



Université de Montréal

**Étude fonctionnelle du cotransporteur  $\text{Na}^+$ /glucose  
(hSGLT1) : courant de fuite, vitesse de cotransport  
et modélisation cinétique**

par

Jean-Philippe Longpré

Département de physique

Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de doctorat

en physique

option biophysique et physiologie moléculaire

Mai 2012

© Jean-Philippe Longpré, 2012

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Étude fonctionnelle du cotransporteur Na<sup>+</sup>/glucose  
(hSGLT1) : courant de fuite, vitesse de cotransport  
et modélisation cinétique**

Présentée par :

Jean-Philippe Longpré

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Rikard Blunck, président-rapporteur

Jean-Yves Lapointe, directeur de recherche

Rémy Sauvé, membre du jury

Melvin Silverman, examinateur externe

Karen C. Waldron, représentante du doyen de la FES

## Résumé

Les résultats présentés dans cette thèse précisent certains aspects de la fonction du cotransporteur  $\text{Na}^+$ /glucose (SGLT1), une protéine transmembranaire qui utilise le gradient électrochimique favorable des ions  $\text{Na}^+$  afin d'accumuler le glucose à l'intérieur des cellules épithéliales de l'intestin grêle et du rein.

Nous avons tout d'abord utilisé l'électrophysiologie à deux microélectrodes sur des ovocytes de xénope afin d'identifier les ions qui constituaient le courant de fuite de SGLT1, un courant mesuré en absence de glucose qui est découplé de la stœchiométrie stricte de 2  $\text{Na}^+$ /1 glucose caractérisant le cotransport. Nos résultats ont démontré que des cations comme le  $\text{Li}^+$ , le  $\text{K}^+$  et le  $\text{Cs}^+$ , qui n'interagissent que faiblement avec les sites de liaison de SGLT1 et ne permettent pas les conformations engendrées par la liaison du  $\text{Na}^+$ , pouvaient néanmoins générer un courant de fuite d'amplitude comparable à celui mesuré en présence de  $\text{Na}^+$ . Ceci suggère que le courant de fuite traverse SGLT1 en utilisant une voie de perméation différente de celle définie par les changements de conformation propres au cotransport  $\text{Na}^+$ /glucose, possiblement similaire à celle empruntée par la perméabilité à l'eau passive. Dans un deuxième temps, nous avons cherché à estimer la vitesse des cycles de cotransport de SGLT1 à l'aide de la technique de la trappe ionique, selon laquelle le large bout d'une électrode sélective ( $\sim 100 \mu\text{m}$ ) est pressé contre la membrane plasmique d'un ovocyte et circonscrit ainsi un petit volume de solution extracellulaire que l'on nomme la trappe. Les variations de concentration ionique se produisant dans la trappe en conséquence de l'activité de SGLT1 nous ont permis de déduire que le cotransport  $\text{Na}^+$ /glucose s'effectuait à un rythme d'environ  $13 \text{ s}^{-1}$  lorsque le potentiel membranaire était fixé à  $-155 \text{ mV}$ . Suite à cela, nous nous sommes intéressés au développement d'un modèle cinétique de SGLT1. En se servant de l'algorithme du recuit simulé, nous avons construit un schéma cinétique à 7 états reproduisant de façon précise les courants du cotransporteur en fonction du  $\text{Na}^+$  et du glucose extracellulaire. Notre modèle prédit qu'en présence d'une concentration saturante de glucose, la réorientation dans la membrane de SGLT1 suivant le relâchement intracellulaire de ses substrats est l'étape qui limite la vitesse de cotransport.

**Mots-clés** : cotransporteur Na<sup>+</sup>/glucose (SGLT1), électrophysiologie, électrode sélective, volumétrie, modélisation cinétique, recuit simulé, ovocyte de *Xenopus laevis*.

## Abstract

The results presented in this thesis clarify certain functional aspects of the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter (SGLT1), a membrane protein which uses the downhill electrochemical gradient of Na<sup>+</sup> ions to drive the accumulation of glucose in epithelial cells of the small intestine and the kidney.

We first used two microelectrodes electrophysiology on *Xenopus* oocytes to identify the ionic species mediating the leak current of SGLT1, a current measured in the absence of glucose that is uncoupled from the strict 2 Na<sup>+</sup>/1 glucose stoichiometry characterising cotransport. Our results showed that cations such as Li<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Cs<sup>+</sup>, which interact weakly with SGLT1 binding sites and are unable to generate the conformational changes that are triggered by Na<sup>+</sup> binding, were however able to generate leak currents similar in amplitude to the one measured in the presence of Na<sup>+</sup>. This suggests that the leak current permeating through SGLT1 does so using a pathway that differs from the conformational changes associated with Na<sup>+</sup>/glucose cotransport. Moreover, it was found that the cationic leak and the passive water permeability could share a common pathway. We then sought to estimate the turnover rate of SGLT1 using the ion-trap technique, where a large tip ion-selective electrode (~100 μm) is pushed against the oocyte plasma membrane, thus enclosing a small volume of extracellular solution referred to as the trap. The variations in ionic concentration occurring in the trap as a consequence of SGLT1 activity made it possible to assess that the turnover rate of Na<sup>+</sup>/glucose cotransport was 13 s<sup>-1</sup> when the membrane potential was clamped to -155 mV. As a last project, we focused our interest on the development of a kinetic model for SGLT1. Taking advantage of the simulated annealing algorithm, we constructed a 7-state kinetic scheme whose predictions accurately reproduced the currents of the cotransporter as a function of extracellular Na<sup>+</sup> and glucose. According to our model, the rate limiting step of cotransport under a saturating glucose concentration is the reorientation of the empty carrier that follows the intracellular release of substrates.

**Keywords** : Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter (SGLT1), electrophysiology, ion-selective electrode, volumetry, kinetic modelling, simulated annealing, *Xenopus laevis* oocyte.

## Table des matières

|  |     |
|--|-----|
| Résumé.....  | i   |
| Abstract.....  | iii |
| Table des matières.....                                  | v   |
| Liste des tableaux.....                                  | x   |
| Liste des figures.....                                   | xi  |
| Liste des abréviations.....                              | xiv |
| 1 Introduction.....                                      | 1   |
| 1.1 Structures cristallographiques et accès alterné..... | 3   |
| 1.1.1 LeuT.....  | 3   |
| 1.1.2 Mhp1.....  | 7   |
| 1.1.3 BetP.....  | 11  |
| 1.1.4 vSGLT.....   | 15  |
| 1.1.5 CaiT, ApcT et AdiC.....                            | 20  |
| 1.1.6 Mécanismes de cotransport et discussion.....       | 22  |
| 1.2 Cinétique de SGLT1.....                              | 24  |
| 1.2.1 Courants transitoires.....                         | 25  |
| 1.2.2 Modélisation cinétique.....                        | 30  |
| 1.2.3 Fréquence des cycles de cotransport.....           | 38  |
| 1.2.4 Perméabilité à l'eau.....                          | 40  |
| 1.3 Courants de fuites chez les cotransporteurs.....     | 42  |
| 1.3.1 Famille SLC5.....                                  | 43  |
| 1.3.1.1 NIS.....   | 43  |
| 1.3.1.2 SMIT2.....                                       | 43  |
| 1.3.1.3 SMCT1.....                                       | 44  |
| 1.3.1.4 SGLT1.....                                       | 44  |
| 1.3.2 Famille SLC6.....                                  | 45  |
| 1.3.2.1 GAT1.....  | 45  |



|         |  |    |
|---------|--|----|
| 1.3.2.2 | GAT3, GAT4 .....   | 46 |
| 1.3.2.3 | SERT .....   | 47 |
| 1.3.3   | Famille SLC1 : exemple de Glt <sub>ph</sub> .....  | 47 |
| 1.3.4   | Famille SLC34 : exemple du cotransport Na <sup>+</sup> /phosphate .....                                    | 48 |
| 1.4     | Physiologie de la famille SLC5 .....   | 49 |
| 1.4.1   | SGLT1 .....  | 51 |
| 1.4.2   | SGLT2 .....  | 52 |
| 1.4.3   | SGLT3 .....  | 54 |
| 1.4.4   | SGLT4 et SGLT5 .....   | 55 |
| 1.5     | Justification de la démarche et des objectifs de la thèse .....  | 55 |
| 1.5.1   | Courant de fuite .....   | 55 |
| 1.5.2   | Détermination du TOR de SGLT1 .....  | 56 |
| 1.5.3   | Modélisation cinétique de SGLT1 et recuit simulé .....   | 57 |
| 2       | Méthodologies .....  | 59 |
| 2.1     | Ovocytes de xénope .....   | 59 |
| 2.2     | Électrophysiologie à deux microélectrodes .....  | 59 |
| 2.3     | Technique de la trappe ionique (ITT) .....   | 60 |
| 2.4     | Volumétrie .....   | 61 |
| 2.5     | Immuno-colorimétrie .....  | 63 |
| 2.6     | Modélisation cinétique .....   | 64 |
| 2.6.1   | Théorie de Eyring et simulation de l'activité électrogénique .....   | 64 |
| 2.6.2   | Recuit simulé .....  | 66 |
| 3       | The actual ionic nature of the leak current through the Na <sup>+</sup> /glucose cotransporter SGLT1 ..... | 69 |
| 3.1     | Contribution personnelle .....   | 69 |
| 3.2     | Résumé .....   | 69 |
| 3.3     | Abstract .....   | 70 |
| 3.4     | Introduction .....   | 71 |
| 3.5     | Materials and Methods .....  | 73 |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 3.5.1 | Oocyte preparation and injection .....   | 73  |
| 3.5.2 | Molecular biology .....  | 73  |
| 3.5.3 | Electrophysiology .....  | 73  |
| 3.5.4 | Volume measurements .....  | 74  |
| 3.5.5 | Immunocolorimetric detection of SGLT1 plasma membrane expression .....   | 75  |
| 3.5.6 | Statistics .....   | 76  |
| 3.6   | Results .....  | 76  |
| 3.7   | Discussion .....   | 86  |
| 3.7.1 | The leak through the C292A mutant .....  | 87  |
| 3.7.2 | The leak through the wt SGLT1 .....  | 88  |
| 3.7.3 | The leak current and the cotransporter water permeability share a common pathway .....                               | 89  |
| 3.8   | Conclusion .....   | 90  |
| 3.9   | Acknowledgements .....   | 90  |
| 3.10  | References .....   | 90  |
| 4     | Determination of the Na <sup>+</sup> /glucose cotransporter (SGLT1) turnover rate using the ion-trap technique ..... | 96  |
| 4.1   | Contribution personnelle .....   | 96  |
| 4.2   | Résumé .....   | 96  |
| 4.3   | Abstract .....   | 97  |
| 4.4   | Introduction .....   | 98  |
| 4.5   | Materials and Methods .....  | 100 |
| 4.5.1 | Oocyte preparation and injection .....   | 100 |
| 4.5.2 | Solutions .....  | 100 |
| 4.5.3 | Electrophysiology and the ion-trap technique .....   | 101 |
| 4.5.4 | Estimating the cotransporter TOR using ITT .....   | 103 |
| 4.5.5 | Statistics .....   | 106 |
| 4.6   | Results .....  | 106 |
| 4.7   | Discussion .....   | 113 |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 4.8   | Conclusion .....  | 117 |
| 4.9   | Acknowledgments.....  | 117 |
| 4.10  | References.....   | 117 |
| 5     | Simulated annealing reveals the kinetic activity of SGLT1, a member of the LeuT structural family ..... | 121 |
| 5.1   | Contribution personnelle.....   | 121 |
| 5.2   | Résumé.....   | 121 |
| 5.3   | Abstract.....   | 122 |
| 5.4   | Introduction.....   | 123 |
| 5.5   | Materials and Methods.....  | 126 |
| 5.5.1 | Oocyte preparation and injection .....  | 126 |
| 5.5.2 | Solutions.....  | 127 |
| 5.5.3 | Electrophysiology .....   | 127 |
| 5.5.4 | Kinetic modelling of SGLT1 through the direct fitting approach.....                                     | 128 |
| 5.5.5 | A Simulated Annealing algorithm .....   | 130 |
| 5.5.6 | Statistics .....  | 133 |
| 5.5.7 | Online Supplemental Material .....  | 133 |
| 5.6   | Results.....  | 133 |
| 5.7   | Discussion .....  | 141 |
| 5.7.1 | Model structure and rate-limiting steps.....  | 141 |
| 5.7.2 | Voltage-sensitive steps.....  | 143 |
| 5.7.3 | A film of the cotransport mechanism.....  | 144 |
| 5.7.4 | Turnover rate.....  | 147 |
| 5.7.5 | Differences and similarities with previously suggested models of SGLT1 ...                              | 147 |
| 5.8   | Conclusion .....  | 149 |
| 5.9   | Acknowledgements.....   | 149 |
| 5.10  | References.....   | 149 |
| 5.11  | Supplemental Material .....   | 154 |
| 6     | Discussion.....   | 157 |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 6.1   | Le courant de fuite de SGLT1.....  | 157 |
| 6.1.1 | Nature ionique du courant de fuite du mutant C292A.....                        | 158 |
| 6.1.2 | Nature ionique et voie de perméation du courant de fuite de SGLT1.....         | 159 |
| 6.1.3 | Précisions concernant l'effet du glucose sur le mutant C292A.....              | 163 |
| 6.2   | Le TOR de SGLT1.....   | 165 |
| 6.2.1 | Caractérisation des signaux obtenus avec l'ITT.....                            | 165 |
| 6.2.2 | Estimation du TOR et du nombre de transporteurs à la membrane plasmique<br>167 |     |
| 6.2.3 | Implications fonctionnelles du TOR.....  | 169 |
| 6.3   | Modélisation cinétique de SGLT1.....   | 169 |
| 6.3.1 | Construction du modèle.....  | 170 |
| 6.3.2 | Nature des transitions du modèle.....  | 173 |
| 6.3.3 | Film du mécanisme de cotransport.....  | 174 |
| 6.3.4 | Fréquence des cycles de cotransport.....                                       | 175 |
| 6.3.5 | Perméabilité à l'eau des états.....  | 176 |
| 6.3.6 | Effet du glucose sur les courants transitoires.....                            | 177 |
|       | Conclusions et perspectives.....   | 181 |
|       | Bibliographie.....   | 184 |

## Liste des tableaux

|   |     |
|---|-----|
| Tableau 1.I Constantes de vitesse du modèle à trois états de hSGLT1 (Loo et al., 1993)...           | 34  |
| Tableau 1.II Propriétés de transport des SGLT dans le corps humain (Tiré de (Wright et al., 2011)). | 50  |
| Tableau 4.I Calculated TOR values associated with different extracellular conditions ....           | 112 |
| Tableau 5.I Rates constants and parameters of the 7-state kinetic model.....                        | 138 |

## Liste des figures

|  |    |
|--|----|
| Figure 1.1 Absorption du glucose à travers une cellule épithéliale (tirée de (Nelson et al., 2000)).   | 2  |
| Figure 1.2 Structure de LeuT <sub>Aa</sub> (tirée de (Yamashita et al., 2005)).  | 4  |
| Figure 1.3 Sites de liaison des ions Na <sup>+</sup> de LeuT <sub>Aa</sub> (tirée de (Yamashita et al., 2005)).  | 5  |
| Figure 1.4 Changements de conformations postulés pour LeuT <sub>Aa</sub> (tirée de (Singh et al., 2008)).  | 6  |
| Figure 1.5 Structures ouverte vers l'extérieur et ouverte vers l'intérieur de Mhp1 (tirée de (Shimamura et al., 2010)).  | 8  |
| Figure 1.6 Comparaison des sites de liaison du substrat et de l'ion Na <sup>+</sup> dans les structures occluse (a) et ouverte vers l'intérieur (b) de Mhp1 (tirée de (Shimamura et al., 2010)). | 9  |
| Figure 1.7 Schéma du mécanisme de cotransport postulé pour Mhp1 (tirée de (Shimamura et al., 2010)).   | 11 |
| Figure 1.8 Structure de BetP (tirée de (Ressl et al., 2009)).  | 12 |
| Figure 1.9 Structure des sites de liaison de la bétaine (a) et des ions Na <sup>+</sup> (b) dans BetP (tirée de (Ressl et al., 2009)).   | 13 |
| Figure 1.10 Structure occluse orientée vers l'intérieur de vSGLT en complexe avec un galactose et un ion Na <sup>+</sup> (postulé). On a aussi représenté les deux répétitions inversées.        | 16 |
| Figure 1.11 Vue de l'extérieur de la membrane illustrant les portes extracellulaires (a) et le site de liaison du galactose (b) dans vSGLT (tirée de (Wright et al., 2011)).                     | 17 |
| Figure 1.12 Site de liaison du Na <sup>+</sup> dans vSGLT.   | 18 |
| Figure 1.13 Structure ouverte vers l'intérieur de vSGLT et sa superposition avec la structure occluse (tirée de (Watanabe et al., 2010)).  | 20 |
| Figure 1.14 Changement de conformation dans le cotransporteur AdiC (tirée de (Gao et al., 2010)).  | 22 |

|  |     |
|--|-----|
| Figure 1.15 Courants sensibles à la Pz de hSGLT1 mesurés en fonction du voltage membranaire.....             | 26  |
| Figure 1.16 Constantes de temps et courbes $QVm$ de SGLT1.....   | 28  |
| Figure 1.17 Modèle cinétique symétrique à six états de SGLT1 où $\mu = FVmRT$ . ....                         | 31  |
| Figure 1.18 Effet du MTSEA sur la conformation de hSGLT1-Q457C (tirée de (Loo et al., 1998))......           | 33  |
| Figure 1.19 Modèle cinétique de hSGLT1 à 4 états proposé dans (Chen et al., 1996).....                       | 36  |
| Figure 1.20 Modèle cinétique à 5 états de hSGLT1 présenté dans (Gagnon et al., 2007)...                      | 38  |
| Figure 1.21 Réabsorption du glucose dans le tubule proximal (tirée de (Wright et al., 2011))......           | 53  |
| Figure 2.1 Circuit du montage d'électrophysiologie à deux microélectrodes en voltage imposé. ....            | 60  |
| Figure 2.2 Montage expérimental relatif à la technique de la trappe ionique.....                             | 61  |
| Figure 2.3 Immuno-colorimétrie sur un ovocyte exprimant SGLT1. ....  | 63  |
| Figure 2.4 Barrière d'énergie ( $\Delta G$ ) inhérente à la transition entre les états $C_i$ et $C_j$ . .... | 65  |
| Figure 2.5 Boucle logique de l'algorithme de Metropolis. ....  | 68  |
| Figure 3.1 Leak and cotransport currents of wt hSGLT1 and C292A mutant.....                                  | 77  |
| Figure 3.2 Proton-driven cotransport currents of wt SGLT1 and C292A mutant. ....                             | 78  |
| Figure 3.3 $Na^+$ dependence of the C292A leak current. ....   | 79  |
| Figure 3.4 $Cl^-$ dependence of the C292A leak current. ....   | 80  |
| Figure 3.5 Proton dependence of the C292A leak current.....  | 81  |
| Figure 3.6 Cationic selectivity of C292A leak current. ....  | 83  |
| Figure 3.7 Cationic selectivity of wt SGLT1 leak current.....  | 84  |
| Figure 3.8 Effect of DTT on water permeability and leak current.....   | 85  |
| Figure 3.9 Relationship between water permeability and leak current.....                                     | 86  |
| Figure 4.1 Experimental arrangement and pulse protocol used for the ITT. ....                                | 101 |
| Figure 4.2 Charge displacement in hSGLT1. ....   | 105 |
| Figure 4.3 Experimental current and pH signals ( $V_H$ ) measured in 0 mM $Na^+$ solution, pH 5.5.....       | 108 |

|   |     |
|---|-----|
| Figure 4.4 Average ( $\pm$ SE) of the rapid pH change (the step) measured as the membrane potential is stepped from +50 to -150 mV.....   | 109 |
| Figure 4.5 Mean values ( $\pm$ SE) of the slope of the $V_H$ signal and the corresponding oocyte cotransport current at -150 mV. ....   | 110 |
| Figure 5.1 Cotransport mechanism of SGLT1 suggested by the structural data of the LeuT fold family.....   | 126 |
| Figure 5.2 The Metropolis algorithm and the principal parameters characterizing a SA run. ....  | 132 |
| Figure 5.3 Complete 7-state model used to simulate SGLT1 transient and steady-state currents.....   | 136 |
| Figure 5.4 Simulation of the pre-steady-state ON and OFF currents (solid lines) using the 5-state model. ....   | 137 |
| Figure 5.5 The simulated steady-state and pre-steady-state ON and OFF currents in the presence of 90 mM $[Na^+]_o$ and $\alpha$ MG.....   | 140 |
| Figure 5.6 The conformational time course of SGLT1 in different conditions. ....  | 145 |
| Figure 5.7 The simulated transient currents resulting from a 4-state model where the transition $C_3 \rightarrow C_4$ represents the cooperative binding of two $Na^+$ ions. .... | 155 |
| Figure 6.1 La structure de vSGLT (hélices) et le modèle par homologie de hSGLT1 (ruban bleu) sont superposés afin d'illustrer la position du résidu C292.....                     | 163 |
| Figure 6.2 Électrophysiologie et transport radioactif sur SGLT1 sauvage et C292A. ....  | 164 |
| Figure 6.3 Probabilités d'occupation des états du modèle en fonction du temps en réponse à une hyperpolarisation de +70 mV à -150 mV.....   | 179 |
| Figure 6.4 Courants partiels provenant des transitions électrogéniques individuelles du modèle.....   | 180 |



## Liste des abréviations

### Symboles latins

|                  |   |
|------------------|---|
| AdiC             | antiporteur d'acides aminés   |
| ADN(c)           | acide désoxyribonucléique (complémentaire)  |
| Agm <sup>+</sup> | agmatine  |
| Ala              | alanine   |
| APC              | famille des transporteurs d'acides aminés, polyamines et organocations                      |
| ApcT             | transporteur d'acides aminés couplé aux H <sup>+</sup> et indépendant du Na <sup>+</sup>    |
| Arg              | arginine  |
| ARN(m)           | acide ribonucléique (messenger)   |
| Asn              | asparagine  |
| Asp              | acide aspartique (aspartate)  |
| ATP              | adénosine triphosphate  |
| ATPase           | enzyme qui fabrique et/ou hydrolyse l'ATP   |
| BetP             | cotransporteur de Na <sup>+</sup> /bétaine de <i>Corynebacterium glutamicum</i>             |
| BCCT             | famille des transporteurs de bétaine/carnitine/choline                                      |
| Br <sup>-</sup>  | ion brome   |
| BSA              | albumine de sérum bovin   |
| CaiT             | antiporteur de carnitine/butyrobétaine indépendant du Na <sup>+</sup> et des H <sup>+</sup> |

|                 |  |
|-----------------|--|
| CCD             | capteur « <i>charge-coupled device</i> »                                   |
| CHT             | transporteur de choline dépendant du Na <sup>+</sup> et du Cl <sup>-</sup> |
| $C_i$           | état <i>i</i> d'un modèle cinétique  |
| Cl <sup>-</sup> | ion chlore   |
| CIC-ec1         | échangeur Cl <sup>-</sup> /H <sup>+</sup> de <i>Escherichia coli</i> 1     |
| Cs <sup>+</sup> | ion césium   |
| DM              | dynamique moléculaire  |
| DMSO            | dyméthylsulfoxyde  |
| DTT             | dithiothréitol   |
| <i>e</i>        | charge électrique élémentaire  |
| E <sub>a</sub>  | énergie d'activation   |
| EAAT            | transporteur d'acides aminés excitateurs couplé au Na <sup>+</sup>         |
| Ec              | <i>Escherichia coli</i>  |
| eI              | électrode d'injection de courant   |
| eR              | électrode de référence   |
| eS              | électrode sélective  |
| eV              | électrode de voltage   |
| <i>F</i>        | constante de Faraday (96500 Coulombs mole <sup>-1</sup> )                  |
| FBA             | amplificateur à rétroaction négative à haut gain                           |
| FEP             | perturbation d'énergie libre (« <i>free energy perturbation</i> »)         |
| FRG             | glycosurie rénale familiale (« <i>familial renal glucosuria</i> »)         |
| GABA            | acide γ-aminobutyrique   |

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| GAT1-3-4                         | cotransporteur $\text{Na}^+/\text{Cl}^-/\text{GABA}$ 1-3-4              |
| GGM                              | malabsorption intestinale de glucose-galactose                          |
| Gln                              | glutamine   |
| $\text{Glt}_{\text{ph}}$         | transporteur d'aspartate de <i>Pyrococcus horikoshii</i>                |
| Glu                              | acide glutamique (glutamate)  |
| GLUT1-2                          | transporteur de glucose 1-2   |
| Gly                              | glycine   |
| $\text{H}^+$                     | proton  |
| HEK                              | cellules « <i>human embryonic kidney</i> »                              |
| HRP                              | péroxydase du raifort (« <i>horseradish peroxidase</i> »)               |
| hSGLT1                           | isoforme humain du cotransporteur $\text{Na}^+/\text{glucose}$          |
| I                                | ion iode  |
| $I_{\text{Cotr}}$                | courant de cotransport  |
| Ile                              | isoleucine  |
| ITT                              | technique de la trappe ionique (« <i>ion- trap technique</i> »)         |
| $\text{K}^+$                     | ion potassium   |
| $k_{ij}, k_{ji}$                 | constante de vitesse entre les états $i$ et $j$ d'un modèle cinétique   |
| $K_{\text{m}}^{\alpha\text{MG}}$ | affinité apparente pour le $\alpha\text{MG}$                            |
| $K_{\text{m}}^{\text{Na}}$       | affinité apparente pour le $\text{Na}^+$                                |
| Leu                              | leucine   |
| $\text{LeuT}_{\text{Aa}}$        | transporteur de $\text{Na}^+/\text{leucine}$ de <i>Aquifex aeolicus</i> |
| $\text{Li}^+$                    | ion lithium   |

|                          |  |
|--------------------------|--|
| $L_p$                    | perméabilité à l'eau   |
| Lys                      | lysine   |
| MES                      | acide 2-(N-Morpholino) éthanesulfonique  |
| Met                      | méthionine   |
| Mhp1                     | transporteur de $\text{Na}^+$ /benzyle hydantoïne de <i>Microbacterium liquefaciens</i>    |
| MTSEA                    | 2-aminoéthyl méthaneethiosulfonate hydrobromide  |
| $N$                      | nombre de molécules d'un transporteur donné exprimées à la membrane plasmique d'un ovocyte |
| $\text{Na}^+$            | ion sodium   |
| $[\text{Na}^+]_o$        | concentration de sodium extracellulaire  |
| $\text{NaP}_i\text{-II}$ | transporteur de $\text{P}_i$ couplé au $\text{Na}^+$                                       |
| NCS1                     | famille des symporteurs de cation/nucléobase 1   |
| NIS                      | cotransporteur $\text{Na}^+/\text{I}^-$  |
| NMDG                     | N-méthyl-D-glucamine   |
| $\text{NO}_3^-$          | bicarbonate  |
| NSS                      | famille des cotransporteurs de $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ /neurotransmetteurs               |
| ORT                      | thérapie de la réhydratation orale   |
| PFA                      | acide phosphonoformique  |
| Phe                      | phénylalanine  |
| $\text{P}_i$             | phosphate inorganique divalent   |
| Pm                       | <i>Proteus mirabilis</i>   |
| Pz                       | phlorizine   |

|               |  |
|---------------|--|
| $Q_{\max}$    | déplacement de charge transitoire maximal  |
| $R$           | constante des gaz ( $8,31 \text{ Joule mole}^{-1} \text{ Kelvin}^{-1}$ )                 |
| $\text{Rb}^+$ | ion rubidium   |
| RMSD          | racine carrée de l'erreur quadratique moyenne  |
| $S$           | surface d'un ovocyte   |
| $s$           | nombre net de charges élémentaires ( $e$ ) cotransportées pendant un cycle complet       |
| SA            | recuit simulé (« <i>simulated annealing</i> »)   |
| Ser           | sérine   |
| SERT          | transporteur de sérotonine couplé au $\text{Na}^+$ , au $\text{Cl}^-$ et au $\text{K}^+$ |
| SGLT1         | cotransporteur $\text{Na}^+$ /glucose à haute affinité                                   |
| SGLT2         | cotransporteur $\text{Na}^+$ /glucose à faible affinité                                  |
| SGLT3         | senseur de glucose   |
| SLC           | famille des transporteurs de solutés dépendants du $\text{Na}^+$                         |
| SMCT1-2       | cotransporteur de $\text{Na}^+$ /monocarboxylates 1-2                                    |
| SMIT1-2       | cotransporteur de $\text{Na}^+$ / <i>myo</i> -inositol 1-2                               |
| SMVT          | transporteur de $\text{Na}^+$ /multivitamines  |
| SSS           | famille des symporteurs de sodium/soluté   |
| STM           | segment transmembranaire   |
| $T$           | température  |
| Thr           | thréonine  |
| TMB           | tétraméthylbenzidine   |
| TMR6M         | tétraméthylrhodamine-6-maléimide   |

|           |  |
|-----------|--|
| TOR       | fréquence des cycles de cotransport (« <i>turnover rate</i> »)                 |
| Trp       | tryptophane  |
| Tyr       | tyrosine   |
| $V_{1/2}$ | voltage où la moitié de la charge transitoire totale a bougé                   |
| Val       | valine   |
| $V_H$     | potentiel d'une électrode sélective aux protons                                |
| $V_m$     | potentiel membranaire  |
| $V_R$     | potentiel d'inversion  |
| vSGLT     | cotransporteur $\text{Na}^+$ /galactose de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>      |
| $v_w$     | volume molaire de l'eau ( $18,2 \text{ cm}^3 \text{ mole}^{-1}$ )              |
| $z, z_i$  | valence apparente de la charge mobile qui traverse toute la membrane plasmique |

### Symboles grecs

|                       |  |
|-----------------------|--|
| $\alpha_i$            | asymétrie d'une barrière d'énergie                 |
| $\alpha\text{MG}$     | $\alpha$ -méthyl glucose                           |
| $[\alpha\text{MG}]_o$ | concentration extracellulaire de $\alpha\text{MG}$ |
| $\Delta G$            | différence (barrière) d'énergie libre              |
| $\Delta\pi$           | gradient de pression osmotique                     |
| $\tau$                | constante de temps                                 |

**Autres symboles**

3D

tridimensionnel

Å

angstrom ( $10^{-10}$  mètre)

*À ma famille, mes parents et Myriam.*



## **Remerciements**

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation des travaux qui sont présentés dans cette thèse. Plus particulièrement mon directeur de recherche Jean-Yves, mais aussi les membres du laboratoire et du GÉPROM que j'ai côtoyés au fil des ans. Un merci spécial à mes proches et ma famille pour leur encouragement.

# 1 Introduction

Les protéines transmembranaires telles qu'on les connaît aujourd'hui sont des molécules essentielles à la régulation du métabolisme des cellules qui composent les êtres vivants. Les cotransporteurs constituent une classe importante de ces protéines et leur rôle consiste à coupler le gradient électrochimique favorable d'un ion à un substrat afin d'acheminer ce dernier de l'autre côté de la membrane plasmique contre son gradient de concentration. L'archétype des protéines qui effectuent un transport actif secondaire est le cotransporteur  $\text{Na}^+$ /glucose (SGLT1). Tributaire de l'hypothèse formulée par Crane en 1965 (Crane, 1965), SGLT1 utilise le gradient électrochimique du  $\text{Na}^+$  afin d'accumuler le glucose dans les cellules épithéliales de l'intestin grêle et du tubule proximal rénal. SGLT1 est exprimé à la membrane apicale de ces cellules et c'est la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase basolatérale qui crée et maintient le gradient de  $\text{Na}^+$  requis pour fournir l'énergie nécessaire au cotransport (Figure 1.1). Des années 60 jusqu'au milieu des années 80, la nature du cotransport  $\text{Na}^+$ /glucose se précise grâce à l'utilisation de vésicules de membranes de bordure en brosse intestinales (Hopfer et al., 1973) ainsi que de cellules intestinales isolées (Kimmich and Randles, 1984). En 1987, on obtient la séquence d'ADNc de SGLT1 à partir de l'intestin grêle de lapin (Hediger et al., 1987). Cette découverte ouvre la voie à la caractérisation détaillée du cotransporteur exprimé dans des ovocytes de xénope à l'aide de l'électrophysiologie à deux microélectrodes et de la fluorométrie en voltage imposé (Umbach et al., 1990; Parent et al., 1992a; Loo et al., 1998).

