of mood stabilizers. *Br J Psychiatry Suppl* 41:s107-19
- Marieb EN (1999) Anatomie et physiologie humaines chap. 26 p.991, vol Chap. ERPI
- Marmol F (2008) Lithium: bipolar disorder and neurodegenerative diseases Possible cellular mechanisms of the therapeutic effects of lithium. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32:1761-71
- 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* 436:854-7
- McLaurin J, Kierstead ME, Brown ME, Hawkes CA, Lambermon MH, Phinney AL, Darabie AA, Cousins JE, French JE, Lan MF, Chen F, Wong SS, Mount HT, Fraser PE, Westaway D, St George-Hyslop P (2006) Cyclohexanehexol inhibitors of Aβ aggregation prevent and reverse Alzheimer phenotype in a mouse model. *Nat Med* 12:801-8
- Michell RH (2008) Inositol derivatives: evolution and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:151-61

- Molitoris BA, Hruska KA, Fishman N, Daughaday WH (1979) Effects of glucose and parathyroid hormone on the renal handling of myoinositol by isolated perfused dog kidneys. *J Clin Invest* 63:1110-8
- Moore GJ, Bebchuk JM, Parrish JK, Faulk MW, Arfken CL, Strahl-Bevacqua J, Manji HK (1999) Temporal dissociation between lithium-induced changes in frontal lobe myo-inositol and clinical response in manic-depressive illness. *Am J Psychiatry* 156:1902-8
- Moris M-A (2006) Synthèse d'analogues de phosphate d'inositol mimes de l'adénophostine Sciences Pharmaceutiques, vol Doctorat. Strasbourg I - Louis Pasteur, Strasbourg, pp 210
- Nayak B, Xie P, Akagi S, Yang Q, Sun L, Wada J, Thakur A, Danesh FR, Chugh SS, Kanwar YS (2005) Modulation of renal-specific oxidoreductase/myo-inositol oxygenase by high-glucose ambience. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:17952-7
- Nielsen NS, Petersen A, Meyer AS, Timm-Heinrich M, Jacobsen C (2004) Effects of lactoferrin, phytic acid, and EDTA on oxidation in two food emulsions enriched with long-chain polyunsaturated fatty acids. *J Agric Food Chem* 52:7690-9
- Novak JE, Agranoff BW, Fisher SK (2000) Regulation of Myo-inositol homeostasis in differentiated human NT2-N neurons. *Neurochem Res* 25:561-6
- Novak JE, Turner RS, Agranoff BW, Fisher SK (1999) Differentiated human NT2-N neurons possess a high intracellular content of myo-inositol. *J Neurochem* 72:1431-40
- Ostlund RE, Jr., McGill JB, Herskowitz I, Kipnis DM, Santiago JV, Sherman WR (1993) D-chiro-inositol metabolism in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9988-92
- Ostlund RE, Jr., Seemayer R, Gupta S, Kimmel R, Ostlund EL, Sherman WR (1996) A stereospecific myo-inositol/D-chiro-inositol transporter in HepG2 liver cells. Identification with D-chiro-[3-3H]inositol. *J Biol Chem* 271:10073-8
- Patishi Y, Lubrich B, Berger M, Kofman O, van Calker D, Belmaker RH (1996) Differential uptake of myo-inositol in vivo into rat brain areas. *Eur Neuropsychopharmacol* 6:73-5
- Pendaries C, Tronchere H, Plantavid M, Payrastra B (2003) Phosphoinositide signaling disorders in human diseases. *FEBS Lett* 546:25-31
- Poppe R, Karbach U, Gambaryan S, Wiesinger H, Lutzenburg M, Kraemer M, Witte OW, Koepsell H (1997) Expression of the Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransporter SGLT1 in neurons. *J Neurochem* 69:84-94
- Rand EB, Depaoli AM, Davidson NO, Bell GI, Burant CF (1993) Sequence, tissue distribution, and functional characterization of the rat fructose transporter GLUT5. *Am J Physiol* 264:G1169-76
- Reece EA, Homko CJ, Wu YK, Wiznitzer A (1998) The role of free radicals and membrane lipids in diabetes-induced congenital malformations. *J Soc Gynecol Investig* 5:178-87

