

2m11. 2906. 7

Université de Montréal

**Étude de la force motrice impliquée dans
le flux d'eau associé au cotransport Na^+ /glucose**

par

Pierre-Pascal Duquette

Département de Physique

Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès Science (M. Sc.)

Décembre 2000

©Pierre-Pascal Duquette



QC

3

154

2001

N.013

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :
Étude de la force motrice impliquée dans
le flux d'eau associé au cotransport Na⁺/glucose

présenté par
Pierre-Pascal Duquette

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Alfred Berteloot

Dr Jean-Yves Lapointe

Dr Lucie Parent

Mémoire accepté le :

Résumé

Il a récemment été proposé (Loo *et al*, 1996) que SGLT1, le cotransporteur Na^+ /glucose responsable de la réabsorption du glucose dans le tubule proximal, transporte des molécules d'eau avec les substrats de façon stœchiométrique : 2 Na^+ , 1 glucose et ~ 260 molécules d'eau par cycle de transport. À l'aide de mesures en électrophysiologie effectuées de façon simultanée à des mesures de volume, nous avons entrepris d'identifier la nature de la force motrice causant les flux d'eau lors du transport de glucose.

La perméabilité passive à l'eau des ovocytes exprimant hSGLT1 ($L_p \pm \text{SE}$) est $3,8 \pm 0,3 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ ($n = 15$). L'addition de 100 μM phlorizin (Pz, un inhibiteur spécifique de SGLT1) réduit cette perméabilité à celle des ovocytes non injectés. L'addition de glucose externe (5 mM) en présence de Na^+ induit un courant moyen de $0,8 \pm 0,1 \mu\text{A}$ et un flux d'eau atteignant $117 \pm 17 \text{ pL cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en environ 10-20 minutes. Après inhibition rapide du cotransport Na^+ /glucose avec la Pz, le flux d'eau reste considérablement élevé à $61,4 \pm 7 \text{ pL cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, révélant la présence d'un gradient osmotique établi à travers la membrane.

Une dépolarisation rapide de -100 mV à 0 mV en présence de αMG réduit le courant de cotransport de 94% mais ne réduit le taux de gonflement que de 25% ; le transport d'eau ne suit donc pas le cotransport de Na^+ /glucose. Pour les ovocytes exprimant SGLT1, le flux d'eau qui accompagne les flux de glucose et de Na^+ est passif et il ne répond qu'à la présence d'un gradient d'osmolarité. Un modèle théorique

supposant l'accumulation d'osmolytes sous la membrane lors du transport et permettant la diffusion des osmolytes à l'intérieur de l'ovocyte avec un coefficient de diffusion $\sim 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ peut expliquer les flux observés dans les précédentes conditions expérimentales.

La perméabilité à l'eau des ovocytes exprimant SGLT1 s'est montrée indépendante du potentiel membranaire et de la présence de Na^+ dans le milieu externe. Le flux passif à travers SGLT1, bien que sensible à la phlorizine, ne semble pas intimement relié à l'une ou l'autre des conformations du cotransporteur qui sont accessibles en appliquant soit du Na^+ extracellulaire, soit un changement de potentiel membranaire.

Table des matières

Identification du jury	ii
Résumé	iii
Table des matières	v
Liste des figures	viii
Liste des abréviations	x
Dédicace	xi
Remerciement	xii
<u>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION</u>	<u>1</u>
1.1 LA DIFFUSION PASSIVE ET L'OSMOSE	2
1.2 LES MÉCANISMES DE TRANSPORT D'EAU	3
1.2.1 LA DIFFUSION D'EAU À TRAVERS LA BICOUCHE LIPIDIQUE	4

1.2.2	LES CANAUX À EAU	4
1.2.3	LES TRANSPORTEURS	6
1.2.3.1	Les transporteurs passifs	6
1.2.3.2	Les transporteurs secondairement actifs	8
1.3	LE COTRANSPORTEUR Na^+/GLUCOSE (SGLT1)	11
1.3.1	DÉCOUVERTE, CLONAGE ET EXPRESSION	11
1.3.2	LOCALISATION ET STRUCTURE	12
1.3.3	MÉCANISME DE FONCTIONNEMENT	14
1.4	BUT DU TRAVAIL DE RECHERCHE	16

**CHAPITRE 2 : ARTICLE “ LOCAL OSMOTIC GRADIENTS DRIVE THE WATER
FLUX ASSOCIATED WITH Na^+ /GLUCOSE COTRANSPORT ”
PUBLIÉ DANS PNAS** **18**

**CHAPITRE 3 : RÉSULTATS ADDITIONNELS SUR L'ACCUMULATION D' α MG
ET SUR LA PERMÉABILITÉ PASSIVE À L'EAU DE SGLT1** **25**

3.1	DÉTECTION DE L'ACCUMULATION DE αMG PENDANT LE COTRANSPORT Na^+/GLUCOSE	25
3.2	EFFET DE LA CONFORMATION DE LA PROTÉINE SUR LA PERMÉABILITÉ À L'EAU	26
3.2.2	EFFET DU POTENTIEL MEMBRANAIRE SUR LA PERMÉABILITÉ À L'EAU	28
3.2.3	EFFET DU SODIUM SUR LA PERMÉABILITÉ À L'EAU	29

CHAPITRE 4 : DISCUSSION	32
4.1 ASPECTS TECHNIQUES	32
4.1.1 OVOCYTES	32
4.1.2 ÉCLAIRAGE, CONTRASTE	33
4.1.3 ACQUISITION DES DONNÉES	36
4.1.4 FLUX DE LA SOLUTION ET ESPACE MORT	36
4.2 ARGUMENTS "SUPPORTANT" LE TRANSPORT SECONDAIREMENT ACTIF	37
4.2.1 FLUX D'EAU ASSOCIÉ À L'ACTIVITÉ D'UN COTRANSPORTEUR PAR RAPPORT À CELLE D'UN CANAL	37
4.2.2 FLUX D'EAU PROPORTIONNEL AU TRANSPORT Na^+ /GLUCOSE ET ÉNERGIE D'ACTIVATION	39
4.2.3 AUCUN DÉLAI ENTRE LE FLUX D'EAU ET L'APPARITION DU COURANT	41
4.2.4 FLUX CONTRE GRADIENT	41
CHAPITRE 5 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	44
BIBLIOGRAPHIE	46

Liste des figures

Figures du chapitre 1

Figure 1.1	Reconstitution 3D de l'aquaporine	8
Figure 1.2	Topologie membranaire et fonctionnement de SGLT1	11
Figure 1.3	Topologie membranaire présumée de SGLT1.....	14

Figures du chapitre 2

Figure 2.1	α -methyl-glucose-dependent water flux.....	20
Figure 2.2	Analysis of water transport during prolonged exposure to 5mM α MG.....	21
Figure 2.3	Effect of a rapid reduction in the cotransported current.....	21
Figure 2.4	Effect of a K^+ inward current on oocyte volume and osmolyte accumulation.....	22
Figure 2.5	Theoretical fit using the osmolyte accumulation model.....	23
Figure 2.6	Passive water transport against an apparent osmotic gradient	24

Figures du chapitre 3

Figure 3.1	Détection de l'accumulation de α MG sous la membrane de l'ovocyte.....	27
Figure 3.2	Effet du potentiel sur la perméabilité à l'eau de SGLT1	30

Figures du chapitre 4

Figure 4.1	Schéma du montage expérimental	34
Figure 4.2	Image captée par ordinateur.....	35

Liste des abréviations

- α MG** : α -méthyl-glucose
- AQP** : Aquaporine
- Glut** : Transporteur facilité de glucose
- Pz** : Phlorizine
- SGLT1** : Cotransporteur Na⁺/Glucose

Dédicace

*Je dédie ce travail à une femme
merveilleuse.*

*Maman, j'ai toujours pu compter sur
ta présence, tant pour célébrer mes joies que
pour consoler mes peines. Merci.*

Remerciements

Je tiens à remercier tout spécialement mon directeur de recherche, Dr Jean-Yves Lapointe, pour sa grande disponibilité, ses judicieux conseils et son appui constant.

Je veux également souligner l'accueil extraordinaire que j'ai reçu au laboratoire. Mes collègues de travail et amis m'ont guidé jour après jour sans hésiter à mettre de côté leurs occupations pour me donner un coup de pouce. Aussi, en créant constamment une ambiance enjouée dans le laboratoire, ils m'ont fait passer un agréable moment en leur compagnie. Merci à vous, Bernadette, Pierre et Emmanuelle.

Je remercie également Dr Micheal Coady et Michel Brunette pour leur indispensable appui technique.

J'adresse ma reconnaissance à mes parents pour leur support moral et leur appui financier tout au long de mes études. Cette maîtrise est le résultat de ce que vous m'avez enseigné. Merci !

Enfin, je veux saluer les personnes qui ont fait de mon séjour universitaire un souvenir magnifique; Mes amis Josée, Vicky, Boul, Lex, Éric et Louis-Patrick.

Chapitre 1 : Introduction

L'eau est le composé de base des cellules vivantes. En effet, les cellules sont composées à 70% d'eau et, chez les organismes multicellulaires, elles baignent dans un milieu (le milieu intérieur) qui en est composé à 99.1%. Cette prépondérance impose de considérer les mécanismes de transport d'eau avec la plus grande importance. À quelques exceptions près, toutes les membranes sont perméables à l'eau et les cellules vivent en équilibre osmotique avec leur environnement. Les membranes cellulaires sont essentiellement constituées de lipides et de protéines. En milieu aqueux, les lipides forment un film bimoléculaire dont la partie intérieure est la chaîne carbonée hydrophobe et la partie extérieure est la tête hydrophile. La bicouche lipidique, grâce à sa portion hydrophobe, limite considérablement le passage d'eau et de molécules hydrophiles. En plus de la diffusion passive de l'eau à travers la membrane bilipidique, s'ajoutent d'autres modes de transport qui dépendent de la présence de protéines membranaires spécifiques.

Dans cette introduction, nous allons analyser les différents modes de transport de l'eau à travers les membranes biologiques et allons présenter les principales caractéristiques de la protéine membranaire qui fera l'objet de ce mémoire : le cotransporteur Na^+ /glucose. Mais d'abord, présentons les paramètres et les concepts qui nous permettront de décrire la diffusion de l'eau à travers la membrane.

1.1 La diffusion passive et l'osmose

La diffusion simple d'un soluté dans un milieu aqueux est le processus le plus élémentaire de transport passif. La diffusion d'une molécule peut être décrite selon l'équation de Fick, telle que dérivée par Einstein à partir de considérations cinétiques (Einstein, 1956):

$$J = -D \frac{dC}{dx} \quad (1.1)$$

où J est le flux ($\text{mol s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$), D est le coefficient de diffusion ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$) et $\frac{dC}{dx}$ est le gradient de concentration. En intégrant l'équation de Fick, le flux s'exprime tel que :

$$J = P[C_2 - C_1] \quad (1.2)$$

où P est la perméabilité ($P = \beta D / \Delta x$, où β est le coefficient de partition et Δx l'épaisseur de la membrane).

Dans le cas de la diffusion de l'eau elle-même, l'osmose, le problème est généralement abordé de façon légèrement différente. L'eau pure correspond à une "concentration" de 55 mol L^{-1} et, quoique tout à fait correct, il est malaisé de parler de différence de concentrations d'eau en tant que force motrice pour l'osmose. Le flux d'eau entre deux milieux séparés par une couche membranaire perméable est plutôt décrit en fonction de la pression osmotique, qui est la pression devant être exercée sur la paroi pour empêcher le phénomène d'osmose. Cette pression est directement liée à la concentration des molécules non diffusibles, c'est-à-dire des différences d'osmolarité. L'osmolarité d'une solution est définie comme la concentration d'une molécule dans une solution exprimée en osmole par litre de solution. Lorsque la concentration de solutés

est suffisamment élevée pour influencer le volume final de la solution, elle peut être décrite par l'osmolalité, qui est la concentration d'une substance dans une solution exprimée en osmole par kilogramme d'eau. À partir de l'équation 1.2, la perméabilité osmotique L_p [cm s^{-1}] peut être définie telle que:

$$L_p = \frac{J}{\Delta\pi \bar{v}_w} \quad (1.3)$$

où J est le flux [$\text{L s}^{-1} \text{cm}^{-2}$], $\Delta\pi$ est le gradient osmotique, c'est-à-dire la différence de pression osmotique de part et d'autre de la membrane [mOsm] et \bar{v}_w est le volume spécifique de l'eau ($18 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$).

1.2 Les mécanismes de transport d'eau

Dès le début du siècle, Overton remarque que le taux de pénétration des molécules non chargées dans les cellules végétales est proportionnel à leur hydrophobicité (Overton, 1902). Quelques années plus tard, Collander et Bärlund confirment ces observations mais observent qu'en certains cas, ce taux dépend majoritairement de la taille de la molécule (Collander and Bärlund, 1933). De ces observations, il a été proposé que les membranes physiologiques sont essentiellement composées de lipides et de pores. La proportion relative de ceux-ci détermine le degré d'hydrophobicité vis à vis de différents solutés alors que la grosseur des pores limite la taille des molécules qui peuvent les traverser.

1.2.1 La diffusion d'eau à travers la bicouche lipidique

Deux facteurs sont limitants pour le transport de l'eau à travers une bicouche lipidique: le transport par l'interface entre la membrane et la solution aqueuse et la diffusion dans le milieu non polaire au centre de la bicouche. Le coefficient de diffusion à travers une membrane P_f a été mesuré expérimentalement en fonction du coefficient de diffusion dans l'eau D de plusieurs particules (Orbach et Finkelstein, 1980; Walter et Gutknecht, 1984). Les résultats montrent que:

$$P_f \propto KD \quad (1.4)$$

où K est le coefficient de dissociation de la particule dans l'eau. Pour une même membrane, le rapport P_f / KD est constant.

Dans le cas de l'eau, le rapport P_f / KD est un peu plus élevé qu'attendu. Il est généralement accepté que cette différence vienne du fait que l'eau est une molécule très petite (Finkelstein, 1987). Selon la longueur des chaînes carbonées formant la couche lipidique, leur degré de saturation et la quantité de cholestérol contenu dans la membrane, les valeurs de P_f peuvent varier de $2 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$ jusqu'à $1 \times 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$.

Les membranes biologiques ont donc une importante perméabilité intrinsèque à l'eau, mais elles jouent toujours leur rôle en parallèle avec les autres moyens permettant à l'eau de traverser la couche lipidique, soit les pores et les transporteurs.

1.2.2 Les canaux à eau

Les membranes cellulaires possèdent une perméabilité à l'eau finie, permettant un flux maximum par diffusion simple. Cependant, le flux d'eau traversant plusieurs membranes cellulaires est nettement supérieur à la limite prédite autorisée par une

simple diffusion à travers la couche lipidique. La présence de canaux spécialisés est donc nécessaire pour expliquer les phénomènes observés (Finkelstein, 1987). De plus, parce que la diffusion d'eau tritiée ne rend pas bien compte des flux d'eau mesurés de façon macroscopique par diffusion et convection, il a été proposé que l'eau doive diffuser à la file indienne, suggérant la présence d'une structure spécialisée permettant à l'eau de traverser de façon organisée. L'identification du premier canal à eau a été permise par la découverte d'une nouvelle protéine de 28kD (Agre *et al.*, 1987), qui fut abondamment rencontrée dans des tissus hautement perméables à l'eau, dans le tubule proximal du rein et dans l'intestin (Denker *et al.*, 1988). Ce canal, maintenant connu comme aquaporine-1 (AQP1), fut cloné en 1993 (Agre *et al.*, 1993). À ce jour, il existe une liste toujours croissante de 10 aquaporines, localisées dans différents tissus des mammifères. L'AQP2 est localisée dans le canal apical du tubule collecteur du rein (Fushimi *et al.*, 1993) et est régulée par l'hormone antidiurétique (Nielsen *et al.*, 1995). Tout comme l'AQP2, l'AQP3 se trouve également dans le tubule collecteur (Ishibashi *et al.*, 1994; Echevarria *et al.*, 1994; Ma *et al.*, 1994) et est aussi régulée par l'hormone antidiurétique (Ecelbarger *et al.*, 1995). Elle se retrouve également en plus faible quantité dans quelques endroits, tel les voies respiratoires (Frigeri *et al.*, 1995). Contrairement aux AQP1 et 2, l'AQP3 est aussi perméable au glycérol et à l'urée. L'AQP4 est surtout présente dans le cerveau, mais aussi dans le tubule collecteur (Terris *et al.*, 1995), dans la rétine et dans le nerf optique (Nagelhus *et al.*, 1998).