L'émergence de ces nouvelles données apporte une profondeur à la compréhension du mécanisme de fonctionnement du cotransporteur, l'accès alterné. Initialement postulé par Jardetsky (Jardetzky, 1966), ce mode de fonctionnement repose sur le fait qu'un cotransporteur doit effectuer un cycle de changements de conformation comprenant des états occlus pour orienter successivement ses sites de liaison de part et d'autre de la membrane plasmique. Le mouvement de réorientation entre ces deux états principaux est stimulé par la liaison des ions  $\text{Na}^+$  au cotransporteur et permet la translocation du glucose à travers la barrière énergétique de la membrane qui empêche ordinairement sa perméation. Des modèles cinétiques comprenant six (Parent et al., 1992b) et plus récemment cinq

(Gagnon et al., 2007) et huit états (Loo et al., 2006) ont été proposés afin de comprendre les changements de conformations et la liaison des substrats à SGLT1.

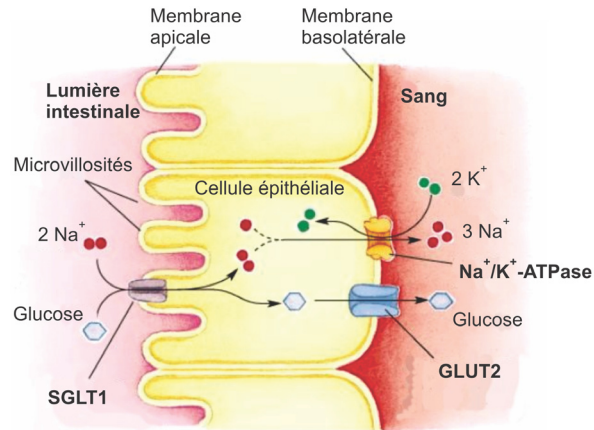


Figure 1.1 Absorption du glucose à travers une cellule épithéliale (tirée de (Nelson et al., 2000)).

En 2008, la structure cristallographique de vSGLT (Faham et al., 2008), un homologue procaryote de SGLT1, fut élucidée. On s'est alors aperçu que cette dernière était similaire aux structures tridimensionnelles (3D) de cotransporteurs couplés au Na<sup>+</sup> appartenant à d'autres familles. En effet, il a été établi que des protéines comme le transporteur de Na<sup>+</sup>/leucine LeuT<sub>Aa</sub> (Yamashita et al., 2005), membre de la famille des symporteurs de Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>/neurotransmetteurs (NSS), le transporteur de Na<sup>+</sup>/bétaine BetP (Ressl et al., 2009), un membre de la famille des transporteurs de bétaine/carnitine/choline (BCCT), ainsi que le transporteur de Na<sup>+</sup>/benzyle hydantoïne Mhp1 (Weyand et al., 2008), membre de la famille des symporteurs de cation/nucléobase 1 (NCS1), possédaient un cœur fonctionnel très semblable à celui observé chez vSGLT qui est constitué de deux répétitions inversées contenant chacune cinq segments transmembranaires (STM). Ces similarités inattendues ont graduellement permis de valider le mécanisme d'accès alterné en construisant la séquence de changements de conformations correspondant à chaque cotransporteur.

Nous débuterons donc cette introduction en nous intéressant aux structures de vSGLT et des transporteurs qui possèdent des répétitions inversées de STM dans le but d'en dégager les principes directeurs du point de vue des sites de liaison des ions et des substrats ainsi que du mécanisme d'accès alterné. Nous passerons ensuite en revue l'évolution de la modélisation cinétique de SGLT1, en accordant une importance particulière aux courants de fuite, c'est-à-dire aux courants découplés de la stœchiométrie précise du cotransport.

## 1.1 Structures cristallographiques et accès alterné

La structure d'un transporteur membranaire fournit de l'information au niveau moléculaire et atomique sur la façon dont les substrats sont coordonnés de l'extérieur de la membrane jusqu'à leurs sites de liaison. Lorsque l'on dispose de plusieurs structures qui reflètent des conformations différentes rencontrées lors d'un cycle de cotransport, il devient possible de postuler des modèles associés à la description de changements de conformations précis. Cette section présente la structure 3D de transporteurs possédant une architecture de type LeuT dont les caractéristiques permettent de proposer un mécanisme de transport moléculaire pour SGLT1.

### 1.1.1 LeuT

Le transporteur de  $\text{Na}^+$ /leucine présent chez *Aquifex aeolicus* ( $\text{LeuT}_{\text{Aa}}$ ) est un homologue procaryote des membres de la famille eucaryote des cotransporteurs de  $\text{Na}^+$ / $\text{Cl}^-$ /neurotransmetteurs (NSS, SLC6). Les transporteurs de cette famille sont exprimés à la membrane pré-synaptique des neurones et utilisent le gradient électrochimique favorable de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{Cl}^-$  pour vider les synapses et retourner des substrats tels les amines biogéniques (sérotonine, dopamine, adrénaline) et les acides aminés (glycine, proline, taurine, acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA)) dans les neurones et les cellules gliales contre leur gradient de concentration. Il existe une identité de séquence d'environ 20-25% entre  $\text{LeuT}_{\text{Aa}}$  et ses

homologues eucaryotes de la famille SLC6 concentrée près des sites de liaison présumés des substrats et des ions  $\text{Na}^+$ . En 2005, le laboratoire d'Éric Gouaux a obtenu la structure cristallographique de  $\text{LeuT}_{\text{Aa}}$  à une résolution de 1,65 Å en complexe avec 2 ions  $\text{Na}^+$ , un  $\text{Cl}^-$ , et une L-leucine (Yamashita et al., 2005). Le transporteur est caractérisé par 12 STM et possède une répétition structurelle inversée permettant de superposer les carbones  $\alpha$  des résidus composant les segments 1 à 5 à ceux des segments 6 à 10 en effectuant une rotation de  $176,5^\circ$  parallèle au plan de la membrane plasmique, pour une valeur RMSD des distances entre les carbones  $\alpha$  de 5,3 Å. Cette symétrie n'est pas décelable au niveau de la structure primaire, c'est-à-dire de la séquence d'acides aminés.

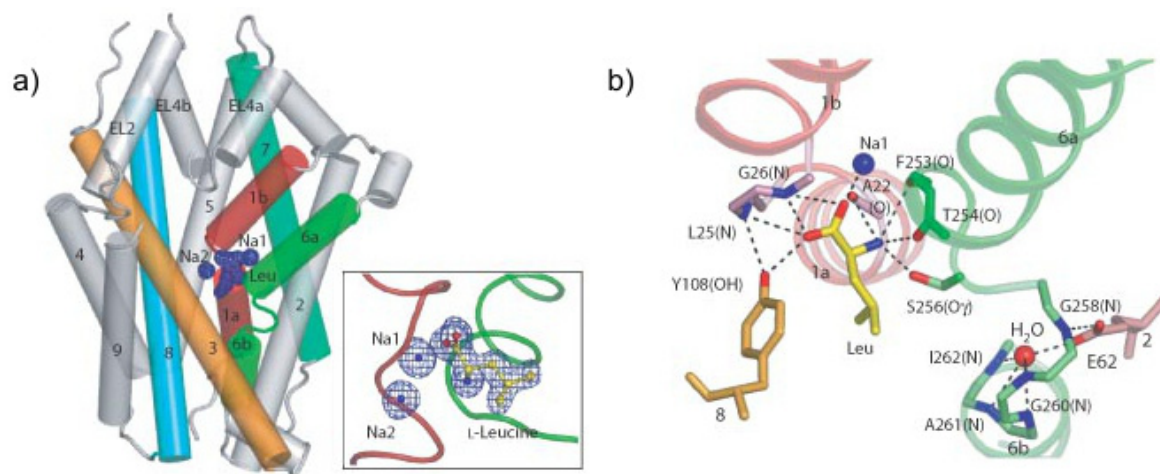


Figure 1.2 Structure de  $\text{LeuT}_{\text{Aa}}$  (tirée de (Yamashita et al., 2005)).

a) Structure de  $\text{LeuT}_{\text{Aa}}$  sans les STM 10 à 12. b) Site de liaison du substrat L-leucine où les ponts hydrogène sont représentés par des pointillés.

Les hélices 1 et 6 sont antiparallèles et brisées près du centre de la membrane ce qui expose les groupements oxygène carbonyles et les atomes d'azote de la chaîne principale d'acides aminés afin de permettre une coordination accrue des ions  $\text{Na}^+$  et du substrat L-leucine (Figure 1.2). La pochette de liaison de la leucine est complètement déshydratée. Ainsi, les résidus non chargés Ala 22 (STM 1), Phe 253, Thr 254 et Ser 256 (STM 6)

forment des ponts hydrogène avec le groupe  $\alpha$ -amine de la leucine, tandis que son groupe  $\alpha$ -carboxyle interagit avec Tyr 108 (STM 3), Leu 25 et Gly 26 (STM 1) ainsi qu'un ion  $\text{Na}^+$ . De plus, les dipôles produits par les hélices 1 et 6 contribuent à coordonner la chaîne principale de la leucine dans son site. La chaîne latérale de la leucine est stabilisée par des interactions hydrophobes avec les chaînes latérales de Val 104, et Tyr 108 (STM 3), Phe 253, Ser 256 et Phe 259 (STM 6) ainsi que Ser 355 et Ile 359 (STM 8). La complémentarité des surfaces de Wan der Waals de cette pochette hydrophobe avec la chaîne latérale de la L-leucine témoigne de la sélectivité de  $\text{LeuT}_{\text{Aa}}$  pour son substrat.

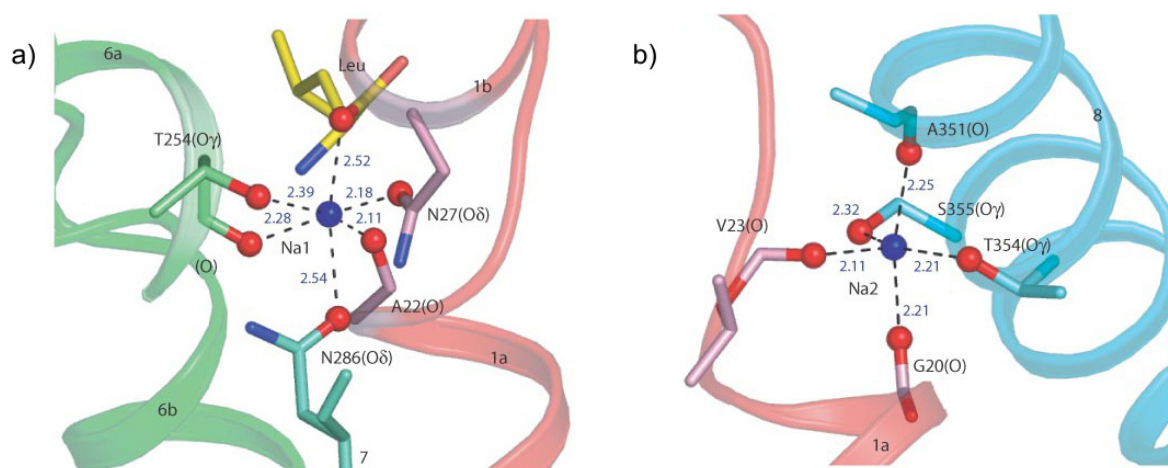


Figure 1.3 Sites de liaison des ions  $\text{Na}^+$  de  $\text{LeuT}_{\text{Aa}}$  (tirée de (Yamashita et al., 2005)).

a) Site Na1. b) Site Na2. Les ions  $\text{Na}^+$  sont en bleu et les distances sont en Å.

Les sites de liaison des ions  $\text{Na}^+$  sont à proximité du site de la leucine. L'ion Na1 (Figure 1.3a) est coordonné avec une géométrie octaédrale par l'oxygène carboxyle de la leucine, ainsi que par les résidus Ala 22 et Asn 27 (STM 1), Thr 254 (STM 6) et Asn 286 (STM 7). Le site de liaison de l'ion Na2 (Figure 1.3b) est situé entre la section brisée de l'hélice 1 et le STM 8, un peu plus loin du site de la leucine que Na1. La coordination de Na2 est attribuable aux oxygènes carbonyles de Gly 20, Val 23 (STM 1) et Ala 351 (STM 8), ainsi qu'aux oxygènes hydroxyles de Thr 354 et Ser 355 (STM 8).

À l'aide de simulations combinant la dynamique moléculaire (DM) à des techniques de perturbation de l'énergie libre (FEP), Noskov a étudié la sélectivité des sites Na1 et Na2 de LeuT<sub>Aa</sub> pour les ions Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> et K<sup>+</sup> (en utilisant les structures présentées dans (Yamashita et al., 2005; Singh et al., 2007)) afin de comprendre la façon dont ils sont couplés entre eux ainsi que l'influence qu'ils exercent sur l'affinité de liaison du substrat leucine dans son site (Caplan et al., 2008; Noskov and Roux, 2008). On a trouvé que le site Na1 était moins sélectif pour le Na<sup>+</sup> (relativement aux autres cations) que le site Na2 d'environ 2 kcal mol<sup>-1</sup> et qu'il existait un couplage structurel entre les deux sites qui améliorerait la sélectivité du transporteur pour le Na<sup>+</sup> de 2-4 kcal mol<sup>-1</sup>. Ces résultats suggèrent un mécanisme dans lequel un ion Na<sup>+</sup> se lie d'abord au site Na2, ce qui a pour effet de stabiliser la structure du site Na1 et de la pochette de liaison du substrat afin d'améliorer leur sélectivité pour engendrer la coordination du deuxième ion Na<sup>+</sup> et de la leucine.

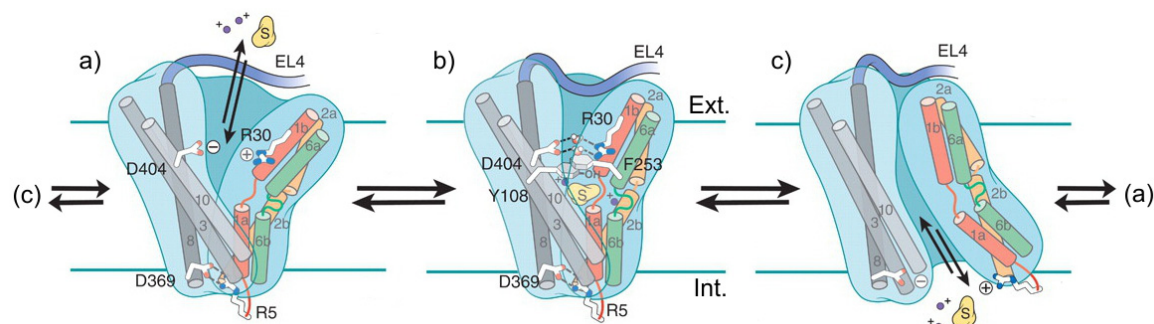


Figure 1.4 Changements de conformations postulés pour LeuT<sub>Aa</sub> (tirée de (Singh et al., 2008)).

La liaison des substrats provoque une isomérisation de la conformation ouverte vers l'extérieur (a) à la conformation occluse (b), puis de la conformation occluse vers la conformation ouverte vers l'intérieur (c) où les substrats sont libérés dans la cellule. Le transporteur vide se réoriente ensuite vers l'extérieur de la cellule en passant directement de (c) à (a).

Dans la structure présentée par Gouaux, le substrat L-leucine est occlus. On peut observer un vestibule extracellulaire, mais les résidus aromatiques Tyr 108 et Phe 253 ainsi que la paire chargée formée de Arg 30 et Asp 404 constituent une porte qui obstrue la voie de perméation liant le vestibule aux sites des ions  $\text{Na}^+$  et du substrat. Ces résidus sont importants car ils sont conservés dans la famille NSS. Dans cette conformation, le vestibule intracellulaire est complètement fermé et remplacé par environ 20 Å de structure protéique compacte. Près de la face cytoplasmique de la protéine on trouve une autre paire conservée de résidus chargés formant un pont salin, Arg 5 et Asp 369. Afin de modéliser le passage de la conformation occluse faisant face à l'extérieur à la conformation ouverte vers l'intérieur, Gouaux propose un mécanisme (Figure 1.4) selon lequel les parties brisées des hélices 1 et 6 jouent le rôle d'un pivot lorsque les segments 1a et 6b ouvrent la cavité intracellulaire en s'éloignant des segments transmembranaires 3 et 8, après que les segments 1b et 6a aient fermé le vestibule extracellulaire.

### 1.1.2 Mhp1

Le transporteur de benzyle hydantoïne Mhp1 est membre de la famille des symporteurs de cation/nucléobase 1 (NCS1). Il possède une faible identité de séquence de 15% avec LeuT<sub>Aa</sub> et de 16% avec vSGLT. Mhp1 catalyse le transport de 5-benzyle hydantoïne vers le cytoplasme de *Microbacterium liquefaciens* où des enzymes peuvent transformer la molécule en tryptophane ou en phénylalanine. Des travaux de cristallographie ont d'abord permis de déterminer des structures de Mhp1 dans une conformation ouverte vers l'extérieur sans substrat à une résolution de 2,85 Å, ainsi qu'une autre à 4 Å représentant un état occlus mais toujours orienté vers l'extérieur où le benzyle hydantoïne est lié au centre de la protéine (Weyand et al., 2008). Un an et demi plus tard, en 2010, une structure à 3,8 Å du transporteur ouvert vers l'intérieur est publiée et permet d'établir plus solidement les bases moléculaires du mécanisme d'accès alterné (Shimamura et al., 2010). Mhp1 possède 12 STM (Figure 1.5) comprenant deux répétitions formées des segments 1 à 5 et 6 à 10 dont la topologie est inversée et reliée par une rotation de 168° par rapport à un axe situé au centre de la membrane et qui est parallèle à cette dernière. Comme



dans LeuT<sub>Aa</sub>, les hélices 1 et 6 sont brisées en leur centre. En fait, 249 des 460 carbones  $\alpha$  des 10 hélices du cœur fonctionnel de Mhp1 peuvent être superposés à ceux de LeuT<sub>Aa</sub> avec un RMSD de 2,4 Å.

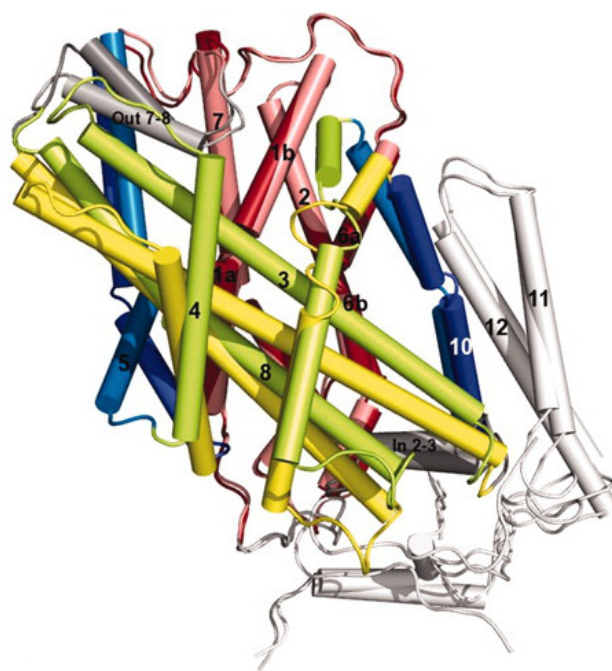


Figure 1.5 Structures ouverte vers l'extérieur et ouverte vers l'intérieur de Mhp1 (tirée de (Shimamura et al., 2010)).

La structure ouverte vers l'intérieur est colorée en saumon pour le « *bundle* », en vert pâle pour le « *hash motif* » et en bleu pâle pour les STM 5 et 10. Dans la structure ouverte vers l'extérieur, le « *bundle* » est rouge, le « *hash motif* » est jaune et les STM 5 et 10 sont bleus.

Le site de liaison du substrat est situé dans l'espace entouré des STM 3 et 8 et des sections brisées des hélices 1 et 6 (Figure 1.6a). Le groupe hydantoïne du substrat forme une interaction  $\pi$  avec la chaîne latérale de Trp 117 (STM 3) et partage des ponts hydrogène avec Gln 121 (STM 3) et Asn 318 (STM 8). Trp 117 et Asn 318 sont conservés dans tous

les membres de la famille NCS1. Lorsque Mhp1 effectue le changement de conformation de l'état occlus vers l'état ouvert vers l'intérieur, Trp 117 s'incline légèrement vers le centre du site tandis que Asn 318 et Gln 121 s'en éloignent, ce qui compromet la capacité de liaison du site pour le substrat (Figure 1.6b). La portion benzyle du substrat, quant à elle, interagit avec Trp 220 (STM 6) et Gln 42 (STM 1). Une comparaison de séquences suggère que le pont hydrogène que Gln 42 forme avec le substrat est un déterminant important de la sélectivité dans la famille NCS1 (Pantazopoulou and Diallinas, 2007). Il est intéressant de noter que lors du passage de la conformation ouverte vers l'extérieur à la conformation occluse, le résidu Trp 220 se rapproche du site de liaison.

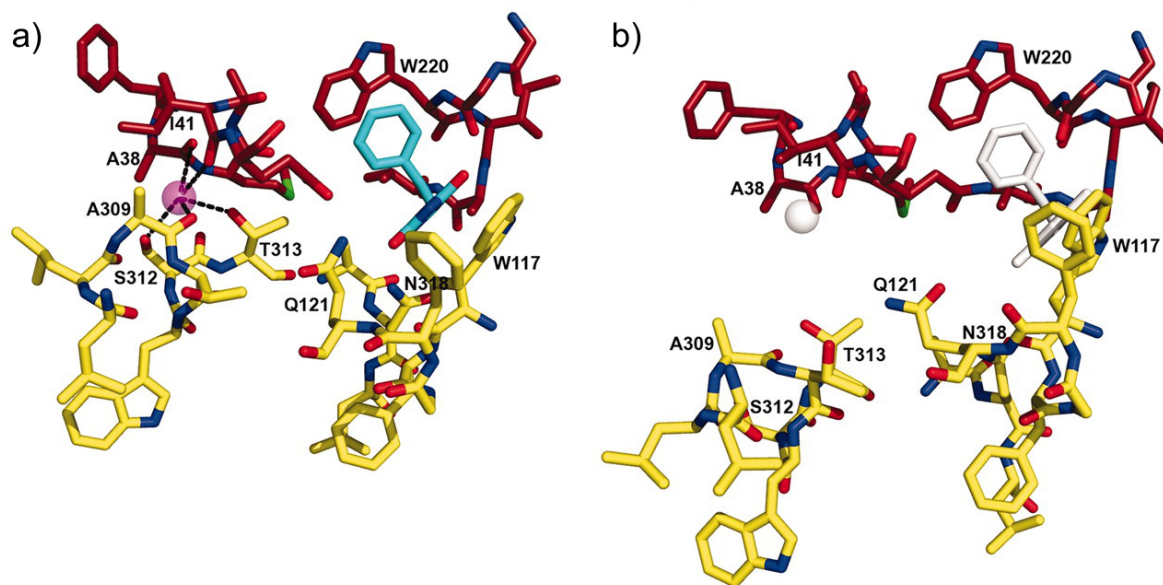


Figure 1.6 Comparaison des sites de liaison du substrat et de l'ion Na<sup>+</sup> dans les structures occluse (a) et ouverte vers l'intérieur (b) de Mhp1 (tirée de (Shimamura et al., 2010)).

- a) Le Na<sup>+</sup> et le benzyle hydantoïne sont représentés en magenta et en cyan, respectivement.  
 b) On a placé le Na<sup>+</sup> et le benzyle hydantoïne où on les trouve dans la conformation occluse.

On a identifié un site de liaison au  $\text{Na}^+$  dans la structure occluse de Mhp1 à proximité du bout (début de la section brisée) de l'hélice 1a et du STM 8 (Figure 1.6a). L'ion  $\text{Na}^+$  est coordonné par les oxygènes carbonyle de Ala 38 et Ile 41 (STM 1) ainsi que celui de Ala 309 (STM 8). Les chaînes latérales de Ser 312 et de Thr 313 (STM 8) contribuent aussi à la coordination, de même que le moment dipolaire du bout de l'hélice 1a qui y joue vraisemblablement un rôle. Le couplage entre les sites de liaison du  $\text{Na}^+$  et du substrat pourrait provenir des résidus Asn 318 (STM 8) et Gln 42 (STM 1). Dans la structure ouverte vers l'intérieur, le site pour le  $\text{Na}^+$  semble déformé par l'éloignement de 4,5 Å du STM 8 par rapport au STM 1. En effet, des simulations de DM démontrent que l'ion  $\text{Na}^+$  quitte son site et diffuse vers le vestibule aqueux après moins de 2 ns dans la conformation ouverte vers l'intérieur, contrairement à la conformation occluse où il demeure dans son site pour plus de 100 ns et à la conformation ouverte vers l'extérieur où on a observé l'ion  $\text{Na}^+$  se libérer de son site après 18 ns dans une des trois simulations de 100 ns effectuées. Ces résultats suggèrent que l'ion  $\text{Na}^+$  n'est lié de façon stable que dans les deux conformations orientées vers l'extérieur.

Grâce aux trois structures dont on dispose, il est possible de formuler une hypothèse plutôt précise sur les changements de conformation qui constituent le mécanisme de cotransport de Mhp1 (Figure 1.7). Lorsque le transporteur est dans l'état ouvert vers l'extérieur, l'occlusion de la voie de perméation extracellulaire semble être initiée par le mouvement du résidu Trp 220 situé dans le STM 6, qui se répercute ensuite au STM 10 qui lui est adjacent et qui vient obstruer le vestibule extracellulaire en se pliant. Ce changement de conformation s'apparente au mouvement d'une porte extracellulaire mince, car la portion intracellulaire des segments d'une épaisseur de 20 Å demeure complètement étanche pendant ce mouvement et ne forme pas de vestibule orienté vers l'intérieur. La création d'un tel vestibule et la fermeture totale du passage extracellulaire nécessite le changement de conformation important engendré lorsque les STM 3, 4, 8 et 9 (le « *hash motif* ») bougent à la manière d'un corps rigide par rapport aux STM 1, 2, 6 et 7 (le « *bundle* »). Il en résulte la fermeture totale de la cavité extracellulaire par les extrémités C-terminales des STM 3 et 9, cette dernière étant déjà partiellement obstruée par la fermeture

de la porte mince (STM 10). Suite à cette réorganisation, la nouvelle position des STM 4 et 8 crée le vestibule intracellulaire. De plus, l'hélice flexible 5 se déploie légèrement afin d'ouvrir davantage la voie de perméation cytoplasmique à la manière d'une porte mince, comme le fait le STM 10 du côté extracellulaire.

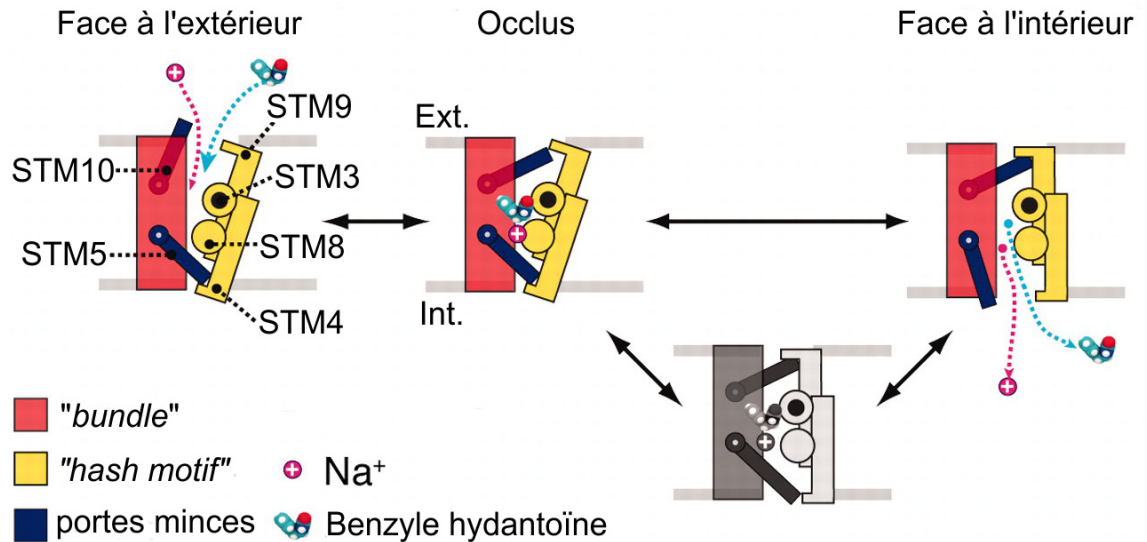


Figure 1.7 Schéma du mécanisme de cotransport postulé pour Mhp1 (tirée de (Shimamura et al., 2010)).

### 1.1.3 BetP

Le cotransporteur de Na<sup>+</sup>/bétaine BetP fait partie de la famille des transporteurs de bétaine/choline/carnitine (BCCT) et couple deux ions Na<sup>+</sup> à l'entrée de glycine bétaine dans le cytoplasme de *Corynebacterium glutamicum*. BetP est activé par le stress hyperosmotique, une situation qui cause une augmentation de la concentration cytoplasmique de K<sup>+</sup> qui est sentie par le domaine C-terminal de la protéine. Les osmolytes, comme la bétaine, sont des molécules organiques polaires qui favorisent la stabilité des protéines en interagissant défavorablement avec leurs conformations repliées incorrectement. En 2009, le laboratoire de Ziegler a résolu à 3,35 Å la structure trimérique

d'un mutant de BetP où l'extrémité N-terminale a été tronquée (Ressl et al., 2009). Un monomère de BetP possède 12 STM (Figure 1.8) et une répétition structurale inversée inattendue du point de vue de la séquence d'acides aminés relie les hélices 3 à 7 aux hélices 8 à 12. Les deux paires inversées d'hélices formées des STM 3 et 4 et des STM 8 et 9 forment le « *bundle* », tandis que les STM 5 à 7 et les STM 10 à 12 constituent le groupe échafaud (« *scaffold* »).

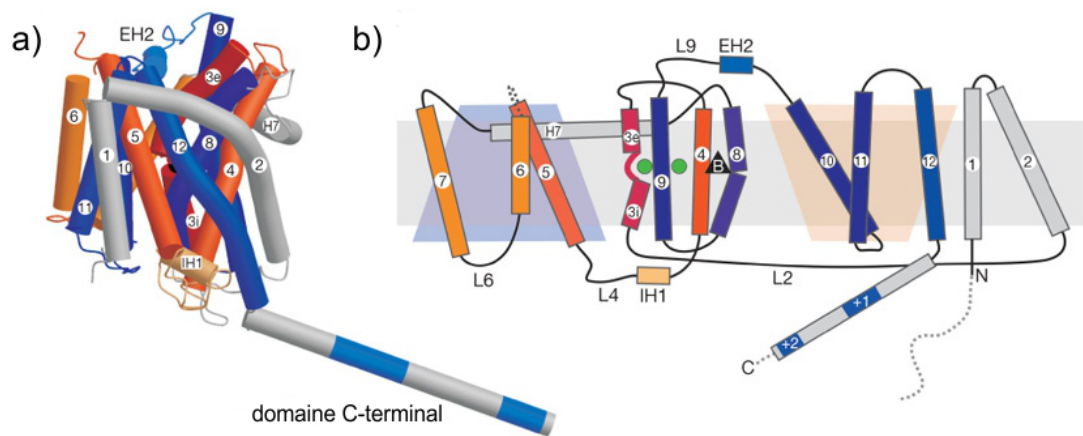


Figure 1.8 Structure de BetP (tirée de (Ressl et al., 2009)).

a) La répétition inversée formée des STM 3 à 7 est de couleur orange, tandis que celle formée des STM 8 à 12 est bleue. b) Topologie des répétitions inversées de BetP.