- Reshkin SJ, Vilella S, Ahearn GA, Storelli C (1989) Basolateral inositol transport by intestines of carnivorous and herbivorous teleosts. *Am J Physiol* 256:G509-16
- Rim JS, Atta MG, Dahl SC, Berry GT, Handler JS, Kwon HM (1998) Transcription of the sodium/myo-inositol cotransporter gene is regulated by multiple tonicity-responsive enhancers spread over 50 kilobase pairs in the 5'-flanking region. *J Biol Chem* 273:20615-21
- Roll P, Massacrier A, Pereira S, Robaglia-Schlupp A, Cau P, Szepetowski P (2002) *Gene* 285:141-48
- Scalera V, Natuzzi D, Prezioso G (1990) myo-inositol transport in rat intestinal brush border membrane vesicles, and its inhibition by D-glucose. *Biochim Biophys Acta* 1062:187-92
- Scalera V, Natuzzi D, Prezioso G (1991) myo-inositol transport in rat intestinal brush border membrane vesicles, and its inhibition by D-glucose. *Biochim Biophys Acta* 1062:187-92
- Scherer J (1850) Uber eine neue, aus dem Muskelfleische gewonnene Zuckerart. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 73:322-328
- 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
- Shaltiel G, Shamir A, Shapiro J, Ding D, Dalton E, Bialer M, Harwood AJ, Belmaker RH, Greenberg ML, Agam G (2004) Valproate decreases inositol biosynthesis. *Biol Psychiatry* 56:868-74
- 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* 95:542-6
- Shetty HU, Siarey RJ, Galdzicki Z, Stoll J, Rapoport SI (1999) Ts65Dn Mouse, a Down Syndrome Model, Exhibits Elevated myo-Inositol in Selected Brain Regions and Peripheral Tissues. *Neurochemical Research* 25: pp. 431–435
- Silbernagl S, Volker K, Dantzler WH (2003) Tubular reabsorption of myo-inositol vs. that of D-glucose in rat kidney in vivo et situ. *Am J Physiol Renal Physiol* 284:F1181-9
- Spector R (1976) The specificity and sulfhydryl sensitivity of the inositol transport system of the central nervous system. *J Neurochem* 27:229-36
- Spector R, Lorenzo AV (1975) Myo-inositol transport in the central nervous system. *Am J Physiol* 228:1510-18
- Stokes CE, Hawthorne JN (1987) Reduced phosphoinositide concentrations in anterior temporal cortex of Alzheimer-diseased brains. *J Neurochem* 48:1018-21
- Streb H IR, Berridge MJ, Schulz I. (1983) Release of Ca<sup>2+</sup> from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* Nov 3-9;306(5938):67-9
- Takenawa T, Itoh T (2001) Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin cytoskeletal organization and membrane traffic from the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* 1533:190-206

- Tandon BN (2003) Hepatic encephalopathy syndromes. *Indian J Gastroenterol* 22 Suppl 2:S4-6
- 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* 20:4467-77
- 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* 23:531-40
- 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* 276:15466-71
- Vilella S, Reshkin SJ, Storelli C, Ahearn GA (1989) Brush-border inositol transport by intestines of carnivorous and herbivorous teleosts. *Am J Physiol* 256:G501-8
- Wentzel P, Wentzel CR, Gareskog MB, Eriksson UJ (2001) Induction of embryonic dysmorphogenesis by high glucose concentration, disturbed inositol metabolism, and inhibited protein kinase C activity. *Teratology* 63:193-201
- Williams RS, Harwood AJ (2000) Lithium therapy and signal transduction. *Trends Pharmacol Sci* 21:61-4
- Wright EM, Loo DD, Hirayama BA, Turk E (2004) Surprising versatility of Na<sup>+</sup>-glucose cotransporters: SLC5. *Physiology (Bethesda)* 19:370-6
- Wright EM, Turk E (2003) The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch* 447:510-8
- Yamashita T, Shimada S, Yamauchi A, Guo W, Kohmura E, Hayakawa T, Tohyama M (1997) Induction of Na<sup>+</sup>/myo-inositol co-transporter mRNA after rat cryogenic injury. *Brain Res Mol Brain Res* 46:236-42
- Yamauchi A, Kwon HM, Uchida S, Preston AS, Handler JS (1991) Myo-inositol and betaine transporters regulated by tonicity are basolateral in MDCK cells. *Am J Physiol* 261:F197-202
- Yamauchi A, Miyai A, Shimada S, Minami Y, Tohyama M, Imai E, Kamada T, Ueda N (1995) Localization and rapid regulation of Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter in rat kidney. *J Clin Invest* 96:1195-201
- Yorek MA, Stefani MR, Dunlap JA, Ro KS, Davidson EP (1991) Trans-hydroxyl group configuration on carbons 2 and 3 of glucose. Responsible for acute inhibition of myo-inositol transport? *Diabetes* 40:1016-23