L'AQP1 est composée de 6 segments avec les extrémités N- et C-terminales orientées vers le cytoplasme (Preston *et al.*, 1994). Les études sur la structure de AQP1

ont mené au modèle de "sablier" (i.e. "hourglass" en anglais), dans lequel les repliements des différents segments transmembranaires de la protéine créent le pore aqueux (Jung *et al.*, 1994). Ces observations ont été confirmées par reconstruction 3D de la protéine à partir d'images obtenues en microscopie électronique (Figure 1.1) (Verkman *et al.*, 2000). Les études sur la perméabilité membranaire de AQP1 ont été réalisées grâce à l'expression de la protéine dans des ovocytes de *Xenopus Laevis* puisque ceux-ci possèdent une faible perméabilité endogène. Les ovocytes, ainsi injectés, sont très perméables à l'eau ($L_p = 200 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$) (Preston *et al.*, 1992) et peuvent même exploser en quelques minutes sous l'effet d'un choc hypotonique (Borgnia *et al.*, 1999). La direction du flux d'eau est déterminée par le gradient osmotique de part et d'autre de la membrane cellulaire. Une molécule d'aquaporine a un flux unidirectionnel de 3×10^9 molécules d'eau par sous-unités par seconde. Face à un gradient osmotique de 1mM, ceci correspond à 54 500 molécules d'eau par seconde.

1.2.3 Les transporteurs

Parallèlement à l'identification moléculaire de l'aquaporine, il a été découvert que d'autres protéines de transport pouvaient aussi accélérer le transport d'eau. D'abord, certains transporteurs passifs ont été identifiés comme perméable à l'eau puis, plus récemment, ce fut le tour des transporteurs secondairement actifs.

1.2.3.1 Les transporteurs passifs

La présence de certaines protéines de transport membranaire, tels que les transporteurs de glucose (Fischbarg *et al.*, 1990; Loike *et al.*, 1993), augmentent la

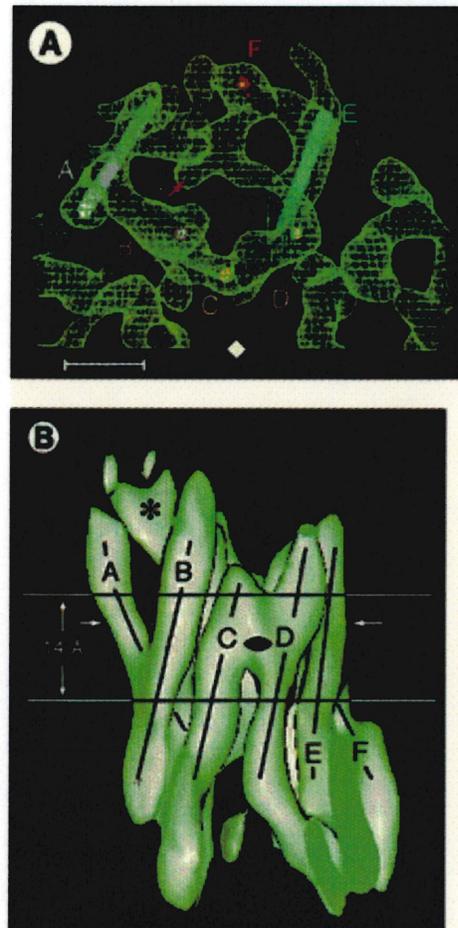


Figure 1.1 Reconstitution 3D de l'aquaporine

Structure tri-dimensionnelle de l'AQP1 obtenue à partir d'un cristal 2D de molécules d'aquaporine dans des protéoliposomes (Verkman *et al.*, 2000).

A. Vue stéréoscopique de la protéine dans un plan perpendiculaire à la membrane. Six hélices entourent le vestibule possédant un diamètre de 8 Å (représenté par un cercle pointillé).

B. Vue des 6 hélices dans le plan de la membrane.

perméabilité à l'eau de la membrane et l'ajout d'inhibiteurs spécifiques de ces transporteurs ralentit le flux d'eau. Ceci suggère que ces protéines possèdent un pore permettant à l'eau de traverser la membrane cellulaire (Loike *et al.*, 1996).

La conductance à l'eau de ces protéines est environ 2,5 fois plus faible que celle des aquaporines (Fischbarg *et al.*, 1993). Cependant, la perméabilité macroscopique observée correspond au produit de la perméabilité de chaque protéine et du nombre de ces protéines. La densité membranaire d'une protéine peut varier sur plusieurs décades selon le type de protéine. Par exemple, les études de patch-clamp nous montrent que la densité typique d'un canal ionique est de l'ordre de 1 canal par μm^2 . La densité de la Na^+/K^+ -ATPase pouvant être estimée d'après le transport actif de Na^+ et l'activité de la pompe ("turnover number") serait plutôt de 10^4 pompes/ μm^2 . Dans le cas du transport d'eau, certaines membranes sont connues pour n'afficher que très peu de canaux à eau (membrane apicale du petit intestin, membrane apicale de l'anse de Henlé). Dans ces cas, le transport d'eau par l'intermédiaire de transporteurs passifs d'autres solutés peut devenir la voie majeure de perméation.

1.2.3.2 Les transporteurs secondairement actifs

Dans tous les cas précédents, la force motrice régissant le mouvement d'eau est passive, c'est-à-dire que le flux d'eau s'effectue dans le sens du gradient osmotique. Cependant, il a aussi été démontré que certaines protéines de transport secondairement actif, telle que la protéine du cotransport Na^+ /glucose (SGLT1), peuvent transporter l'eau de façon stœchiométrique avec leurs substrats (Loo *et al.*, 1996, 1999; Zeuthen *et al.*, 1997; Meinild *et al.*, 1998). Il peut être imaginé dans ces cas qu'un volume d'eau

fixe accompagne les substrats dans le pore et qu'il est éjecté de l'autre côté de la membrane lors du changement de conformation permettant le phénomène de cotransport (Wright, 1998). Dans le cas de SGLT1, il s'agirait donc d'un cotransport de 1 molécule de glucose avec 2 ions Na^+ et environ 260 molécules d'eau. Du point de vue du transport d'eau, il s'agirait d'une véritable "pompe à eau" qui permettrait d'utiliser le gradient électrochimique de Na^+ pour, éventuellement, transporter de l'eau contre un gradient osmotique.

De nombreux articles de revue témoignent du grand intérêt porté par la communauté des physiologistes à ce nouveau type de transport d'eau. Deux possibilités peuvent être envisagées pour expliquer ce phénomène: soit ~260 sites de liaison sont disponibles pour l'eau sur SGLT1, soit il existe un large vestibule qui se trouve exposé de façon alternative à l'une ou l'autre des interfaces de la membrane cytoplasmique (Figure 1.2). Il semble peu probable que 200 sites de liaison existent sur une protéine comportant 662 acides aminés au total. D'autre part, des particules membranaires de 21 nm^2 ont été aperçues en cryo-décapage sur des cellules exprimant SGLT1 (Eskandari *et al.*, 1998). Puisque cette protéine a un poids moléculaire d'environ 75 kDa et qu'elle est surtout extracellulaire, un volume de 74 nm^3 peut être prédit. Un vestibule pouvant contenir 260 molécules d'eau, soit environ 8% du volume total, apparaît possible avec ce genre de molécule. À titre d'exemple, la structure cristallographique d'un canal potassique (Kcsa) démontre l'existence d'un vestibule au cœur de la protéine tétramérique pouvant accueillir 80 molécules d'eau (Doyle *et al.*, 1998). Cependant, il est plus difficile d'expliquer le mécanisme par lequel le vestibule éventuel de SGLT1

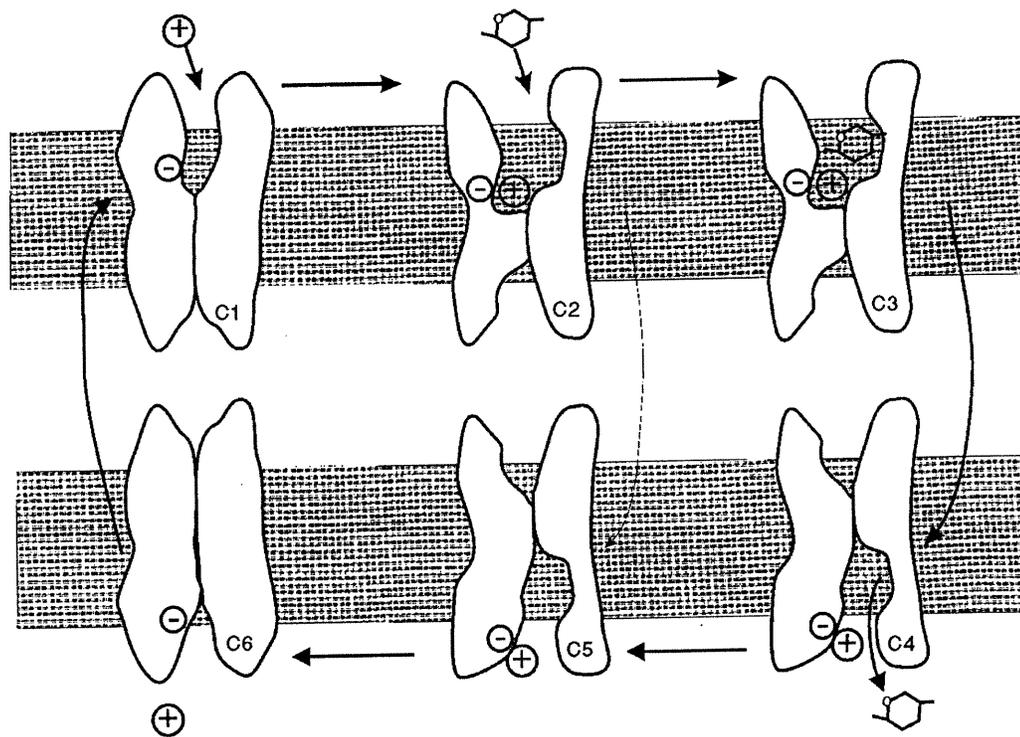


Figure 1.2 Topologie membranaire et fonctionnement de SGLT1

Modèle à 6 états pour le cotransport Na^+ /glucose (Wright *et al.*, 1998). Pour simplifier le schéma, seul 1 des deux Na^+ est représenté. Pour permettre à 260 molécules d'eau d'être activement transportées, le vestibule doit pouvoir modifier son volume de 6 nm^3 , ce qui représente 8 % du volume de la protéine.

pourrait se remplir et se vider de façon efficace à chaque cycle de cotransport. Il faudrait probablement faire l'hypothèse que ce vestibule est beaucoup plus grand que l'espace requis pour contenir les molécules d'eau transportées et qu'un changement de conformation de la protéine permette une réduction de sa taille d'un volume correspondant à 260 molécules d'eau.

1.3 Le cotransporteur Na^+ /glucose (SGLT1)

SGLT1 est l'archétype d'une large famille de cotransporteurs, responsables du transport couplé au Na^+ ou au H^+ des sucres, des acides aminés, des vitamines, de l'urée et de plusieurs anions (Turk *et al.*, 1997). Ces protéines se retrouvent chez les bactéries, les levures, les invertébrés et les vertébrés. Plusieurs d'entre elles ont été identifiées dans la bordure en brosse de l'intestin (cotransporteur Na^+ /Glucose et Na^+ /Proline) (Peerce *et al.*, 1984; Wright *et al.*, 1984) et du rein (cotransporteur Na^+ /phosphate et Na^+ /sulfate) (Werner *et al.*, 1991; Markovich *et al.*, 1993) et dans le cerveau (Na^+ / Cl^- /GABA) (Radian *et al.*, 1986). L'étude de SGLT1 pourrait donc permettre d'obtenir d'importantes informations sur le fonctionnement des cotransporteurs membranaires en général.

1.3.1 Découverte, clonage et expression

En 1987, SGLT1 est devenu le premier cotransporteur présent dans les cellules animales à avoir été cloné (Hediger *et al.*, 1987). De nombreuses particularités de son fonctionnement ont été étudiées grâce à son expression dans les ovocytes de *Xenopus Laevis* et à des mesures électrophysiologiques (Umbach *et al.*, 1990; Birnir *et al.*, 1991;

Parent *et al.*, 1992). L'utilisation d'ovocytes pour l'étude de SGLT1 est très intéressante, car celui-ci s'y exprime en grande quantité ($>10^{11}$ copies par ovocyte). Ceci permet d'obtenir un excellent rapport signal sur bruit de 1000 : 1 dans la mesure du courant de cotransport, de l'ordre de 1000 : 1. De plus, des études sur la structure ont été effectuées en microscopie électronique SGLT1 afin de déterminer sa taille et sa forme (Zampighi *et al.*, 1995).

1.3.2 Localisation et structure

SGLT1 est principalement situé dans la bordure en brosse de l'intestin et du tubule proximal du rein. Il est composé de 14 segments transmembranaires avec ses extrémités N- et C-terminales orientées vers l'extérieur de la cellule (Figure 1.3). Récemment, le nombre de segments transmembranaires a été remis en question puisqu'un épitope de reconnaissance ajouté à la dernière boucle (c'est-à-dire C-terminal) intracellulaire a été reconnu de l'extérieur de la cellule (Lin *et al.*, 1999). La structure tertiaire de la protéine est à ce jour inconnue.

En exprimant une protéine tronquée contenant les résidus d'acides aminés 406 à 662, il a été démontré que la partie C-terminale peut à elle seule transporter le glucose; le site de liaison du glucose se situerait donc dans cette région de la protéine (Wright *et al.*, 1998).

Le site de liaison du Na^+ semble être quant à lui sur la moitié N-terminale (Wright *et al.*, 1998). Le remplacement systématique un à un des acides aminés 162 à 173 par des cystéines ("cysteine scan") a modifié l'affinité aux sucres et les caractéristiques des courants transitoires de SGLT1, dont une partie dépend de la liaison

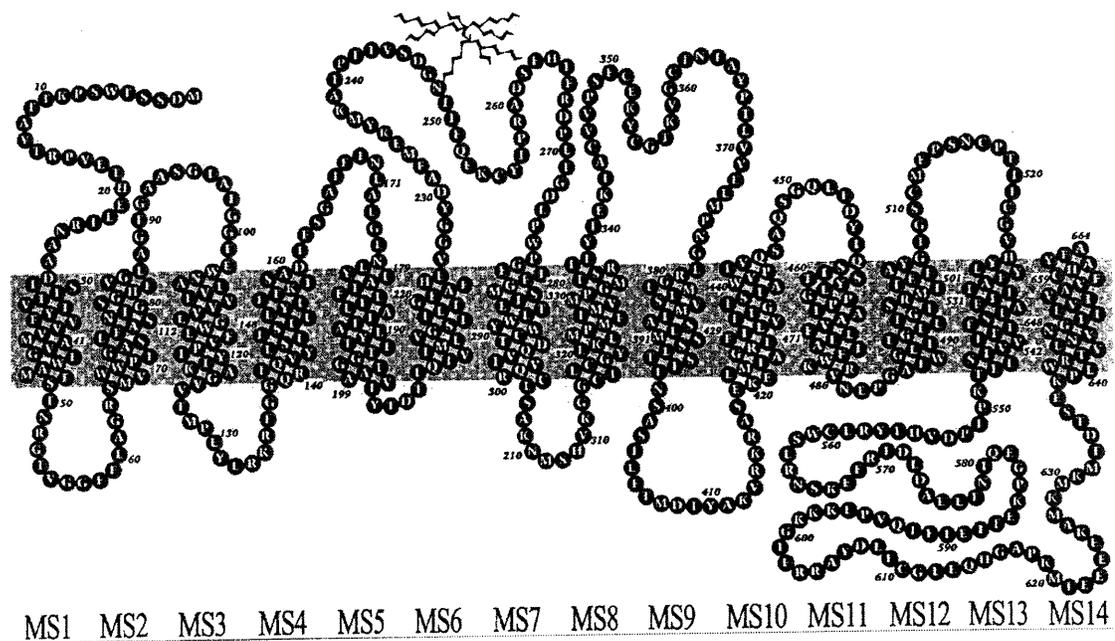


Figure 1.3 Topologie membranaire présumée de SGLT1

Modèle théorique tiré de l'analyse de l'hydrophobicité de la protéine (Turk *et al.*, 1997). SGLT1 est composé de 14 hélices transmembranaires avec ces extrémités N et C-terminales faisant face à l'extérieur de la cellule.

du Na^+ . Ces deux événements peuvent s'expliquer par la possibilité que ces acides aminés, qui constituent une boucle extracellulaire entre les hélices transmembranaires IV et V, forment la paroi du canal qui conduit le Na^+ à son site de liaison (Lo *et al.*, 1998).