Le site de liaison de la bétaine est composé des chaînes latérales de quatre résidus Trp des STM 4 et 8 disposés en forme de boîte autour du groupe ammonium du substrat, créant ainsi une zone aromatique à l'aide d'interactions de Van der Waals et cation- $\pi$  (Figure 1.9a). Les chaînes latérales de Trp 194 (STM 4) et Trp 374 (STM 8) sont parallèles l'une par rapport à l'autre et perpendiculaires à Trp 189 (STM 4) qui constitue le couvercle périplasmique du site. Le résidu Trp 197 (STM 4) forme le dernier côté de la boîte de coordination. En effectuant un alignement de séquence avec d'autres membres de la famille BCCT, on constate que Trp 194 est conservé dans toute la famille, alors qu'on ne retrouve Trp 189, Trp 197 et Trp 374 que dans les membres qui cotransportent des substrats

ammonium quaternaire comme la carnitine et la choline. Cependant, la sélectivité pour le substrat bétaine ne provient pas de ces résidus conservés, car le site de liaison de CaiT, un antiporteur de carnitine/butyrobétaine indépendant du  $\text{Na}^+$  et des  $\text{H}^+$ , possède une architecture similaire au site de BetP (Schulze et al., 2010; Ziegler et al., 2010).

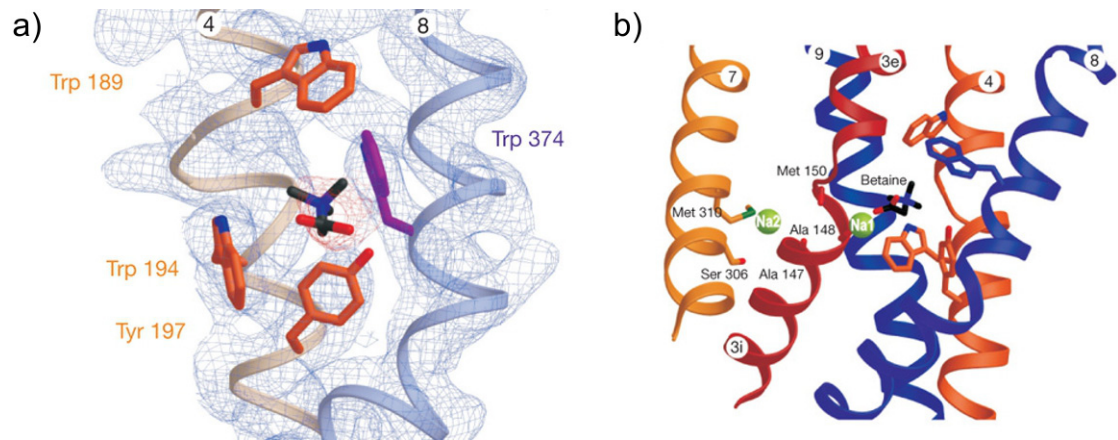


Figure 1.9 Structure des sites de liaison de la bétaine (a) et des ions  $\text{Na}^+$  (b) dans BetP (tirée de (Ressl et al., 2009)).

BetP présente 23 résidus à chaîne latérale aromatique qui bordent la voie de perméation du substrat, dont 4 forment une boîte autour de la bétaine. Or, selon le mécanisme d'accès alterné, la bétaine ne devrait interagir principalement qu'avec les résidus de son site de liaison, de sorte que la nature des résidus qui tapissent la paroi du vestibule aqueux ne devrait pas être un déterminant de la sélectivité et de l'affinité de la protéine pour son substrat. Cependant, les osmolytes agissent souvent comme des co-solvants qui sont repoussés par la chaîne de polypeptides principale d'une protéine. La présence de résidus aromatiques dans le pore de BetP semble contrer partiellement cet effet qui nuit à l'occlusion de la bétaine.

Aucun ion  $\text{Na}^+$  n'a été identifié dans la structure de BetP, mais on a pu proposer deux sites de liaison (Figure 1.9b) grâce à un alignement de structure avec  $\text{LeuT}_{\text{Aa}}$ . Dans le

site Na1, le  $\text{Na}^+$  semble coordonné par les oxygènes carboxyles de la bétaine et par les oxygènes carbonyles de Met 150 (portion brisée du STM 3) et Ala 148 (STM 3i). Le site Na2 serait situé entre les hélices 3 et 7 et l'ion  $\text{Na}^+$  interagirait avec l'oxygène carbonyle de Ala 147 (STM 3i) et les chaînes latérales de Ser 306 et Met 310 (STM 7). De plus, Thr 467 et Ser 468 (STM 10) pourraient interagir avec les sites Na1 et Na2 par l'intermédiaire de molécules d'eau. Ser 468 est conservé dans la famille BCCT. Ce résidu correspond à Ser 355 dans la famille NSS et à Ser 364 ou Ser 365 dans la famille NSS qui sont aussi conservés dans leurs familles respectives. Dans la famille BCCT, le motif conservé de glycines Gly149-x-Gly151-x-Gly153 dans le TM3, qui inclut Met 150, est exclusif aux membres qui transportent la bétaine avec une haute affinité et leur confère une sélectivité au substrat via la liaison du  $\text{Na}^+$  au site Na1 (Perez et al., 2011).

Les sites des ions et du substrat sont occlus dans la structure de BetP. Un petit vestibule cytoplasmique est présent, mais il comporte une constriction empêchant le passage des ligands. Cette dernière est formée par Ala 147 (STM 3), Ile 302 et Ser 306 (STM 7), Phe 380 et Phe 384 (STM 8) ainsi que Ser 471 (STM 10). En considérant des contraintes stériques attribuables à la nature des résidus composants la constriction, les auteurs de (Ressl et al., 2009) postulent que l'ouverture du passage nécessiterait un changement de conformation majeur. Ceci implique que la structure de BetP rapportée dans (Ressl et al., 2009) constituerait un état intermédiaire symétrique dans le mécanisme de cotransport couplé au  $\text{Na}^+$  que nous avons jusqu'à maintenant caractérisé uniquement à l'aide de structures orientées vers l'extérieur ou l'intérieur de la membrane (LeuT<sub>Aa</sub>, Mhp1). Cependant, dans des travaux plus récents, le même groupe obtient la structure 3D du mutant BetP-G153D à une résolution de 3,35 Å dans une conformation ouverte vers le cytoplasme (Perez et al., 2011). Cette mutation nuit à l'affinité de BetP pour la bétaine, mais rend la protéine apte à effectuer un transport de  $\text{Na}^+$ /choline et même de  $\text{H}^+$ /choline. Ainsi, on retrouve une molécule de choline dans le site de liaison d'un des monomères composant le trimère qui a été cristallisé. De façon étonnante, une superposition de cette nouvelle structure avec la structure occluse de BetP soutient un mouvement de type corps rigide du « *bundle* » (STM 3, 4, 8 et 9) par rapport à l'échafaud (STM 5 à 7 et 10 à 12).

Ceci amène les auteurs à reconsidérer leur postulat sur la nature intermédiaire de la structure occluse de BetP qu'ils avaient présentée dans (Ressl et al., 2009) et décident que dorénavant on référerait à cette structure comme représentant une conformation occluse faisant face à l'intérieur de la cellule.

### 1.1.4 vSGLT

Le transporteur de Na<sup>+</sup>/galactose exprimé dans la bactérie *Vibrio parahaemolyticus* (vSGLT) fait partie de la famille des symporteurs de sodium/soluté (SSS, SLC5) dont les membres cotransportent des sucres, des acides aminés, des cations inorganiques et des vitamines (Wright et al., 2004; Wright and Turk, 2004). Il possède une identité de séquence de 32% (60% de similarité) avec son homologue humain, le cotransporteur de Na<sup>+</sup>/glucose SGLT1. En 2008, le laboratoire de Abramson a obtenu la structure cristallographique de vSGLT lié au galactose à une résolution de 2,7 Å dans une conformation orientée vers l'intérieur de la cellule (Faham et al., 2008). Des 543 résidus constituant vSGLT, 512 ont été reconstruits. La structure présente 14 STM<sup>1</sup> dont un cœur fonctionnel de 2 répétitions topologiques inversées de 5 hélices transmembranaires (STM 1 à 5 et STM 6 à 10) pouvant être superposées par une rotation d'environ 153° par rapport au plan de la membrane (Figure 1.10). Les hélices 1 et 6 sont brisées près du centre de la membrane au niveau des résidus Ile 65, Ser 66 et Ala 67 (STM 1) et Phe 266, Asn 267, Gln 268 et Tyr 269 (STM6). Les extrémités N et C terminales se trouvent dans le périplasme.

---

<sup>1</sup> Dans les publications subséquentes à celle présentant la première structure de vSGLT, le système de numérotation des STM a été revu de façon à ce qu'il y ait une correspondance avec les STM de LeuT. Ainsi, les 14 STM de vSGLT sont maintenant numérotés comme suit : -1, 1, 2, ..., 13. Nous utilisons d'emblée cette convention pour discuter de la première structure de vSGLT.



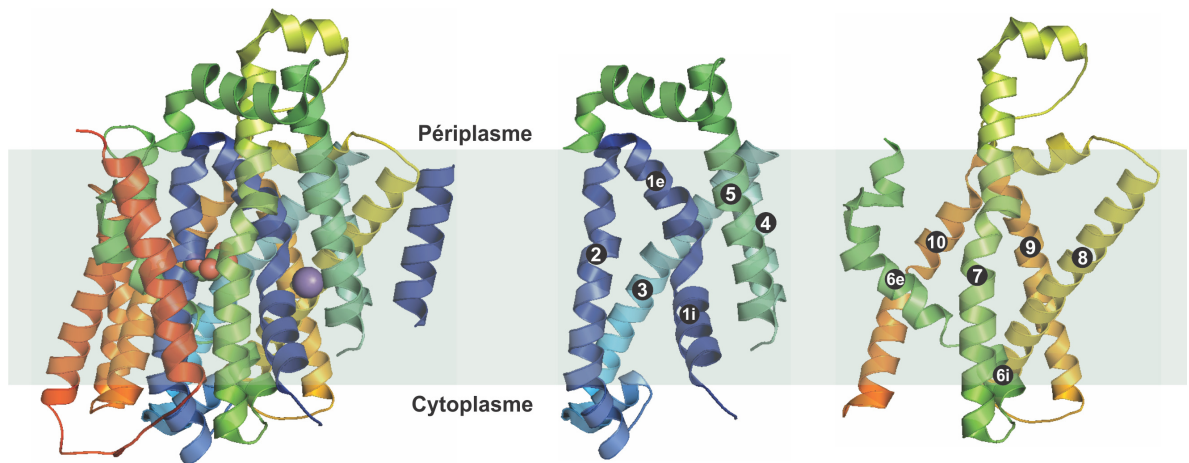


Figure 1.10 Structure occluse orientée vers l'intérieur de vSGLT en complexe avec un galactose et un ion  $\text{Na}^+$  (postulé). On a aussi représenté les deux répétitions inversées.

Dans la structure de vSGLT, le galactose est situé au centre de la membrane et son anneau pyranose interagit avec le résidu aromatique Tyr 263 qui bloque l'accès au vestibule intracellulaire près de l'interruption dans le STM 6 (Figure 1.11). Cet acide aminé, en plus de Tyr 262 et Trp 264 forment la porte mince intracellulaire. De l'autre côté, les résidus hydrophobes Met 73, Tyr 87 et Phe 424 constituent la porte mince extracellulaire qui permettrait de retenir le galactose dans son site une fois le vestibule extracellulaire ouvert. Les acides aminés formant les portes minces de vSGLT jouent un rôle crucial dans l'occlusion du substrat car ils sont conservés dans la famille SLC5. La coordination des groupes hydroxyle du galactose est assurée par des ponts hydrogènes avec les chaînes latérales des résidus Gln 69, Glu 88, Ser 91, Asn 260, Lys 294 et Gln 428. La mutation de chacun de ces acides aminés en alanine résulte en l'abolition du transport de galactose dans des protéoliposomes, sauf pour S91A, ce qui démontre leur importance dans le mécanisme de transport.

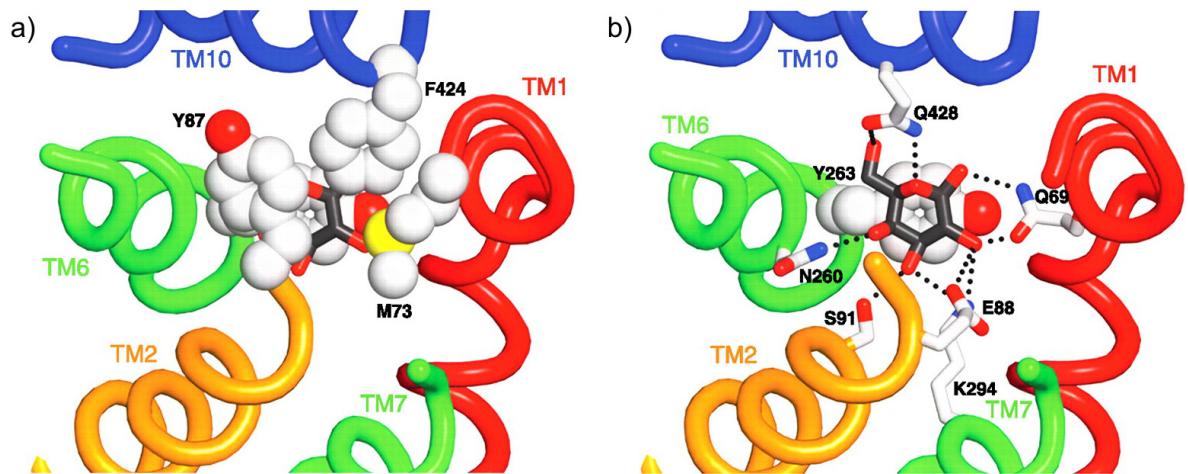


Figure 1.11 Vue de l'extérieur de la membrane illustrant les portes extracellulaires (a) et le site de liaison du galactose (b) dans vSGLT (tirée de (Wright et al., 2011)).

La présence d'un ion  $\text{Na}^+$  dans vSGLT n'est pas démontrée hors de tout doute à cause de la résolution insuffisante de la structure et de l'impossibilité de cristalliser avec les ions  $\text{Rb}^+$  et  $\text{Cs}^+$ . Cependant, en comparant vSGLT avec la structure de LeuT (Yamashita et al., 2005), on a pu proposer un site potentiel pour le  $\text{Na}^+$  (Figure 1.12) similaire au site Na2 de LeuT. Situé à environ 10 Å du site du galactose, près du STM 8 et de la portion brisée du STM 1, l'ion  $\text{Na}^+$  serait coordonné par les oxygènes carbonyle de Ala 62, Ile 65 (STM1) et Ala 361 (STM 8). De plus, l'oxygène hydroxyle de Ser 365 (STM 8) pourrait former un pont hydrogène avec le  $\text{Na}^+$ . Ce résidu est conservé dans la famille SLC5 et est essentiel à la fonction de vSGLT, ce qui appuie l'idée que le site proposé est effectivement un site de liaison pour le  $\text{Na}^+$ . Cependant, la distance supérieure entre l'ion  $\text{Na}^+$  modélisé et les résidus qui le coordonnent dans vSGLT (3,1-3,8 Å) comparé à LeuT (2,2-2,5 Å) et Mhp1 (2,1-2,7 Å) laisse envisager que le  $\text{Na}^+$  est instable ou absent du site proposé dans la structure cristallographique de vSGLT (Abramson and Wright, 2009). Ceci est soutenu par des simulations de DM effectuées par un autre groupe (Li and Tajkhorshid, 2009) qui démontrent que l'ion  $\text{Na}^+$  diffuse à l'extérieur de son site vers le vestibule intracellulaire après seulement quelques nanosecondes. Lors de sa diffusion, l'ion  $\text{Na}^+$  interagit avec le

résidu chargé Asp 189 (STM 5) situé à environ 5 Å du site de liaison Na2. Ce résidu est conservé dans la famille SLC5 et pourrait avoir la fonction d'attirer l'ion  $\text{Na}^+$  afin de faciliter la diffusion hors de son site. La différence structurale entre le site Na2 de LeuT, dans lequel l'ion  $\text{Na}^+$  demeure stable pendant des dizaines de ns de DM (Celik et al., 2008), et le site observé dans vSGLT semble provenir de l'angle supérieur entre les STM 1 et 8 de vSGLT par rapport à ceux de LeuT.

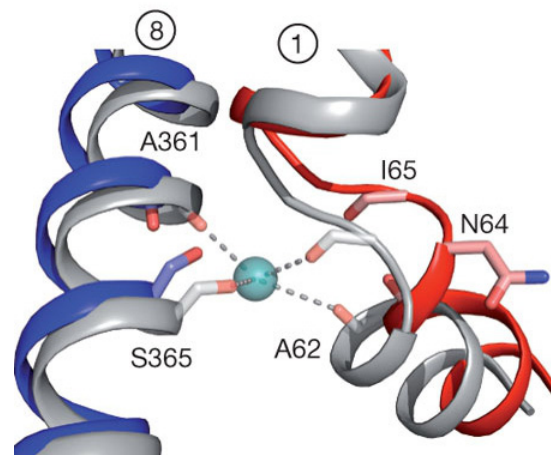


Figure 1.12 Site de liaison du  $\text{Na}^+$  dans vSGLT.

Présenté dans la conformation occluse orientée vers l'intérieur (gris) et dans la conformation ouverte vers l'intérieur sans ligands (couleurs). Le changement de conformation produit une inclinaison de  $\sim 13^\circ$  dans la portion brisée du STM 1 qui nuit à la coordination de l'ion  $\text{Na}^+$  (tirée de (Watanabe et al., 2010)).

En 2010, le groupe d'Abramson décide lui aussi d'étudier la stabilité de l'ion  $\text{Na}^+$  (Watanabe et al., 2010). Ils observent que l'ion  $\text{Na}^+$  quitte son site après seulement 9 ns de DM, confirmant ainsi l'idée qu'il n'y est pas lié de façon stable. Suite à la libération du  $\text{Na}^+$ , le résidu Asn 64, situé dans la portion brisée du STM 1, forme un pont hydrogène avec le groupe O2 hydroxyle du galactose ainsi qu'avec la chaîne latérale du résidu formant la porte mince intracellulaire, Tyr 263. En continuant la simulation de DM, les auteurs

constatent que les liens entre Asn 64, Tyr 263 et le galactose se brisent, ce qui permet à la chaîne latérale de Tyr 263 d'adopter une nouvelle conformation rotamère (entre 52 et 110 ns) qui engendre la libération du galactose (~110 ns) vers le vestibule intracellulaire puis le retour de Tyr 263 dans sa conformation originale. Par contre, des simulations récentes présentées par le groupe de Tajkhorshid (Li and Tajkhorshid, 2011) indiquent que le galactose quitterait plutôt son site de liaison en suivant d'abord un chemin parallèle au plan de la membrane plasmique, puis en contournant Tyr 263, résultant en un mécanisme de relâchement qui est indépendant de la rotation de la chaîne latérale de Tyr 263.

Afin d'approfondir la compréhension du couplage entre le site Na<sup>2</sup> et le substrat, le groupe d'Abramson obtient la structure cristallographique ouverte vers l'intérieur sans ligands du mutant Lys 294 Ala de vSGLT à une résolution de 2,7 Å (Watanabe et al., 2010). L'architecture de cette nouvelle conformation est similaire à celle de la structure occluse (Figure 1.13). La comparaison des deux structures permet d'identifier le « *hash motif* » composé des STM 3 et 4 ainsi que de leurs équivalents dans la répétition inversée, les STM 8 et 9. Le « *hash motif* » des deux structures peut être superposé avec un RMSD de 0,9 Å. De plus, les STM 2, 6 et 7 forment le groupe échafaud (« *sugar bundle* ») qui peut être superposé avec un RMSD de 0,5 Å. Ces résultats appuient l'hypothèse que la transition entre les conformations occluse et ouverte s'effectue à l'aide d'un mouvement de type corps rigide du « *hash motif* » et du groupe échafaud qui s'éloignent de 3° chacun l'un par rapport à l'autre (Figure 1.13). Cet écartement augmente le volume du vestibule intracellulaire d'environ 1400 Å<sup>3</sup>, permettant à davantage de molécules d'eau d'atteindre le site du galactose afin de faciliter sa libération. Cependant, le mouvement du STM 1 est indépendant de ce mécanisme. En effet, dans la conformation ouverte la portion de l'hélice 1 située sous sa région brisée s'incline de 13° vers le corps de la structure et vient moduler les interactions de Asn 64. En absence de Na<sup>+</sup> et de galactose, Asn 64 effectue des ponts hydrogène avec Tyr 263 et Glu 88. Dans la structure occluse, Glu 88 coordonnait deux groupes hydroxyle du galactose. La conformation ouverte vers l'intérieur est aussi stabilisée par le pont hydrogène entre Ser 365, qui coordonnait le Na<sup>+</sup>, et Glu 68 de la portion brisée du STM 1. Dans l'ensemble, ces données suggèrent que Asn 64, qui brise ses

liens avec Tyr 263 et le galactose suite à l'inclinaison de la portion inférieure du STM 1, joue un rôle clé dans le lien structural qui contribue au couplage entre les sites de liaison du substrat et du  $\text{Na}^+$ .

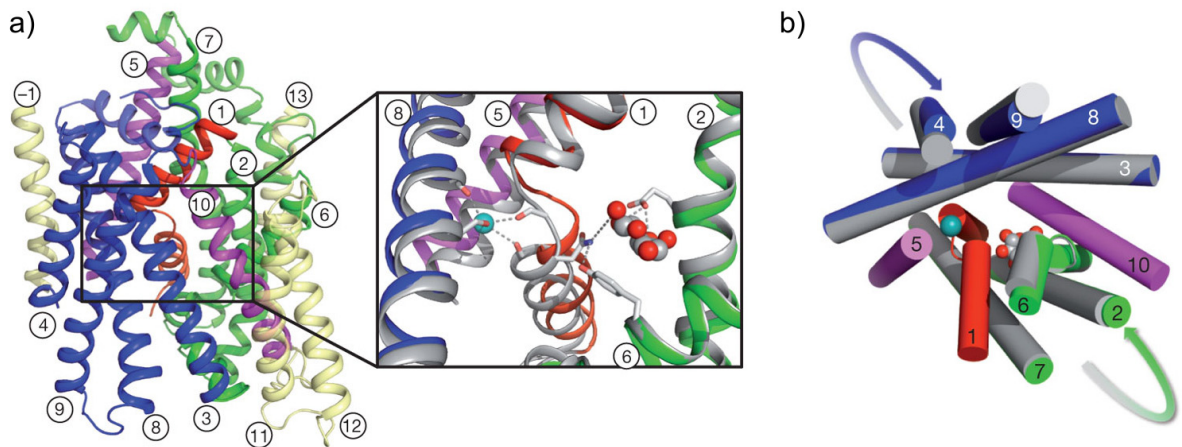


Figure 1.13 Structure ouverte vers l'intérieur de vSGLT et sa superposition avec la structure ocluse (tirée de (Watanabe et al., 2010)).

a) Structure ouverte vers l'intérieur qui illustre le « *hash motif* » en bleu et le « *sugar bundle* » en vert. b) Changement de conformation représenté par la superposition des cœurs fonctionnels des deux structures (structure ocluse en gris).

### 1.1.5 CaiT, ApcT et AdiC

D'autres transporteurs dont nous n'avons pas discuté jusqu'à maintenant possèdent aussi une répétition topologique inversée et partagent l'architecture de la superfamille structurale de LeuT<sub>Aa</sub>. C'est le cas de l'antiporteur de carnitine/butyrobétaine indépendant du  $\text{Na}^+$  et des  $\text{H}^+$  CaiT, un membre de la famille BCCT. On a obtenu des structures de CaiT provenant des procaryotes *Proteus mirabilis* (Pm) et *Escherichia coli* (Ec) à 2,3 Å et 3,5 Å respectivement (Schulze et al., 2010). Dans les deux cas, la protéine est dans une conformation orientée vers l'intérieur. EcCaiT est liée à deux molécules de butyrobétaine, une située dans un site au centre de la membrane, et une autre dans une poche près de la

surface extracellulaire de la membrane, tandis que PmCaiT ne comporte aucun ligand. Le site central de CaiT coordonne le substrat à l'aide de quatre résidus Trp qui forment une boîte autour de la butyrobétaine, comme dans le transporteur de  $\text{Na}^+$ /bétaine BetP. La principale différence entre les deux structures est attribuable à une rotation de  $60^\circ$  de Trp 323 (STM 8) dans PmCaiT qui vient encombrer le site de liaison vide. Les auteurs proposent que le site extracellulaire de CaiT agisse comme un régulateur allostérique de l'antiport.

ApcT, un membre de la famille des transporteurs d'acides aminés, polyamines et organocations (APC), possède aussi une architecture similaire à celle de LeuT<sub>Aa</sub>. ApcT est indépendant du  $\text{Na}^+$  et est actif à pH acide. Il est capable de coupler les protons au transport d'une large gamme d'acides aminés. La structure d'ApcT a été résolue à 2,35 Å dans une conformation occluse orientée vers l'intérieur de la cellule (Shaffer et al., 2009). Un alignement de structure révèle que la chaîne latérale de Lys 158 (STM 5), qui pourrait être protonée pendant le cotransport afin d'initier l'isomérisation de ApcT vers sa conformation orientée vers l'extérieur, est située au même endroit que le site Na2 de LeuT<sub>Aa</sub>.

On a aussi obtenu des structures de l'antiporteur d'acides aminés AdiC, lui aussi membre de la famille APC. Ce dernier échange l'arginine ( $\text{Arg}^+$ ) extracellulaire contre l'agmatine ( $\text{Agm}^{2+}$ ) intracellulaire, le produit de décarboxylation de l'arginine, afin de réguler le pH de procaryotes comme *Ec*. AdiC a d'abord été cristallisé dans une conformation ouverte vers l'extérieur par deux groupes (Fang et al., 2009; Gao et al., 2009), ce qui a révélé une architecture similaire à celle des symporteurs couplés au  $\text{Na}^+$ . On a ensuite obtenu la structure de AdiC-N22A dans une conformation occluse faisant face à l'extérieur de la cellule, en complexe avec le substrat  $\text{Arg}^+$  (Gao et al., 2010). En comparant ces conformations avec la structure occluse de LeuT<sub>Aa</sub> liée à la leucine, on a constaté que la structure ouverte vers l'extérieur de AdiC était plus semblable au complexe LeuT<sub>Aa</sub>-leu que le complexe AdiC- $\text{Arg}^+$  pouvait l'être, notamment à cause des positions relatives du STM 6. En effectuant un alignement de structure entre l'état ouvert vers l'extérieur et l'état occlus de AdiC, on a pu identifier un mouvement important d'environ  $40^\circ$  de l'hélice 6a

par rapport à la portion brisée du STM 6, en plus de légers déplacements vers l'intérieur des STM 2 et 10 (Figure 1.14a). Ce mouvement du STM 6a a pour effet de positionner le Trp 202 juste au dessus de la chaîne aliphatique du substrat Arg<sup>+</sup> afin de bloquer le passage vers le milieu extracellulaire (Figure 1.14b).

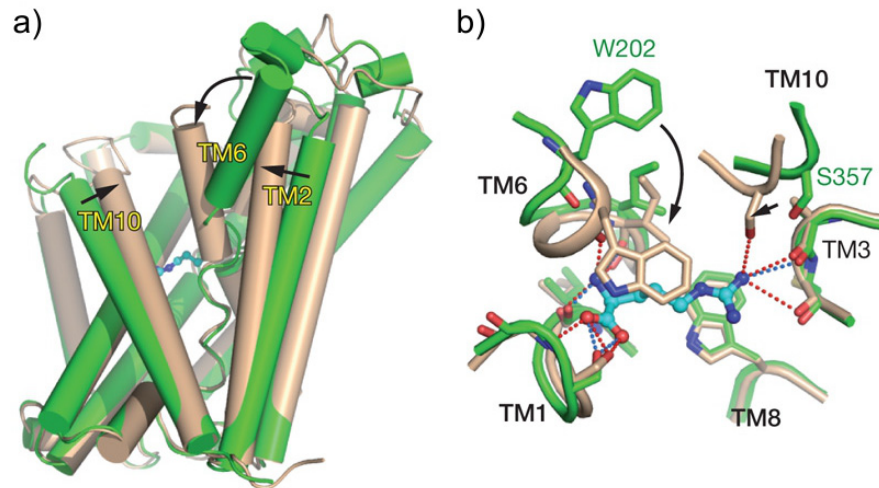


Figure 1.14 Changement de conformation dans le cotransporteur AdiC (tirée de (Gao et al., 2010)).

a) Superposition des structures sans ligands (vert) et liée à l'arginine (gris) de AdiC. b) Le mouvement de Trp 202 vient occlure le substrat.

### 1.1.6 Mécanismes de cotransport et discussion

De façon remarquable, les cœurs fonctionnels de 10 STM de LeuT<sub>Aa</sub>, Mhp1, BetP et vSGLT peuvent être superposé avec un RMSD de 3,8 à 4,5 Å même s'ils ne partagent aucune similarité notable au niveau de leur séquence. Dans chaque cas, les deux répétitions structurelles inversées constituant ce cœur hébergent les sites de liaison des substrats dont la sélectivité provient de l'interaction avec des résidus précis. La première hélice de chaque répétition est toujours brisée à proximité du centre de la membrane plasmique ce qui expose les résidus de la chaîne principale à cet endroit en plus de fournir un environnement polaire

pour la coordination des ligands. Le fait que les structures de protéines membranaires opérant à l'aide de modes de couplages variés, mais possédant une architecture atomique commune, aient été obtenues dans des conformations diverses qui présentent un vestibule aqueux orienté vers l'extérieur (LeuT<sub>Aa</sub>, Mhp1, AdiC) ou l'intérieur (Mhp1, BetP, vSGLT, CaiT, ApcT) de la cellule ainsi qu'une capacité à occlure le substrat vient appuyer solidement le mécanisme d'accès alterné.

Par contre, les hypothèses qui peuvent être dégagées concernant les changements de conformation attribuables au mécanisme d'accès alterné ne font pas encore l'unanimité. S'agit-t-il d'un mouvement des portions partielles des STM brisés 1 et 6 par rapport à leurs portions brisées qui vient ouvrir et fermer le vestibule, proposé pour LeuT<sub>Aa</sub>, ou d'un mouvement de type corps rigide de deux motifs de STM l'un par rapport à l'autre, proposé pour Mhp1 ? (Pour des revues voir (Abramson and Wright, 2009; Forrest and Rudnick, 2009; Krishnamurthy et al., 2009; Forrest et al., 2011).)

L'inhibition compétitive de LeuT par le tryptophane a été démontrée avec l'obtention d'une structure où cet acide aminé est lié au site du substrat (Singh et al., 2008). Cette structure montre une conformation ouverte vers l'extérieur dans laquelle le vestibule est élargi par rapport à l'état occlus. Les groupes  $\alpha$ -amine et  $\alpha$ -carboxyle du Trp sont décalés d'environ 2 Å dans le site de liaison par rapport à la position des mêmes groupes dans la structure occluse liée à la leucine. C'est la chaîne latérale du Trp qui empêche la formation de la structure occluse en rendant impossible la création du pont hydrogène normalement présent entre le substrat et le groupe hydroxyle du résidu Tyr 108 (STM 3). Cela engendre une accessibilité accrue au site de liaison grâce à un élargissement d'environ 3 Å entre les résidus Tyr 108 (STM 3) et Phe 253 (STM 6) de la porte extracellulaire. Ces résultats permettent de corroborer l'hypothèse élaborée par Gouaux en 2005 (Yamashita et al., 2005) qui proposait que le changement de conformation qui ouvre le vestibule extracellulaire de LeuT<sub>Aa</sub> implique un mouvement des hélices 1 et 6 par rapport à leurs portions centrales brisées qui jouent le rôle d'un pivot. En effet, l'analyse comparative des complexes LeuT-Trp et LeuT-Leu suggère que les segments 1b et 6a ont la possibilité de



bouger indépendamment des portions 1a et 6b orientées vers la face intracellulaire de la membrane, et donc que les STM 1, 2, 6 et 7 ne constitueraient pas un corps rigide (motif « *bundle* »). Ceci est aussi appuyé par les structures de AdiC dans lesquelles un mouvement du STM 6a par rapport à sa portion brisée est observé en comparant l'état ouvert vers l'extérieur à l'état occlus (Gao et al., 2010).

Le mécanisme du changement de conformation menant à l'accès-alterné postulé pour Mhp1 (Shimamura et al., 2010) est différent de celui mis de l'avant par Gouaux pour LeuT. Il est plus près du mécanisme « *rocking-bundle* », élaboré par Forrest et Rudnick (Forrest et al., 2008; Forrest and Rudnick, 2009), qui propose un mouvement quasi symétrique de type corps rigide des STM 1, 2, 6 et 7 par rapport au reste du cœur fonctionnel (STM 3, 4, 5, 8, 9, 10). Cependant, dans le cas de Mhp1 le groupe échafaud (« *hash motif* ») n'est composé que des STM 3, 4, 8 et 9, alors que les STM 5 et 10 peuvent plier de façon presque stochastique dans les conformations intracellulaires et extracellulaires, respectivement, et jouent le rôle de portes minces. Les structures de vSGLT (Watanabe et al., 2010) constituent un cas intermédiaire où les motifs formés des STM 3, 4, 8, 9 et des STM 2, 6 et 7 bougent comme un corps rigide l'un par rapport à l'autre lors de l'ouverture de la cavité intracellulaire, alors que la portion inférieure du STM 1 plie de 13°. Il est aussi intéressant de noter que dans la portion extracellulaire fermée de vSGLT, le STM10 adopte une conformation similaire à celle du STM 10 dans la conformation occluse de Mhp1 (Wright et al., 2011).

## 1.2 Cinétique de SGLT1

L'analyse de la cinétique du transporteur électrogénique SGLT1 permet de formuler des hypothèses concernant des caractéristiques précises du mécanisme de fonctionnement du transporteur. Dans cette section, nous détaillons l'état actuel des connaissances relatives aux courants transitoires produits par SGLT1, aux modèles cinétiques qui ont été utilisés pour expliquer et prédire la façon dont les courants de SGLT1 sont générés, et à

l'estimation de la fréquence des cycles de translocation (« *turnover rate* » (TOR)) du cotransporteur. Nous abordons aussi la question de la perméabilité à l'eau associée à la présence de SGLT1.

### 1.2.1 Courants transitoires

La présence de transitions cinétiques dépendantes du voltage dans le mécanisme de cotransport de SGLT1 implique que des charges mobiles qui sentent le voltage membranaire sont capables d'utiliser l'énergie contenue dans ce potentiel pour générer des changements de conformation. On peut mesurer la conséquence de ces mouvements de charges, les courants transitoires, en générant des sauts de potentiel membranaire ( $V_m$ ) en absence de glucose. En effet, la présence d'une concentration saturante de glucose ou de phlorizine (Pz) inhibe complètement les courants transitoires (Parent et al., 1992a; Loo et al., 1993; Gagnon et al., 2007). Afin d'isoler la cinétique pré-stationnaire de SGLT1 des courants endogènes de l'ovocyte, on peut procéder de deux façons différentes. La première stratégie consiste à lisser le courant total mesuré suite à un saut de potentiel à l'équation suivante

$$I_{\text{tot}}(t) = I_{\text{cap}} \exp(-t/\tau_{\text{cap}}) + \sum_n I_n \exp(-t/\tau_n) + I_{\text{ss}}, \quad (1.1)$$

où  $I_{\text{cap}} \exp(-t/\tau_{\text{cap}})$  approxime la relaxation du courant capacitif attribuable à la membrane lipidique de l'ovocyte à partir de la valeur initiale  $I_{\text{cap}}$  (typiquement,  $\tau_{\text{cap}} \cong 0,5 - 1$  ms (Parent et al., 1992a; Loo et al., 1993) et est indépendante du voltage), et la combinaison linéaire  $\sum_n I_n \exp(-t/\tau_n)$  décrit le courant transitoire de SGLT1. Le dernier terme,  $I_{\text{ss}}$ , fait référence à la valeur stationnaire vers laquelle le courant total relaxe, composée des courants endogènes de l'ovocyte (Weber, 1999; Sobczak et al., 2010) et du courant de fuite spécifique à SGLT1 (Umbach et al., 1990). On a donc accès aux courants transitoires en isolant le deuxième terme de l'équation. Une approche alternative équivalente consiste à soustraire le courant mesuré en présence de Pz du courant total de l'ovocyte. Le courant résultant, que l'on nomme courant sensible à la Pz (Figure 1.15), est

alors composé uniquement des courants transitoires de SGLT1 qui relaxent vers le courant de fuite du cotransporteur.

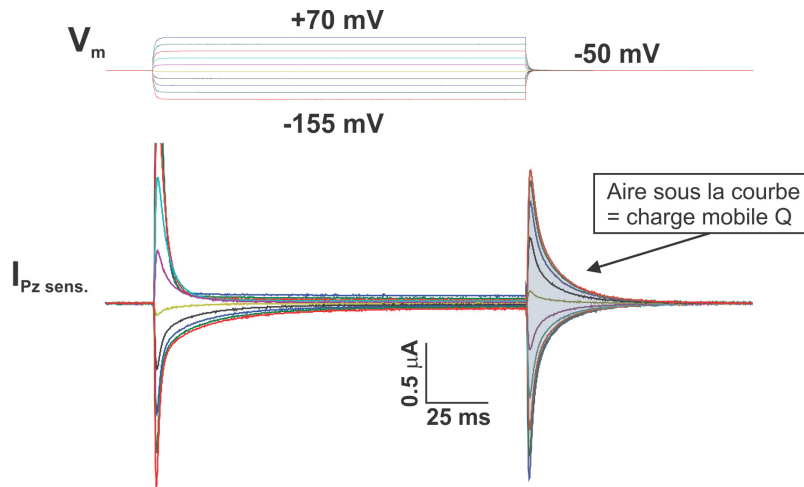


Figure 1.15 Courants sensibles à la Pz de hSGLT1 mesurés en fonction du voltage membranaire.

L'aire sous la courbe de la relaxation des courants représente la charge mobile  $Q$ .

On peut obtenir la valeur de la charge mobile ( $Q$ ) associée à l'activité électrogénique de SGLT1 en intégrant les courants transitoires mesurés à différents  $V_m$ . Les charges transférées lors des sauts de voltage ON et OFF sont généralement identiques. En assumant que le mouvement de charge dans le champ électrique membranaire résulte d'une simple transition entre deux conformations du transporteur, il est possible de décrire analytiquement la relation  $Q(V_m)$  en termes d'une fonction de Boltzmann

$$Q = Q_{\max} / [1 + \exp(zF(V_m - V_{1/2})/RT)] + Q_{\text{hyp}}, \quad (1.2)$$

où  $Q_{\max} = Q_{\text{dep}} - Q_{\text{hyp}}$ , avec  $Q_{\text{dep}}$  et  $Q_{\text{hyp}}$  représentant les valeurs absolues de la charge aux limites de dépolarisation et d'hyperpolarisation,  $V_{1/2}$  est le potentiel auquel 50% de  $Q_{\max}$  est déplacée,  $z$  modélise la valence apparente de la charge transférée,  $F$  est la

constante de Faraday ( $96500 \text{ C mole}^{-1}$ ) et  $R$  la constante des gaz ( $8,31 \text{ J mole}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ). Dans cet ordre d'idées, on note qu'un groupe a généralisé la fonction de Boltzmann à une transition impliquant trois états (Krofchick et al., 2004).

La charge déplacée maximale  $Q_{\max}$  obtenue en présence d'une concentration saturante de  $\text{Na}^+$  permet d'évaluer le nombre de transporteurs ( $N$ ) qui sont exprimés à la membrane plasmique. Sachant que

$$Q_{\max} = N \times z \times e, \quad (1.3)$$

où  $e$  est la charge élémentaire, on calcule que  $N \sim 10^{11}$  en considérant que  $z = 1$  et  $Q_{\max} = 25 \text{ nC}$  à  $100 \text{ mM Na}^+$ , tel que déduit d'un lissage à la fonction de Boltzmann (Loo et al., 1993). Cependant, les modèles cinétiques de SGLT1 qui ont été mis de l'avant jusqu'à maintenant suggèrent que le transporteur possède une charge intrinsèque de  $-2e$  qui serait neutralisée suite à la liaison des ions  $\text{Na}^+$  (Parent et al., 1992b; Loo et al., 1993; Loo et al., 2006; Gagnon et al., 2007), ce qui contraste avec la valence ( $z$ ) découlant du lissage de Boltzmann. De plus, une étude où des membranes cryo-décapées qui expriment SGLT1 ont été inspectées au microscope électronique propose qu'une valence de  $3,5e$  par molécule de SGLT1 permet de corrélérer la charge totale d'un ovocyte ( $Q_{\max}$ ) à la densité de SGLT1 ( $N$ ) sur les membranes gelées (Zampighi et al., 1995).

Dans les premières études d'électrophysiologie à deux microélectrodes (résolution temporelle de 1 à 3 ms) qui ont suivi le clonage de SGLT1 et son expression dans des ovocytes, on arrive à expliquer la cinétique des courants transitoires de SGLT1 à l'aide d'une seule constante de temps dépendante du voltage qui varie entre 2 et 15 ms (Parent et al., 1992a; Loo et al., 1993). On trouve qu'une diminution de la concentration de  $\text{Na}^+$  à l'extérieur de la cellule ( $[\text{Na}^+]_o$ ) accélère la cinétique pré-stationnaire aux potentiels négatifs, en plus de diminuer la quantité de charge transférée  $Q_{\max}$  et de déplacer  $V_{1/2}$  vers des valeurs plus négatives.

Quelques années plus tard, en analysant des courants mesurés à l'aide de la technique de l'ovocyte « *cut-open* », qui permet d'atteindre un voltage imposé en environ

80  $\mu\text{s}$  (Stefani and Bezanilla, 1998), on découvre que les courants transitoires de SGLT1 relaxent selon une cinétique caractérisée par 2 constantes de temps (Chen et al., 1996). Une nouvelle constante rapide (0,4 à 0,8 ms) et indépendante du voltage est identifiée, tandis que la seconde, plus lente (2 à 10 ms) et modulée par le voltage correspond à celle qu'on avait mesurée auparavant. De façon étonnante, on constate que même en absence de  $\text{Na}^+$  les courants transitoires de SGLT1 nécessitent une somme de deux exponentielles afin d'être reproduits. Ceci suggère que la réorientation du transporteur libre dans la membrane plasmique doit s'effectuer en deux étapes distinctes. De plus, la dépendance en  $\text{Na}^+$  de  $Q_{\text{max}}$ , de  $V_{1/2}$  et de la vitesse de relaxation des courants (Figure 1.16), ainsi que le fait qu'il subsiste un mouvement de charges en absence de  $\text{Na}^+$  appuie l'hypothèse que la dépendance en voltage de SGLT1 proviendrait du déplacement des ions  $\text{Na}^+$  près de leurs sites de liaison situés dans le champ électrique membranaire, et de la réorientation dépendante du voltage du transporteur vide.

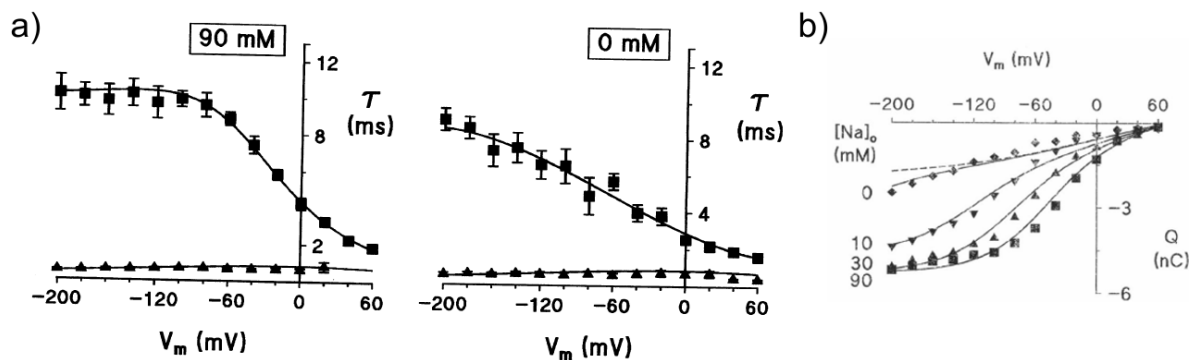


Figure 1.16 Constantes de temps et courbes  $Q(V_m)$  de SGLT1.

a) Dépendance en voltage des deux constantes de temps à 90 et 0 mM  $[\text{Na}^+]_o$ . b) Effet de  $[\text{Na}^+]_o$  sur la courbe  $Q(V_m)$ . Les mesures ont été obtenues en « cut-open » et les traits pleins représentent la prédiction d'un modèle cinétique à quatre états (tirée de (Chen et al., 1996)).

L'électrophysiologie à deux microélectrodes a aussi permis d'identifier une phase de montée rapide des courants transitoires ( $\sim 3,5$  ms) avant leur relaxation lors d'une

dépolarisation vers un voltage très positif, par exemple de -50 mV vers +50 mV (Hazama et al., 1997). Des modèles cinétiques proposés pour SGLT1 dans les années 1990 rendent compte de cette observation (Parent et al., 1992b; Panayotova-Heiermann et al., 1994; Hazama et al., 1997), mais prédisent que la montée vers le pic de courant doit s'effectuer encore plus rapidement ( $\sim 0,5$  ms), ce qui est partiellement attribuable à l'utilisation d'un saut de voltage instantané pour simuler les courants (Hazama et al., 1997). Une étude plus approfondie du phénomène est entreprise plus tard à l'aide de la technique de l'ovocyte « *cut-open* » sur le mutant Q457C de hSGLT1 (Loo et al., 2005). En présence de 100 mM  $[\text{Na}^+]_o$ , des sauts de voltage dépolarisants révèlent la montée rapide du courant vers un pic d'une largeur d'environ 1 ms selon une constante de temps de 0,17 ms. Le temps requis pour atteindre le pic (0,9 ms) diminue avec  $[\text{Na}^+]_o$  et lorsque le potentiel devient moins positif. En absence de  $[\text{Na}^+]_o$  la phase montante n'est plus observée. Dans cette étude, on s'intéresse aussi au comportement de SGLT1 pendant des sauts de potentiels d'une durée de 500 ms. On identifie alors une constante de temps dépendante du voltage très lente (30-100 ms) qui est présente peu importe la valeur de  $[\text{Na}^+]_o$ .

À ce jour, il n'existe pas de consensus quant à l'origine moléculaire des courants transitoires mesurés chez SGLT1. Il est possible que la source des courants transitoires chez les cotransporteurs soit attribuable à l'effet d'un puits ionique (« *ion-well* »), c'est-à-dire au déplacement de substrats chargés dans un conduit qui traverse le champ électrique membranaire pour se rendre aux sites de liaison (Mitchell, 1972; Lauger and Jauch, 1986). D'autre part, ces courants pourraient être la conséquence du mouvement d'acides aminés chargés ou polaires qui se redistribuent dans la membrane en réponse à une modulation du champ électrique membranaire. Un tel déplacement de charges intrinsèques à la protéine rappelle celui du senseur de voltage qui produit les courants de « *gating* » et qui contrôle l'ouverture et la fermeture des canaux ioniques sensibles au voltage (Bezaniilla, 2000, 2008). Plusieurs études ont tenté d'identifier, avec un niveau modeste de succès, la provenance de ces mouvements de charges en mutant des résidus chargés de SGLT1 (Panayotova-Heiermann et al., 1994; Lo and Silverman, 1998; Panayotova-Heiermann et al., 1998; Huntley et al., 2004). Il a été suggéré que des résidus neutres polaires ou des

groupes carbonyles de la chaîne principale auraient une fonction dans la détermination de la valence du senseur de voltage (Panayotova-Heiermann et al., 1994). La structure cristallographique de vSGLT (Faham et al., 2008) permettra sans doute d'approfondir les connaissances à ce sujet, car on sait maintenant que le site Na<sub>2</sub> coordonne le Na<sup>+</sup> à l'aide de résidus polaires ou neutres. De plus, on peut penser que les dipôles produits par les hélices brisées (STM 1 et 6) sont importants dans le mécanisme de sensibilité au voltage de SGLT1.

### 1.2.2 Modélisation cinétique

La modélisation cinétique est une représentation des liens dynamiques qui existent entre les différentes conformations qu'un cotransporteur adopte afin de générer les courants pré-stationnaires et les courants stationnaires qui caractérisent sa fonction. La vue d'ensemble apportée par ce type de modèle permet de contextualiser les structures cristallographiques connues d'un transporteur et d'évaluer leur importance dans le cycle de cotransport. Les modèles cinétiques qui ont été proposés jusqu'à maintenant pour SGLT1 sont basés sur le mécanisme d'accès alterné, qui soutient que les sites de liaison du cotransporteur sont accessibles d'un seul côté de la membrane plasmique à la fois. Comme nous l'avons souligné dans la section 1.1, les données cristallographiques récentes obtenues pour les membres de la famille structurale de LeuT appuient l'idée que l'homologue procaryote de SGLT1, vSGLT, utilise ce mode de fonctionnement.

À la fin des années 1980, le clonage et l'expression de SGLT1 de lapin dans des ovocytes engendrent les premiers résultats expérimentaux constituant une base de données détaillée sur les propriétés électrogéniques du cotransporteur (Umbach et al., 1990; Birnir et al., 1991; Parent et al., 1992a). Le laboratoire de Wright propose alors un modèle cinétique symétrique à 6 états (Figure 1.17) dans le but de rationaliser les observations sur le cotransport Na<sup>+</sup>/glucose (Parent et al., 1992b). Les états C1 et C2 représentent le transporteur vide dans des conformations où les sites de liaison font face à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule, respectivement. C3(2Na<sup>+</sup>) et C6(2Na<sup>+</sup>) réfèrent au transporteur dans les cas où ses deux sites pour le Na<sup>+</sup> sont occupés, tandis que dans les états

C4(2Na<sup>+</sup>Glc) et C5(2Na<sup>+</sup>Glc) une molécule de glucose est liée à SGLT1 en plus des deux ions Na<sup>+</sup>. Selon ce schéma, un cycle de cotransport entrant est constitué de la liaison simultanée de deux ions Na<sup>+</sup> extracellulaires au transporteur vide, suivie de la liaison d'un glucose extracellulaire. Le complexe SGLT1-ligands se réoriente ensuite vers l'intérieur de la cellule afin de relâcher le glucose, puis les deux ions Na<sup>+</sup>. Le transporteur vide repositionne alors ses sites vers la face extracellulaire de la membrane plasmique.

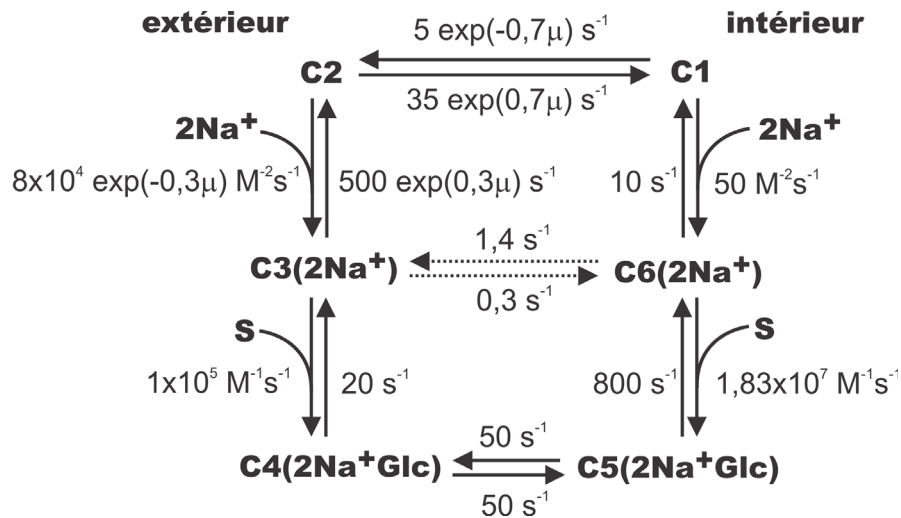


Figure 1.17 Modèle cinétique symétrique à six états de SGLT1 où  $\mu = FV_m/RT$ .

Dans ce modèle, le fait que la liaison des deux ions Na<sup>+</sup> s'effectue en une seule étape implique que la liaison du premier Na<sup>+</sup> est lente par rapport à celle du second Na<sup>+</sup>. Ainsi, on considère que ces deux événements sont coopératifs dans la mesure où une première liaison stimule la suivante. D'autre part, on met de l'avant l'idée que le transporteur vide possède une charge intrinsèque de  $-2e$  qui est neutralisée lorsque les ions Na<sup>+</sup> extracellulaires se lient, faisant en sorte que toutes les transitions subséquentes du cycle de cotransport sont électroneutres. Ainsi, on assume que la réorientation de la protéine libre dans la membrane ( $C1 \leftrightarrow C2$ ) ainsi que la liaison des ions Na<sup>+</sup> ( $C2 \leftrightarrow C3(2Na^+)$ ) sont les seules transitions dont la fréquence peut être modulée par le voltage. Le modèle comprend



aussi une voie de translocation auxiliaire ( $C3(2Na^+) \leftrightarrow C6(2Na^+)$ ) afin de rendre compte de l'observation d'un courant sensible à la Pz et dépendant du  $Na^+$  en absence de glucose, soit le courant de fuite de SGLT1 (Umbach et al., 1990; Parent et al., 1992a). De plus, on effectue les simulations en considérant que  $5 \times 10^{10}$  molécules de SGLT1 sont exprimées à la membrane plasmique d'un ovocyte (Umbach et al., 1990).

Les auteurs admettent que l'ensemble de paramètres numériques qu'il proposent afin de reproduire les données expérimentales rapportées dans (Parent et al., 1992a) n'est pas unique, mais il permet néanmoins de tirer un certain nombre de conclusions concernant du mécanisme de cotransport de SGLT1. Le modèle prédit que les ions  $Na^+$  extracellulaires sentent environ 30 % du champ électrique membranaire lorsqu'ils migrent vers leurs sites de liaison ou lorsque ces sites, une fois occupés, bougent afin de préparer la coordination du glucose. La réorientation du transporteur libre, quant à elle, implique que les sites au  $Na^+$  vides traversent 70 % du champ électrique de la membrane. Les courants transitoires proviennent de la rééquilibration des probabilités d'occupation des états  $C1 \leftrightarrow C2 \leftrightarrow C3(2Na^+)$  lors d'un saut de potentiel membranaire, ce qui fournit une explication au fait que l'amplitude de ces courants dépend de  $[Na^+]_o$ . En présence de  $Na^+$  et de glucose extracellulaires saturants, l'étape limitante de la cinétique stationnaire de cotransport est la réorientation vers l'extérieur du transporteur vide ( $C1 \rightarrow C2$ ) lorsque le potentiel est plus positif que -43 mV. Pour des valeurs de potentiel entre -43 et -134 mV, la fréquence du cotransport est limitée par la dissociation intracellulaire des ions  $Na^+$  ( $C6(2Na^+) \rightarrow C1$ ). À  $[Na^+]_o$  plus faible (<10 mM), la liaison des ions  $Na^+$  extracellulaires devient limitante aux potentiels entre 0 et -134 mV, car le potentiel membranaire module plus fortement  $k_{12}$  que  $k_{23}$ .

Une étude subséquente portant sur l'accessibilité au résidu cystéine du mutant hSGLT1-Q457C vient appuyer la prédiction faite par le modèle quant à l'origine des courants transitoires (Loo et al., 1998). En effet, ce résidu impliqué dans la coordination du glucose n'est accessible à l'agent alkylant 2-aminoéthyl méthanesulfonate hydrobromide (MTSEA) qu'en présence de  $Na^+$  extracellulaire et en absence de glucose et

de Pz (Figure 1.18). Le degré d'accessibilité est faible à 0 mV et augmente aux potentiels hyperpolarisants, ce qui suggère que Q457C n'est accessible que dans la conformation C3(2Na<sup>+</sup>). En normalisant l'accessibilité à la valeur de la charge transférée à -50 mV, on observe une certaine corrélation entre les deux mesures. Ces résultats renforcent l'idée que la courbe  $Q(V_m)$  est attribuable aux changements de conformations dépendants du voltage C1↔C2↔C3(2Na<sup>+</sup>).

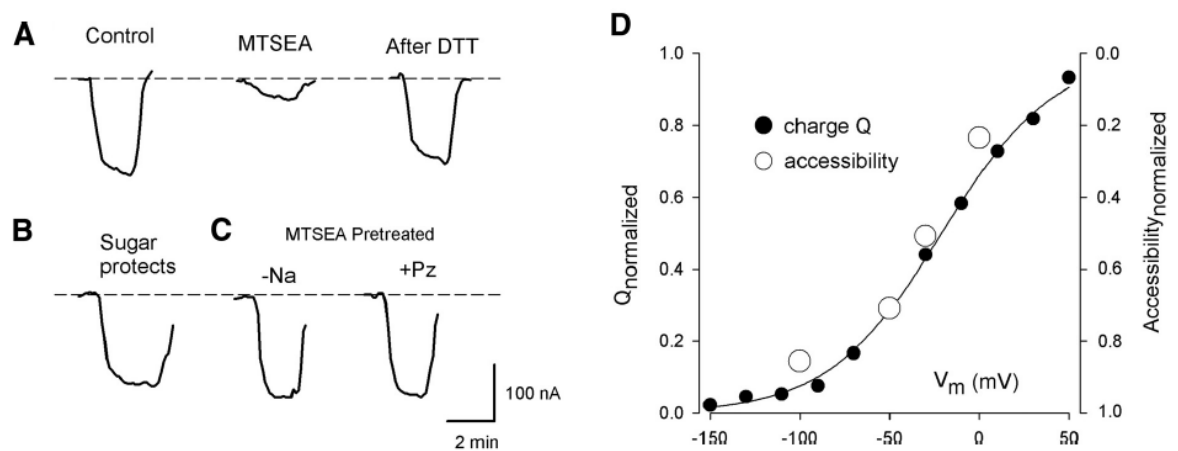


Figure 1.18 Effet du MTSEA sur la conformation de hSGLT1-Q457C (tirée de (Loo et al., 1998)).

a) Inactivation par 1 μM MTSEA du cotransport stimulé par 200 mM αMG à -50 mV. b) La présence de αMG prévient l'inactivation par le MTSEA. c) Le marquage dépend du Na<sup>+</sup> et de la Pz. d) Corrélation entre l'accessibilité au résidu Q457C et le mouvement de charges pré-stationnaire.

Peu de temps après la publication du modèle cinétique, on entreprend une étude plus approfondie des courants transitoires de hSGLT1 (Loo et al., 1993). On s'intéresse surtout aux propriétés de la charge mobile découlant de lissages à une fonction de Boltzmann. Comme il a été énoncé à la section 1.2.1, ceci permet d'établir qu'une diminution de [Na<sup>+</sup>]<sub>o</sub> de 100 à 10 mM réduit  $Q_{\max}$  de 40 %, déplace  $V_{1/2}$  de 30 mV vers les potentiels

hyperpolarisants et accélère la constante de temps de relaxation du courant de hSGLT1, surtout aux potentiels négatifs. Le modèle cinétique à trois états qui en découle ( $C1 \leftrightarrow C2 \leftrightarrow C3(2Na^+)$ ) reproduit qualitativement la dépendance en  $Na^+$  de  $Q_{max}$  et l'effet du voltage sur la constante de temps de hSGLT1. Les constantes de vitesse du modèle (Tableau 1.I) impliquent que lors d'une dépolarisation, la dissociation du  $Na^+$  extracellulaire ( $k_{32}$ ) est l'étape limitante, rôle qui est joué par la réorientation du transporteur libre ( $k_{21}$ ) dans le cas de SGLT1 de lapin (Parent et al., 1992b).

Tableau 1.I Constantes de vitesse du modèle à trois états de hSGLT1 (Loo et al., 1993).

|                             |                                       |
|-----------------------------|---------------------------------------|
| $k_{12}$ ( $s^{-1}$ )       | $25 \exp(-0,7 FV_m/RT)$               |
| $k_{21}$ ( $s^{-1}$ )       | $600 \exp(0,7 FV_m/RT)$               |
| $k_{23}$ ( $M^{-2}s^{-1}$ ) | $14000 [Na^+]_o^2 \exp(-0,3 FV_m/RT)$ |
| $k_{32}$ ( $s^{-1}$ )       | $300 \exp(0,3 FV_m/RT)$               |

Une implication sous-jacente au modèle à six états proposé par le groupe de Wright est que le cotransport  $Na^+$ /glucose est réversible. À l'aide de la technique du « *patch-clamp* » géant appliquée à des bouts de membrane plasmique d'ovocytes exprimant SGLT1 de lapin, les conséquences du mode de transport inverse sur le modèle cinétique sont évaluées (Eskandari et al., 2005). À 0 mV, le  $K_m^{\alpha MG}$  est estimé à  $32 \pm 8$  mM, ce qui est similaire à la valeur obtenue pour hSGLT1 ( $56 \pm 9$  mM) exprimé dans la bactérie *E. coli* et étudié en transport radioactif sur des vésicules membranaires (Quick et al., 2003). Le  $K_m^{Na}$  est aussi mesuré, mais le lissage à la courbe de Hill n'est pas probant. On croit qu'il se situe entre 6 et 50 mM à 0 mV avec un coefficient de Hill de 2. Le modèle cinétique à six états rend compte des observations relatives au transport inverse effectuées en présence de 10 mM  $[Na^+]_o$  et 500 mM  $[Na^+]_i$ , mais les constantes de vitesses de la liaison du intracellulaire du  $Na^+$  ( $k_{16}$ ) et de la réorientation du transporteur libre ( $k_{12}$  et  $k_{21}$ ) doivent être réajustées à

4500 M<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 3 s<sup>-1</sup> et 350 s<sup>-1</sup>, respectivement. Afin de respecter la microréversibilité, on doit aussi diminuer  $k_{63}$  à  $9,1 \times 10^{-4}$  s<sup>-1</sup> et  $k_{65}$  à 12190 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. Ces résultats soulignent le fait que les constantes de vitesses  $k_{12}$  et  $k_{21}$  dépendent de la valeur du gradient de Na<sup>+</sup> à la membrane plasmique lorsque l'on considère que la liaison des deux ions Na<sup>+</sup> à SGLT1 s'effectue en une seule étape (Falk et al., 1998). L'asymétrie entre les courbes I-V des modes de cotransport entrant et sortant est cohérente avec la proposition du modèle cinétique voulant que la liaison du Na<sup>+</sup> intracellulaire ne dépende pas du voltage. Cependant, cette hypothèse n'est pas soutenue par la structure cristallographique de vSGLT (Faham et al., 2008).