1.3.3 Mécanisme de fonctionnement

L'ajout de glucose ou de son isomère non métabolisable, l' α -méthyl-glucose (α MG), à des ovocytes exprimant SGLT1 produit un courant total de 1 à 3 μA . L'amplitude de ce courant dépend du taux d'expression du transporteur dans la membrane (maximal après 4 à 5 jours), de la concentration de glucose ($K_m = 0,1 - 0,4 \text{ mM}$ selon l'espèce), de la présence de Na^+ ($K_m = 2,5 \text{ à } 50 \text{ mM}$, selon la concentration de sucre et l'ampleur du potentiel membranaire), du potentiel membranaire (courant maximal à -150 mV), de la concentration de phlorizine (inhibiteur spécifique de SGLT1, $K_I = 10 \text{ nM} - 2 \text{ }\mu\text{M}$, selon l'espèce) et de la température. Des mesures simultanées en électrophysiologie et en captation de ^{22}Na et de ^{14}C - α MG démontrent que le courant glucose-dépendant est directement proportionnel aux flux isotopiques de α MG et de Na^+ avec une stœchiométrie s'approchant de 2Na^+ par molécule d' α MG (Mackenzie *et al.*, 1998). Des mesures du potentiel d'inversion utilisant la technique du "cut-open oocyte" avaient d'ailleurs prouvé que la stœchiométrie était précisément 2 Na^+ par molécule de sucre transporté dans une variété de conditions expérimentales (Chen *et al.*, 1995).

Le modèle couramment utilisé pour représenter le couplage des substrats lors du cotransport met en jeu un changement de conformation de la protéine tel qu'illustré par la figure 2. La liaison des substrats permet une réorientation des sites de liaison de la face membranaire externe vers la face interne où ils sont libérés. En utilisant des sondes fluorescentes attachées au cotransporteur, des observations directes de changements de conformation de la protéine suite à l'application de potentiels membranaires confirment ce modèle (Loo *et al.*, 1998). De plus, en absence de glucose et de Na^+ intracellulaires, les courants transitoires sensibles à la phlorizine possèdent deux constantes de relaxation (Chen *et al.*, 1996). Ces deux constantes de temps sont justement associées à la réorientation du cotransporteur libre dans le champ électrique de la membrane par laquelle les sites de liaison du Na^+ sont successivement exposés à l'une ou l'autre des interfaces membranaires.

Actuellement, deux mécanismes cinétiques sont proposés quant à l'ordre d'addition du Na^+ et du glucose sur le transporteur. Le premier mécanisme suppose que l'attachement des deux ions Na^+ précède celui du glucose avant que ne s'effectue le changement de conformation qui permettra à tous les substrats de rejoindre le côté intracellulaire (Wright *et al.*, 1994). Une simulation par ordinateur de ce mécanisme a démontré qu'il ne pouvait être valide que dans certains cas particuliers, par exemple lorsque les concentrations de Na^+ sont très faibles (Falk *et al.*, 1998). Ces résultats théoriques sont en accord avec les résultats expérimentaux où le courant de fuite de Na^+ sensible à la phlorizine en absence de glucose est mesuré en fonction de la concentration de Na^+ (Chen *et al.*, 1997). Ce courant dépend de la concentration de Na^+ de façon

Michaelienne et sa constante d'affinité est 6 fois plus faible qu'en présence de glucose. Ce résultat est attendu avec le mécanisme de liaison Na^+ - glucose - Na^+ tandis que celui Na^+ - Na^+ - glucose prévoit plutôt une dépendance de forme sigmoïdale et une constante d'affinité égale pour le courant de fuite et le courant en présence d'une faible concentration de glucose.

En présence d'une concentration de glucose maximale, un flux d'eau de l'ordre de 60 pL s^{-1} est généré (Loo *et al.*, 1996). Plusieurs articles ont avancé l'hypothèse que ce transport d'eau est en partie couplé au transport des substrats dans un ratio 1 glucose : 2 Na^+ : $\sim 260 \text{ H}_2\text{O}$ (Loo *et al.*, 1996, 1999; Zeuthen *et al.*, 1997; Meinild *et al.*, 1998). Les principales observations qui supportent cette hypothèse sont :

1. L'énergie d'activation est la même pour le cotransport de glucose que pour le transport d'eau.
2. Le flux d'eau est proportionnel au transport Na^+ /Glucose
3. Le transport d'eau induit par le fonctionnement du cotransporteur cause un gonflement beaucoup plus rapide et important que dans le cas des canaux ioniques.
4. Il n'y a aucun délai observé entre le début du transport Na^+ /Glucose et le début du flux d'eau.
5. Un flux d'eau peut être observé dans le sens inverse prédit par le gradient transmembranaire d'osmolarité.

1.4 But du travail de recherche

Deux forces motrices peuvent expliquer le gonflement d'un ovocyte exprimant SGLT1 lors de l'ajout de glucose. Premièrement, le flux d'eau peut être causé par la

création d'un gradient osmotique consécutif à l'accumulation des osmolytes transportés dans une couche aqueuse non mixée au voisinage de la face membranaire interne. Deuxièmement, ce flux d'eau peut être couplé directement au fonctionnement du système de cotransport suite à son activation, tel que suggéré par le groupe de Wright.

Le but de cette recherche est donc de déterminer l'importance relative de ces deux voies du transport d'eau et d'identifier la force motrice éventuelle qui sous-tend les flux d'eau observés.

Suite à la connaissance de ces informations, il sera possible de proposer un modèle de diffusion intracellulaire du Na^+ et du glucose dans l'ovocyte. Ce modèle devrait fournir une description adéquate des flux d'eau associés au cotransport Na^+ /glucose. Les différents paramètres qui sous-tendent les flux d'eau dans ce modèle pourront finalement être évalués quant à leur pouvoir prédictif des flux d'eau générés par le fonctionnement de différents systèmes de transport, tant d'autres cotransporteurs que de transporteurs facilités pour les substrats organiques et les ions.

Chapitre 2 : Article “ Local osmotic gradients drive the water flux associated with Na⁺/glucose cotransport ” publié dans PNAS

Le présent chapitre, contenant l'article *Local osmotic gradients drive the water flux associated with Na⁺/glucose cotransport*, est la principale partie de mon mémoire de maîtrise.

J'ai réalisé et analysé l'ensemble des expériences contenu dans cet article. J'en ai rédigé seul une première version et participé de façon active à son amélioration en compagnie de Dr Bissonnette et de mon directeur de recherche, Dr Lapointe.

Local osmotic gradients drive the water flux associated with Na⁺/glucose cotransport

Pierre-Pascal Duquette, Pierre Bissonnette, and Jean-Yves Lapointe*

Groupe de Recherche en Transport Membranaire, Physics Department, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada, H3C 3J7

Edited by Maurice B. Burg, National Institutes of Health, Bethesda, MD, and approved January 29, 2001 (received for review May 26, 2000)

It recently was proposed [Loo, D. D. F., Zeuthen, T., Chandy, G. & Wright, E. M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13367–13370] that SGLT1, the high affinity intestinal and renal sodium/glucose cotransporter carries water molecules along with the cosubstrates with a strict stoichiometry of two Na⁺, one glucose, and ≈220 water molecules per transport cycle. Using electrophysiology together with sensitive volumetric measurements, we investigated the nature of the driving force behind the cotransporter-mediated water flux. The osmotic water permeability of oocytes expressing human SGLT1 ($L_p \pm SE$) averaged $3.8 \pm 0.3 \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ($n = 15$) and addition of 100 μM phlorizin (a specific SGLT1 inhibitor) reduced the permeability to $2.2 \pm 0.2 \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ($n = 15$), confirming the presence of a significant water permeability closely associated with the cotransporter. Addition of 5 mM α -methylglucose (αMG) induced an average inward current of $800 \pm 10 \text{ nA}$ at -50 mV and a water influx reaching $120 \pm 20 \text{ pL} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ within 5–8 min. After rapidly inhibiting the Na⁺/glucose cotransport with phlorizin, the water flux remained significantly elevated, clearly indicating the presence of a local osmotic gradient ($\Delta\pi$) estimated at $16 \pm 2 \text{ mOsm}$. In short-term experiments, a rapid depolarization from -100 to 0 mV in the presence of αMG decreased the cotransport current by 94% but failed to produce a comparable reduction in the swelling rate. A mathematical model depicting the intracellular accumulation of transported osmolytes can accurately account for these observations. It is concluded that, in SGLT1-expressing oocytes, αMG -dependent water influx is induced by a local osmotic gradient by using both endogenous and SGLT1-dependent water permeability.

Until the 1990s, it was believed that water movement across cell membrane occurred solely by diffusion through the lipid bilayer and through unidentified pores capable of containing a file of several water molecules (1). In 1990, expression of the facilitated glucose transporter (GLUT) in *Xenopus* oocytes was reported to produce a large increase in membrane water permeability (2), suggesting its capacity of mediating water movement. In 1993, with the cloning of the first water channel (3), it was clearly demonstrated that some membrane proteins do specialize in mediating water transport. Later on, expression of the Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) in oocyte, on top of increasing the passive water permeability (4), also was suggested to perform a secondary-active water transport (5). Although the coupling between solute and water transport has long been explained with the generation of a transmembrane osmotic gradient (6), it was proposed that SGLT1 was, in fact, transporting Na⁺, glucose, and water in a fixed stoichiometric ratio of two Na⁺/one glucose/200–250 water molecules (5, 7–9).

Using oocytes expressing human SGLT1, we present a series of volumetric and electrophysiological experiments aimed at identifying the driving force behind the water movement that accompanies the cotransport of Na⁺ and glucose. The main observations are consistent with the presence of transport-related osmotic gradients that can account for all of the observed water flux through the cotransporter.

Materials and Methods

Oocytes and Solutions. *Xenopus laevis* oocytes preparation and cRNA injection were as described (10, 11). Our control solution

for volumetric and electrophysiological experiments contained: 50 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.82 mM MgCl₂, 0.74 mM CaCl₂, 5 mM Hepes (pH 7.6), and 85 mM mannitol (final osmolality of 197 mosm/kg H₂O). Hypotonic solutions were obtained by removing 50 mM mannitol (final osmolality of 147 mosm/kg H₂O), α -Methylglucose (αMG) solution was obtained by replacing 5 mM mannitol by 5 mM αMG and, when present, 100 μM phlorizin (Pz, Sigma) was directly added to either one of these solutions from a concentrated stock solution in ethanol (20 mM). The osmolality of each solution was controlled within 1 mOsm/kg H₂O with a vapor pressure osmometer (Advanced DigiMatic Osmometer, model 3D2, Advanced Instruments, Norwood, MA). For all experimental protocols, oocytes were equilibrated for at least 20 min in control solution to obtain a stable volume measurement.

For experiments with potassium channel expression, oocytes were injected with 4–6.5 ng cRNA coding for rat ROMK2 (kindly provided by J. Xu and S. C. Hebert, Vanderbilt University, Nashville; see ref. 12) and were incubated at 18°C for 3–4 days in antibiotic supplemented Barth's solution. Experimental solution for these experiments were enriched in K⁺ and contained: 50 mM NaCl, 20 mM KCl, 0.82 mM MgCl₂, 0.74 mM CaCl₂, 20 mM mannitol, and 5 mM Hepes (pH 7.6).

Electrophysiology. Oocyte currents were recorded by using the two-electrode voltage clamp technique as described (13, 14). Electrode tips were filled with a cushion layer of 4% agarose in 1 M KCl to reduce the cell swelling associated to KCl leakage into the cytosol (15). Data acquisition and analysis were performed with PCLAMP 6 (Axon instruments, Foster City, CA) and commercially available spreadsheet software.

With SGLT1-expressing oocytes, the membrane potential was clamped at -50 mV , and the current values were sampled at every second (unless otherwise stated). With ROMK2-expressing oocytes, the membrane potential was clamped near the resting potential ($\approx -35 \text{ mV}$, in the presence of 20 mM external K⁺) and an inward current of 1–2 μA was rapidly generated by hyperpolarizing the oocyte by 10 mV. The reversal potential was determined by briefly switching off the voltage clamp.

Optical Measurements. The experimental chamber (volume of 0.07 ml) was similar to the one described by Zeuthen *et al.* (8). The solution flux was 1.2 ml/min, and the dead space between the solution selector and the bath was reduced to 110 μl . Experimentally, 80% of the maximal cotransport current generated by addition of 5 mM αMG could be reached within 20 s. The light

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: αMG , α -methylglucose; Pz, phlorizin.

See commentary on page 3628.

*To whom reprint requests should be addressed at: Physics Department, Université de Montréal, P. O. Box 6128, succ. "centre-ville," Montréal, QC, Canada, H3C 3J7. E-mail: jean-yves.lapointe@umontreal.ca.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

source of 2 mm by 5 mm was touching the surface of the solution to avoid distortion and reflection.

The oocyte volume (V) was calculated from its measured cross-section (A) by using an inverted microscope, a $\times 3$ objective and a video camera (model CCD72, Dage-MTI, Michigan, IN). The system was calibrated with a 1-mm diameter steel ball replacing the oocyte. Images were sent to a computer (Intel 403E 486 30 MHz) through a video card (Image-1280, Matrox Electronic Systems, Dorval, QC, Canada), and our custom-made Windows-compatible software gave a real-time graphic of the number of pixels corresponding to the oocyte cross section. This setup provides a sensitivity of 0.05% in the determination of the oocyte volume. In long time course experiments (10–15 min), a rate of 1 volume measurement per s was generally used, and, in short time course experiments (2–5 min), the accuracy was further improved by taking five measurements per s and averaging the data by bins of 10 points.

Analysis. Assuming a spherical oocyte that swell uniformly, the water fluxes per unit of membrane area (J_w) were calculated as:

$$J_w = \frac{1}{S} \frac{dV}{dt}, \quad [1]$$

where S is a standard oocyte surface of 0.4 cm² for an infolding factor of 8.5- to 9.5-fold (16). The water permeability (L_p) in cm·s⁻¹ is calculated from the water flux and the osmotic gradient as:

$$L_p = \frac{J_w - J_0}{\Delta\pi} \frac{1}{\bar{v}_w}, \quad [2]$$

where J_w is the water flux per unit of membrane area (cm³·cm⁻²·s⁻¹) during the application of an osmotic gradient $\Delta\pi$ (osmol·cm⁻³), J_0 is the baseline water flux observed immediately before the osmotic shock (same units as J_w), and \bar{v}_w is the water-specific molar volume (18 cm³·mol⁻¹).

All numbers are given as means \pm SEM (n), where n is the number of oocytes tested. All experiments were performed by using oocytes from at least two different donors. Paired and unpaired Student's t tests, as appropriate, were used to compare sets of data.

Results

Basic Observations. The effects of SGLT1 on oocyte water permeability were measured by recording the oocyte swelling rate in hypotonic solution for both SGLT1-injected and noninjected oocytes. When calculating the membrane water permeability according to Eq. 2, noninjected oocytes gave $2.12 \pm 0.14 \times 10^{-4}$ cm·s⁻¹ (L_p^{control} , $n = 21$) but $3.8 \pm 0.3 \times 10^{-4}$ cm·s⁻¹ (L_p^{SGLT1} , $n = 15$) in SGLT1-expressing oocytes ($P < 0.001$). As reported (5), the water permeability of SGLT1-expressing oocytes was reduced to a level not different from noninjected oocytes when 100 μ M Pz was added to the bathing solution ($L_p^{\text{SGLT1+Pz}} = 2.2 \pm 0.2 \times 10^{-4}$ cm·s⁻¹, $n = 15$). Thus, we confirmed that SGLT1 increases the oocyte water permeability (by 1.8- \pm 0.3-fold) and that water is very likely to pass through the cotransporter itself as this water flux is totally sensitive to the presence of a specific competitive inhibitor.