Comme nous l'avons abordé à la section 1.2.1, la technique de l'ovocyte « cut-open » a permis au laboratoire de Lapointe d'établir que la réorientation dans la membrane de SGLT1 sans ligands s'effectue en deux étapes distinctes, plutôt qu'une seule (Chen et al., 1996). En ajoutant l'état Ca entre les états C1 et C2, et en considérant qu'un seul ion Na<sup>+</sup> se lie au transporteur lors de la transition  $k_{23}$ , on tire un certain nombre de conclusions sur la cinétique transitoire de SGLT1 (Figure 1.19). De toutes les constantes de vitesses de ce modèle à quatre états, seule la deuxième étape de la translocation vers l'extérieur du transporteur vide ( $k_{a2}$ ) est indépendante du voltage ( $\alpha_a=0$ ), et c'est cette transition qui est responsable de la valeur limite (~10 ms) atteinte par la constante de temps  $\tau_1$  aux potentiels négatifs (Figure 1.16). Les deux autres barrières d'énergie du modèle sont plutôt symétriques ( $\alpha_1=0,3$  et  $\alpha_2=0,4$ ), et c'est la forte dépendance en voltage caractérisant la liaison rapide du Na<sup>+</sup> extracellulaire qui module la forme de la courbe  $\tau_1(V_m)$  en fonction de  $[Na^+]_o$ . La valence totale associée aux deux étapes décrivant le changement de conformation de SGLT1 vide ( $z_1 + z_a = -0,4 + -0,35 = -0,75$ ) est plus faible que celle proposée pour la transition équivalente (C1↔C2) dans les modèles du groupe de Wright (Parent et al., 1992b; Loo et al., 1993), qui correspond à 70 % de la charge mobile du transporteur, soit  $-2 \times 0,7 = -1,4$ . Par contre, la valence modélisant la liaison du Na<sup>+</sup> extracellulaire ( $z_2 = -0,6$ ) est similaire à celle des modèles précédents. Il est intéressant de noter que l'implication d'un seul ion Na<sup>+</sup> dans la génération des courants transitoires de

SGLT1 semble maintenant appuyée par l'observation qu'un des deux ions  $\text{Na}^+$  liés dans la structure de LeuT interagit directement avec le substrat afin d'être stabilisé dans son site (Yamashita et al., 2005). Même si le glucose et la leucine sont des substrats différents, il est raisonnable de penser qu'en absence de glucose, un des ions  $\text{Na}^+$  ne peut pas se lier à SGLT1.

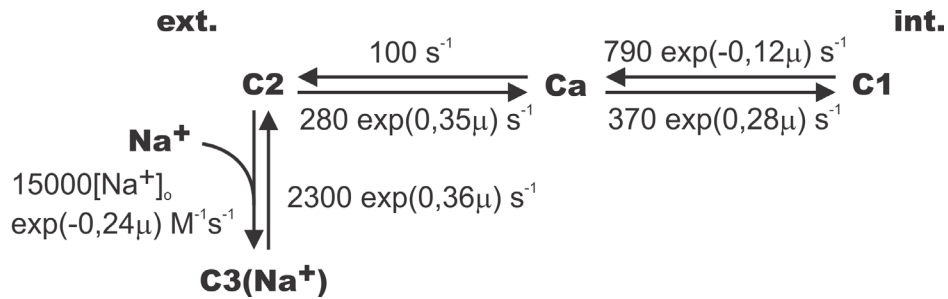


Figure 1.19 Modèle cinétique de hSGLT1 à 4 états proposé dans (Chen et al., 1996).

La dépendance en voltage des réactions, où  $\mu = FV_m/RT$ , est caractérisée par  $\alpha_1=0,3$ ,  $\alpha_a=0$  et  $\alpha_2=0,4$ , ainsi que par  $z_1 = -0,4$ ,  $z_a = -0,35$  et  $z_2 = -0,6$ .

L'identification d'une constante de temps lente (30-100 ms) due à l'utilisation de sauts de voltage d'une durée de 500 ms (Loo et al., 2005) (section 1.2.1) amène le groupe de Wright à proposer qu'un état supplémentaire (Cb) doit être inclus dans la réorientation du transporteur libre ( $\text{C2} \leftrightarrow \text{Ca} \leftrightarrow \text{Cb} \leftrightarrow \text{C1}$ ), car cette composante lente subsiste même en absence de  $[\text{Na}^+]_o$ . Cependant, aucun ensemble unique de paramètres ne semble pouvoir reproduire les résultats expérimentaux. Les auteurs suggèrent que cette difficulté provient de la liaison simultanée des deux ions  $\text{Na}^+$  dans le modèle, qui n'est valide qu'à  $[\text{Na}^+]_o$  saturant lorsque les événements de liaison sont caractérisés par une coopérativité élevée. Cet aspect est aussi souligné dans (Hazama et al., 1997), où le modèle ( $\text{C3(2Na}^+) \leftrightarrow \text{C2} \leftrightarrow \text{C1}$ ) n'arrive pas à rendre compte du déplacement de -100 mV du  $V_{1/2}$  (voir éq. 1.2) attendu quand  $[\text{Na}^+]_o$  diminue de 100 à 10 mM. Dans le même ordre d'idées, le groupe de Silverman ne parvient pas à générer la dépendance en  $\text{Na}^+$  à l'aide d'une

réaction unique ( $k_{23}$ ) en comparant les ensembles de paramètres qui découlent de lissages effectués à 100 et à 10 mM  $[\text{Na}^+]_o$  en utilisant le modèle  $(\text{C3}(2\text{Na}^+) \leftrightarrow \text{C2} \leftrightarrow \text{Ca} \leftrightarrow \text{C1})$  (Krofchick and Silverman, 2003).

Pour faire suite à l'introduction de l'état Cb, on s'intéresse à la cinétique de cotransport de hSGLT1 en utilisant un modèle qui comporte maintenant huit états (Loo et al., 2006). Bien qu'il soit délicat d'évaluer la qualité de la simulation des courants à cause de l'absence d'une comparaison avec les résultats expérimentaux, les conclusions quant à la distribution des probabilités des états en fonction du voltage sont les mêmes que précédemment (Parent et al., 1992b). Des mesures de fluorescence sur le mutant hSGLT1-G507C marqué avec la sonde tétraméthylrhodamine-6-maléimide (TMR6M) sont aussi effectuées. En présence d'une  $[\alpha\text{MG}]_o$  saturante, les courants transitoires sont totalement abolis, tandis qu'il subsiste un changement de fluorescence aux potentiels positifs d'une amplitude représentant environ 50 % de celle mesurée en absence de  $[\alpha\text{MG}]_o$ . Ceci contraste avec le cas où la perfusion d'une concentration saturante de Pz élimine autant la charge transférée que les changements de fluorescence. Les auteurs formulent alors l'hypothèse que ce résultat met en lumière un changement de conformation électroneutre  $(\text{C6}(2\text{Na}^+) \rightarrow \text{C1})$  se produisant lors du cotransport  $\text{Na}^+$ /glucose.

Des travaux du laboratoire de Lapointe portant sur la disparition des courants transitoires en fonction de  $[\alpha\text{MG}]_o$  suggèrent un modèle simplifié à cinq états (Figure 1.20) afin de rationaliser le mécanisme de fonctionnement de hSGLT1 (Gagnon et al., 2007). Les états intracellulaires sont regroupés en C1 à cause de la mauvaise affinité de SGLT1 pour le  $\text{Na}^+$  et le glucose lors du mode de transport inverse (Quick et al., 2003; Eskandari et al., 2005; Charron et al., 2006), et la liaison du  $\text{Na}^+$  extracellulaire  $(\text{C2} \leftrightarrow \text{C3})$  est à l'équilibre rapide. On utilise les données expérimentales relatives aux courants transitoires ( $Q(V_m)$ ,  $V_{1/2}$ ,  $\tau(V_m)$ ) comme contraintes pour déterminer l'ensemble des paramètres du modèle. À -50 mV, 73% des transporteurs sont orientés vers l'extérieur de la membrane (C2 ou  $\text{C3}(2\text{Na}^+)$ ), tandis que à +70 mV, C1 et Ca représentent 52% et 40% des probabilités d'occupation, respectivement. Aux potentiels hyperpolarisants en absence de  $[\alpha\text{MG}]_o$ , la

transition  $C1 \rightarrow Ca$  est rapide, mais  $Ca \rightarrow C2$  est lente, ce qui génère une accumulation transitoire en  $Ca$  qui finit par s'estomper lentement pour laisser les transporteurs se stabiliser majoritairement en  $C3(2Na^+)$ . En présence de  $[\alpha MG]_o$  saturant, les transporteurs relaxent à une valeur de  $Ca$  qui reflète le taux de cotransport  $Na^+/glucose$ , ce qui souligne que  $k_{a2}$  limite le cotransport à  $-150$  mV.

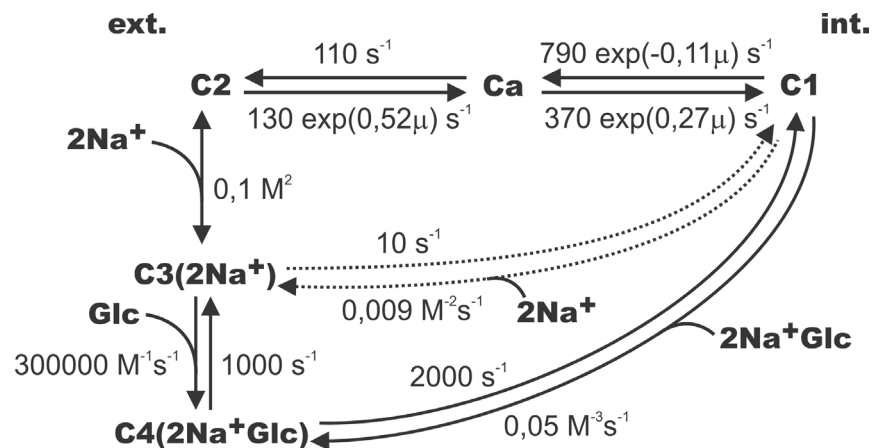


Figure 1.20 Modèle cinétique à 5 états de hSGLT1 présenté dans (Gagnon et al., 2007).

La dépendance en voltage des réactions, où  $\mu = FV_m/RT$ , est caractérisée par  $\alpha_1=0,3$  et  $\alpha_a=0$ , ainsi que par  $z_1 = -0,38$ ,  $z_a = -0,52$  et  $z_2 = -1,1$ .

### 1.2.3 Fréquence des cycles de cotransport

La fréquence à laquelle une molécule de cotransporteur fait traverser la membrane plasmique à ses ligands (TOR) à l'aide du mécanisme d'accès alterné est déterminée par la vitesse du changement de conformation le plus lent impliqué dans le cycle de cotransport. Le premier modèle cinétique construit pour SGLT de lapin suivant son expression dans des ovocytes suggère que la dissociation intracellulaire du  $Na^+$  est l'étape limitante du mécanisme de cotransport aux potentiels négatifs et qu'elle s'effectue au rythme de  $10 s^{-1}$  (Parent et al., 1992b), ce qui implique que le TOR ne peut être plus rapide que  $10 s^{-1}$ . Dans un modèle cinétique subséquent proposé pour hSGLT1, on évalue cette constante de vitesse

à  $5 \text{ s}^{-1}$  (Loo et al., 2006). On peut aussi relier le TOR au courant maximal de cotransport ( $I_{Cotr}$ ) mesuré pour une cellule exprimant  $N$  molécules du transporteur de la façon suivante

$$I_{Cotr} = N \times \text{TOR} \times s \times e, \quad (1.4)$$

où  $s$  représente le nombre net de charges élémentaires ( $e$ ) cotransportées pendant chaque cycle complet. Dans le cas de SGLT1,  $s = 2$  car deux ions  $\text{Na}^+$  sont couplés à chaque molécule de glucose transportée (Chen et al., 1995). La façon la plus courante d'estimer le TOR consiste à calculer le rapport  $I_{Cotr}/Q_{\max}$ , où  $Q_{\max}$  est déduit d'un lissage de l'intégrale des courants transitoires en fonction du potentiel à une fonction de Boltzmann (section 1.2.1). Afin de réduire l'erreur expérimentale, on se sert souvent de la pente d'un graphique  $I_{Cotr}$  vs.  $Q_{\max}$  composé de données provenant d'un certain nombre d'ovocytes avec des niveaux d'expression différents. En utilisant cette méthode, le groupe de Wright trouve que le TOR de SGLT1 se situe autour de  $57 \text{ s}^{-1}$  aux potentiels très négatifs (Loo et al., 1993). Dans une étude plus récente, l'utilisation de sauts de potentiels de 500 ms mène à une révision à la hausse de  $Q_{\max}$  qui se répercute sur le TOR qu'on évalue alors à  $28 \text{ s}^{-1}$  (Loo et al., 2005). Cependant, en comparant les équations 1.3 et 1.4, on constate que les estimés présentés jusqu'à maintenant ne tiennent pas compte de la discordance entre la stœchiométrie de SGLT1 ( $s = 2$ ) et la valence provenant du lissage de Boltzmann ( $z = 1$ ) (Loo et al., 1993). Après correction, le TOR mis de l'avant dans (Loo et al., 2005) devrait plutôt être  $\sim 14 \text{ s}^{-1}$ .

Les valeurs de TOR proposées pour SGLT1 sont similaires à celles obtenues pour d'autres cotransporteurs électrogéniques qui se situent généralement en deçà de 100 cycles  $\text{s}^{-1}$  (Forster et al., 2002). Il existe cependant des exceptions à cette tendance, notamment chez l'échangeur bactérien de  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  CIC-ec1 (Accardi and Miller, 2004) où on a mesuré un TOR d'environ  $4000 \text{ s}^{-1}$  (Walden et al., 2007). Ceci souligne la diversité des mécanismes responsables de l'occlusion et du couplage stœchiométrique des substrats chez les cotransporteurs. Bien qu'on connaisse encore peu de détails sur ces mécanismes, on peut penser qu'un taux de transport reflète l'équilibre entre les affinités de liaison d'un



substrat pour les différentes conformations intermédiaires rencontrées durant un cycle de cotransport. Par exemple, dans le cas de LeuT, les substrats leucine et méthionine sont caractérisés par un faible TOR mais une forte affinité de liaison, tandis que l'affinité du substrat alanine est réduite et que son TOR est élevé (Singh et al., 2008). Ces particularités pourraient provenir du fait que les états occlus formés lors de la liaison de la leucine ou de la méthionine sont très stables, et que les barrières d'énergie associées aux isomérisations vers les conformations où un des vestibules est ouvert sont relativement élevées. Inversement, le taux de transport élevé de l'alanine serait attribuable au degré de stabilité limité du complexe occlus que ce substrat forme avec LeuT.

#### **1.2.4 Perméabilité à l'eau**

L'implication de protéines membranaires dans la perméabilité à l'eau des cellules épithéliales est un concept qui a été suggéré au début des années 1990. On remarque alors que l'expression du transporteur GLUT1 dans des ovocytes est associée à une augmentation significative de la perméabilité à l'eau de la membrane plasmique (Fischbarg et al., 1990). La découverte subséquente du canal à eau aquaporine 1, spécialisé dans la perméation de  $10^9$  molécules d'eau par seconde, vient solidement démontrer le rôle des protéines membranaires dans le transport d'eau (Agre et al., 1993; Zhang et al., 1993).

Dans ce contexte, une étude menée en 1996 suggère que SGLT1 peut effectuer un transport secondairement actif d'eau caractérisé par une stœchiométrie fixe de 2 Na<sup>+</sup>/1 glucose et 260 molécules d'eau (Loo et al., 1996). Cette hypothèse est alors soutenue par un certain nombre d'observations qui sont réitérées et développées par la suite (Zeuthen et al., 1997; Meinild et al., 1998; Zeuthen et al., 2001). Notamment, l'ajout de glucose à la solution dans laquelle baigne un ovocyte exprimant SGLT1 génère un gonflement presque instantané qui suit de près le décours temporel du courant de Na<sup>+</sup>/glucose, et ce gonflement s'effectue plus rapidement que celui qui accompagne le courant de Na<sup>+</sup> du canal gramicidine. De plus, une modulation du potentiel membranaire permet d'observer un changement d'amplitude dans le courant de Na<sup>+</sup>/glucose qui se répercute sur le rythme de gonflement de l'ovocyte. On constate également que le cotransport d'eau est indépendant

du gradient osmotique présent à la membrane plasmique et qu'il peut même avoir lieu contre un gradient osmotique. Des expériences réalisées à différentes températures permettent d'établir que le transport d'eau et le cotransport  $\text{Na}^+$ /glucose sont caractérisés par des énergies d'activation ( $E_a$ ) presque identiques, soit de 23 et 26 kcal mol<sup>-1</sup>, respectivement, appuyant ainsi l'idée qu'ils utilisent le même mécanisme afin de traverser SGLT1. Ces  $E_a$  sont plus élevées que celle mesurée lorsque SGLT1 transporte l'eau passivement en absence de glucose de façon sensible à la Pz, qu'on estime à 5 kcal mol<sup>-1</sup>. Ceci indique qu'il existerait deux voies de perméation différentes pour l'eau à travers SGLT1. Plus récemment, l'hypothèse du cotransport d'eau chez SGLT1 a pu être testée en utilisant la structure cristallographique de vSGLT (Choe et al., 2010). Des simulations de dynamique moléculaire de 200 ns ont démontré qu'il n'existe pas de flux d'eau net à travers vSGLT lorsque le galactose est présent dans son site de liaison, mais qu'une fois qu'il est libéré vers le vestibule intracellulaire (entre 90 et 110 ns) le substrat entraîne avec lui 70 à 80 molécules d'eau à la manière d'un piston brownien<sup>2</sup> qui rectifie le mouvement de ces dernières. Dans cette situation, on prétend que le galactose ne peut retourner vers son site car la porte intracellulaire constituée du résidu hydrophobe Tyr 263 s'est refermée derrière lui.

Le groupe de Lapointe propose plutôt que la perméabilité à l'eau mesurée lors du cotransport  $\text{Na}^+$ /glucose serait attribuable à la création rapide d'un gradient osmotique. Plusieurs arguments concluants soutiennent cette explication. En effet, en utilisant une échelle de temps suffisamment longue, on démontre que le changement du rythme de gonflement d'un ovocyte lors d'une dépolarisation de la membranaire plasmique n'est pas quantitativement corrélé à la modulation concomitante du courant de cotransport (Duquette et al., 2001). De plus, une analyse des processus d'accumulation du glucose et du  $\text{Na}^+$  à l'intérieur d'un ovocyte suggère fortement que le glucose soit responsable des deux tiers du gradient osmotique créé lors du cotransport  $\text{Na}^+$ /glucose (Gagnon et al., 2004), malgré la stœchiométrie de 2  $\text{Na}^+$ /1 glucose de SGLT1. Ceci explique pourquoi le gonflement initial

---

<sup>2</sup> Le terme piston brownien a été introduit pour la première fois dans (Choe et al., 2010) simplement afin d'imager que le galactose semble entraîner des molécules d'eau dans la direction de son mouvement.

associé au cotransport  $\text{Na}^+$ /glucose est plus important que celui engendré par un flux cationique équivalent. Finalement, on a pu observer expérimentalement que des gradients osmotiques d'une taille suffisante pour rendre compte de 70 à 100 % du transport d'eau sont clairement établis en deçà d'une minute du début de l'activation du cotransport  $\text{Na}^+$ /glucose (Charron et al., 2006).

### **1.3 Courants de fuites chez les cotransporteurs**

Les courants de fuite produits par un cotransporteur électrogénique sont le résultat d'une perméation d'ions qui est découplée du mécanisme de cotransport et qui fait dévier la protéine de la stœchiométrie ions/substrats stricte qui caractérise sa fonction. Ces courants ont été identifiés au sein de cotransporteurs appartenant à plus de neuf familles SLC et leurs propriétés peuvent varier à l'intérieur des membres d'une même famille (voir (Andrini et al., 2008) pour une revue détaillée). On a répertorié des courants de fuite qui peuvent se manifester seulement en absence de substrat (Umbach et al., 1990; Forster et al., 1998; Tsukaguchi et al., 1999; Yao and Pajor, 2000; Mackenzie et al., 2006) et qui peuvent être mutuellement exclusifs au courant de cotransport ion-substrat. L'amplitude de ces fuites varie selon le transporteur étudié entre des courants aussi importants que ceux associés à l'activité de cotransport (Mager et al., 1994) et des courants de quelques dizaines de nA (Umbach et al., 1990; Eskandari et al., 1997; Forster et al., 1998; Coady et al., 2002) qui ne peuvent être identifiés de façon claire et robuste qu'en utilisant un inhibiteur spécifique qui bloque la protéine. À l'opposé, certains courants de fuite nécessitent la présence du substrat cotransporté ainsi que des ions qui énergisent la protéine pour être mesurés et ils sont associés à des charges qui excèdent la stœchiométrie du cotransporteur (Fairman et al., 1995; Ryan and Mindell, 2007). Il est aussi intéressant de noter que peu importe le type de courant de fuite que l'on considère et la famille de la protéine au sein de laquelle il a été caractérisé, les ions qui composent ce courant ne sont pas nécessairement les mêmes que ceux qui sont couplés au substrat pour générer l'activité de cotransport (Mager et al., 1996;

Karakossian et al., 2005; Coady et al., 2010). De plus, un cotransporteur donné peut produire différents types des courants de fuite.

Dans cette section, nous passerons en revue les caractéristiques des courants de fuite mesurés chez différents cotransporteurs choisis dans les familles SLC1, SLC5, SLC6 et SLC34, dans le but de contextualiser ceux qui ont été observés chez SGLT1. Nous nous intéresserons à la nature ionique des ces courants de fuite, au mécanisme associé à la voie de perméation qu'ils empruntent (uniport ou canal) et nous chercherons à éclaircir leur signification ainsi que leur rôle physiologique.

### 1.3.1 Famille SLC5

#### 1.3.1.1 NIS

L'accumulation d'iode dans les cellules folliculaires de la glande thyroïde est attribuable au cotransporteur  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  (NIS). Exprimé au pôle basolatéral, NIS est caractérisé par une activité électrogénique attribuable à une stœchiométrie de  $2 \text{Na}^+/1$  anion, et présente une identité de séquence de 25 % avec SGLT1. En remplaçant 100 mM de chlorure de choline par du NaCl en absence de substrat, on mesure un courant de plus de 100 nA à -50 mV qui correspond à ~35 % du courant produit en présence d'une concentration saturante de substrat (Eskandari et al., 1997). À ce même potentiel, la sensibilité au  $[\text{Na}^+]_o$  du courant de fuite révèle une affinité ( $K_m^{\text{fuite}}$ ) de  $74 \pm 14$  mM et un coefficient de Hill de  $0,9 \pm 0,1$  mM, ce qui amène les auteurs à proposer que ce courant est composé d'ions  $\text{Na}^+$ , malgré le fait que sa dépendance en voltage n'ait pas été étudiée. Il est conclu qu'en absence de substrat, NIS est un uniporteur qui fait traverser la membrane à un ion  $\text{Na}^+$  à la fois.

#### 1.3.1.2 SMIT2

Le cotransporteur de  $\text{Na}^+/\text{myo}$ -inositol SMIT2, un membre de la famille SLC5 dont la fonction est connue depuis une dizaine d'année (Coady et al., 2002), présente un courant de fuite sensible à la Pz qu'il est possible de mesurer en absence de *myo*-inositol et qu'on

attribue au mouvement d'ions  $\text{Na}^+$ . Aux potentiels très hyperpolarisants, l'amplitude de ce courant représente environ 5 % de celle du courant de cotransport, ce qui est similaire à la taille du courant de fuite mesuré chez SGLT1 (Umbach et al., 1990). Cependant, contrairement à SGLT1, les courants de fuite sortants de SMIT2 mesurés aux potentiels positifs sont négligeables.

### 1.3.1.3 SMCT1

Le gène SLC5A8 exprime le cotransporteur de  $\text{Na}^+$ /monocarboxylates SMCT1 que l'on retrouve notamment à la membrane apicale des cellules épithéliales du rein, du colon et de la glande thyroïde (Coady et al., 2004). SMCT1 est caractérisé par un courant de fuite sensible à l'ibuprofène qui est surtout présent aux potentiels plus positifs que -30 mV. On a d'abord postulé que ce courant provenait d'un flux entrant d'anions dépendant de la  $[\text{Cl}^-]_o$ , sans toutefois être attribuable à une perméation importante d'ions  $\text{Cl}^-$  (Coady et al., 2004). La validité de cette hypothèse a ensuite été établie en mesurant que la stœchiométrie du courant de fuite concordait avec le passage de  $0,98 \pm 0,21$  osmolytes par charge négative (Coady et al., 2007) et que le courant présentait la séquence de sélectivité anionique  $\text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$  (Coady et al., 2010). Il est aussi clair que le courant de fuite traverse SMCT1 car l'ajout de  $\text{I}^-$  dans la solution extracellulaire entraîne un déplacement considérable de la courbe  $Q(V_m)$  découlant des courants transitoires. De plus, on sait maintenant que la rectification apparente du courant de fuite aux potentiels dépolarisants est attribuable à une inhibition dépendante du voltage par le  $\text{Na}^+$  extracellulaire. On peut donc s'imaginer que le courant de fuite de SMCT1 recèle une importance physiologique dans des conditions où  $[\text{Na}^+]$  est faible ou lorsque le potentiel membranaire est dépolarisé. Dans cette veine, il a été proposé qu'un flux de  $\text{Cl}^-$  associé à SMCT1 puisse jouer un rôle à la membrane apicale des colonocytes (Coady et al., 2010).

### 1.3.1.4 SGLT1

L'expression de SGLT1 dans des ovocytes de xénope permet de mesurer un courant de fuite sensible à la Pz qui représente environ 5-10 % du courant maximal de cotransport

$\text{Na}^+$ /glucose (Umbach et al., 1990; Chen et al., 1997). On a originalement émis l'idée que ce courant était sélectif aux ions  $\text{Na}^+$ , malgré le fait qu'il s'inverse à un potentiel de -42 mV (Umbach et al., 1990), et qu'on ait mesuré qu'une réduction de  $[\text{Na}^+]_o$  engendre un déplacement du potentiel d'inversion ( $V_R$ ) vers des valeurs plus positives, contrairement au déplacement vers des potentiels plus négatifs prédit par la théorie du potentiel de Nernst. D'autre part, la comparaison de mesures concomitantes du transport radioactif de  $^{22}\text{Na}$  et de la charge obtenue en intégrant le courant sensible à la Pz suggère que ce dernier est attribuable au  $\text{Na}^+$  (Mackenzie et al., 1998). Par contre, la robustesse de cette expérience peut être questionnée considérant que la valeur de la charge provient d'un courant de  $\sim 10$  nA maintenu durant 10 minutes. La dépendance en température du courant de fuite a aussi été étudiée et a permis d'estimer une  $E_a$  de 19 kcal mol<sup>-1</sup> (Loo et al., 1999) dont la valeur est similaire à celle mesurée pour le cotransport  $\text{Na}^+$ /glucose (25 kcal mol<sup>-1</sup> (Hazama et al., 1997)), suggérant un mécanisme de type uniport comme celui mis de l'avant dans le modèle cinétique de SGLT1 (Loo et al., 2006). Il est intéressant de noter que des courants de fuite on aussi pu être mesurés lorsque le  $\text{Na}^+$  extracellulaire est remplacé par du  $\text{Li}^+$  (Panayotova-Heiermann et al., 1995) ou des  $\text{H}^+$  (Hirayama et al., 1994).

## 1.3.2 Famille SLC6

### 1.3.2.1 GAT1

Le transporteur couplé à deux ions  $\text{Na}^+$  et un ion  $\text{Cl}^-$  GAT1 retourne le GABA présent dans la synapse vers la terminaison pré-synaptique seulement quelques millisecondes après sa libération. La présence de  $\text{Cl}^-$  n'est pas nécessaire à la génération du courant de cotransport, mais elle augmente le TOR ainsi que l'affinité pour le  $\text{Na}^+$  et le GABA (Lu and Hilgemann, 1999; Loo et al., 2000). En absence de GABA et de  $\text{Na}^+$ , des courants de fuites inhibés de façon non compétitive par le  $\text{Na}^+$  (Kanner, 2003) peuvent être enregistrés lorsque du  $\text{Li}^+$  (Mager et al., 1996; MacAulay et al., 2002; Kanner, 2003; Meinild et al., 2009), du  $\text{Cs}^+$  (Mager et al., 1996) ou du  $\text{K}^+$  (Kanner, 2003) sont ajoutés à la solution dans laquelle baigne un ovocyte et que le potentiel membranaire est plus négatif

que -50 mV. De plus, on observe que la perfusion de LiCl produit un courant d'une amplitude 5,8 fois plus grande que le Li acétate, ce qui appuie l'idée que le Cl<sup>-</sup> améliore l'interaction entre les ions et le transporteur (Mager et al., 1996). D'autre part, en marquant le résidu Cys 74 situé à l'extrémité extracellulaire du STM 1 de GAT1 de rat avec le fluorophore TMR6M, on a pu observer une corrélation entre les dépendances en voltage du courant de fuite et des modulations de fluorescence induites par le Li<sup>+</sup> (Meinild et al., 2009). Ces résultats suggèrent que le Li<sup>+</sup> permet à GAT1 d'adopter des conformations distinctes de celles accessibles en présence de Na<sup>+</sup>. Ainsi, une fois le Li<sup>+</sup> lié à GAT1, des potentiels plus négatifs que -50 mV provoqueraient un changement de conformation correspondant à l'ouverture d'une conductance au Li<sup>+</sup> de type canal, malgré le fait que ce courant de fuite soit caractérisé par une E<sub>a</sub> de 26 ± 1 kcal mol<sup>-1</sup> à -80 mV (MacAulay et al., 2002).

### 1.3.2.2 GAT3, GAT4

Une perméation d'ions découplée du mécanisme de cotransport Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>/GABA a aussi été relevée chez l'isoforme GAT4. En effet, on a observé des courants de fuite attribuables au Li<sup>+</sup> et au Cl<sup>-</sup> en absence de Na<sup>+</sup> (Karakossian et al., 2005). Ces courants ne sont pas influencés par la présence de GABA (jusqu'à 1 mM), ils sont mutuellement exclusifs et inhibés par la liaison du Na<sup>+</sup> qui prépare le transporteur pour la liaison du GABA. Le courant de Cl<sup>-</sup> (I<sub>fuite</sub><sup>Cl</sup>) traverserait la membrane en utilisant un mode de perméation de type canal, car on a mesuré qu'il était inhibé par le Na<sup>+</sup> et le Li<sup>+</sup>, que son V<sub>R</sub> (-29 mV) était similaire à celui d'une conductance au Cl<sup>-</sup> (-32 mV), et que son amplitude était indépendante de la température. D'autre part, si le Na<sup>+</sup> est remplacé par le Li<sup>+</sup>, un courant de fuite indépendant de la température est observé lorsque le potentiel membranaire est plus négatif que -50 mV, et ce courant est stimulé par la présence de Cl<sup>-</sup> (bien que I<sub>fuite</sub><sup>Cl</sup> soit inhibé dans cette situation) comme dans le cas de GAT1. L'effet inhibiteur du Li<sup>+</sup> sur I<sub>fuite</sub><sup>Cl</sup> pourrait provenir du changement de conformation provoqué par la liaison du Li<sup>+</sup> à GAT4.

Chez l'isoforme GAT3, l'absence de  $\text{Na}^+$  génère aussi un  $I_{\text{fuite}}^{\text{Cl}}$ , mais son amplitude est plus faible que dans le cas de GAT4 (Karakossian et al., 2005). De plus, le courant de fuite au  $\text{Li}^+$  de GAT3 mesuré aux potentiels négatifs n'est que légèrement affecté lorsque de faibles ( $< 20 \text{ mM}$ )  $[\text{Na}^+]$  sont présentées à un ovocyte (Grossman and Nelson, 2003), ce qui contraste avec les mesures faites chez GAT1 et GAT4.

### 1.3.2.3 SERT

Le transporteur de sérotonine (SERT) est une cible pharmacologique importante, notamment pour les antidépresseurs et les drogues qui diminuent le trouble obsessionnel-compulsif. Le retour de la sérotonine dans les terminaisons pré-synaptiques effectué par SERT est couplé à un  $\text{Na}^+$ , un  $\text{Cl}^-$  et un  $\text{K}^+$  contre-transporté. Cependant, le  $\text{K}^+$  intracellulaire n'est pas essentiel au mécanisme et peut être remplacé par un  $\text{H}^+$  (Cao et al., 1997). En absence de substrat, la perfusion de l'inhibiteur désipramine permet de mesurer des courants de fuite entrants de  $\text{Na}^+$  de  $\text{Li}^+$  et de  $\text{K}^+$  (Mager et al., 1994), démontrant ainsi que la présence de  $\text{Na}^+$  n'est pas essentielle à la liaison de l'inhibiteur. À  $-80 \text{ mV}$ , les courants de fuite attribuables à la substitution du  $\text{Na}^+$  par le  $\text{Li}^+$  ou le  $\text{K}^+$  représentent 310 % et 73 % du courant de fuite mesuré en présence de  $\text{Na}^+$  (absence de sérotonine), respectivement. De plus, on a mesuré un effet inhibiteur du  $\text{Cl}^-$  sur le courant de fuite au  $\text{Na}^+$ , ainsi qu'une inhibition des courants de fuite de  $\text{Li}^+$  et de  $\text{K}^+$  par la sérotonine. Ainsi, SERT pourrait jouer un rôle important dans l'entrée thérapeutique de  $\text{Li}^+$  à l'intérieur des cellules. Finalement, une autre étude a relevé l'observation d'un courant de fuite de  $\text{H}^+$  à des pH plus acides que 6,5 (à  $-60 \text{ mV}$ ,  $\sim 40 \text{ nA}$  à pH 5,5 et  $\sim 150 \text{ nA}$  à pH 4,5) dont l'amplitude était réduite de 30 à 50 % en présence de  $\text{Na}^+$  (Cao et al., 1997).

### 1.3.3 Famille SLC1 : exemple de $\text{Glt}_{\text{ph}}$

Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur prédominant dans le système nerveux central des mammifères. Son retour dans les neurones est géré par les transporteurs d'acides aminés exciteurs couplés au  $\text{Na}^+$  (EAAT), qui sont caractérisés par une conductance anionique découplée du mécanisme de cotransport, mais activée par la liaison



du  $\text{Na}^+$  et du glutamate (Fairman et al., 1995). Récemment, des travaux de cristallographie ont révélé la structure du transporteur  $\text{Glt}_{\text{ph}}$  (Yernool et al., 2004), un homologue procaryote présentant une identité de séquence d'environ 36 % avec les membres des EAAT (Boudker et al., 2007). Malgré le fait que  $\text{Glt}_{\text{ph}}$  transporte l'aspartate plutôt que le glutamate (Boudker et al., 2007), il a été démontré que le cotransport générerait un courant de fuite de  $\text{Cl}^-$  (Ryan and Mindell, 2007), comme chez les EAAT de mammifères. On a ainsi pu établir que le rôle de cette fuite de  $\text{Cl}^-$  qui entre dans la cellule était de diminuer la dépolarisation causée par le cotransport électrogénique d'aspartate (au moins une charge nette) afin d'en accélérer le TOR. Le degré d'efficacité d'anions donnés à générer le transport trouvé dans le cas de  $\text{Glt}_{\text{ph}}$  ( $\text{Cl}^- \approx \text{Br}^- < \text{I}^- < \text{NO}_3^-$ ) est similaire à la séquence de sélectivité anionique du courant de fuite des EAAT ( $\text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^- < \text{NO}_3^-$ ). De plus, la mutation S65V dans  $\text{Glt}_{\text{ph}}$  (STM 2) réduit le courant de fuite de  $\text{Cl}^-$  d'environ 40 % par rapport à la protéine sauvage, un effet analogue à ce que l'on observe chez le mutant équivalent S103V de EAAT1, où la conductance au  $\text{Cl}^-$  est diminuée sans conséquence significative sur le transport de glutamate (Ryan et al., 2004). Ces résultats appuient l'idée que ce courant découplé est conservé entre des membres distants de la famille des cotransporteurs de glutamate, et que les anions qui le constituent traversent le transporteur à l'aide d'une voie de perméation distincte de celle utilisée pour le cotransport, possiblement située le long du STM 2 de  $\text{Glt}_{\text{ph}}$ .

### 1.3.4 Famille SLC34 : exemple du cotransport $\text{Na}^+$ /phosphate

La famille SLC34 comporte trois membres dont la fonction principale dans l'organisme est de réabsorber le phosphate inorganique divalent ( $\text{P}_i$ ) couplé au  $\text{Na}^+$  dans l'épithélium du tubule proximal. De ces trois isoformes,  $\text{NaP}_i\text{-IIa}$  et  $\text{NaP}_i\text{-IIb}$  effectuent un transport électrogénique soumis à une stœchiométrie de  $3\text{Na}^+ : 1\text{P}_i$ , tandis que l'isoforme  $\text{NaP}_i\text{-IIc}$  est électroneutre à cause de sa stœchiométrie de  $2\text{Na}^+ : 1\text{P}_i$ . Des mesures d'électrophysiologie à deux microélectrodes effectuées sur les isoformes  $\text{NaP}_i\text{-IIa/b}$  exprimés dans des ovocytes de xénope ont permis d'identifier un courant de fuite en absence du substrat  $\text{P}_i$  (Forster et al., 1998). En effet, l'application d'acide

phosphonoformique (PFA), un inhibiteur du transport, bloque un courant ( $I_{\text{PFA}}$ ) dont l'amplitude à -50 mV correspond à 10-20% du courant de cotransport  $\text{Na}^+/\text{P}_i$  ( $I_{\text{P}_i}$ ). On a mesuré un déplacement nernstien du  $V_R$  de  $I_{\text{PFA}}$  suite à une variation de la concentration extracellulaire de  $\text{Na}^+$ , indiquant que le courant de fuite serait le résultat de la perméation d'un ion  $\text{Na}^+$  ( $K_m^{\text{Na}} = 128 \text{ mM}$ ), bien que  $I_{\text{PFA}}$  s'inverse entre -30 et -10 mV au lieu du  $\sim +60 \text{ mV}$  attendu pour une conductance de  $\text{Na}^+$  pure. D'autre part, en remplaçant 90% du  $\text{Cl}^-$  extracellulaire par de gros anions comme le glucuronate, on a pu mesurer qu'une partie de  $I_{\text{PFA}}$  était supprimée lorsque  $V_m > 0 \text{ mV}$  et que son  $V_R$  était déplacé vers des valeurs positives, indiquant la présence d'un flux de  $\text{Cl}^-$  entrant au sein de  $I_{\text{PFA}}$  (Andrini et al., 2008). Cependant, on observe également que l'application de PFA à des ovocytes injectés à l'eau inhibe un courant à rectification sortante qui n'est pas affecté par le  $\text{Cl}^-$  extracellulaire aux  $V_m < 0 \text{ mV}$ . Ce courant endogène pourrait donc être la source du  $V_R$  négatif du courant de fuite mesuré chez des ovocytes qui expriment  $\text{NaP}_i\text{-IIa/b}$ .

Afin de déterminer si les ions qui participent à  $I_{\text{PFA}}$  traversent le transporteur à l'aide de changements de conformation ou plus simplement en diffusant à l'intérieur d'un conduit de type canal, le groupe de Forster s'est intéressé à la dépendance en température de  $I_{\text{PFA}}$  et de  $I_{\text{P}_i}$  (Bacconi et al., 2007). On a pu estimer des  $E_a$  de  $\sim 11 \text{ kcal mol}^{-1}$  pour  $I_{\text{PFA}}$  et de  $\sim 16 \text{ kcal mol}^{-1}$  pour  $I_{\text{P}_i}$  à -100 mV, et établir que ces dernières ne dépendaient que faiblement du potentiel membranaire, en accord avec un mécanisme de type uniport où l'étape limitante est indépendante du voltage.

## 1.4 Physiologie de la famille SLC5

La famille génétique SLC5 comprend douze membres chez l'humain. Ces derniers codent pour des protéines de 60 à 80 kDa qui contiennent entre 580 et 718 acides aminés. Celles-ci sont exprimées dans plusieurs tissus et la fonction de onze d'entre elles est connue (Wright and Turk, 2004; Wright et al., 2011). Dans cette section, notre intérêt sera dirigé

vers les transporteurs de sucres SGLT1-2, ainsi que vers SGLT3 qu'on croit être un senseur de glucose. Les propriétés de ces transporteurs sont résumées dans le Tableau 1.II.

Tableau 1.II Propriétés de transport des SGLT dans le corps humain (Tiré de (Wright et al., 2011)).

| Transporteur    | Substrat(s)        | K <sub>m</sub> (mM) | Distribution  |
|-----------------|--------------------|---------------------|---|
| SGLT1 (SLC5A1)  | glucose, galactose | 0,5                 | Intestin, trachée, rein, cœur, cerveau, testicules, prostate      |
| SGLT2 (SLC5A2)  | glucose            | 6                   | Rein, cerveau, foie, glande thyroïde, muscles, cœur               |
| SGLT3 (SLC5A4)  | glucose (senseur)  | 20                  | Intestin, testicules, utérus, poumons, cerveau, glande thyroïde   |
| SGLT4 (SLC5A9)  | mannose            | 0,5                 | Intestin, rein, foie, cerveau, poumons, trachée, utérus, pancréas |
|                 | glucose            | 2                   |   |
| SGLT5 (SLC5A10) | -                  | -                   | Cortex rénal  |

D'autre part, mentionnons que la famille SLC5 compte parmi ses membres SMIT1 et SMIT2 (SGLT6), deux transporteurs de *myo*-inositol (Hager et al., 1995; Coady et al., 2002; Lahjouji et al., 2007) qui sont notamment exprimés dans le rein et le cerveau. On y retrouve aussi le transporteur NIS qui est responsable de l'accumulation de I<sup>-</sup> dans la glande thyroïde (Dai et al., 1996; Eskandari et al., 1997). SMCT1 et SMCT2 font également partie de la famille SLC5 et effectuent le transport d'une variété de monocarboxylates dans divers organes dont l'intestin et le rein (Coady et al., 2004; Ganapathy et al., 2008). Un autre transporteur, SMVT, est exprimé entre autres dans le placenta, le rein et l'intestin où il est associé à l'accumulation d'acide pantothénique, de biotine et d'acide  $\alpha$ -lipoïque, qui sont des vitamines solubles dans l'eau (Prasad and Ganapathy, 2000). Récemment, on a démontré la capacité de SMVT à transporter l'iode (de Carvalho and Quick, 2011), ce qui

suggère un rôle pour ce membre dans l'homéostasie de l'iode dans le corps humain. Finalement, on recense aussi le transporteur de choline CHT qui est exprimé à la membrane des neurones cholinergiques où il retourne la choline dans la terminaison pré-synaptique afin de synthétiser de l'acétylcholine (Ribeiro et al., 2006).

### 1.4.1 SGLT1

SGLT1 est une protéine de 73 kDa (Hediger et al., 1987) qui cotransporte le D-glucose et le D-galactose avec une affinité similaire ( $K_m=0,5$  mM) (Diez-Sampedro et al., 2001b; Hummel et al., 2011) et une stœchiométrie de 2 Na<sup>+</sup>/1 sucre (Chen et al., 1995). Elle est exprimée abondamment dans l'épithélium en bordure en brosse de l'intestin grêle, mais on la retrouve aussi vers la fin du tubule proximal (segment S3) où elle est responsable d'environ 10 % de la réabsorption du glucose contenu dans le filtrat glomérulaire. La fonction de SGLT1 fait partie des mécanismes responsables de l'homéostasie qui maintiennent entre 4 et 6 mM la concentration de glucose qui circule dans le sang (Wright et al., 2011).

Dans l'intestin, SGLT1 accumule le glucose dans les cellules épithéliales contre son gradient de concentration, puis ce dernier franchit passivement la membrane basolatérale vers le sang à travers GLUT2 (voir (Uldry and Thorens, 2004) pour une revue de la famille SLC2). Cependant, une étude où on a trouvé que des souris « *knockout* » GLUT2 -/- présentaient une cinétique de transport intestinal de glucose normale laisse planer le doute quant au rôle de GLUT2 dans ce mécanisme (Stumpel et al., 2001). Ces résultats suggèrent plutôt que le glucose puisse sortir des entérocytes par le biais de l'exocytose ou de d'autres transporteurs présents à la membrane basolatérale (Wright et al., 2004).

L'importance que recèle le transport intestinal de glucose attribuable à SGLT1 est mise en évidence par une maladie à transmission autosomique récessive, la malabsorption intestinale de glucose-galactose (GGM) (Wright, 1998; Wright et al., 2002). La GGM cause une diarrhée sévère qui cesse moins d'une heure après l'élimination du glucose, du galactose et du lactose de la diète du patient. Il est intéressant de noter que les individus

affectés par la GGM ne présentent qu'une faible glycosurie. Des recherches menées sur plus de 80 patients ont permis d'identifier 54 mutations de SGLT1 responsables de la GGM (Wright et al., 2007). On a répertorié des mutations ponctuelles qui modifient un acide aminé (34 cas) ou qui introduisent un codon stop (6 cas), ainsi que des mutations qui modifient le cadre de lecture (7 cas) ou qui introduisent ou suppriment un certain nombre de résidus à divers endroits de la protéine (7 cas). De plus, ces mutations impliquent des résidus conservés dans neuf isoformes de SGLT1 et dans dix autres membres de la famille SLC5. Parmi ces mutations, plusieurs sont conservatives, dont cinq Ala-Val et une Ile-Leu.

La thérapie de la réhydratation orale (ORT) est une application médicale importante de SGLT1 qui a été créée afin de contrer la diarrhée infectieuse aiguë causée par le cholera. En effet, les toxines produites par la bactérie *Vibrio cholerae* engendrent une sécrétion intestinale de fluide pouvant atteindre  $120 \text{ ml h}^{-1}$  et durer de deux à quatre jours chez un enfant de 10 kg (Wright et al., 2007). La déshydratation peut être balancée par l'administration d'une solution de sels et de glucose (75 mM NaCl, 75 mM glucose, 20 mM KCl et 10 mM citrate de sodium). Ceci est possible grâce au transport journalier d'une mole de glucose et de deux moles de  $\text{Na}^+$  effectué par SGLT1 dans l'intestin grêle qui stimule l'entrée de 2 moles d'anions ( $\text{Cl}^-$  et  $\text{HCO}_3^-$ ) et d'environ 6 litres d'eau résultant en une absorption isotonique vers le sang (Wright et al., 2004).

#### 1.4.2 SGLT2

On en connaît relativement peu sur le cotransporteur SGLT2 à cause de sa très faible expression dans les systèmes hétérologues comme les ovocytes. Cependant, on sait qu'il transporte le glucose avec une faible affinité ( $K_m=6 \text{ mM}$ ) et une stœchiométrie de 1  $\text{Na}^+$ /1 glucose (Kanai et al., 1994; Hummel et al., 2011). SGLT2 est notamment exprimé dans les segments S1 et S2 du tubule proximal où il réabsorbe 90 % des  $\sim 180 \text{ g}$  de glucose présents dans le filtrat glomérulaire à chaque jour (Figure 1.21). Comme il a été mentionné précédemment, SGLT1 réabsorbe presque tout le glucose restant (10 %), ce qui fait en sorte qu'on en retrouve moins de 0,15 g dans l'urine. Dans le rein, le transport de glucose effectué par SGLT2 et SGLT1 n'influence que très faiblement l'absorption d'eau et serait

responsable de seulement 2 % des ~150 litres réabsorbés chaque jour (Wright et al., 2007). De plus, contrairement au cas de l'intestin grêle, il est clair que GLUT2 est important pour le transport de glucose basolatéral dans le rein, car on a mesuré une glycosurie pouvant atteindre 200 g par jour chez des patients avec des mutations (codon stop) de GLUT2 (Wright et al., 2011).

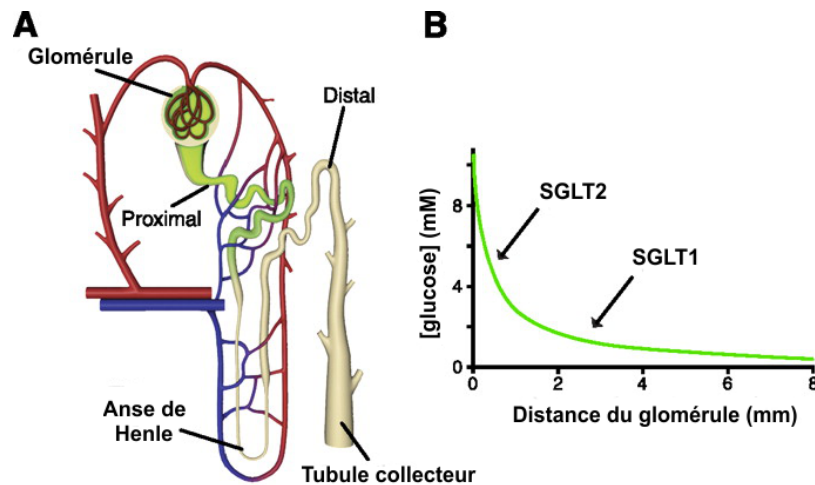


Figure 1.21 Réabsorption du glucose dans le tubule proximal (tirée de (Wright et al., 2011)).

a) Anatomie d'un néphron et de son irrigation. b) Mesure de la concentration de glucose le long d'un tubule à partir du glomérule.

On croit que des mutations dans la séquence de SGLT2 engendrent la glycosurie rénale familiale (FRG) (Santer et al., 2003; Calado et al., 2008), une maladie rare à transmission autosomique récessive qui est caractérisée par une excrétion de glucose dans l'urine allant de 1 à 170 g par jour, mais dont les conséquences sur la santé sont bénignes. En effet, même une excrétion de glucose qui dépasse 100 g par jour ne cause pas d'hypoglycémie ou de dommages au niveau du rein ou de d'autres organes. Malgré la corrélation entre le phénotype de la FRG et les 17 mutations qui ont été répertoriées chez SGLT2, on a rencontré deux individus avec la même mutation qui présentaient des niveaux

de glycosurie différents. Ceci suggère que d'autres transporteurs, comme par exemple SGLT5 qui est exprimé exclusivement dans le cortex rénal, pourraient être impliqués dans la réabsorption de glucose. Le fait que la GGM n'implique qu'une faible glycosurie élimine SGLT1 des candidats potentiels.

La nature bénigne de la FRG a aussi fait émerger l'idée d'une thérapie alternative visant à contrôler la concentration de glucose dans le sang d'individus diabétiques. Dans cette veine, plusieurs laboratoires s'affèrent actuellement à concevoir des inhibiteurs spécifiques de SGLT2 (Chao and Henry, 2010). On pense notamment à la dapagliflozine (Meng et al., 2008), une drogue assujettie à des essais clinique en phase III qui est ~1200 fois plus sélective pour SGLT2 que SGLT1 et qui inhibe SGLT2 avec une affinité ( $K_m$ ) de 1 nM. On a constaté que la dapagliflozine inhibait ~50 % de la réabsorption de glucose chez des patients diabétiques qui l'ingéraient durant 2 semaines, malgré sa capacité à inhiber complètement SGLT2 *in vitro* (Komoroski et al., 2009a; Komoroski et al., 2009b). Ces résultats sont encourageants, mais d'autres études devront être conduites afin de déterminer si ces nouvelles drogues qui visent à contrôler l'hyperglycémie sont efficaces et sûres pour la santé de patients diabétiques.

### 1.4.3 SGLT3

Contrairement à SGLT1 et SGLT2 qui transportent le glucose, des travaux suggèrent que SGLT3 serait un senseur de glucose exprimé dans plusieurs tissus dont l'intestin grêle et la jonction neuromusculaire des muscles squelettiques (Diez-Sampedro et al., 2003). La présence de SGLT3 aux neurones cholinergiques du système nerveux entérique aurait un rôle à jouer dans la motilité intestinale associée aux réflexes entériques suivant un repas. Des expériences menées à l'aide d'ovocytes ont révélé que l'expression de SGLT3 ne générerait aucun transport radioactif en présence de glucose comparé à des ovocytes témoins. On a cependant pu mesurer des dépolarisations dépendantes du  $\text{Na}^+$  et du sucre (D-glucose ~  $\alpha\text{MG}$  >> D-galactose) pouvant aller jusqu'à 12 mV et caractérisées par une affinité ( $K_m$ ) très faible de 19 mM dans le cas du D-glucose (Diez-Sampedro et al., 2003).

Il est intéressant de constater que l'isoforme de porc de SGLT3 transporte le D-glucose avec une stœchiométrie de 2 Na<sup>+</sup>/1 glucose (Diez-Sampedro et al., 2001a), mais qu'il le fait avec une faible affinité ( $K_m = 6$  mM) (Wright, 2001).

#### **1.4.4 SGLT4 et SGLT5**

Peu de données sont disponibles sur la fonction de SGLT4. On sait cependant qu'il transporte le mannose avec une meilleure affinité que le glucose, et qu'il n'est responsable d'aucun transport de galactose (Tazawa et al., 2005). On en connaît encore moins sur le rôle de SGLT5, mis à part le fait qu'il soit exprimé exclusivement dans le cortex rénal. Une étude nous informe aussi qu'il est responsable d'un transport de  $\alpha$ MG et de galactose couplé au Na<sup>+</sup> et sensible à la Pz lorsqu'on l'exprime dans des cellules HEK (voir (Wright et al., 2011)).

### **1.5 Justification de la démarche et des objectifs de la thèse**

Au moment de débiter les travaux de doctorat qui généreraient éventuellement cette thèse, certains objectifs précis furent établis afin de structurer notre étude. Tout d'abord, nous voulions identifier quels ions étaient responsables du courant de fuite de SGLT1, qui avait jusqu'à maintenant été assimilé à un courant de Na<sup>+</sup> malgré plusieurs incohérences thermodynamiques. D'autre part, nous désirions bâtir un modèle cinétique et trouver un ensemble de paramètres qui serait capable de reproduire de façon satisfaisante les courants transitoires et stationnaires de SGLT1 en fonction du Na<sup>+</sup> et du glucose.

#### **1.5.1 Courant de fuite**

Notre intérêt et notre motivation pour le courant de fuite de SGLT1 furent construits autour des principes suivants. Nous savions que chaque cycle de cotransport effectué par SGLT1 permettait au glucose et au Na<sup>+</sup> d'entrer dans une cellule épithéliale selon un couplage strict de 2 Na<sup>+</sup>/1 glucose. De plus, lorsque SGLT1 était exprimé à la membrane



d'ovocytes de xénope, l'électrophysiologie à deux microélectrodes révélait que, en absence de glucose, il existait un courant sensible à la Pz significatif, le courant de fuite, qui représentait 5 à 10% du courant maximal de cotransport  $\text{Na}^+$ /glucose (Umbach et al., 1990; Chen et al., 1997). On ne savait cependant pas si ce courant de fuite subsistait lors de l'activité de cotransport ou si ces deux modes étaient mutuellement exclusifs. Une étude avait proposé un modèle cinétique qui suggérait que l'amplitude des courants de fuite et de cotransport étaient égales quand  $[\alpha\text{MG}]_o = 40 \mu\text{M}$ , et que au-delà de cette concentration la stœchiométrie du cotransport  $\text{Na}^+$ /glucose demeurerait stricte (Chen et al., 1995). D'autre part, il avait toujours été présumé que seuls les ions  $\text{Na}^+$  étaient responsables du courant de fuite (Umbach et al., 1990; Mackenzie et al., 1998), malgré le fait que le  $V_R$  du courant, généralement situé entre  $-40$  et  $-10$  mV, s'avérait beaucoup plus négatif que le  $V_R$  attribuable à un courant de  $\text{Na}^+$  pur, soit environ  $+63$  mV dans des conditions où  $[\text{Na}^+]_i = 7$  mM et  $[\text{Na}^+]_o = 90$  mM. Une sélectivité au  $\text{Na}^+$  allait aussi à l'encontre du fait qu'on ait mesuré un déplacement du  $V_R$  du courant de fuite vers des valeurs plus positives en réduisant  $[\text{Na}^+]_o$ , contrairement au déplacement nernstien négatif alors attendu.

C'est dans ce contexte que le premier projet présenté dans cette thèse fut développé. Notre stratégie consistait à varier les concentrations extracellulaires des divers ions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) susceptibles de participer au courant de fuite dans le but d'identifier quels d'entre eux engendreraient un déplacement nernstien du  $V_R$ , c'est-à-dire de 58 mV pour une variation de la concentration extracellulaire d'un facteur 10. Nous disposions également d'un mutant de SGLT1 (C292A) dont la caractérisation préalable avait révélé un fort courant de fuite, mais une activité de cotransport presque inexistante (Gagnon et al., 2006). Ce mutant nous offrait donc la possibilité d'étudier la nature de la fuite ionique avec plus de facilité en manipulant des signaux d'amplitude accrue.

### 1.5.2 Détermination du TOR de SGLT1

Le second projet à susciter notre intérêt fut initié par une publication d'un de nos collègues du laboratoire. Ce dernier réussit à mettre au point la technique de la trappe

ionique (ITT) (Blanchard et al., 2008), selon laquelle une électrode sélective à large embout ( $\sim 100 \mu\text{m}$ ) qui est pressée contre la membrane plasmique d'un ovocyte, définissant ainsi un petit volume (la trappe), permet de mesurer des changements de concentrations ioniques associés à l'activité de cotransport de SGLT1. À ce moment, nous en étions à l'élaboration de notre modèle cinétique, et nous avons eu l'idée d'utiliser l'ITT afin d'estimer la fréquence à laquelle une molécule de SGLT1 effectue un cycle de cotransport, une caractéristique importante dans la compréhension de la cinétique des changements de conformation du cotransporteur. Plusieurs estimés du TOR de SGLT1 et de d'autres transporteurs étaient présentés dans la littérature, et la plupart avaient été obtenus à partir du rapport  $I_{Cotr}/Q_{\max}$  ou de l'étape limitante d'un modèle décrivant la cinétique stationnaire de cotransport (voir la section 1.2.3). Par contre, les valeurs du TOR de SGLT1 découlant de ces techniques étaient plutôt variables, dans la mesure où elles se situaient entre  $5 \text{ s}^{-1}$  (Loo et al., 2006) et  $57 \text{ s}^{-1}$  (Loo et al., 1993). Le mérite de l'ITT résidait dans sa capacité à déterminer d'une façon plus robuste le TOR de SGLT1. Ainsi, ce projet constituerait la première application fonctionnelle concrète de l'ITT, et en plus de mieux délimiter la valeur du TOR, il nous permettrait d'évaluer le nombre de transporteurs exprimés à la membrane plasmique à l'aide d'un outil expérimental indépendant des approches communément utilisées.

### 1.5.3 Modélisation cinétique de SGLT1 et recuit simulé

Le dernier projet que nous avons entrepris avait pour objectif l'élaboration d'un modèle cinétique de SGLT1. Une telle approche est intéressante car elle révèle de l'information concernant les liens dynamiques qui existent entre les conformations stables d'un cotransporteur en se servant de la théorie d'Eyring. Dans ce formalisme, deux états adjacents sont séparés par une barrière d'énergie dont la hauteur, qui peut être modulée par le  $V_m$ , permet de déduire la fréquence moyenne à laquelle un cotransporteur effectuera une transition entre ces états. Dans le cas de SGLT1, les modèles cinétiques basés sur la théorie d'Eyring qui ont été proposés depuis le clonage du cotransporteur ont tous été construits de façon à recréer le mécanisme d'accès alterné, un concept qui est maintenant appuyé par l'obtention des structures de plusieurs cotransporteurs adoptant l'architecture de LeuT, mais

qui s'étend aussi à d'autres familles structurales (Krishnamurthy et al., 2009; Boudker and Verdon, 2010; Forrest et al., 2011). Cependant, même si une vingtaine d'années se sont écoulées depuis la publication des premiers modèles cinétiques de SGLT1 fondés sur des données d'électrophysiologie extensives, il n'existait pas, au moment d'entreprendre les travaux de cette thèse, de modèle général décrivant de façon précise les courants du cotransporteur en fonction de  $[Na^+]_o$  et de  $[\alpha MG]_o$ .

Nous cherchions donc à établir un tel modèle, mais aussi à améliorer la façon de juger de sa qualité. En effet, jusqu'alors l'analyse de la justesse d'un modèle avait toujours été basée sur la comparaison de la dépendance en voltage des constantes de temps extraites de lissages exponentiels des données expérimentales et des courants simulés. De plus, il n'existait aucune technique permettant de déterminer directement l'ensemble de paramètres d'un modèle cinétique décrivant un groupe de données expérimentales. Dans le but de proposer une solution à ces problèmes, nous avons eu l'idée d'utiliser le recuit simulé (SA). Cette technique robuste d'optimisation nous permettrait de déterminer les paramètres et la structure du modèle cinétique le plus simple capable de reproduire les courants transitoires et stationnaires de SGLT1 en fonction de  $V_m$ , de  $[Na^+]_o$  et de  $[\alpha MG]_o$ .

## 2 Méthodologies

La section suivante constitue un résumé des techniques expérimentales et théoriques que nous avons utilisées lors des travaux qui ont mené aux résultats qui sont présentés dans cette thèse.

### 2.1 Ovocytes de xénope

Les ovocytes de la grenouille sud-africaine *Xenopus laevis* sont communément utilisés comme système d'expression hétérologue depuis le début des années 1970 (Gurdon et al., 1971). On les prélève des lobes ovariens d'une grenouille femelle adulte lorsqu'ils sont au stade de développement V ou VI (classification de Dumont (Dumont, 1972)). Ce sont des cellules faciles à manipuler à cause de leur diamètre d'environ 1 mm. Leur membrane plasmique comporte un grand nombre d'invaginations (Zampighi et al., 1995) qui fait en sorte qu'ils ont une surface de  $\sim 20 \text{ mm}^2$  (Sobczak et al., 2010) à  $\sim 40 \text{ mm}^2$  (Duquette et al., 2001) selon les estimés. Un ovocyte possède un pôle végétal pâle et un pôle animal brun foncé ou noir qui contient son noyau. Typiquement, on injecte dans le cytoplasme quelques ng d'ARNm codant pour une protéine donnée, puis l'ovocyte produit cette dernière en grande quantité et l'achemine à la membrane plasmique. Dans le cas de hSGLT1, 4 à 5 jours d'expression sont nécessaires avant de pouvoir effectuer des expériences d'électrophysiologie.

### 2.2 Électrophysiologie à deux microélectrodes

On place un ovocyte exprimant SGLT1 à sa membrane plasmique dans un bain contenant une solution saline physiologique (Figure 2.1). Notre but est de pouvoir moduler et maintenir le potentiel membranaire de cet ovocyte à des valeurs choisies en y injectant un courant. Pour ce faire, on étire des pipettes de verre de borosilicate en chauffant leur centre de manière à obtenir des électrodes à la pointe fine (quelques  $\mu\text{m}$ ). Les électrodes de voltage (eV) et d'injection de courant (eI) sont ensuite remplies d'une solution de KCl 1 M, puis montées sur des porte-électrodes reliés à l'amplificateur (OC-725C Oocyte Clamp,

Warner Instrument, Hamden, CT) contrôlé par le logiciel d'acquisition (pClamp 8.2, Axon Instruments Inc, Union City, CA). Le potentiel de la solution saline du bain est mesuré via un pont d'agar rempli de KCl 1 M et par une pastille d'Ag-AgCl. Le potentiel membranaire déterminé dynamiquement par l'électrode eV est comparé au voltage de commande imposé par l'expérimentateur et la différence est annulée à l'aide d'un amplificateur à réaction négative à haut gain (FBA) qui injecte un courant dans l'ovocyte via l'électrode eI. Cette technique permet de résoudre des événements se produisant plus lentement que 2-3 ms.