Fig. 1 shows a representative example of the long time course swelling induced by the activation of Na⁺/glucose cotransport in SGLT1-expressing oocytes. When 5 mM α MG was given in equimolar replacement for mannitol, an average inward Na⁺ current (I_{COTR}) of 800 ± 10 nA ($n = 11$) was generated along with a water flux (J_w) reaching 120 ± 20 pL s⁻¹·cm⁻², 5–8 min after having presented the substrate. Using a stoichiometry of 2 Na⁺ ions per α MG molecule (10), this steady-state water flux corresponds to 815 water molecules per α MG transported. An

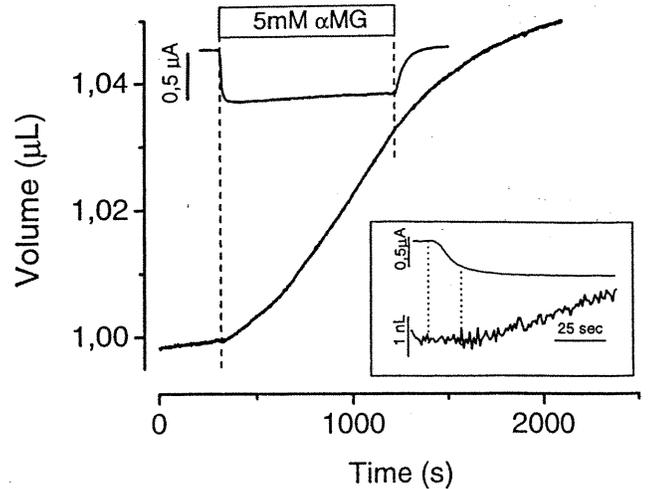


Fig. 1. α MG-dependent water flux. Oocyte current and volume are displayed as a function of time. From $t = 300$ – $1,200$ s, 5 mM α MG was added to the bathing solution. (Inset) Enlargement of the initial portion of the curves. Dotted lines, represent the time needed to reach 80% of the final cotransport current.

enlargement of the initial swelling is shown in the *Inset*. It can be seen that 80% of the maximal cotransport current is reached within 20 s after α MG addition and the volume measurement departs from the initial value at about the same time (taking into consideration the noise level that was estimated to be $\pm 0.03\%$ in the present case). Upon complete removal of α MG, the cotransport current stops, but the oocytes are still swelling at a high rate (see Fig. 1), which can continue for 15 min and more. The fact that a portion of J_w remained while I_{COTR} vanished shows that the glucose uptake into the oocyte wasn't isotonic and that a significant osmolyte accumulation had occurred during the 15-min exposure to α MG.

Testing the Water Cotransport Hypothesis. *Prolonged period of Na⁺/αMG cotransport.* The transport-dependent osmotic gradient was evaluated from the water flux remaining immediately after blocking the cotransporter with 100 μ M Pz at the end of a 15-min cotransport period (see Fig. 2). For each oocyte of this series, the membrane water permeability was measured in the presence ($L_p^{\text{SGLT1+Pz}}$) and in the absence of Pz (L_p^{SGLT1}). Basically, the cell swelling that continues immediately after Pz addition during glucose cotransport allows for the determination of the effective osmotic gradient at this moment (knowing the value of $L_p^{\text{SGLT1+Pz}}$). This osmotic gradient then can be used to predict the passive portion of the water flux in the presence of α MG (using the value of L_p^{SGLT1} measured for this given oocyte). Subtracting this passive water flux from the total water flux in the presence of α MG yields the magnitude of the putative secondary active transport of water. As shown in the *Appendix*, a simple relationship can be found between the different measured fluxes to obtain the water flux (i) through the endogenous water permeability (J_{ENDO}), (ii) through the passive SGLT1 water permeability (J_{SGLT1}), and (iii) through the water flux actually cotransported with Na⁺ and α MG (J_{COTR}).

Eleven experiments of the type shown in Fig. 2 were performed. A rapid inhibition of the cotransport current by addition of 100 μ M Pz produced an immediate reduction in this swelling rate due to the reduction in membrane water permeability from L_p^{SGLT1} to $L_p^{\text{SGLT1+Pz}}$. As the water flux was observed to continue to decrease at a slower rate in the following several minutes, the initial swelling rate immediately after Pz addition was accurately

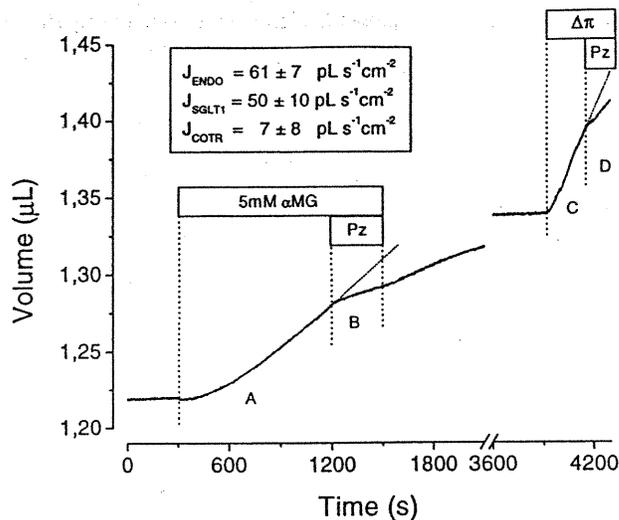


Fig. 2. Analysis of water transport during prolonged exposure to 5 mM α MG. Oocyte volume is displayed as a function of time. α MG was present between $t = 300$ s and 1,500 s, and Pz was added as indicated. After a recovery period in the absence of α MG, an osmotic shock was imposed to enable water permeability measurement. (Inset) Calculated fluxes passing through the three presumed water pathways: endogenous water permeability (J_{ENDO}), SGLT1 passive permeability (J_{SGLT1}), and cotransported with Na^+ and α MG (J_{COTR}).

estimated by the value of $(\Delta V/\tau)$ by using the following equation to fit the volume vs. time curve.

$$V = V_{\text{ini}} + \Delta V(1 - e^{-(t - t_{\text{ini}})/\tau}), \quad [3]$$

where V_{ini} and t_{ini} are the volume and time when Pz was added, and τ is the time constant associated with the additional volume (ΔV) that would be gained during a prolonged transport inhibition period. In the presence of Pz, $L_{\text{P}}^{\text{SGLT1}+\text{Pz}}$ averaged $2.5 \pm 0.2 \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, and the initial cell swelling right after Pz addition was $61 \pm 7 \text{ pL} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$. Individual values of these two parameters were used to estimate the effective osmotic gradient ($\Delta\pi$) for each of the 11 experiments, which yielded an average of $16 \pm 2 \text{ mOsm}$. In the absence of Pz, $L_{\text{P}}^{\text{SGLT1}}$ averaged $4.0 \pm 0.3 \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, and the individual values of $L_{\text{P}}^{\text{SGLT1}}$ with their corresponding $\Delta\pi$ were used to calculate an amplitude for the passive cell swelling of $110 \pm 20 \text{ pL} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$. Using the equation presented in the *Appendix*, the water flux observed after 15-min exposure to α MG can be accounted as follows: $61 \pm 7 \text{ pL} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ was attributed to J_{ENDO} , $50 \pm 10 \text{ pL} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ was attributed to J_{SGLT1} , and only $7 \pm 8 \text{ pL} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ can be associated with a putative water cotransport process (not statistically different from 0, $P = 0.40$). It is concluded from the present series of 11 experiments that, after a 15-min exposure to α MG, a significant amount of osmolyte accumulated under the oocyte membrane and that this transmembrane osmotic gradient is sufficient to drive water flux through passive pathways, which can quantitatively account for the total cell swelling observed.

Absence of early water cotransport. Because it may be difficult to detect a relatively small J_{COTR} in the presence of a large transport-related osmotic gradient, the presence of J_{COTR} was tested in the first minute after the activation of a cotransport current. As α MG addition to the bath takes ≈ 20 s, we chose to modulate the cotransport activity by changing the membrane potential from -100 mV to 0 mV, a procedure that takes only 10 ms with our system. The time course of the oocyte volume, as predicted from the water cotransport hypothesis (V_{COTR}), should follow the integrated current, as:

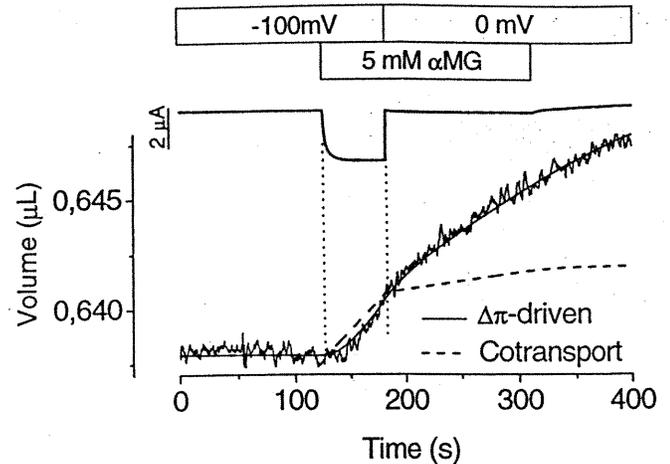


Fig. 3. Effect of a rapid reduction in the cotransported current. After a stabilization period at a membrane potential of -100 mV, 5 mM α MG is introduced in the bathing solution. After establishment of a steady-state cotransport current (a 60-s period), the membrane potential was stepped to 0 mV to abruptly reduce the cotransport current. At $t = 300$ s, α MG was removed to allow a determination of background current at 0 mV. The volume data were either fitted according to the water-cotransport hypothesis (240 water molecules/ α MG molecule, dashed line) or by using the osmolyte accumulation model (full line).

$$V_{\text{COTR}} = V_0 + \frac{N\bar{V}_w}{2F} \int_0^t I_{\text{COTR}} dt, \quad [4]$$

where V_0 is the initial oocyte volume, N is the number of water molecules per α MG transported, F is the Faraday constant, and I_{COTR} is the α MG-dependent cotransport current. In this series of six experiments, the oocyte was maintained at -100 mV until the volume reached a stable level. At this time, 5 mM α MG was presented in the bath and after 60 s the holding potential was stepped to 0 mV (see Fig. 3). Upon depolarization, the cotransport current decreased abruptly by $94 \pm 1\%$ but the oocyte swelling rate was reduced by only $25 \pm 2\%$, as measured in a 20-s period after the voltage step. The theoretical prediction (Eq. 4) is shown in Fig. 3 by using a constant N that matches the water flux observed at -100 mV ($n = 240$ water molecules per α MG transported in the case presented). It will be shown below that a model based on transport-dependent intracellular accumulation of osmolytes can precisely account for the cell volume time course presented in Fig. 3.

Role of Cations in Osmolyte Accumulation. Accumulation of transport-dependent osmolytes must involve α MG as well as a certain amount of Na^+ accompanied by some intracellular anion to obey the electroneutrality law (global electroneutrality being taken care of by the current electrode of the voltage clamp system). Indeed, the osmotic effect of a cation transport is not trivial as one Na^+ ion entering the cell can either attract an intracellular anion or repel an intracellular cation, generating a local accumulation of two osmolytes in the first case but none in the second (if the attracted or repelled ion is monovalent). To determine the osmotic importance of the cation during Na^+/α MG cotransport, the cell swelling produced by the generation of a purely cationic current was measured in six oocytes expressing the potassium channel ROMK2. The osmolality gradient caused by K^+ uptake can be estimated from the rate of cellular swelling and the reversal potential of the K^+ current (E_{K}) can be used to obtain an independent estimation of the local intracellular K^+ concentration ($[\text{K}]_i$). Given the facts that the selectivity of ROMK2 for

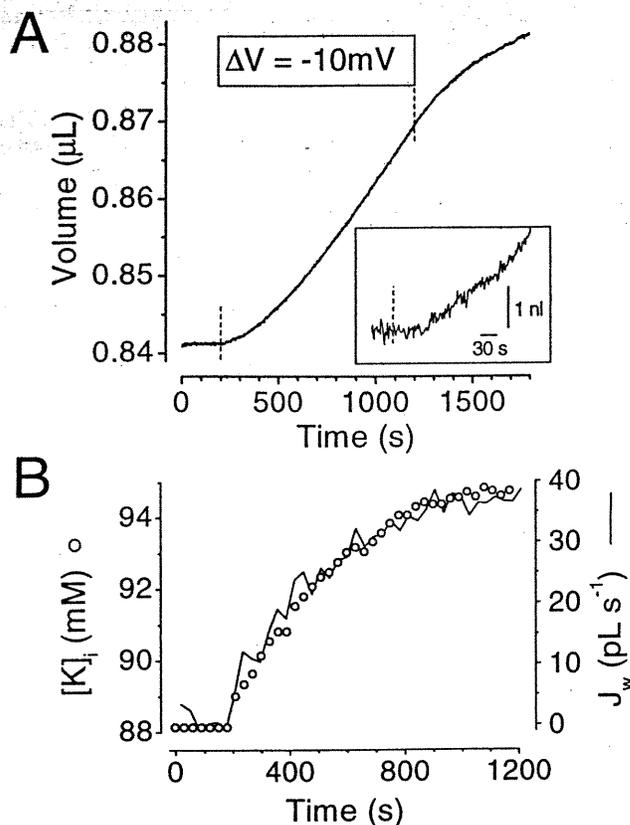


Fig. 4. Effect of a K^+ inward current on oocyte volume and intracellular K^+ concentration. (A) Average volume measurements in ROMK2-injected oocytes ($n = 3$). At $t = 180$ s, the oocyte membrane was hyperpolarized by 10 mV to stimulate an inward K current averaging 1.8 μA . (Inset) Enlargement of the initial portion of the curve shown in A. The dotted line represents the time at which the inward current was stimulated. (B) Parallel increases in intracellular K^+ concentration ($[K]_i$, \circ) and in the instantaneous water flux (J_w , full line). $[K]_i$ was obtained from the K^+ reversal potential and J_w was obtained from the slope of the curve shown in A, which was measured every 30 s using a time window of ± 25 s.

K^+ is very high (17) and oocytes expressing the channel present a conductance 2 orders of magnitude larger than noninjected oocytes, the total oocyte current was assumed to represent a pure K^+ current. In this series of experiments, the volume of ROMK2-expressing oocytes was measured as the membrane potential was stepped from the reversal potential in the presence of 20 mM K^+ to a potential 10 mV more negative. The inward K^+ current averaged $1.8 \pm 0.2 \mu A$ and triggered both a cell swelling and a significant increase in $[K]_i$ averaging 8 ± 2 mM in 10 min ($P < 0.01$, $n = 6$, from a baseline of 90 ± 5 mM). Fig. 4A shows the average time course of these effects from three synchronized experiments where E_K was measured every 30 s. The swelling rate, plotted in Fig. 4B, was obtained from the slope of the curve in Fig. 4A, which also was determined every 30 s. From Fig. 4, it is clear that an inward K^+ current can generate an accumulation of intracellular K^+ that can be readily detected at 30 s and that triggers a parallel cell swelling.

Computer Simulation. To understand and predict the osmolyte accumulation inside the oocyte, a theoretical model of diffusion was elaborated. An oocyte of a given radius is separated in 50 concentric shells of 10 μm thickness and a final inner sphere (of $\approx 100 \mu m$ in radius). The osmotic force driving water inside the oocyte is the osmotic gradient between the first oocyte shell and the external solution. As the osmolality of the external solution is considered

constant, the goal of the model is to obtain the osmolality of the first shell allowing the calculation of J_w . In this model, a single average diffusion coefficient is used for the diffusion of αMG as well as for Na^+ and its accompanying anion. At each time increment (dt), an amount of solute ($J_1 dt$) entering the oocyte first shell is obtained from the cotransport current as follows:

$$J_1 dt = \frac{n_{\alpha MG}}{2FS} I dt, \quad [5]$$

where $n_{\alpha MG}$ is the number of osmolytes per αMG molecule transported. The intracellular solutes were allowed to diffuse inside the oocyte from shell i to shell $i + 1$, following Fick's first law:

$$J_{i,i+1} = D \frac{(C_i - C_{i+1})}{\Delta x}, \quad [6]$$

where C_i and C_{i+1} are the added solute concentration in the i and $i + 1$ shells, respectively, Δx corresponds to 10 μm , and D is the intracellular diffusion coefficient. Changes in C_i were calculated by using Eqs. 5 and 6, taking into account the fact that the water content of an oocyte was found, in preliminary experiments, to be 85% of its geometric volume (data not shown). Finally, at each time increment, the volume of the first shell was allowed to increase due to the water uptake driven by the local hypertonicity developed. The oocyte theoretical volume at a time t [$V(t)$] is given by:

$$V(t) = V(t - 1) + \bar{v}_w L_P S C_1 dt, \quad [7]$$

where $V(t - 1)$ is the oocyte total volume calculated at the previous time increment. The value of 10 μm for the shell thickness was chosen to yield a satisfactory resolution in the C_i vs. distance curves and, with this shell thickness, the selected time increment could not exceed 0.1 s without generating instabilities in the determination of $C_i(t)$.

In a series of five experiments, the model was used to reproduce the time course of the oocyte volume as αMG was added for 15 min followed by a recovery period of similar duration. Basically, only two parameters needed to be adjusted: the intracellular diffusion coefficient D and $n_{\alpha MG}$ (the number of osmolytes accompanying one αMG molecule). In four of five instances, the value of L_P^{SGLT1} was precisely adjusted to account for the cell swelling induced by a 2-min hypotonic shock (-50 mOsm) performed at the end of the experimental period (see Fig. 5). In the remaining case, L_P^{SGLT1} was considered as an additional adjustable parameter. The average of intracellular diffusion coefficients used was $1.1 \pm 0.3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, and the average $n_{\alpha MG}$ was 4.1 ± 0.3 osmolytes per αMG molecule. Interestingly, as shown in Fig. 3, shorter time course experiments also could be fitted with the model using the average L_P^{SGLT1} and values for D and $n_{\alpha MG}$ that are within the range used for the long time course experiments.

Discussion

The suggestion that the Na^+ /glucose cotransporter (SGLT1) can act as a water pump has generated a significant interest among transport physiologists (18–20) and appeared well supported experimentally (5, 8, 9). In the present study, crucial experiments demonstrate dissociation between the solute and water fluxes, which is inconsistent with the hypothesis of water cotransport but supports our contention that the water flux through SGLT1 is essentially passive, being driven by a readily detectable local osmotic gradient. In the following paragraphs, we will review our evidence and compare it to the corresponding evidence used to support the water cotransport hypothesis.

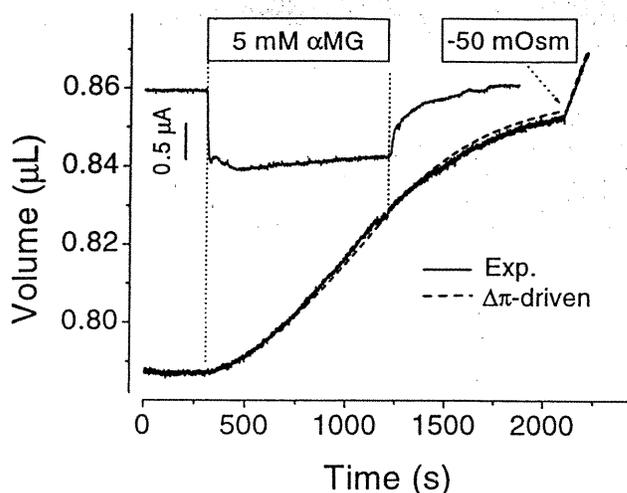


Fig. 5. Theoretical fit using the osmolyte accumulation model. Oocyte current and volume are shown as a function of time. From $t = 300$ – $1,200$ s, 5 mM α MG was added to the bathing solution and at $t = 2,100$ s, 50 mM mannitol was removed from the external solution. Superposition of the experimental data (full line) to the theoretical prediction (dashed line) from the accumulation model are presented.

SGLT1 Passive Water Permeability. First of all, the present study confirms that water can be driven through SGLT1 as oocytes injected with SGLT1 cRNA display an additional water permeability that can be blocked by Pz, the specific inhibitor of SGLT1. In a series of 11 oocytes expressing an average of 800 nA of cotransport current, the additional water permeability for the whole oocyte was $0.64 \times 10^{-4} \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ [i.e., $(L_P^{\text{SGLT1}} - L_P^{\text{SGLT1+Pz}}) \times S$]. Using a turnover rate estimated at 57 s^{-1} for the human SGLT1 (21), the average cotransport current would correspond to 4×10^{10} cotransporter molecules per oocyte, and the water permeability of individual cotransporters would be of the order of $1.5 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$. In comparison, the single-channel water permeabilities of aquaporins 1, 2, 3, and 5 were reported as varying between 20 and $60 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ (22), i.e., 10–40 times larger than the present estimate for SGLT1.

The Relationship Between Cotransport Current and Water Flux. The present study also confirms that isotonic addition of α MG generates a cell swelling (see Fig. 1) that can last for hours as reported (5, 8, 9). The absence of a significant time delay between glucose addition and cell swelling was a first criterion used in early studies to support the water cotransport hypothesis (8). In the present study, we didn't attempt to determine a time delay for two reasons: (i) accurate determination of oocyte volume requires a rather gentle solution flow rate and the time required to reach 80% of the cotransport current is already of the order of 15–20 s (ref. 8 and present study), and (ii) the extrapolation normally used to determine a time delay is inaccurate and subjective and yields a wide range of time delays that often include negative values that are clearly artifactual.

A better way of looking at the relationship between cotransport current and water flux is to measure oocyte volume while the cotransport current is changed by a rapid step in membrane potential. This series of experiments (see Fig. 3) clearly shows that the cell swelling does not follow the amount of α MG transported (i.e., the integrated cotransport current) as predicted by the water cotransport hypothesis. This is in contradiction with previously published results where an immediate effect of an hyperpolarization from 0 to -100 mV was reported (5). We think that the experimental protocol used in the present study is more discriminant than the protocol previously used because (i) enough time was spent at

-100 mV to make sure that the swelling rate closely corresponds to the putative water cotransport (≈ 240 water molecules per α MG molecule) and (ii) using 5 mM α MG with the human SGLT1 provides for a dramatic reduction in the cotransport current as only 6% of the current measured at -100 mV remained at 0 mV. In contrast, Loo *et al.* (5) used the rabbit SGLT1 for which, in their experimental conditions, the cotransport current measured at 0 mV is as much as 29% of the current measured at -100 mV. In addition, their result is difficult to interpret as the experiment was performed in the presence of an osmotic gradient (the external solution being hypotonic by 15 mOsm), which generates an initial swelling rate at 0 mV that is, in fact, higher than could be expected from the water cotransport hypothesis. As shown in Fig. 3, the cell swelling induced by a strong cotransport current appears almost "irreversible" when the current is rapidly shut down, an observation in good agreement with the hypothesis of intracellular osmolyte accumulation.

Effect of a Pure K^+ Current (ROMK2) on Water Flux. A second criterion used to support the water cotransport hypothesis was the reported absence of cell swelling (in the first 30 s) caused by the stimulation of an ionic current using different ionophores or ionic channels (8, 9). In our series of experiments with oocytes expressing ROMK-2, it was found that a K^+ influx is fully capable of producing a cell swelling on a long-term basis (≈ 5 min) that is smaller in amplitude but qualitatively similar to what could be observed with a cotransport current (compare Figs. 1 and 4). Measurements of E_K show that the intracellular K concentration increases by 8 mM in 10 min, and this increase is already detectable 30 s after initiating the K^+ inward current. Not surprisingly, the full time course of the K^+ -induced swelling can be accurately reproduced with the osmolyte accumulation model. However, care must be taken in directly comparing the cotransport and the K^+ current experiments. First, SGLT1-expressing oocytes present a water permeability that is about twice the permeability of a noninjected oocyte. This makes SGLT1-expressing oocytes much more sensitive to any osmolyte accumulation than noninjected oocytes. Second, a Na/glucose cotransport current carries with it an extra osmolyte with respect to an equivalent K^+ current. This is important as, unlike α MG, injected cations do not simply accumulate under the oocyte membrane. Considering the electroneutrality law, a influx of cations across the oocyte membrane is matched by a compensatory charge displacement at the current-injecting electrode. Depending on the relative mobilities of intracellular cations and anions, osmolytes (or salt) accumulation will be divided between these two locations: under the oocyte membrane and around the current electrode. These two factors should increase the relative sensitivity of SGLT1-expressing oocytes vs. ROMK-2-expressing oocytes in the face of transport-related osmolyte accumulation.

Osmolyte Accumulation Model. The data presented in Fig. 2 clearly indicate the presence of a transport-dependent osmotic gradient after a prolonged stimulation of a cotransport current. We tested the possibility of accounting for the build-up of such an osmotic gradient by using the simplest diffusion model for SGLT1-expressing oocyte. As shown in Fig. 5, the rate of cell swelling when α MG is added and removed from the bath can be accurately accounted for by the adjustment of only two parameters: $n_{\alpha\text{MG}}$, the number of osmolyte accumulated per α MG molecule transported, and D , the average intracellular diffusion coefficient for the "average" intracellular osmolyte. The best value of $n_{\alpha\text{MG}}$ was found to be 4.1, which is in good agreement with the known stoichiometry of the cotransporter and a significant Cl^- injection by the KCl-filled current electrode. The best diffusion coefficient was $1.1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, which is about five times lower than the diffusion coefficient expected for a small molecule or NaCl in Barth's solution. This is in qualitative agreement with a recent determination of the intracellular

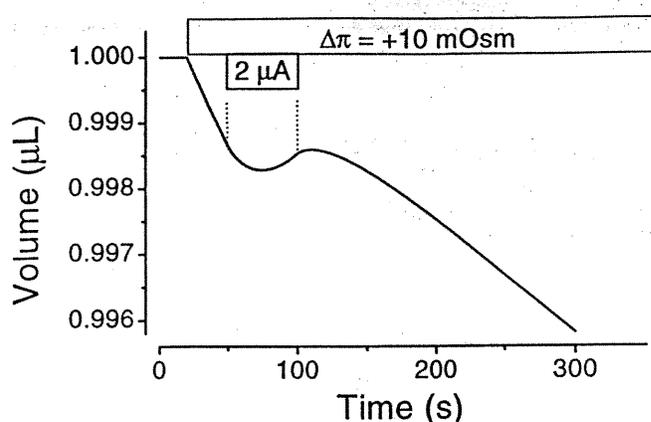


Fig. 6. Passive water transport against an apparent osmotic gradient. The osmolyte accumulation model was used to calculate the oocyte volume as a function of time after presenting an hypertonic (+10 mOsm) bath solution. The parameters used were: $L_p = 7 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$, $D = 0.5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, and $n = 5$ osmolytes/ α MG transported. From $t = 50$ – 100 s, a $2 \mu\text{A}$ inward cotransport current is applied.

conductivity of an oocyte that was found to be five times smaller than the extracellular conductivity of a normal Barth's solution (23). A low intracellular diffusion coefficient is indeed expected given the relatively high viscosity of the cytosol and the fact that only a fraction of the intracellular space is available for diffusion.

Finally, our simple diffusion model can be used to explain the capacity of SGLT1 to induce a change in oocyte volume against an osmotic gradient that had been previously used as a third criterion supporting the water cotransport hypothesis (9). In Fig. 6, using the parameters found with SGLT1-expressing oocytes, the calculated volume of an oocyte is shown as a function of time after changing the osmolality of the bathing solution from 200 to 210 mOsm. While the oocyte volume is experiencing a steady-state decrease, an inward cotransport current of $2 \mu\text{A}$ is applied for 50 s. This is shown to be sufficient to reverse the oocyte shrinkage into a swelling phase apparently "against" an imposed osmotic gradient. This is to be expected if the osmolyte accumulation is capable of "locally" reversing the imposed osmotic gradient of 10 mOsm. Clearly, the direction of the water flux cannot be taken as an indication of secondary active water transport in this experimental situation.

Conclusion

On a short-term basis, rapid depolarization has failed to reveal the presence of any specific water cotransport. On a long-term basis (several minutes), which is the physiologically relevant

situation, the presence of a trans-membrane osmotic gradient is certainly the dominant driving force for water influx and the portion corresponding to the putative water cotransport was not found to be significant. Using a simple model based on intracellular solute diffusion, the full time course (0–30 min) of transport-dependent water influx can be correctly accounted for with a reasonable intracellular diffusion coefficient. Although it is clear that SGLT1 and some other solute transporters are significantly permeable to water, it was found that water transport was passive and required, in all studied cases, the presence of an osmotic gradient to energize it.

Appendix

Taking into consideration the water cotransport hypothesis, the observed water flux (J_w) is composed of three different water fluxes across the oocyte membrane: (i) the passive osmotic flux using the endogenous water permeability (J_{ENDO}), (ii) the osmotic water flux through the SGLT1 (J_{SGLT1}), and (iii) the cotransported water flux through SGLT1 (J_{COTR}). In the experiment shown in Fig. 2, the J_{COTR} was calculated for each individual oocyte from the fluxes measured in four conditions. In condition A, α MG is cotransported and all of the different water fluxes are present. Thus, the total flux in this time period (J_A) is $J_{\text{ENDO}} + J_{\text{SGLT1}} + J_{\text{COTR}}$. In condition B (see Fig. 2), Pz was added, blocking α MG transport and reducing J_{SGLT1} and J_{COTR} to 0. Thus, the total flux in condition B (J_B) is simply J_{ENDO} itself. In condition C, the water flux was caused by an osmotic shock of 50 mOsm ($\Delta\pi'$). In this case, the total water flux (J_C) is mediated by the endogenous permeability and SGLT1, but cannot be actively transported by SGLT1 because α MG is not present. Thus, J_C is $J_{\text{ENDO}} + J_{\text{SGLT1}}$. Finally, in condition D, the addition of Pz during the osmotic shock blocked the passive water flux through SGLT1. Thus, the total water flux (J_D) is only J_{ENDO} . With these four conditions, posing that $\Delta\pi$ is the transport-dependent osmotic gradient and using the permeability definition given in Eq. 2, we find:

$$\begin{aligned} J_{\text{COTR}} &= J_A - J_{\text{ENDO}} - L_P^{\text{SGLT1}} \cdot \Delta\pi \\ &= J_A - J_C \frac{J_{\text{ENDO}}}{J_{\text{ENDO}}} \\ &= J_A - J_C \frac{J_B}{J_D} \end{aligned} \quad [\text{A1}]$$

We express our gratitude to Dr. Jason Xu and Steve C. Hebert from Vanderbilt for the gift of the ROMK2 clone. We also thank Ms. Bernadette Wallendorff for her excellent technical help in several experiments. This work was supported by Medical Research Council of Canada Grant MT-10580.

- Finkelstein, A. (1987) *Water Movements Through Lipid Bilayers, Pores, and Plasma Membranes: Theory and Reality* (Wiley, New York).
- Fischbarg, J., Kuang, K. Y., Vera, J. C., Arant S., Silverstein, S. C., Loike, J. & Rosen, O. M. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3244–3247.
- Agre, P., Preston, G. M., Smith, B. L., Jung, J. S., Raina, S., Moon, C., Guggino, W. B. & Nielsen, S. (1993) *Am. J. Physiol.* **265**, F463–F476.
- Loike, J. D., Hickman, S., Kuang, K., Xu, M., Cao, L., Vera, J. C., Silverstein, S. C. & Fischbarg, J. (1996) *Am. J. Physiol.* **271**, C1774–C1779.
- Loo, D. D. F., Zeuthen, T., Chandy, G. & Wright, E. M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13367–13370.
- Diamond, J. M. & Bossert, W. H. (1967) *J. Gen. Physiol.* **50**, 2061–2083.
- Loo, D. D. F., Hirayama, B. A., Meinild, A. K., Chandy, G., Zeuthen, T. & Wright, E. M. (1999) *J. Physiol. (London)* **518**, 195–202.
- Zeuthen, T., Meinild, A. K., Klaerke, D. A., Loo, D. D. F., Wright, E. M., Belhage, B. & Litman, T. (1997) *Biol. Cell.* **89**, 307–312.
- Meinild, A. K., Klaerke, D. A., Loo, D. D., Wright, E. M. & Zeuthen, T. (1998) *J. Physiol. (London)* **508**, 15–21.
- Chen, X. Z., Coady, M. J., Jackson, F., Berteloot, A. & Lapointe, J. Y. (1995) *Biophys. J.* **69**, 2405–2414.
- Chen, X. Z., Coady, M. J., Jalal, F., Wallendorff, B. & Lapointe, J. Y. (1997) *Biophys. J.* **73**, 2503–2510.
- Boim, M. A., Ho, K., Shuck, M. E., Bienkowski, M. J., Block, J. H., Slightom, J. L., Yang, Y., Brenner, B. M. & Hebert, S. C. (1995) *Am. J. Physiol.* **268**, F1132–F1140.
- Coady, M. J., Jalal, F., Chen, X., Lemay, G., Berteloot, A. & Lapointe, J. Y. (1994) *FEBS Lett.* **356**, 174–178.
- Bissonnette, P., Noël, J., Coady, M. J. & Lapointe, J. Y. (1999) *J. Physiol. (London)* **520**, 359–371.
- Schreibmayer, W., Lester, H. A. L. & Dascal, N. (1994) *Pflügers Arch.* **426**, 453–458.
- Zampighi, G. A., Kreman, M., Boorer, K. J., Loo, D. D. F., Bezanilla, F., Chandy, G., Hall, J. E. & Wright, E. M. (1995) *J. Membr. Biol.* **148**, 65–78.
- Zhou, H., Tate, S. S. & Palmer, L. G. (1994) *Am. J. Physiol.* **266**, C809–C824.
- Diamond, J. M. (1996) *Nature (London)* **384**, 611–612.
- Reuss, L. (1996) *J. Physiol. (London)* **497**, 1.
- Spring, K. R. (1999) *News Physiol. Sci.* **14**, 92–100.
- Panayotova-Heiermann, M., Loo, D. D. F. & Wright, E. M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 27099–27105.
- Zeuthen, T. & Klaerke, D. A. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 21631–21636.
- Baumgartner, W., Islas, L. & Sigworth, F. J. (1999) *Biophys. J.* **77**, 1980–1991.