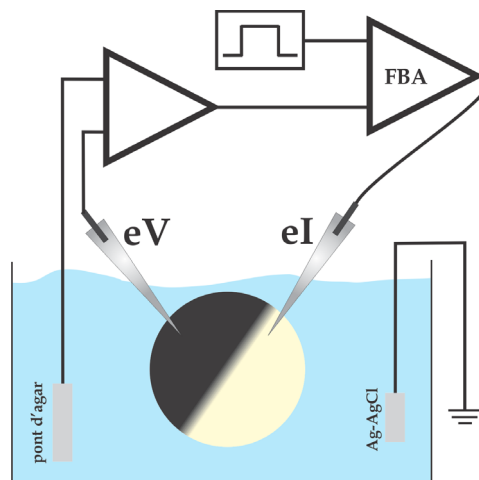


Figure 2.1 Circuit du montage d'électrophysiologie à deux microélectrodes en voltage imposé.

### 2.3 Technique de la trappe ionique (ITT)

Les fondements de l'ITT ont été décrits en détails dans un article récent du laboratoire de Lapointe (Blanchard et al., 2008). Cette technique permet de mesurer la concentration d'un ion à la surface d'un ovocyte en condition de voltage imposé à l'aide d'une électrode sélective (eS) dont le large embout (50-100  $\mu\text{m}$ ) est appuyé sur la membrane plasmique (Figure 2.2). La pression du bout de l'électrode sélective sur la membrane circonscrit un petit volume de solution extracellulaire qu'on nomme la trappe,

dont la hauteur, estimée à 5  $\mu\text{m}$ , correspond approximativement à l'épaisseur des invaginations membranaires. Afin d'améliorer la précision des mesures effectuées lorsqu'un courant important circule dans le bain, on positionne une électrode de référence (eR) remplie de KCl 1 M à moins de 100  $\mu\text{m}$  de la trappe. Cette électrode (eR) mesure les changements de potentiel locaux et permet de corriger le signal enregistré par l'électrode sélective. À titre d'exemple, l'ITT peut être utilisée pour mesurer le changement de concentration produit par un ion qui quitte la trappe lorsqu'il est cotransporté vers le cytoplasme par des protéines situées dans la portion de membrane plasmique délimitant la partie inférieure de la trappe.

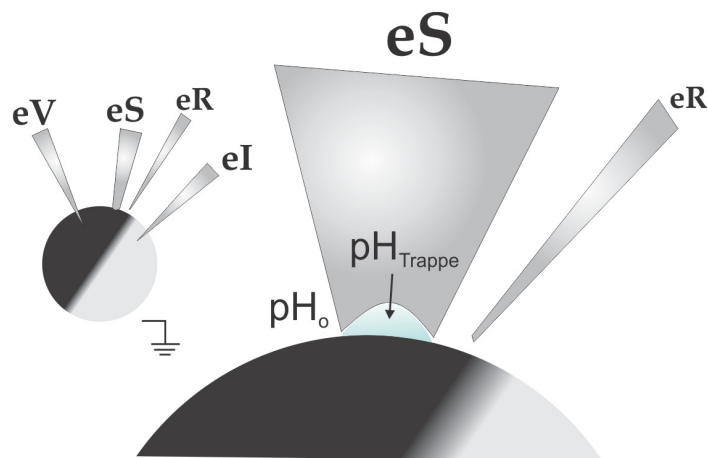


Figure 2.2 Montage expérimental relatif à la technique de la trappe ionique.

Dans le cas illustré, une électrode sélective aux  $\text{H}^+$  mesure les changements de pH dans la trappe.

## 2.4 Volumétrie

La volumétrie permet de mesurer les changements de volume d'un ovocyte qui ont lieu lorsque des molécules d'eau entrent ou sortent de son cytoplasme. Ces déplacements d'eau illustrent le principe d'osmose et peuvent être produits en réponse à l'application d'un choc osmotique ou à la perméation d'osmolytes à travers un canal ionique ou un

cotransporteur exprimé à la membrane plasmique de l'ovocyte. Les résultats de volumétrie que nous présentons dans cette thèse font intervenir la mesure en voltage imposé du courant de fuite inhérent à SGLT1, puis sur le même ovocyte, la mesure du gonflement produit par l'application d'un choc hyposmotique (concentration extracellulaire de mannitol réduite de 20 mM). Afin d'enregistrer les changements de volume d'un ovocyte, ce dernier est placé dans un bain d'environ 120  $\mu\text{l}$  où une solution saline est perfusée à 1,5 ml/min. Un espace perdu de 50  $\mu\text{l}$  sépare le bain de la valve électrique qui contrôle les changements de solutions. L'ovocyte est illuminé par une diode électroluminescente positionnée au dessus de lui dont le bout touche à la surface de la solution contenue dans le bain. Une caméra possédant un capteur « *charge-coupled device* » (CCD) et un objectif 3X est placée sous le bain et enregistre l'aire correspondant à la section transverse de l'ovocyte 30 fois par seconde à l'aide d'un logiciel fait sur mesure qui compte les pixels correspondant à l'ovocyte sur une image à haut contraste. En assumant qu'ovocyte est sphérique et en calibrant le système avec un bille d'acier de volume connu, les enregistrements de section transverse peuvent être convertis dynamiquement en mesures de volume.

Tel que décrit dans (Duquette et al., 2001; Bourgeois et al., 2005), la perméabilité à l'eau de l'ovocyte ( $L_P$ ) est calculée à partir de la pente du signal volumétrique résultant d'un choc hyposmotique selon la relation

$$L_P = \frac{1}{S \times v_w \times \Delta\pi} \left( \frac{dV}{dt} - \frac{dV}{dt_0} \right) \quad (2.1)$$

où  $dV/dt$  et  $dV/dt_0$  représentent les flux d'eau après et avant le choc hyposmotique, respectivement. La surface usuelle d'un ovocyte ( $S$ ) est estimée à 0,4  $\text{cm}^2$  considérant un facteur d'invagination membranaire de 9 (Zampighi et al., 1995). La constante  $v_w$  réfère au volume molaire de l'eau (18,2  $\text{cm}^3/\text{mol}$ ) et  $\Delta\pi$  chiffre le choc osmotique appliqué, soit 20 mOsm dans le cadre de nos résultats. Afin d'obtenir la perméabilité à l'eau attribuable uniquement à l'expression de SGLT1, on perfuse l'ovocyte avec une solution hyposmotique contenant 0,2 mM Pz une fois le choc osmotique initial effectué. Nous soustrayons ensuite

la  $L_P$  mesurée en Pz à la  $L_P$  totale de l'ovocyte mesurée lors du choc initial pour trouver la  $L_P$  spécifique à la présence de SGLT1 à la membrane plasmique.

## 2.5 Immuno-colorimétrie

L'immuno-colorimétrie est une technique qui permet de détecter et de quantifier l'expression d'une protéine membranaire à la membrane plasmique d'un ovocyte (Figure 2.3). La méthodologie expérimentale que nous avons utilisée est le résultat de modifications du protocole décrit dans (Zerangue et al., 1999). Typiquement, chaque groupe d'ovocytes correspondant à une condition à tester est placé dans un tube de 2 ml soumis aux manipulations suivantes.

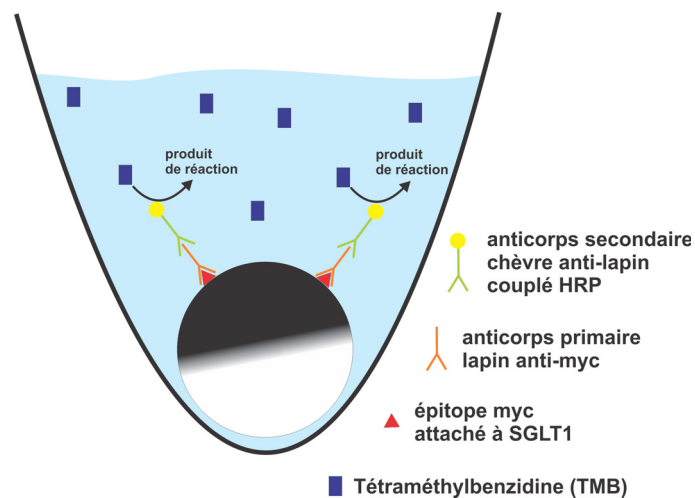


Figure 2.3 Immuno-colorimétrie sur un ovocyte exprimant SGLT1.

1. Incubation de 30 minutes de chaque groupe d'ovocytes dans la solution de blocage faite d'une solution saline contenant 5% d'albumine de sérum bovin (BSA).
2. Incubation de 60 minutes avec l'anticorps primaire (lapin anti-myc dilué à 1/500 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA)).
3. Rincer les ovocytes 8 fois avec la solution saline.



4. Répéter la première étape.
5. Incuber 60 minutes avec l'anticorps secondaire (chèvre anti-lapin couplé à la peroxydase du raifort (HRP) dilué à 1/500 (Millipore, Billerica, MA)).
6. Rincer les ovocytes 8 fois avec la solution saline.
7. Placer chaque ovocyte dans un tube de 1,5 ml et l'exposer pour 60 minutes à 100  $\mu$ l de solution préparée pour la réaction colorimétrique (9 ml d'un tampon de 50 mM phosphate/citrate + 2  $\mu$ l de peroxyde d'hydrogène 30 % + 1 mg de tétraméthylbenzidine (TMB) dissout dans 1 ml de dyméthylsulfoxyde (DMSO)).
8. Arrêter la réaction en ajoutant 50  $\mu$ l d'acide sulfurique 1 M dans chaque tube.
9. Prélever 100  $\mu$ l de la solution jaune dans laquelle l'ovocyte baigne, placer ce volume dans la cuvette d'un spectrophotomètre et mesurer l'absorbance à 450 nm.

## **2.6 Modélisation cinétique**

### **2.6.1 Théorie de Eyring et simulation de l'activité électrogénique**

Les cotransporteurs sont des protéines membranaires qui couplent l'énergie contenue dans le gradient électrochimique d'un ion au transport d'un substrat grâce à des changements de conformation. Les données structurales les plus actuelles soutiennent que ces mouvements effectués par les cotransporteurs obéissent au mécanisme d'accès alterné. La théorie de Eyring (Eyring, 1935) est une approche qui permet de modéliser les changements de conformation en les assimilant à des transitions à travers des barrières d'énergie dont la cinétique est gouvernée par des constantes de vitesse. Le cas le plus simple que l'on puisse imaginer afin d'illustrer le concept de modèle cinétique à accès alterné comprend deux états (Figure 2.4). Ce modèle pourrait décrire une protéine qui expose un groupe de résidus chargés donné d'un côté de la membrane, et qui doit effectuer un changement de conformation dépendant du voltage pour exposer ces résidus de l'autre côté de la membrane. L'évolution temporelle des probabilités d'occupation des deux états respecte alors l'équation différentielle

$$\frac{dC_i}{dt} = k_{ji}C_j - k_{ij}C_i \quad (2.2)$$

et est toujours soumise à

$$C_i + C_j = 1. \quad (2.3)$$

Les taux auxquels les transitions reliant les deux états auront lieu s'écrivent

$$k_{ij} = k_{ij0} \exp\left(z_i \alpha_i \frac{FV_m}{RT}\right) \quad (2.4)$$

$$k_{ji} = k_{ji0} \exp\left(-z_i(1 - \alpha_i) \frac{FV_m}{RT}\right) \quad (2.5)$$

où  $z_i$  est la valence de la charge équivalente mobile, et  $\alpha_i$  ( $0 \leq \alpha_i \leq 1$ ) représente l'asymétrie de la barrière d'énergie qui doit être franchie par le groupe de résidus et qui est modulée par le voltage.  $F$  est la constante de Faraday,  $R$  la constante des gaz et  $T$  la température. Les constantes de vitesses  $k_{ij0}$  et  $k_{ji0}$  sont indépendantes du potentiel membranaire.

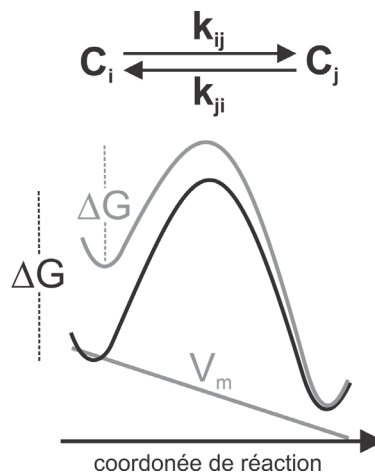


Figure 2.4 Barrière d'énergie ( $\Delta G$ ) inhérente à la transition entre les états  $C_i$  et  $C_j$ .

En gris : le nouveau  $\Delta G$  qui tient compte de l'application d'un potentiel membranaire ( $V_m$ ).

Dans le cadre de cette thèse, le modèle cinétique que nous avons utilisé pour décrire l'activité de SGLT1 est plus complexe et comporte 7 états dont les probabilités d'occupation sont soumises au groupe d'équations différentielles suivant

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} C_1 \\ C_2 \\ C_3 \\ C_4 \\ C_5 \\ C_6 \\ C_7 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -(k_{12} + k_{17}) & k_{21} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & k_{71} \\ k_{12} & -(k_{21} + k_{23}) & k_{32} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & k_{23} & -(k_{32} + k_{34}) & k_{43} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & k_{34} & -(k_{43} + k_{45}) & k_{54} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & k_{45} & -(k_{54} + k_{56}) & k_{65} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & k_{56} & -(k_{65} + k_{67}) & k_{76} & 0 \\ k_{17} & 0 & 0 & 0 & 0 & k_{67} & -(k_{76} + k_{71}) & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} C_1 \\ C_2 \\ C_3 \\ C_4 \\ C_5 \\ C_6 \\ C_7 \end{bmatrix} \quad (2.6)$$

La dépendance en voltage des constantes de vitesse est la même que celle exprimée par les équations (2.4) et (2.5). La valeur de  $k_{170}$  est ajustée afin de respecter la microréversibilité. Pour solutionner ces équations différentielles (méthode d'Euler) et ensuite simuler les courants produits par SGLT1 dans diverses conditions, nous avons écrit un programme avec le logiciel MATLAB 7.9.0 R2009b (MathWorks, Natick, MA). Afin de recréer plus fidèlement le déroulement temporel du voltage membranaire expérimental dans nos simulations, nous avons intégré les courants transitoires capacitifs produits par la membrane suite à un saut de potentiel. Les courants transitoires de SGLT1 mesurés dans une solution saline comportant 90 mM  $\text{Na}^+$  et 0,2 mM Pz fournissent une bonne approximation des courants capacitifs, car la charge ( $Q$ ) provenant de leur intégration produit une courbe  $Q(V_m)$  linéaire. En se servant de ce potentiel, toutes les simulations ont été effectuées avec une résolution temporelle de 20 points/ms sauf pour les 12 ms qui suivent chaque saut de voltage membranaire (ON et OFF) où la résolution a été augmentée à 100 points/ms.

## 2.6.2 Recuit simulé

L'utilisation du recuit simulé (SA) dans le contexte des problèmes de minimisation remonte à 1983 et est attribuable à Kirkpatrick (Kirkpatrick et al., 1983). Le SA vise à améliorer la convergence vers un minimum global fournie par un processus itératif Monte-

Carlo traditionnel, car ce dernier engendre souvent des solutions correspondant à un minimum local. Le SA repose sur une analogie entre l'objet que l'on désire minimiser et un solide qui refroidit doucement, c'est-à-dire qui atteint l'équilibre thermique à chaque température. Ainsi, le système est « chauffé » à une température initiale plutôt élevée, puis on utilise l'algorithme de Metropolis (Metropolis et al., 1953) (créé en 1952 dans le but de simuler adéquatement un ensemble d'atomes en équilibre à une température donnée) pour effectuer le triage des configurations aléatoires et amener progressivement le système à l'équilibre thermique. La température est ensuite réduite lentement en s'assurant que l'équilibre thermique est atteint à chaque étape de refroidissement. Une fois que le système est suffisamment refroidi, on trouve le minimum global du problème d'optimisation.

Dans le cas de notre modèle cinétique de SGLT1, un des paramètres ( $z_i, \alpha_i, k_{ij0}, k_{ji0}, N$ ) est modulé aléatoirement à chaque itération du processus et nous utilisons l'algorithme de Metropolis afin de comparer l'erreur de lissage entre l'ancien et le nouvel ensemble de paramètres (Figure 2.5) et déterminer si le changement est accepté ou rejeté. L'équilibre thermique correspond à une situation où, parmi les changements aléatoires des paramètres qui sont acceptés, on retrouve autant de changements qui diminuent l'erreur de lissage que de changements qui augmentent cette erreur. L'amplitude maximale des modulations aléatoires est ajustée dynamiquement pendant le déroulement du SA de façon à ce que 50 % des essais soient acceptés. Ceci permet d'échantillonner adéquatement l'espace des paramètres. D'autre part, le schéma de refroidissement doit être assez doux afin d'assurer la convergence vers le minimum global. Nous utilisons un schéma logarithmique ( $T_{i+1} = 0,95T_i$ ) où la température est diminuée d'un facteur fixe à chaque étape, car il a été démontré qu'un tel schéma garanti l'obtention du minimum global (Geman and Geman, 1984). D'autres détails concernant l'implémentation du SA sont donnés dans le chapitre 5.

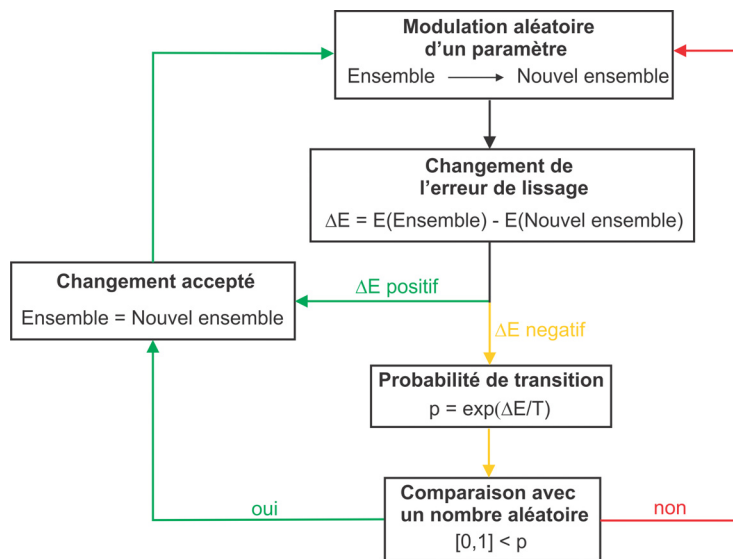


Figure 2.5 Boucle logique de l'algorithme de Metropolis.

## **3 The actual ionic nature of the leak current through the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter SGLT1**

Jean-Philippe Longpré, Dominique G. Gagnon, Michael J. Coady et Jean-Yves Lapointe

Biophysical Journal, 20 Janvier 2010; Volume 98 (2): 231-239.

### **3.1 Contribution personnelle**

J'ai réalisé toutes les expériences d'électrophysiologie et de volumétrie et j'ai effectué l'analyse des résultats. Michael Coady a eu l'idée d'utiliser la technique d'immuno-colorimétrie et m'a aidé à effectuer les manipulations. Il a aussi synthétisé les ARNm de SGLT1 et des deux mutants. Les mutants avaient été créés par Dominique Gagnon dans un projet précédent (Gagnon et al., 2006). J'ai rédigé une première version de l'article qui a été corrigée par mon directeur de recherche et Michael Coady. J'ai participé au processus de soumission et de révision avec l'aide de mon directeur de recherche.

### **3.2 Résumé**

L'expression du cotransporteur Na<sup>+</sup>/glucose SGLT1 dans des ovocytes de xénope est caractérisée par un courant de fuite sensible à la phlorizine (en absence de glucose) qu'on a initialement nommé le « *Na<sup>+</sup> leak* » et qui représente environ 5–10 % du courant de cotransport Na<sup>+</sup>/glucose maximal. Nous avons analysé la nature ionique du courant de fuite en utilisant un mutant (C292A) de SGLT humain capable de générer un courant de fuite trois fois plus grand, mais dont le potentiel d'inversion ( $V_R$ ) de  $\approx -15$  mV était le même que celui de wt SGLT1. Une diminution de la concentration extracellulaire de Na<sup>+</sup> ( $[Na^+]_o$ ) engendra un déplacement négatif modeste du  $V_R$ , tandis que ce dernier fut insensible à des modulations du Cl<sup>-</sup> extracellulaire. Lorsque le pH extracellulaire (pH<sub>o</sub>) fut diminué de 7,5 à 6,5 et 5,5,  $V_R$  fut déplacé de +15 et +40 mV, respectivement, indiquant que les protons

pouvaient être les porteurs de charge à  $\text{pH}_o$  bas, mais que d'autres ions devaient être impliqués à  $\text{pH}_o$  7,5. En présence de 15 mM  $[\text{Na}^+]_o$  ( $\text{pH}_o = 7.5$ ), l'ajout de 75 mM de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  ou  $\text{K}^+$  généra des augmentations similaires de l'amplitude du courant de fuite. Cette observation, qui fut confirmée avec wt SGLT1, indique la présence de voies de perméation distinctes pour le courant de fuite et le courant de cotransport. Ceci signifie que, contrairement à ce qui est généralement accepté, le courant de fuite ne peut être rationalisé par la translocation du cotransporteur lié au  $\text{Na}^+$  sans glucose. En utilisant des modifications chimiques et différents mutants de SGLT1, une relation entre le courant de fuite cationique et la perméabilité à l'eau passive fut identifiée, suggérant que l'eau et les cations puissent partager une voie de perméation commune à travers le cotransporteur.

### 3.3 Abstract

Expression of the  $\text{Na}^+$ /glucose cotransporter SGLT1 in *Xenopus* oocytes is characterized by a phlorizin-sensitive leak current (in the absence of glucose) that was originally called a “ $\text{Na}^+$  leak” and represents some 5–10 % of the maximal  $\text{Na}^+$ /glucose cotransport current. We analyzed the ionic nature of the leak current using a human SGLT1 mutant (C292A) displaying a threefold larger leak current while keeping a reversal potential ( $V_R$ ) of  $\approx -15$  mV as observed for wt SGLT1.  $V_R$  showed only a modest negative shift when extracellular  $\text{Na}^+$  concentration ( $[\text{Na}^+]_o$ ) was lowered and it was completely insensitive to changes in extracellular  $\text{Cl}^-$ . When extracellular pH ( $\text{pH}_o$ ) was decreased from 7.5 to 6.5 and 5.5,  $V_R$  shifted by +15 and +40 mV, respectively, indicating that protons may be the main charge carrier at low  $\text{pH}_o$  but other ions must be involved at  $\text{pH}_o$  7.5. In the presence of 15 mM  $[\text{Na}^+]_o$  ( $\text{pH}_o = 7.5$ ), addition of 75 mM of either  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ , or  $\text{K}^+$  generated similar increases in the leak current amplitude. This observation, which was confirmed with wt SGLT1, indicates a separate pathway for the leak current with respect to the cotransport current. This means that, contrary to previous beliefs, the leak current cannot be accounted for by the translocation of the Na-loaded and glucose-free cotransporter. Using chemical modification and different SGLT1 mutants, a relationship

was found between the cationic leak current and the passive water permeability suggesting that water and cations may share a common pathway through the cotransporter.

### 3.4 Introduction

Many ion-coupled cotransporters feature a leak current, i.e., an ion transport activity that can be observed as a specific, inhibitor-sensitive current in the absence of substrate. The exact relationship between these leak currents and the cotransport kinetic mechanism remains not well established. In some cases, the leak current is thought to be mediated by the reaction steps that precede the binding of the cotransported substrate. Indeed, the  $\text{Na}^+$  leak identified in the rat renal type II  $\text{Na}^+/\text{Pi}$  cotransporter (1) is proposed to be the result of the binding of a  $\text{Na}^+$  ion to the empty carrier facing the extracellular space followed by its translocation inside the cell. Such a mechanism would also explain the  $\text{Na}^+$  leak observed in the rat thyroid  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  symporter (2) as well as the  $\text{Na}^+$  leak reported to share the same pathway as the substrate in the human choline transporter (3). In other cases the leak is considered to be the result of a conduction pathway that is independent of the steps leading to cotransport. For example, the GABA transporter GAT1 has been shown to generate a  $\text{Li}^+$  leak current (4) and even a  $\text{Cs}^+$  leak (5) in the complete absence of  $\text{Na}^+$ , the cation driving the cotransport mechanism. Another isoform of the same transporter family (GAT4) displays mutually exclusive  $\text{Li}^+$  and  $\text{Cl}^-$  leaks that also require the absence of external  $\text{Na}^+$  (6). Nevertheless, in many instances, the experimental evidence favoring a distinct permeation mechanism for the leak current is not really exclusive. An extensive review of the subject is provided in Andrini et al. (7).

In the case of the human  $\text{Na}^+/\text{glucose}$  cotransporter (hSGLT1) expressed in *Xenopus laevis* oocytes, a phlorizin (Pz)-sensitive current averaging 5–10% of the maximal  $\text{Na}^+/\text{glucose}$  cotransport current is observed clearly (8,9). This leak current was considered to come from the glucose independent steps of the cotransport mechanism, i.e., extracellular  $\text{Na}^+$  binding, a slow reorientation of the loaded cotransporter followed by intracellular  $\text{Na}^+$  release and return of the  $\text{Na}^+$  binding site to the extracellular-facing



configuration. This current was consequently called a “Na<sup>+</sup> leak” (9) in the case of SGLT1 and other related transporters (1–3,10) despite the fact that evidence for the involvement of Na<sup>+</sup> is rather weak. Direct measurements comparing the uptake of <sup>22</sup>Na with the charge carried by the leak current seemed to support the idea of a leak mediated by Na<sup>+</sup> (11) but the small amplitude of the leak current makes the correlation between charge and Na<sup>+</sup> transport difficult to measure. The selectivity for Na<sup>+</sup> is seriously challenged by the observation that the leak current reverses at a potential ranging from –40 to –10 mV (9) whereas the reversal potential of Na<sup>+</sup> in a *Xenopus* oocyte is ~+70 mV. In addition, careful reading of the original study (9) indicates that a reduction in [Na<sup>+</sup>]<sub>o</sub> produced a positive displacement of the reversal potential instead of the negative displacement that would have been expected for a Na-selective pathway. In fact, the “Nernstian shift” depicted in Fig. 6 B of Umbach et al. (9) is not consistent with the values of  $V_R$  reported in the text of –42 mV in the presence of 100 mM [Na<sup>+</sup>]<sub>o</sub> and +6 mV at 10 mM [Na<sup>+</sup>]<sub>o</sub>. Although it was further shown that neither the magnitude nor the reversal potential of the leak current was sensitive to variations in extracellular K<sup>+</sup> (up to 25 mM) or to replacement of extracellular Cl<sup>–</sup> (9), the true ionic nature of the leak current remains to be established.

To investigate the ionic nature of the leak current through human SGLT1, we took advantage of a mutant (C292A) characterized previously in our laboratory (12) that exhibits a leak current three times larger than that of wt SGLT1 at hyperpolarizing potentials. Interestingly, the mutation C292Y in hSGLT1 is known to cause the hereditary disease glucose-galactose malabsorption syndrome (13,14). Our results show that the leak current can be carried by a variety of monovalent cations including some that are incapable of affecting the cotransporter presteady-state currents and steady-state cotransport currents. All experiments were repeated with wt SGLT1 and similar results were obtained though with a lower signal/noise ratio. We conclude that the leak current is due to ionic diffusion along a cationic-selective and Pz-sensitive aqueous pathway through the cotransporter. Contrary to previous belief, the leak current is independent of the Na<sup>+</sup> binding site that

leads to the different conformational states through which Na<sup>+</sup>/glucose cotransport is mediated.

## 3.5 Materials and Methods

### 3.5.1 Oocyte preparation and injection

Oocytes were removed surgically from *X. laevis* frogs and were defolliculated as described previously (15). One or two days after defolliculation, healthy oocytes were injected with 46 nL of water containing mRNA coding for human myc-hSGLT1 (0.1 µg/µL) or the C292A, C610A (0.25 µg/µL in each case) mutants of this protein. As shown previously (16), this N-terminus epitope-tagged version of human SGLT1 displays properties that are indistinguishable from the untagged form.

### 3.5.2 Molecular biology

The methods used to construct the human SGLT1, C292A, and C610A mutants were explained in detail previously (12). For some control experiments, the myc epitope needed to be removed from the pBS-myc-SGLT1 clones. This was done using the method of Sawano et al. (17) and the oligonucleotide CTAGTAGGATGGACAGTAGCACCTGG AG.

### 3.5.3 Electrophysiology

When needed, 5 mM α-methyl-D-glucose (αMG, a nonmetabolized glucose analog) or 200 µM Pz were added to the normal saline solution used for electrophysiology (in mM: 90 NaCl, 3 KCl, 0.82 MgCl<sub>2</sub>, 0.74 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES and adjusted to pH 7.5 with Tris). Solutions of different pH were obtained by mixing a normal saline solution buffered with 10 mM Tris with another buffered with 10 mM 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid until the desired pH was reached. Sodium replacement was carried out with *N*-methyl-D-glucamine (NMDG<sup>+</sup>) or, when appropriate, with Li<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>, or K<sup>+</sup>. Chloride replacement was

carried out with sodium cyclamate (Fluka, St. Louis, MO). Unless otherwise mentioned, all chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Two-microelectrode voltage-clamp experiments and data acquisition were carried out as described previously (15). Electrophysiological measurements were done using a voltage pulse protocol with a holding potential of  $-50$  mV and three sequential repetitions of 300 ms voltage steps ranging from  $-155$  mV to  $+70$  mV in increments of 25 mV. Current versus membrane potential curves (I/V curves) were obtained by averaging the current measured between 250 and 300 ms. Charge transfer curves (Q/V curves) were obtained as described previously (15). Briefly, current in the presence of 200  $\mu$ M Pz was subtracted from a corresponding current measured in the normal saline solution. The resulting signal was baseline corrected by subtracting the mean of a 20-ms time window positioned at the end of each pulse. Integrating this signal during the off relaxation of the leak current yielded the total charge transferred at each potential.

### 3.5.4 Volume measurements

Our control solution contained (in mM): 80 NaCl, 3 KCl, 0.82 MgCl<sub>2</sub>, 0.74 CaCl<sub>2</sub>, 5 HEPES and 25 mannitol. The hyposmotic solution was made by reducing the mannitol concentration from 25 to 5 mM. The effect of the reducing agent dithiothreitol (DTT) was studied by adding 10 mM DTT to isosmotic and hyposmotic solutions. An oocyte was perfused with isosmotic + DTT solution for at least 20 min before any recordings were carried out. An improved version of the apparatus described in Charron et al. (18) was used for volumetry experiments. The bath was illuminated from above with a light-emitting diode and the cross-section of the oocyte was measured 30 times/s with custom-made pixel counting software using the image obtained from a CCD camera and an inverted microscope with a 3X objective.

The water permeability ( $L_p$ ) of the oocyte was calculated using the swelling rate slope resulting from a hyposmotic shock, as described in Bourgeois et al. (19), according to the relation:

$$L_P = \frac{1}{S \times v_w \times \Delta\pi} \left( \frac{dV}{dt} - \frac{dV}{dt_0} \right) \quad (3.1)$$

where  $dV/dt$  is the water flux after the hyposmotic shock and  $dV/dt_0$  is the water flux before the shock.  $S$  is a standard oocyte surface of  $0.4 \text{ cm}^2$  assuming a membrane infolding factor of 9 (20),  $v_w$  is the specific volume of water ( $18.2 \text{ cm}^3/\text{mol}$ ) and  $\Delta\pi$  represents the size of the hyposmotic shock, 20 mOsm in the case of this study. To obtain the water permeability attributable only to SGLT1, the oocyte was exposed to a hyposmotic solution containing 200  $\mu\text{M}$  Pz after the initial hyposmotic shock. The  $L_P$  calculated from the measurement in Pz solution was then subtracted from the initial whole oocyte  $L_P$  to get the water permeability due to SGLT1 expression.