Chapitre 3 : Résultats additionnels sur l'accumulation d' α MG et sur la perméabilité passive à l'eau de SGLT1

3.1 Détection de l'accumulation de α MG pendant le cotransport Na^+ /glucose

Il a été présenté dans le chapitre précédent que le gonflement accompagnant le cotransport Na^+ /glucose est le fruit de l'accumulation de solutés sous la membrane de l'ovocyte. Il serait fort intéressant de pouvoir détecter cette accumulation en utilisant une méthode indépendante. Une telle méthode est de mesurer en fonction du temps la variation du potentiel d'inversion de la courbe I-V du cotransport Na^+ /glucose.

Dans la présente série d'expériences, les courbes I-V sensibles à la phlorizine ont été mesurées en fonction du temps pendant le cotransport Na^+ /glucose. Étant donnée la stoechiométrie de 2 Na^+ par molécule de glucose, le potentiel d'inversion est donné par :

$$V_R = -\frac{RT}{2F} \ln \frac{[\alpha\text{MG}]_i [\text{Na}]_i^2}{[\alpha\text{MG}]_o [\text{Na}]_o^2} \quad (3.1)$$

où R, T et F ont leur valeur habituelle, $[\alpha\text{MG}]_o$ et $[\alpha\text{MG}]_i$ sont les concentrations de α MG extracellulaire et intracellulaire et $[\text{Na}^+]_o$ et $[\text{Na}^+]_i$ sont les concentrations de Na^+ extracellulaire et intracellulaire. En supposant que la concentration initiale $[\text{Na}^+]_i$ est de 10.4 mM (Weber *et al.*, 1999) et que la concentration intracellulaire de α MG est très faible au départ de l'expérience, alors le terme influençant davantage la variation de V_R

sera $[\alpha\text{MG}]_o$. Suite à l'addition de αMG , les variations de V_R en fonction du temps sont enregistrées (figure 3-1 insert). À partir de ces valeurs, $[\alpha\text{MG}]_i$ est calculé en supposant que le rapport stœchiométrique de 2 est respecté en tout temps pendant les changements de $[\alpha\text{MG}]_i$ et ceux de $[\text{Na}^+]$. À partir de ces résultats, $[\alpha\text{MG}]_i$ est calculé en fonction du temps pour les 8 expériences. La figure 3.1 présente la valeur moyenne de $[\alpha\text{MG}]_i$ en fonction du temps.

À la lumière de ces résultats, il est évident qu'une amplitude moyenne de courant de cotransport de $1,2 \pm 0,2 \mu\text{A}$ peut produire une accumulation de l'ordre de 8 mM en moins de 15 minutes. En additionnant l'accumulation simultanée du sodium (16 mM) et environ 1.5 osmolytes accumulés par cation transporté, plus de 30 mM sont attendus sous la membrane en moins de 15 minutes.

Ce résultat vient valider de façon indépendante les résultats déjà obtenus aux cours des expériences précédentes, appuyant l'hypothèse que des osmolytes sont accumulés sous la membrane à des concentrations suffisantes et à l'intérieur de délai raisonnables, permettant d'expliquer tous les phénomènes de gonflement observés.

3.2 Effet de la conformation de la protéine sur la perméabilité à l'eau

Dans un ovocyte exprimant SGLT1 à sa membrane, la phlorizine, en se liant au site du glucose, inhibe le cotransport Na^+ /glucose. De même, elle retourne la perméabilité à l'eau à son niveau endogène. Il semble donc y avoir une relation assez intime entre le chemin moléculaire utilisé par le glucose et celui utilisé par l'eau pour traverser le transporteur. En apparence contradiction avec cette hypothèse, la perméabilité à l'eau d'un ovocyte exprimant SGLT1 semble être indépendante de la

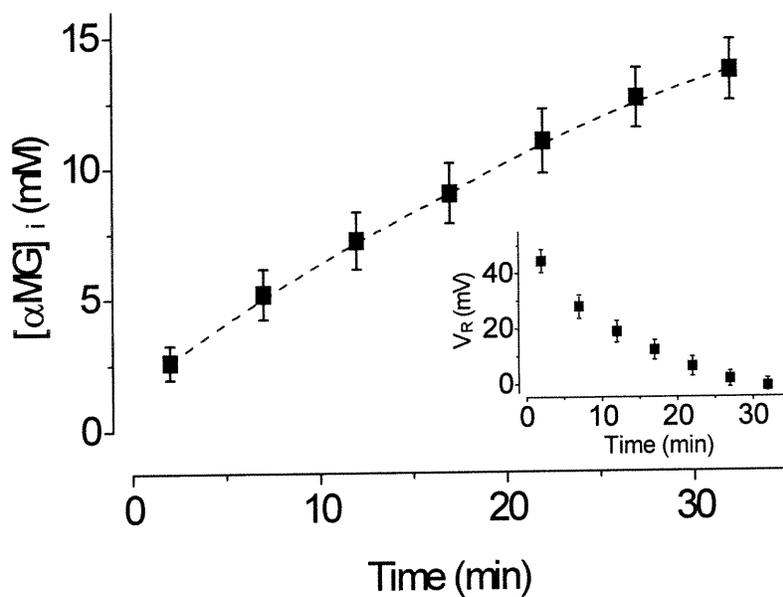


Figure 3.1 Détection de l'accumulation de αMG sous la membrane de l'ovocyte.

Calcul de la concentration de αMG à partir des potentiels d'inversion selon l'équation 3.1.

Insert. Potentiel d'inversion du courant de cotransport sensible à la phlorizine représenté en fonction du temps. Une concentration d' αMG de 5 mM est présente dans la solution.

présence de glucose (Loo *et al.*, 1996; Meinild *et al.*, 1998), ce qui favorise plutôt des voies séparées pour le glucose et l'eau. Afin de progresser dans l'étude de cette relation entre le transport de glucose et le transport d'eau, la question suivante a été posée : est-ce que les différentes conformations de la protéine impliquées dans les diverses étapes du mécanisme de cotransport influencent la perméabilité à l'eau associée à SGLT1? Afin de répondre à cette question, des études sur l'influence du potentiel membranaire et de la présence de sodium sur la perméabilité ont été effectuées.

3.2.2 Effet du potentiel membranaire sur la perméabilité à l'eau

Lorsque le potentiel membranaire est très négatif (~ 100 mV), le site de liaison de SGLT1 est attiré vers la face extérieure de la membrane. De plus, un fort potentiel négatif facilite l'accès du sodium à son site puisque celui-ci est situé quelque peu à l'intérieur du champ électrique membranaire.

En présence de 50 mM Na^+ et en absence de glucose, un potentiel membranaire de -100 mV est maintenu durant un choc hypotonique de 50 mOsm. Après 1 minute de gonflement, un potentiel membranaire de 0 mV est appliqué (figure 3.2). La perméabilité à l'eau calculée à partir de la pente de la relation volume vs temps (équation 2.1 et 2.2) est de $3,8 \pm 0,7$ cm s^{-1} à un potentiel de -100 mV alors qu'elle est de $4,6 \pm 1,5$ cm s^{-1} à 0 mV ($n = 3$). La moyenne des différences de perméabilité sur ces 3 paires de valeurs est de $0,8 \pm 0,8$ cm s^{-1} , ce qui n'est pas significativement différent de "0" ($p = 0,42$).

La constante d'affinité du Na^+ lors de mesure des courants de cotransport Na^+ /glucose avec une faible concentration de glucose est de 30 mM à -50 mV (Chen *et*

al., 1997). Par contre, lorsque la fuite de Na^+ est considérée (Na-leak), i.e. en absence de glucose (tel que dans les conditions expérimentales actuelles), la constante d'affinité du Na^+ chute à 5 mM (toujours à -50 mV). Puisque la concentration relativement élevée de sodium utilisée pourrait éventuellement permettre à celui-ci de se lier à son site peu importe les potentiels appliqués, l'expérience a été répétée pour des concentrations de sodium de 5 mM. Dans ces conditions, la perméabilité à l'eau calculée est de $4,5 \pm 0,5$ cm s^{-1} à un potentiel de -100 mV et de $4,0 \pm 0,2$ cm s^{-1} à 0 mV ($n = 2$). La moyenne des différences de perméabilité sur ces 2 expériences est de $0,4 \pm 0,7$ cm s^{-1} , ce qui est encore une fois tout à fait imperceptible sur la courbe.

De ces résultats, il peut être conclu que dans ces conditions expérimentales, le potentiel membranaire n'influence pas la perméabilité à l'eau de la protéine de façon significative.

3.2.3 Effet du sodium sur la perméabilité à l'eau

Il a précédemment été démontré que le potentiel membranaire n'influence pas la perméabilité à l'eau de la membrane ; qu'en est-il de l'effet de la présence de sodium elle-même ? Cette question avait déjà été posée par Loike *et al.* (Loike *et al.*, 1996) en mesurant l'effet d'un choc osmotique sur le volume d'un ovocyte exprimant SGLT1. En moyennant plusieurs expériences indépendantes sur une période expérimentale de gonflement de 30 minutes provoquant un gonflement de plus de 20% des ovocytes, ces auteurs avaient conclu qu'en absence de Na^+ , la perméabilité à l'eau diminuait au niveau des ovocytes non-injectés.

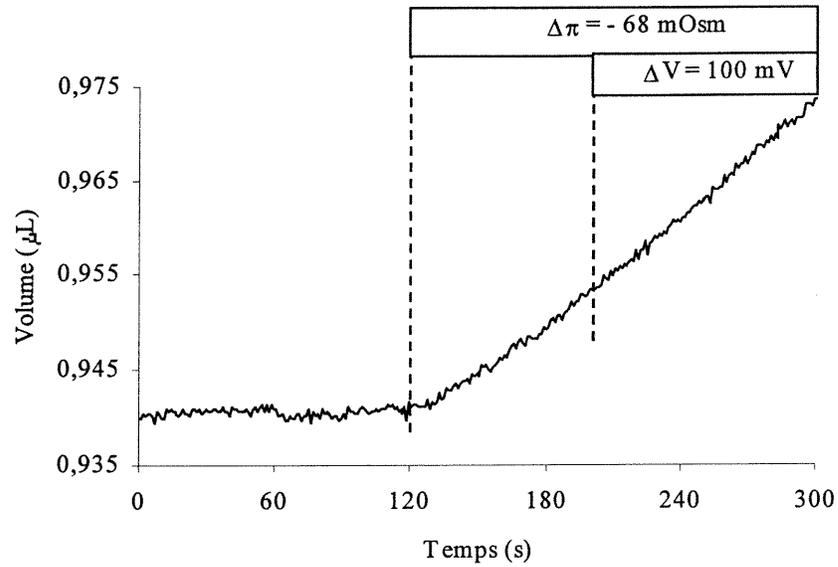


Figure 3.2 Effet du potentiel sur la perméabilité à l'eau de SGLT1

Le volume de l'ovocyte est exprimé en fonction du temps. À $t = 120 \text{ s}$, un choc hypotonique de 68 mOsm est imposé. Le potentiel membranaire, fixé initialement à -100 mV , est soudainement porté à 0 mV lorsque le flux d'eau est stabilisé. Aucun changement significatif dans le taux de gonflement n'est observé.

Afin de vérifier ce résultat, des expériences ont été réalisées de façon pairée en utilisant une période de temps beaucoup plus courte.

Un choc osmotique a été appliqué en présence de 50 mM sodium. Une minute après le début du choc, le sodium est complètement remplacé par le n-méthyl-D-glucamine. À partir des équations 2.1 et 2.2, la perméabilité à l'eau trouvée en présence de sodium est de $5,2 \pm 0,1 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ ($n = 2$) et celle sans sodium est de $5,6 \pm 0,4 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$. La moyenne des différences de perméabilité en présence ou en absence de Na^+ est $0,5 \pm 0,5 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$, ce qui semble négligeable.

La même expérience a été répétée avec une concentration de Na^+ de 5 mM, ce qui permet de retirer le Na^+ en produisant une perturbation beaucoup plus petite dans la composition de la solution. Une perméabilité à l'eau de $5,1 \pm 0,2 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ ($n = 2$) est trouvée en présence et en absence de sodium. Encore une fois, la différence de perméabilité de $0,015 \pm 0,005 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ semble négligeable.

De ces résultats, il peut être conclu que la perméabilité ne dépend ni de la concentration de sodium ni du potentiel membranaire. La conformation de SGLT1 n'influence donc pas la perméabilité à l'eau des ovocytes exprimant SGLT1.

Chapitre 4 : Discussion

Au fil des nombreux articles publiés par le groupe de recherche dirigé par le Dr Ernest Wright sur le sujet, on peut identifier 5 arguments majeurs en faveur de l'hypothèse du transport d'eau secondairement actif. Dans les pages qui suivent nous allons analyser l'implication de nos résultats expérimentaux quant à ces différents arguments.

Cependant, il sera tout d'abord discuté de quelques points techniques reliés à la mesure de volume des ovocytes.

4.1 Aspects techniques

4.1.1 Ovocytes

La mesure expérimentale permettant la détermination du volume V d'un ovocyte est sa coupe transversale de section A . On peut exprimer le volume tel que :

$$V = \sqrt{\frac{A^3}{36\pi}} \quad (4.1)$$

Cette équation est valide seulement en assumant que l'ovocyte est parfaitement sphérique et qu'il gonfle de façon uniforme. Au moment d'empaler l'ovocyte, il est important que l'ovocyte conserve le plus possible sa forme sphérique afin que cette hypothèse reste vérifiée. De plus, il est important de s'assurer que les électrodes ne

nuisent pas au gonflement de l'ovocyte, qui se mettrait alors à gonfler dans une direction plutôt qu'une autre. Finalement, étant donnée la grande sensibilité de notre mesure de volume, il est préférable d'utiliser des électrodes munies de coussins d'agar (Schreibmayer *et al.*, 1994) afin d'éviter l'écoulement de KCl 1M qui produirait alors un gonflement constant de l'ovocyte.

4.1.2 Éclairage, contraste

Étant donné la sensibilité à l'intensité lumineuse de la mesure de la surface de l'ovocyte, l'éclairage provenant de la source doit être uniforme et constant. Afin de s'assurer de cette uniformité, la source est immergée dans la solution au-dessus de l'ovocyte (figure 4.1). La lumière diffuse donc dans celle-ci et l'ovocyte reçoit un éclairage beaucoup plus égal de toutes les directions. De plus, le montage doit être correctement protégé de la lumière extérieure pour garder un éclairage toujours constant.

L'appareil de contrôle de la caméra permet de choisir le contraste et la luminosité auxquels seront analysées les images capturées. Ces paramètres influencent grandement la mesure de la surface en modifiant la définition des contours des images. Le montage doit être calibré à l'aide d'une surface connue pour ensuite ajuster le contraste et la luminosité. Par la suite, ces paramètres doivent être ajustés de façon à obtenir le même type de contour.

Le résultat en temps réel de la mesure de la surface est indispensable pour ajuster de façon adéquate la position de la zone d'analyse, le contraste et la luminosité (figure 4.2). De plus, le résultat en temps réel permet de constater au fur et à mesure les

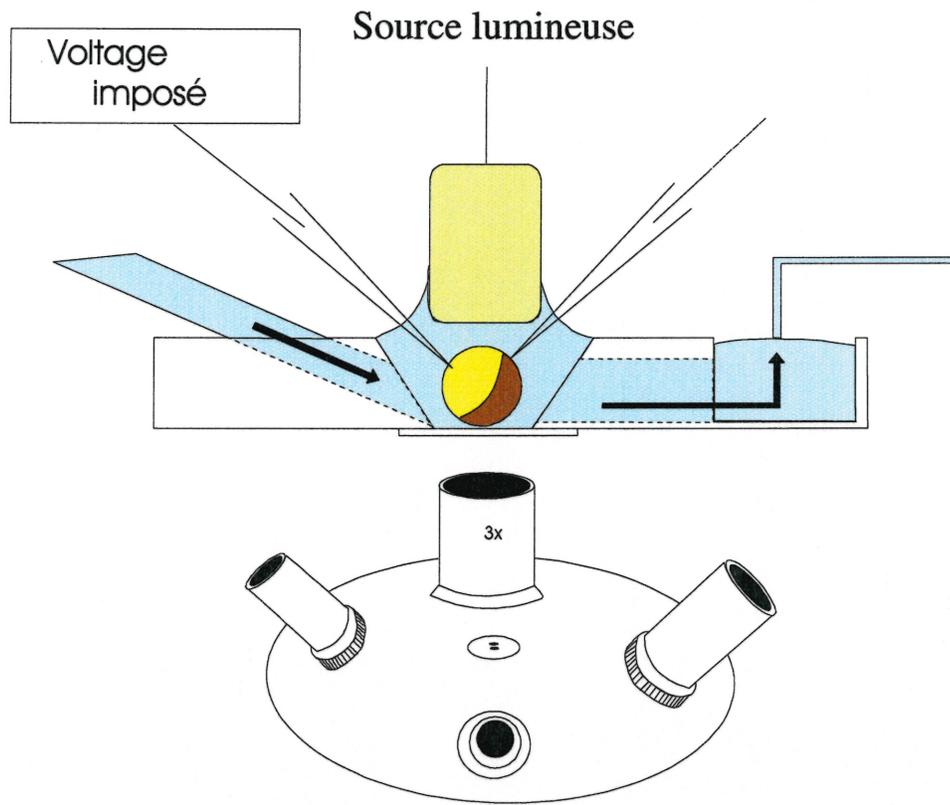


Figure 4.1 Schéma du montage expérimental

Afin d'assurer la constance de l'intensité lumineuse, la source est immergée dans la solution entourant l'ovocyte. La solution entre par le côté gauche du bain, passe par le bain contenant l'ovocyte, poursuit son chemin par un mince passage vers un second bain où elle est aspirée. Le flux entrant et le flux sortant doivent être égaux et constant pour assurer une mesure stable de la surface. L'image est grossie par un microscope inversé et elle est capturée par une caméra pour être envoyée à l'ordinateur.

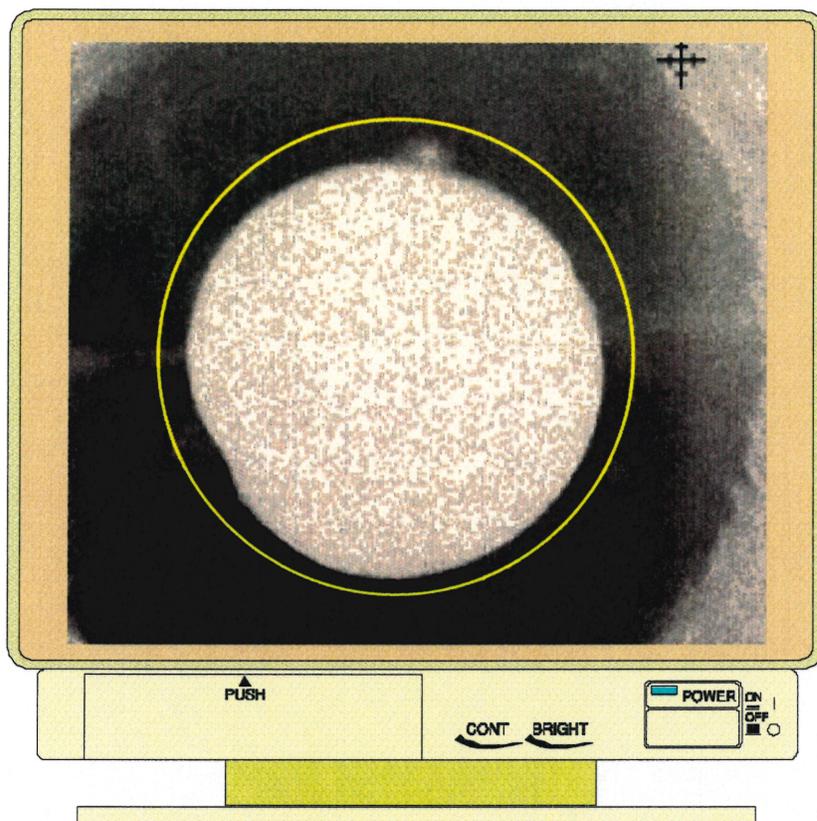


Figure 4.2 Image capturée par l'ordinateur

La surface mesurée est la somme des pixels blancs contenus à l'intérieur de la zone d'analyse (délimitée par le cercle jaune). Le contraste et la luminosité, pouvant être ajustés par l'appareil de contrôle de la caméra, influencent grandement la taille obtenue pour un ovocyte donné. Les électrodes peuvent être aperçues de chaque côté de l'ovocyte, mais elles n'entrent pas dans le calcul de la surface puisqu'elles sont trop foncées

artefacts qui sont susceptibles de produire des changements spontanés de surface au cours de l'expérimentation.

4.1.3 Acquisition des données

Dans nos conditions expérimentales, le bruit sur la mesure du volume est d'environ 0.05%. Les points pris successivement dans le temps ne semblent pas être corrélés de sorte qu'il est possible de diminuer le bruit en augmentant la fréquence d'acquisition et en faisant une moyenne pour un certain nombre de points lors de l'analyse. Avec la carte d'acquisition d'image utilisée, il est possible de prendre un maximum de 5 images par seconde tout en effectuant les calculs nécessaires à la visualisation en temps réel de la mesure. Il est à noter que le bruit ne provient pas du mouvement de l'ovocyte puisqu'un bruit comparable est enregistré lorsqu'une bille d'acier est mesurée au lieu de l'ovocyte. Tel qu'expliqué ci-après, la contribution de l'écoulement de la solution contribue aussi assez peu à l'amplitude du bruit enregistré. Celui-ci provient plutôt de l'erreur statistique du comptage des pixels lors de l'enregistrement de la surface.

4.1.4 Flux de la solution et espace mort

Un facteur déterminant dans la détection des variations de volume est la vitesse à laquelle le glucose et la phlorizine peuvent être ajoutés ou retirés de la solution dans laquelle baigne l'ovocyte. En effet, les mesures expérimentales doivent être réalisées sur des périodes de temps de quelques dizaines de secondes. Le temps nécessaire pour

rincer le bain doit donc être inférieur à ce temps. D'autre part, le contraste et la luminosité sont grandement affectés par les variations de hauteur dans la solution de bain; ces variations doivent donc être minimisées lors des expérimentations.

Afin de satisfaire ces critères, le volume de solution entourant l'ovocyte doit être minimum. D'autre part, l'espace entre le point de branchement des différentes solutions et du bain (espace mort) doit être minimum. Pour obtenir un volume de solution stable, les flux entrant et sortant du bain doivent être égaux et constants. De plus, afin de minimiser les effets de la succion (flux sortant du bain), celle-ci est effectuée à partir d'un deuxième bain relié au premier par un étroit passage.

4.2 Arguments "supportant" le transport secondairement actif

Plusieurs arguments ont été avancés pour soutenir l'hypothèse du transport secondairement actif d'eau. Au cours des différentes expériences réalisées lors de ce projet, les principaux arguments défendant cette hypothèse ont été réfutés et les autres écartés pour des raisons théoriques.

4.2.1 Flux d'eau associé à l'activité d'un cotransporteur par rapport à celle d'un canal

Contrairement aux transporteurs tel que SGLT1, le flux d'ions à travers un canal ne semble pas capable de produire un gonflement rapide (quasi-instantané). Certains y voient un argument en faveur de l'hypothèse d'un cotransport actif de l'eau par les cotransporteurs.

Selon les observations de la présente recherche, le gonflement dû à un courant cationique peut être détecté au cours des 20 à 50 secondes suivant la stimulation, ce qui peut sembler lent par rapport au gonflement observé avec SGLT1. Cependant, certains facteurs doivent être pris en compte lors de l'analyse de ces gonflements suivant la stimulation d'un flux ionique à travers un canal ou un ionophore.

Premièrement, l'expression de canaux ioniques à la membrane d'ovocytes ne modifie pas sa perméabilité à l'eau. En comparaison avec les ovocytes exprimant SGLT1, ceux-ci sont donc beaucoup moins sensibles à toute accumulation d'osmolytes.

Deuxièmement, le nombre d'osmolytes accumulés sous la membrane est différent dans le cas des canaux ioniques par rapport à celui des cotransporteurs. Le nombre d'osmolytes est calculé à partir du courant causé par le flux d'ions lors de l'activation de la protéine de transport. Alors qu'il est évident que le glucose cotransporté est un osmolyte qui, en s'accumulant sous la membrane, est capable d'attirer l'eau de façon efficace, le sort réservé aux cations est moins évident. Lorsque 2 ions Na^+ entrent dans l'ovocyte, l'électroneutralité est conservée grâce à l'électrode de courant qui retirera 2 charges positives de la cellule ou y injectera deux charges négatives. Si l'électrode (qui est remplie de KCl 1 M au début de l'expérience) injecte 2 ions Cl^- , on aura un total de 4 nouveaux osmolytes intracellulaires qui se distribueront autour de l'électrode et sous la membrane selon la mobilité des cations et des anions intracellulaires. Par contre, si c'est 2 ions K^+ intracellulaires qui sont retirés par l'électrode, il n'y a pas de gain net d'osmolytes. Le nombre d'osmolytes accompagnant chaque molécule de glucose sera donc compris entre 0 et 4 et seule une partie de ces osmolytes se retrouvent

immédiatement sous la membrane plasmique. Dans le cas d'un flux purement cationique, entre 0 et 2 osmolytes par cation transporté seront accumulés et, encore une fois, une fraction seulement sera initialement sous la membrane plasmique. Dans le cas d'un canal comme ROMK, il a été démontré dans cette recherche que chaque K^+ pénétrant dans l'ovocyte provoque l'accumulation de 1,7 osmolytes / cation (figure 2.4B).

L'accumulation d'osmolytes par l'activation du transport d'un ovocyte exprimant SGLT1 à sa membrane est donc plus rapide qu'un ovocyte exprimant un canal ionique, d'où la facilité à détecter plus rapidement un gonflement dans le premier cas.

4.2.2 Flux d'eau proportionnel au transport Na^+ /glucose et énergie d'activation

Cet argument, apporté dans l'article original de 1996 *Cotransport of water by the Na^+ /glucose cotransporter* (Loo *et al.*, 1996), n'est pas discriminant entre un modèle de transport secondairement actif d'eau et le modèle d'accumulation locale d'osmolytes. Dans les deux cas, le transport d'eau, à l'état stationnaire, sera proportionnel au transport de sucre. La même chose peut être dite de l'effet de la température sur le transport d'eau (Loo *et al.*, 1996; Meinild *et al.*, 1998). Dans les deux cas, on s'attend à ce qu'un changement de température affecte le cotransport Na^+ /glucose de la même façon que les phénomènes qui lui sont directement reliés.

Un argument légèrement différent est de dire que les changements temporels de cotransport Na^+ /glucose sont accompagnés instantanément par un changement de volume. Dans l'article daté de 1996 (Loo *et al.*, 1996), une expérience telle que celle illustrée à la figure 2.3 a été réalisée et montre que le gonflement suivant le cotransport

de glucose par SGLT1 est proportionnel au transport Na^+ /glucose. Cependant, les conditions dans lesquelles cette expérience a été réalisée étaient loin d'être idéales pour véritablement tester l'hypothèse du cotransport d'eau. En effet, le cotransport Na^+ /glucose s'effectuait à un potentiel membranaire de 0 mV depuis un temps inconnu et en présence d'une solution hypotonique (-15 mOsm). Il est donc difficile de distinguer la part de cotransport d'eau qui peut être accélérée par une hyperpolarisation de la part du transport passif qui est insensible à un changement de potentiel. Il est rapporté que l'augmentation subite du transport en imposant un potentiel membranaire de -100 mV a causé une accélération proportionnelle du gonflement. Cependant, l'ovocyte avait déjà accumulé une quantité significative d'osmolytes sous la membrane et le gonflement était déjà en phase d'accélération afin d'atteindre, à l'état stationnaire, un transport isosmotique d'eau et de solutés. Il est donc très difficile de distinguer la part de l'accélération qui provient de l'accumulation progressive d'osmolytes et la part qui provient de la quantité d'eau qui devrait suivre la quantité de glucose cotransportée.

D'autre part, une expérience beaucoup plus révélatrice serait de suivre les mêmes étapes mais à l'inverse: un fort transport accompagné d'un gonflement est initialement provoqué en maintenant le potentiel membranaire à -100 mV et est subitement arrêté. Tandis que le courant est réduit de 94 %, le gonflement ne subit un ralentissement que de 25% (Figure 2.6). Dans ce cas, contrairement au modèle de transport selon le gradient osmotique, le modèle de cotransport secondairement actif d'eau (qui prévoit un arrêt immédiat du gonflement) n'arrive pas à expliquer le faible ralentissement observé du gonflement.

4.2.3 Aucun délai entre le flux d'eau et l'apparition du courant

Intuitivement, la présence ou l'absence de délai entre le courant de cotransport et le gonflement pourrait apparaître pour certains comme un critère direct permettant d'établir si le transport secondairement actif existe bel et bien. Cependant, quoiqu'il soit clair qu'aucun délai n'existe dans l'hypothèse du cotransport d'eau, il en est de même pour le modèle d'accumulation d'osmolytes. La figure 2.3 montre bien qu'aucun délai n'est attendu pour chacun des modèles. Dès le premier instant de l'activation du cotransport, des osmolytes sont accumulés sous la membrane et le gonflement commence. Le délai nécessaire pour observer ce gonflement dépend simplement du rapport de l'amplitude du bruit sur l'amplitude du signal. En effet, la mesure du temps de délai correspond, en pratique, au temps nécessaire pour obtenir une augmentation de volume significative par rapport au niveau de bruit. La présence d'un niveau de bruit non négligeable fait en sorte qu'il existe toujours un délai entre la stimulation du courant et le temps où on peut détecter un changement de volume. D'autre part, dans une communication personnelle, Zeuthen admet mesurer les délais en extrapolant la pente initiale mesurée dans la première minute de gonflement vers $t = 0$. Il arrive avec cette méthode que des délais négatifs soient observés; l'absence de délai n'est donc pas un critère assez discriminant et assez précis pour permettre de distinguer entre les deux hypothèses proposées.

4.2.4 Flux contre gradient

Plusieurs articles ont proposé que l'eau peut traverser la membrane plasmique contre son gradient osmotique lorsque la protéine de transport exprimée à la membrane

est activée. Ces expériences ont été réalisées en augmentant subitement l'osmolarité tout en ajoutant du glucose dans la solution entourant un ovocyte qui contient SGLT1 à sa membrane. Il a été observé que l'activation du cotransport pouvait compenser complètement l'effet d'un choc hypertonique fait simultanément. Le flux sortant causé par le choc osmotique était donc exactement compensé par le flux d'eau cotransporté par la protéine active. En réalité, cette expérience peut être interprétée d'une toute autre façon.

Le flux d'eau suit le gradient osmotique, mais celui-ci est modifié par la présence d'une accumulation d'osmolytes lors de l'activation du transporteur. Les différents gradients osmotiques, par exemple celui causé par un choc osmotique et celui causé par l'accumulation d'osmolytes, sont simplement additifs. Il y a donc un flux d'eau causé par le choc osmotique, provoquant une diminution du volume de la cellule, et un flux causé par l'accumulation d'osmolytes sous la membrane, provoquant une augmentation du volume. Le flux net observé expérimentalement est la somme des flux précédents. Un ovocyte se trouvant dans un milieu hypertonique peut donc gonfler lorsque l'accumulation d'osmolytes sous la membrane crée une concentration locale qui s'oppose et finit par dominer le sens du gradient osmotique. En arrêtant le transport, les osmolytes sous la membrane diffusent vers le centre de l'ovocyte et le sens du gradient revient graduellement selon la concentration de la solution extérieure. Tel que montré à la figure 2.6, le modèle de diffusion intracellulaire reproduit parfaitement cette condition.

En conclusion, il est évident que la simple observation d'un flux d'eau entrant associé au cotransport Na/glucose en présence d'un milieu hypertonique n'est pas un critère acceptable pour supporter la présence de cotransport d'eau.

Chapitre 5 : Conclusions et perspectives

Au cours des expériences précédentes, il a été démontré que le flux d'eau passant par le cotransporteur SGLT1 est essentiellement passif, étant gouverné par le gradient osmotique de part et d'autre de la membrane. Cependant, certaines différences ont été observées entre les cellules exprimant SGLT1 et celles exprimant ROMK2. Dans ce mémoire, l'explication théorique de ce phénomène a été trouvée. La prochaine étape déterminante sera de vérifier ces arguments au niveau expérimental en déterminant avec précision le devenir des ions transportés à travers la membrane de l'ovocyte et ceux injectés par l'électrode de courant. À cet égard, il serait très intéressant de comparer le gonflement produit par trois types de protéines membranaires de transport: un canal ionique, un cotransporteur et un transporteur facilité. Par exemple, on pourrait utiliser ROMK2, SGLT1 et le transporteur facilité de glucose GLUT. Les mesures obtenues avec GLUT nous renseigneraient sur les effets de l'accumulation d'un soluté neutre alors que celles réalisées avec ROMK2 nous donneraient les effets de l'accumulation d'ions. Le but de l'exercice permettrait de prévoir le gonflement mesuré avec SGLT1 à partir des gonflements mesurés avec ROMK2 et avec GLUT seuls.

Si les flux d'eau entraînés par l'activation du cotransport Na/glucose peuvent être quantitativement expliqués par les paramètres obtenus des transporteurs ioniques et des

transporteurs facilités, la possibilité d'un transport d'eau secondairement actif devra être définitivement abandonnée.

Bibliographie

- Agre, P., Saboori A.M. et Asimos, A. (1987)** Purification and partial characterization of the M_r 30,000 integral membrane protein associated with the erythrocyte Rh(D) antigen. *J. Biol. Chem.* **262** : 17497-17503.
- Agre P, Preston GM, Smith BL, Jung JS, Raina S, Moon C, Guggino WB, Nielsen S. (1993)** Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. *Am. J. Physiol.* **265** : F463-F476.
- Baumgartner W, Islas L, Sigworth FJ. (1999)** Two-microelectrode voltage clamp of *Xenopus* oocytes: voltage errors and compensation for local current flow. *Biophys. J.* **77** : 1980-1991.
- Bissonnette P., Noël J., Coady M.J., Lapointe, J.Y. (1999)** Functional expression of tagged human Na^+ -glucose cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Physiol. London.* **520** : 359-371
- Boim MA, Ho K., Shuck ME, Bienkowski MJ, Block JH, Slightom JL, Yang Y, Brenner BM, Hebert SC. (1995)** ROMK inwardly rectifying ATP-sensitive K^+ channel. II. Cloning and distribution of alternative forms. *Am. J. Physiol.* **268** : F1132-F1140.
- Borgnia, M., Nielson, S., Engel, A. et Agre, P. (1999)** Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annu. Rev. Biochem.* **68** : 425-458.
- Chen, X.Z., Coady, M., Jackson, F., Berteloot, A. et Lapointe, J.Y. (1995)** Thermodynamic determination of the Na^+ : glucose coupling ratio for the human SGLT1 cotransporter. *Biophys. J.* **69** : 2405-14.

- Chen, X.Z., Coady, M. et Lapointe, J.Y. (1996)** Fast voltage clamp discloses a new component of presteady-state currents from the Na⁺-glucose cotransporter. *Biophys. J.* **71** : 2544-2552.
- Chen, X.Z., Coady, M., Jalal, F., Wallendorff, B. et Lapointe, J.Y. (1997)** Sodium leak pathway and substrate binding order in the Na⁺-glucose cotransporter. *Biophys. J.* **73** : 2503-2510.
- Coady MJ, Jalal F., Chen X, Lemay G, Berteloot A, Lapointe J.Y. (1994)** Electrogenic amino acid exchange via the rBAT transporter. *FEBS Lett.* **356** : 174-178.
- Collander, R. et Bärlund, H. (1933)** Permeabilitätsstudien an Chara ceratophylla: II. Die Permeabilität für Nichteletrolyte. *Acta Bot. Fenn.* **11** : 1-114.
- Denker, B.M., Smith, B.L. et Kuhajda, F.P. (1988)** Identification, purification, and partial characterization of a novel M_r 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *J. Biol. Chem.* **263** : 15634-15642.
- Diamond, J.M. (1996)** Wet transport proteins. *Nature* **384** : 611-612.
- Diamond JM, Bossert W.H. (1967)** Standing-gradient osmotic flow. A mechanism for coupling of water and solute transport in epithelia. *J. Gen. Physiol.* **50** : 2061-2083.
- Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T. et MacKinnon, R. (1998)** The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280** : 69-77.

- Duquette, P.P., Bissonnette, P. et Lapointe, J.Y. (2001)** Local Osmotic gradients drive the water flux associated with Na⁺/glucose cotransport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** : 3796-3801
- Ecelbarger, C.A., Terris, J. et Frindt, G. (1995)** Aquaporin-3 water channel localization and regulation in rat kidney. *Am. J. Physiol.* **269** : F663-F672.
- Echevarria, M., Windhager, E.E. et Tate, S.S. (1994)** Cloning and expression of AQP3, a water channel from the medullary collecting duct of rat kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** : 10997-11001
- Einstein, A. (1956)** *Investigation on the Theory of the Brownian Movement*. Dover, New York. pp. 76-89.
- Eskandari, S., Wright, E.M., Kreman, M., Starace, D.M., et Zampighi, G.A. (1998)** Structural analysis of cloned plasma membrane proteins by freeze-fracture electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** : 11235-11240
- Falk, S., Guay, A., Chenu, C., Patil, S.D. et Berteloot, A. (1998)** Reduction of an eight-state mechanism of cotransport to a six-state model using a new computer program. *Biophys. J.* **74** : 816-830.
- Finkelstein, A. (1987)** *Water Movement Through Lipid Bilayers, Pores, and Plasma Membranes : Theory and Reality*. pp. 91-149, New York, John Wiley & Sons.
- Fischbarg, J., Kuang, K., Vera, C., Arant, S., Silverstein, S.C., Loike, J. et Rosen, O.M. (1990)** Glucose transporters serve as water channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** : 3244-3247.

- Fischbarg, J., Kuang, K., Li, J., Arant, S., Vera, S., Silverstein, S.C. et Loike, J. (1993)** Facilitative and sodium dependent glucose transporters behave as water channels. In: *Water Transport in Leaky Epithelia* (H.H. Ussing, J. Fischbarg, E. Sten Knudsen, E. Hviid Larsen, and N.J. Willumsen, Eds) Copenhagen: Munksgaard, pp. 432-446.
- Frigeri, A., Gropper, M.A. et Umeneishi, F. (1995)** Localization of MIWC and GLIP water channel homologs in neuromuscular, epithelial and glandular tissues. *J. Cell. Sci.* **108** : 2993-3002.
- Fushimi, K., Uchida, S. et Hara, Y. (1993)** Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* **361** : 549-552.
- Hediger, M.A., Coady, M., Ikeda, T.S. et Wright, E.M. (1987)** Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter. *Nature* **330** : 379-381.
- Ishibashi, K., Sasaki, S. et Fushimi, K. (1994)** Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. *Proc. Acad. Sci. USA* **91** : 6269-6273.
- Jung, J.S., Preston, G.M. et Smith, B.L. (1994)** Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP : The hourglass model. *J. Biol. Chem.* **269** : 14648-14654.
- Lin J, Kormanec J, Homerova D et Kinne RK. (1999)** Probing transmembrane topology of the high-affinity Sodium/Glucose cotransporter (SGLT1) with histidine-tagged mutants. *J Membr Biol.* **170** : 243-252.

- Lo, B. et Silverman, M. (1998)** Cysteine scanning mutagenesis of the segment between putative transmembrane helices IV and V of the high affinity Na⁺/glucose cotransporter SGLT1. *J. Bio. Chem.* **273** : 29341-29351.
- Loike, J.D., Cao, L., Kuang, K., Vera, J.C., Silverstein, S.C. et Fischbarg, J. (1993)** Role of facilitative glucose transporters in diffusional water permeability. *J. Gen. Physiol.* **102** : 897-906.
- Loike, J.D., Hickman, S., Kuang, K., Xu, M., Cao, L., Vera, J.C., Silverstein, S.C. et Fischbarg, J. (1996)** Sodium-glucose cotransporters display sodium- and phlorizin-dependent water permeability. *Am. J. Physiol.* **271** : C1774-C1779.
- Loo, D.D., Zeuthen, T., Chandy, G., Wright, E.M. (1996)** Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **12** : 13367-13370.
- Loo, D.D., Hirayama, B., Gallardo, E.M., Lam, J.T., Turk, E. et Wright, E.M. (1998)** Conformational changes couple Na⁺ and glucose transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **23** : 7789-7794.
- Loo, D.D., Hirayama, B., Meinild, A.K., Chandy, G., Zeuthen, T. et Wright, E.M. (1999)** Passive water and ion transport by cotransporters. *J. Physiol. (Lond)* **518** : 195-202.
- Ma, T., Frigeri, A. et Hasegawa, H. (1994)** Cloning of a water channel homolog expressed in brain meningeal cells and kidney collecting duct that functions as a stilbene-sensitive glycerol transporter. *J. Biol. Chem.* **269** : 21845-21849.
- Mackenzie, B., Loo, D. et Wright, E.M. (1998)** Relationships between Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) currents and fluxes. *J. Membr. Biol.* **15** : 101-106.

- Markovich D, Forgo J, Stange G, Biber J et Murer H. (1993)** Expression cloning of rat renal $\text{Na}^+/\text{SO}_4^{2-}$ cotransport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **90** : 8073-8077.
- Meinild, A., Klaerke, D., Loo, D.D., Wright, E.M. et Zeuthen, T. (1998)** The human Na^+ -glucose cotransporter is a molecular water pump. *J. Physiol. (Lond)* **508** : 15-21.
- Meinild, A., Klaerke, D.A. et Zeuthen, T (1998)** Bidirectional water fluxes and specificity for small hydrophilic molecules in aquaporins 0-5. *J. Biol. Chem.* **273** : 32446-32451.
- Nagelhus, E.A., Veruki, M.L. et Torp, R. (1998)** Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: Polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes. *J. Neurosci.* **18** : 2506-2519.
- Neilsen, S., Chou, C.L. et Marples, D. (1995)** Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** : 1013-1017.
- Orbach, E. et Finkelstein, A. (1980)** The nonelectrolyte permeability of planar lipid bilayer membranes. *J. Gen. Physiol.* **75** : 427-436.
- Overton, E. (1902)** Beitrage zur allgemeinen Muskel und Nerven Physiologie. *Pfluegers Arch.* **92** : 115-280.
- Panayotova-Heiermann M, Loo DDF, Wright EM. (1995)** Kinetics of steady-state currents and charge movements associated with the rat Na^+ /glucose cotransporter. *J. Biol. Chem.* **270** : 27099-27105.

- Parent, L., Supplisson, S., Loo, D.D. et Wright, E.M. (1992)** Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter: II. A transport model under nonrapid equilibrium conditions. *J. Membr. Biol.* **125** : 63-79. Published erratum appears in *J. Membr. Biol.* **130** : 203.
- Peerce, B.E. et Wright, E.M. (1984)** Conformational changes in the intestinal brush border sodium-glucose cotransporter labeled with fluorescein isothiocyanate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** : 2223-2226.
- Preston, G.M., Carroll, T.P. et Guggino, W.B. (1992)** Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* **256** : 385-387.
- Preston, G.M., Jung, J.S. et Guggino, W.B. (1994)** Membrane topology of aquaporin CHIP: Analysis of functional epitope-scanning mutants by vectorial proteolysis. *J. Biol. Chem.* **269** : 1668-1673.
- Reuss L. (1996)** Active water transport? *J. Physiol. (Lond)*. **497** : 1.
- Radian, R., Bendahan, A. et Kanner, B.I. (1986)** Purification and identification of the functional sodium- and chloride-coupled gamma-aminobutyric acid transport glycoprotein from rat brain. *J. Biol. Chem.* **25** : 15437-15441.
- Schreibmayer W, Lester H.A.L., Dascal N. (1994)** Voltage clamping of *Xenopus laevis* oocytes utilizing agarose-cushion electrodes. *Pflugers Arch.* **426**: 453-458.
- Spring, K.R. (1999)** Epithelial Fluid Transport-A Century of Investigation *News Physiol. Sci.* **14** : 92-100.

- Terris, J., Ecelbarger, C.A. et Marples, D. (1995)** Distribution of aquaporin-4 water channel expression within rat kidney. *Am. J. Physiol.* **269** : F775-F785.
- Turk, E. et Wright, E.M. (1997)** Membrane topology in the SGLT cotransporter family. *J. Bio. Chem.* **271** : 1925-1934.
- Umbach, J.A., Coady, M. et Wright, E.M. (1990)** Intestinal Na⁺/glucose cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes is electrogenic. *Biophys. J.* **57** : 1217-1224.
- Verkman, A.S. et Mitra, A.K. (2000)** Structure and function of aquaporin water channels. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **278** : F13-F28.
- Wall DA, Patel S. (1989)** Isolation of plasma membrane complexes from *Xenopus* oocytes. *J. Membr. Biol.* **107** : 189-201.
- Walter, A. et Gutknecht, J. (1984)** Monocarboxylic acid permeation through lipid bilayer membranes. *J. Membrane biol.* **77** : 255-264.
- Werner A, Moore ML, Mantei N, Biber J, Semenza G et Murer H. (1991)** Cloning and expression of cDNA for a Na/Pi cotransport system of kidney cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **88** : 9608-9612.
- Wright, E.M. et Peerce, B.E. (1984)** Identification and conformational changes of the intestinal proline carrier. *J. Biol. Chem.* **25** : 14993-14996.
- Wright, E.M., Loo, D., Panayotova-Heiermann, M. et Boorer, K.J. (1994)** Mechanisms of Na⁺-glucose cotransport. *Biochem. Soc. Trans.* **22** : 646-650.
- Wright, E.M., Loo, D., Panayotova-Heiermann, M., Hirayama, B.A., Turk, E., Eskandari, S. et Lam, J.T. (1998)** Structure and function of the Na⁺/glucose cotransporter. *Acta Physiol. Scand.* **643** : 257-264.

- Zampighi, G.A., Kreman, M., Boorer, K.J., Loo, D., Bezanilla, F., Chandy, G., Hall, J.E. et Wright, E.M. (1995)** A method for determining the unitary functional capacity of cloned channels and transporters expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Membrane Biol.* **148** : 65-78.
- Zeuthen T, Klaerke DA. (1999)** Transport of water and glycerol in aquaporin 3 is gated by H⁺. *J. Biol. Chem.* **274** : 21631-21636.
- Zeuthen, T., Meinild, A., Klaerke, D.A., Loo, D.D., Wright, E.M., Belhage, B. et Litman, T. (1997)** Water transport by the Na⁺/glucose cotransporter under isotonic conditions. *Biol. Cell.* **89** : 307-312.
- Zhou H, Tate SS, Palmer LG. (1994)** Primary structure and functional properties of an epithelial K channel. *Am J. Physiol.* **266** : C809-C824.