### 3.5.5 Immunocolorimetric detection of SGLT1 plasma membrane expression

Surface quantification of SGLT1 expression in *Xenopus* oocytes was carried out as described previously (21) with some modifications. Briefly, each group of oocytes was incubated for 30 min in a blocking solution (normal saline containing 5% bovine serum albumin) that was used also for subsequent steps of the assay unless otherwise noted. The oocytes were then incubated for 60 min with the primary antibody (rabbit anti-myc mAb, 1/500 dilution (Cell Signaling Technology, Danvers, MA)). Oocytes were washed eight times in normal saline solution before being exposed again for 30 min to the blocking solution and then incubated for 60 min with the secondary antibody (goat anti-rabbit HRP conjugated, 1/500 dilution (Millipore, Billerica, MA)). The oocytes were finally washed eight times in normal saline solution. To carry out the colorimetric reaction, oocytes were exposed individually for 60 min to 100  $\mu\text{L}$  of colorimetric reaction solution (composition: 9 mL of 50 mM phosphate/citrate buffer pH 9 + 2  $\mu\text{L}$  of 30% hydrogen peroxide + 1 mg tetramethylbenzidine dissolved in 1 mL DMSO). Then, 50  $\mu\text{L}$  of 1 M sulfuric acid was added to end the reaction and absorbance ( $\lambda = 450 \text{ nm}$ ) was measured in 100  $\mu\text{L}$  of the

resulting yellow solution (without oocyte). Control experiments were carried out using the human SGLT1 (wt and mutants) lacking the epitope tag.

### 3.5.6 Statistics

Data are presented as average  $\pm$  SE where  $n$  is the number of oocytes used, and are compared using Student's  $t$ -test. In the figures, error bars are not shown when smaller than symbols.

## 3.6 Results

Fig. 3.1 *A* depicts the total currents measured in the presence of a normal saline solution or in a saline solution containing 0.2 mM Pz or 5 mM  $\alpha$ MG for a series of oocytes expressing hSGLT1. In Fig. 3.1 *B*, the increased current due to addition of 5 mM  $\alpha$ MG is depicted together with the leak current obtained by subtraction of the current measured in the presence of 0.2 mM Pz from the current measured in the saline solution. At  $-155$  mV, the leak current averaged  $-82.3 \pm 9.8$  nA, displaying an average reversal potential of  $-14.8 \pm 2.7$  mV ( $n = 5$ ). The average leak current at  $-155$  mV represented 5.6% of the cotransport current that was  $-1460 \pm 150$  nA for the same oocytes. The C292A mutant, which was partially characterized in a previous study, mediated a much larger leak current (12). The average total currents for oocytes expressing C292A are shown in Fig. 3.1 *C*. Fig. 3.1 *D* depicts the corresponding leak currents, which averaged  $-287 \pm 19$  nA at  $-155$  mV with a mean reversal potential of  $-13.9 \pm 2.3$  mV ( $n = 6$ ). The cotransport current observed on adding 5 mM  $\alpha$ MG was very much reduced for the C292A mutant and averaged only  $-140 \pm 17$  nA at  $-155$  mV.

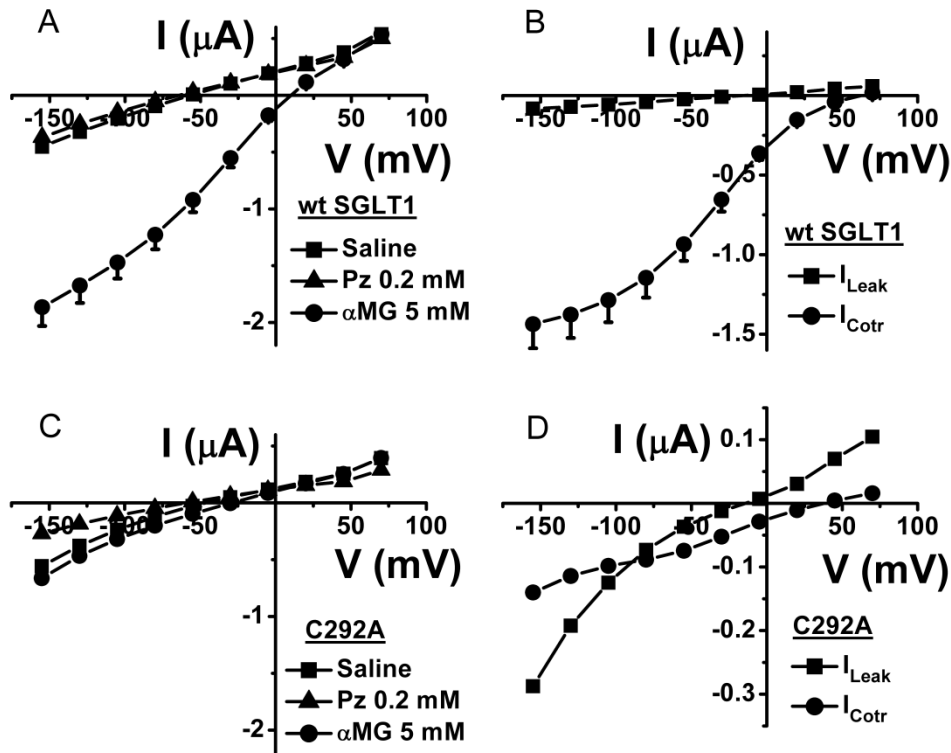


Figure 3.1 Leak and cotransport currents of wt hSGLT1 and C292A mutant.

(A) The total currents of wt SGLT1 for five oocytes coming from three different donor frogs in normal saline solution, with 0.2 mM Pz or with 5 mM  $\alpha$ MG. (B) The leak current was obtained by subtracting the current in the presence of 0.2 mM Pz from the current in normal saline solution. The cotransport current represents the increase in wt SGLT1 current on addition of 5 mM  $\alpha$ MG. (C) The same solutions used in A were presented to the C292A mutant ( $n = 6$ ). (D) The leak current and the cotransport current were extracted from the total currents (C) of the C292A mutant. Mean  $\pm$  SE are shown.

As wt SGLT1 was shown previously to be capable of generating a  $H^+$ /glucose cotransport when  $pH_o$  is reduced from 7.5 to 6.5 and 5.5 in the absence of  $Na^+$  (22–24), we tested the effect of external pH on C292A. In the presence of  $Na^+$ , the effect of  $pH_o$  on the current stimulated by 5 mM  $\alpha$ MG was significant. The cotransport current at pH 5.5

averaged  $-924 \pm 65$  nA at  $-155$  mV ( $n = 7$ ) (Fig. 3.2 A). This indicates that the cotransport capacity of the mutant is rescued by an acidic pH. In the presence of 90 mM  $\text{Na}^+$  and protons ( $\text{pH}_o = 6.5$ ), the apparent affinity of this mutant SGLT1 for  $\alpha\text{MG}$  was  $0.12 \pm 0.04$  mM at  $-155$  mV (data not shown). In the case of wt SGLT1, a  $\text{H}^+$ /glucose cotransport with a low affinity for glucose can be measured in the presence of an acidified extracellular solution only when  $\text{Na}^+$  is replaced by an impermeant cation (22,23). If 90 mM  $\text{Na}^+$  remains in the extracellular solution, acidification of the external solution has a relatively small effect on the cotransport current ( $n = 5$ ) (Fig. 3.2 B). This indicates that the C292A mutant is well expressed at the oocyte membrane and can bind  $\alpha\text{MG}$  with a normal affinity similar to that of wt SGLT1. The difference between the mutant and the wt is that the mutant requires the presence of both  $\text{Na}^+$  and an acidic pH to generate a cotransport current whereas the wt functions well with  $\text{Na}^+$  and is not very pH-sensitive.

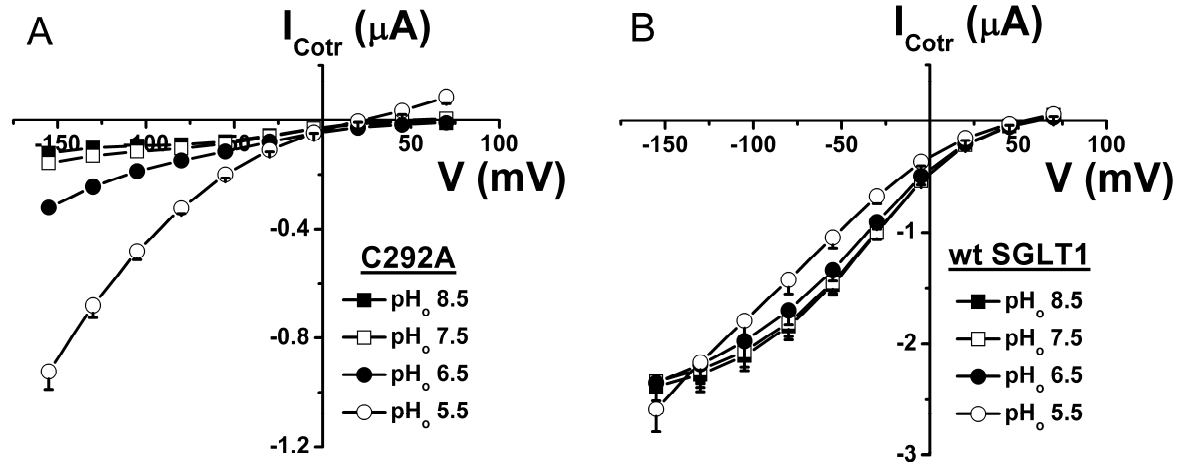


Figure 3.2 Proton-driven cotransport currents of wt SGLT1 and C292A mutant.

(A) The cotransport currents of the C292A mutant were obtained by subtracting the currents in the normal saline solution (buffered with Tris and 2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid) from the currents in the presence of 5 mM  $\alpha\text{MG}$  ( $n = 7$ ). (B) The same data analysis as in A was carried out on the currents of wt SGLT1 ( $n = 5$ ). Mean  $\pm$  SE are shown.

We next examined the nature of the large leak current of C292A. Replacing extracellular  $\text{Na}^+$  by  $\text{NMDG}^+$  produced a progressive decrease in the leak current (Fig. 3.3) and a modest shift of the reversal potential (Fig. 3.3, *inset*) by +18 mV between 5 mM and 90 mM  $\text{Na}^+$  (14 mV per decade,  $n = 8$ ). This shift represents only 24% of the predicted shift in  $E_{\text{Na}}$  and is indicative of  $\text{Na}^+$  being only one of several permeant ions present. A portion of the  $\text{Na}^+$  effect on the leak current amplitude certainly reflects the requirement of  $\text{Na}^+$  for Pz binding as is observed commonly for wt SGLT1 (25,26).

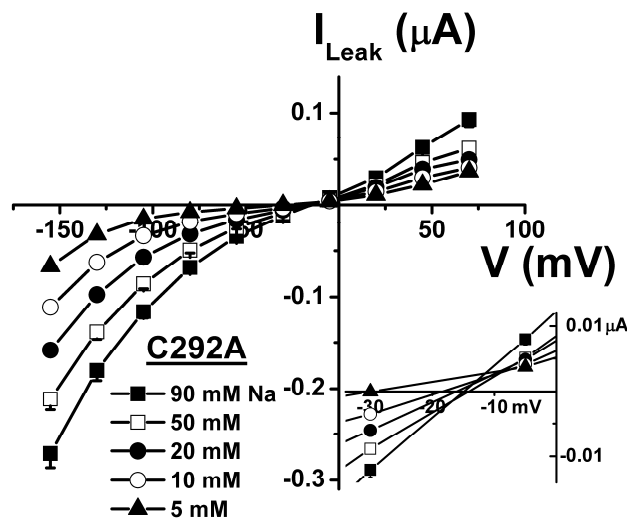


Figure 3.3  $\text{Na}^+$  dependence of the C292A leak current.

At each extracellular  $\text{Na}^+$  concentration, the current in the presence of 0.2 mM Pz was subtracted from the current in saline solution (pH 7.5) to derive the leak current ( $n = 8$ ). The reversal potentials of the leak currents at each  $[\text{Na}^+]_o$  were enlarged (*inset*). Mean  $\pm$  SE are shown.

In Fig. 3.4, the effects of extracellular  $\text{Cl}^-$  replacement on the leak current through C292A are shown. Replacement of  $\text{Cl}^-$  by  $\text{cylamate}^-$  in the external solution, in the presence of 90 mM  $\text{Na}^+$ , produced no significant effect on the leak current or on its reversal



potential that remained constant when measured in the presence of  $\text{Cl}^-$  concentrations varying from 6 to 70 mM ( $n = 6$ ).

As cationic flux seems responsible for the leak current through C292A, and because proton flux through SGLT1 has been described (22,23), we tested the possibility that protons could mediate the leak current through C292A. When the external solution was acidified to pH 6.5 and pH 5.5, the leak current increased significantly (Fig. 3.5) and the reversal potential was displaced toward more positive values (Fig. 3.5, inset). From an external pH of 7.5 to 5.5, the reversal potential changed at a rate of 23 mV/pH unit ( $n = 12$ ). This is consistent with a large proportion of the leak current being mediated by protons at pH<sub>o</sub> 5.5. However, it is clear that at pH<sub>o</sub> 7.5 the role of protons in the leak current is minimal because increasing the pH<sub>o</sub> to 8.5 did not modulate the leak current or the reversal potential in any significant way.

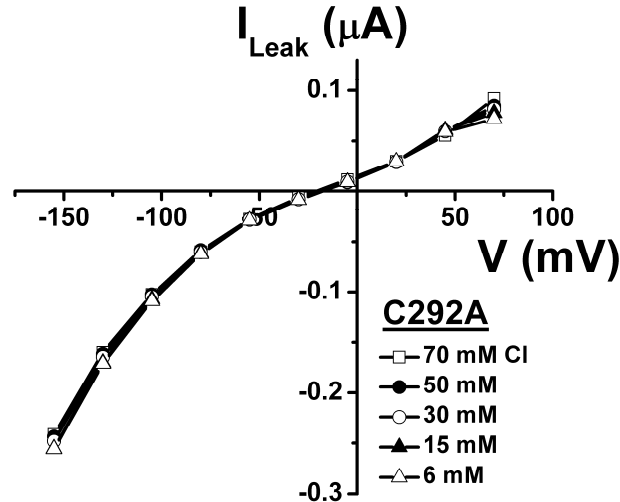


Figure 3.4  $\text{Cl}^-$  dependence of the C292A leak current.

The leak currents were obtained by subtracting the current in the presence of 0.2 mM Pz from the current in the saline solution at each extracellular  $\text{Cl}^-$  concentration ( $n = 6$ ). Mean  $\pm$  SE are shown.

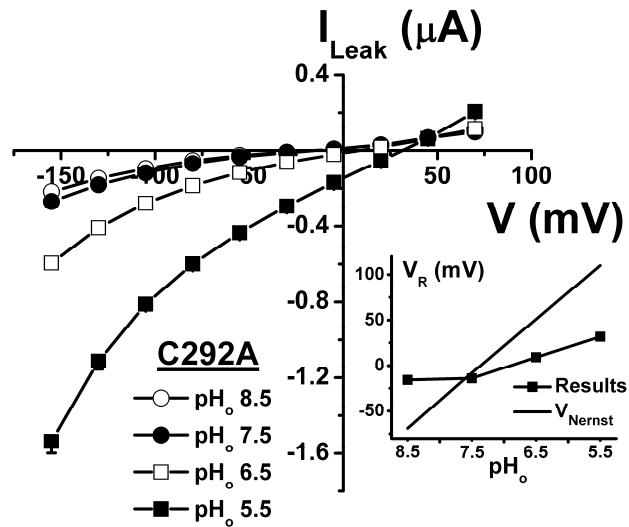


Figure 3.5 Proton dependence of the C292A leak current.

At each  $\text{pH}_o$ , the current in the presence of 0.2 mM Pz was subtracted from the current in saline solution to get the leak current ( $n = 12$ ). The reversal potentials were extracted from the leak current at each  $\text{pH}_o$  and plotted against  $\text{pH}_o$  (*inset*). The Nernst equation was used to obtain a theoretical prediction of the behavior of the reversal potential, with  $\text{pH}_i = 7.35$ . Mean  $\pm$  SE are shown.

As the leak current  $V_R$  is far from  $E_{\text{Na}}$  at pH 7.5 (Fig. 3.3), where proton flux is negligible, and as this  $V_R$  varies less than would be expected as a function of  $[\text{Na}^+]_o$  (Fig. 3.3, *inset*), other cations must participate in the leak current. Because external  $\text{Na}^+$  is required for Pz binding (25,26) (that in turn is required for leak current measurement), we replaced 75 mM  $\text{Na}^+$  with NMDG<sup>+</sup>, keeping 15 mM  $\text{Na}^+$  present in the external solution to permit sufficient Pz binding. With the C292A mutant expressed at the plasma membrane, the leak current averaged  $-56.9 \pm 4.2$  nA at  $-130$  mV (Fig. 3.6). When an additional 75 mM  $\text{Na}^+$  was present in the external solution the leak, as already seen in Fig. 3.3, increased to  $-111.5 \pm 7.4$  nA at  $-130$  mV. Interestingly, leak currents of similar amplitudes were attained by adding 75 mM  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ , or  $\text{K}^+$  (Fig. 3.6). Of these monovalent cations, only  $\text{Na}^+$  can generate a significant cotransport current through wt SGLT1 although  $\text{Li}^+$  has been reported

to support a small cotransport current at very high glucose concentrations (23). Analysis of the presteady-state currents, which are transient, Pz-sensitive currents measured in the absence of substrate as the oocyte is quickly clamped to various membrane potentials, is a useful tool for identifying the cations that can bind to the cotransporter (27–30). Presteady-state currents are associated with the voltage-dependent reorientation of the empty carrier and with extracellular cation binding steps (31–33). The charge corresponding to the area under the presteady-state current is plotted against the membrane potential ( $Q/V$ ) in Fig. 3.6 B for the C292A mutant. As expected, changing  $[Na^+]_o$  from 15 to 90 mM was associated with greater charge entry when the membrane potential was hyperpolarized. This was not observed when 75 mM  $Li^+$ ,  $Cs^+$ , or  $K^+$  was added to the 15 mM  $Na^+$  solution, thus establishing that extracellular  $Na^+$  is the only cation tested that can produce significant charge displacement while interacting with the mutant SGLT1 binding site. This implies that several monovalent cations are equally capable of mediating a leak current even if the conformational changes they generate are distinct from those produced by the interaction of  $Na^+$  with the specific cation binding sites of the cotransporter.

To eliminate the possibility that these results might be due to the C292A mutant having perturbed cation binding sites, we repeated these experiments with the small leak current of wt SGLT1. Starting from 15 mM  $Na^+$ , addition of 75 mM  $Na^+$ ,  $Li^+$ ,  $Cs^+$ , or  $K^+$  stimulated the leak current significantly (Fig. 3.7 A). The corresponding selectivity seemed to be slightly different from the C292A mutant and displayed the following preference:  $K^+ > Cs^+ > Li^+ = Na^+$ . For wt SGLT1, the presteady-state charge transfer was larger than for the C292A mutant, but it was clear that only  $Na^+$  could generate significant charge movement (Fig. 3.7 B).

The results presented so far suggest that the leak current mediated by  $Li^+$ ,  $Cs^+$ , and  $K^+$  ions occur through a Pz-sensitive pathway that does not involve the cotransporter cation binding site. This is reminiscent of the passive water permeability ( $L_p$ ) associated with SGLT1.  $L_p$  was shown to be Pz-sensitive (34,35) and to not require the presence of either  $Na^+$  or glucose (36).  $L_p$  was also independent of membrane potential, indicating that the

pathway used by water through SGLT1 was not influenced by the conformational changes that are required to generate cotransport (37). One interesting possibility is that the cationic leak current could share the pathway with water across the cotransporter. We have shown in a previous study (12) that treating wt SGLT1 with DDT produced a decrease in its leak current. In a series of paired experiments where the leak current and the phlorizin-sensitive  $L_P$  were measured before and after a 20-min treatment with 10 mM DDT, the leak current was reduced 3.4-fold for the wt SGLT1 ( $n = 7$ ) and by 2.6-fold for the mutant C292A ( $n = 8$ ) (Fig. 3.8). In both cases, this decrease in the leak current was associated with a small but highly significant decrease in the Pz-sensitive  $L_P$  ( $p < 0.0002$  for wt and  $p < 0.0002$  for C292A).

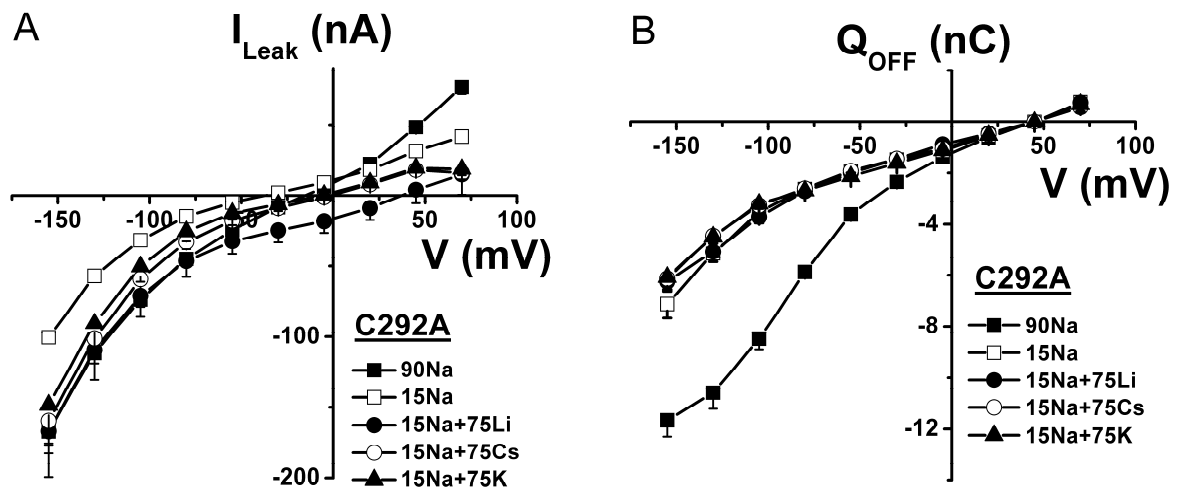


Figure 3.6 Cationic selectivity of C292A leak current.

(A) In the presence of 15 mM  $Na^+$ , 75 mM of additional  $Na^+$  or  $Li^+$ ,  $Cs^+$ , or  $K^+$  was added to the bath and current was measured; current was also measured using the same solutions but in the presence of 0.2 mM Pz, and subtraction of the Pz current from the current in the corresponding saline solution was carried out to derive each leak current ( $n = 5$ ). (B)  $Q/V$  curves associated with the leak currents of A depicting the transient charge movements related to the return to  $-50$  mV after each voltage pulse. Mean  $\pm$  SE are shown.

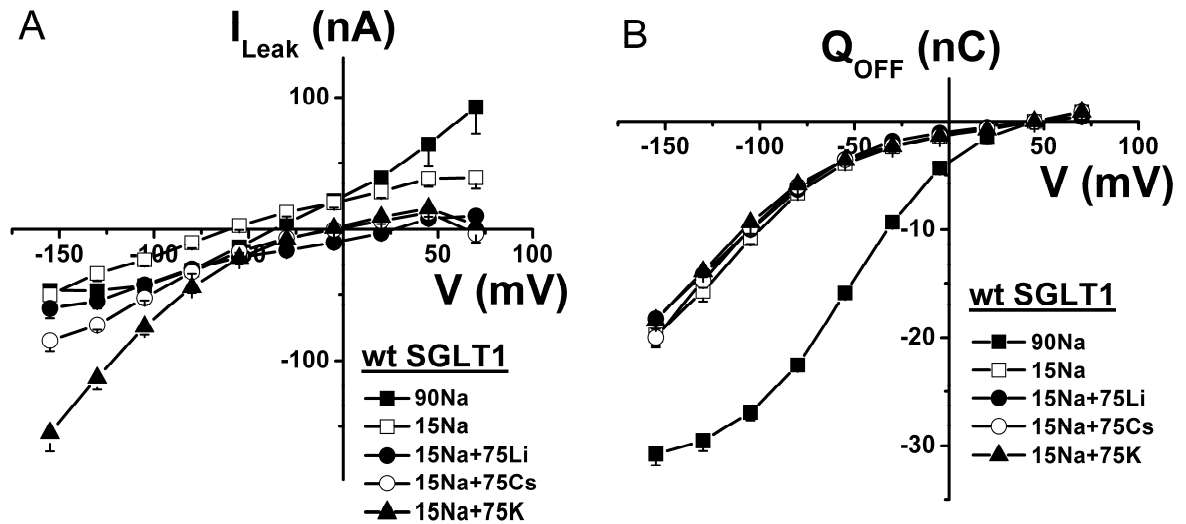


Figure 3.7 Cationic selectivity of wt SGLT1 leak current.

(A) In the presence of 15 mM  $\text{Na}^+$ , 75 mM of additional  $\text{Na}^+$  or  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ , or  $\text{K}^+$  was added to the bath and the leak current was derived by subtracting current measured in each saline solution containing 0.2 mM Pz from current measured in the corresponding saline solution ( $n = 4$ ). (B)  $Q/V$  curves associated with the leak currents of A depicting the transient charge movements related to the return to  $-50$  mV after each voltage pulse. Mean  $\pm$  SE are shown.

We further examined whether this relationship between Pz-sensitive  $L_p$  and leak current could hold for different mutants such as C292A and C610A, which are known to display leak currents that are significantly larger than for wt SGLT1 (12). To accurately interpret these results, it was necessary to correct the measured leak and  $L_p$  for the level of expression of each mutant with respect to wt SGLT1. This was carried out by immunocolorimetric detection on live oocytes. As depicted in Fig. 3.9 B, the expression levels of C292A (measured on  $n = 2$  different groups of 5–12 oocytes) and of another mutant, C610A ( $n = 2$ ), and wt SGLT1 ( $n = 4$ ) were measured. Specificity of the whole method was established by using noninjected oocytes as well as oocytes expressing the nontagged versions of each mutant and of wt SGLT1. In each case, the specific signal was obtained by subtracting the spectrophotometric absorbance of noninjected oocytes and

resulted in expression levels relative to wt SGLT1 of  $77 \pm 13\%$  and  $64 \pm 13\%$  for C292A and C610A respectively. Once the measured leak currents and  $L_p$  were corrected for this expression level at the plasma membrane, C292A displayed a leak current 3.6 times larger than for wt SGLT1 ( $p < 0.001$ ) whereas its  $L_p$  was 2.1 times larger ( $p < 0.001$ ). In the case of C610A, a similar correlation was observed (see Fig. 3.9 A).

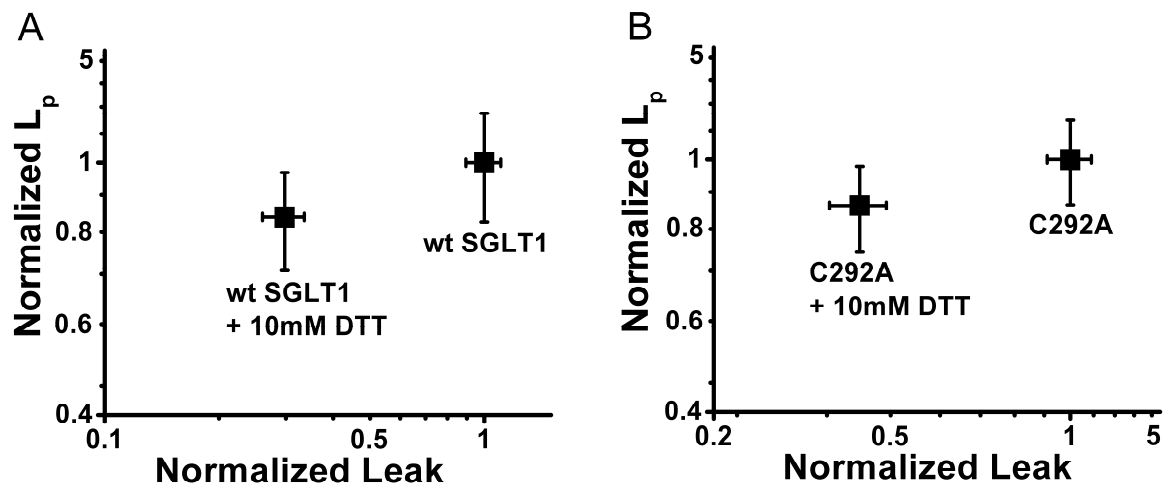


Figure 3.8 Effect of DTT on water permeability and leak current.

(A) Effects of 10 mM DTT on wt SGLT1 leak current (at  $-130$  mV) and  $L_p$ , where the results obtained using the control saline solution were normalized to a value of 1 for each oocyte. (B) Effect of 10 mM DTT on the leak current (at  $-130$  mV) and  $L_p$  of the C292A mutant, where the results obtained using the control saline solution were normalized to a value of 1 for each oocyte. In both cases, the effect of DTT on  $L_p$  was statistically significant ( $p < 0.0002$ ).

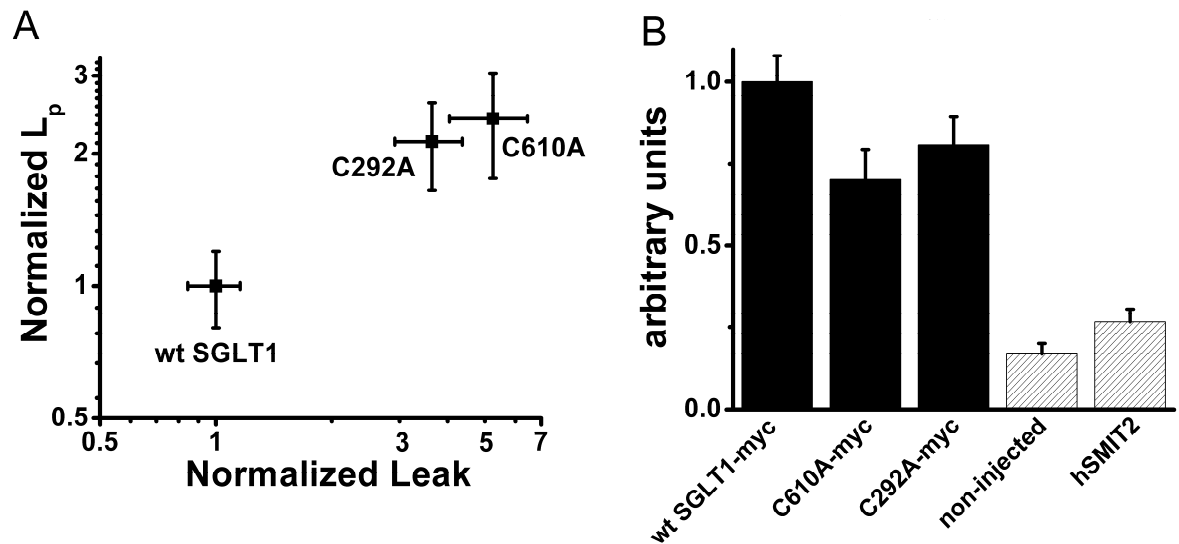


Figure 3.9 Relationship between water permeability and leak current.

(A) Effect of mutations C292A and C610A on  $L_p$  and the leak current (at  $-155$  mV) relative to wt SGLT1 after correcting for plasma membrane expression level. (B) Immunocolorimetric detection of plasma membrane expression levels of wt SGLT1 ( $n = 4$ , where each is a group of 5–12 oocytes), C292A ( $n = 2$ ) and C610A ( $n = 2$ ). Noninjected oocytes ( $n = 4$ ) as well as oocytes expressing the human  $\text{Na}^+$ /myo-inositol cotransporter 2 (hSMIT2) ( $n = 2$ ) were used as negative controls. Mean  $\pm$  SE are shown.

### 3.7 Discussion

The large signal/noise ratio of electrophysiological measurements carried out on oocytes expressing SGLT1 and other members of the SLC5A family has allowed the detection of small currents mediated by cotransporters in the absence of substrate. First described in 1990 by Umbach et al. (9) for rabbit SGLT1, the leak current reversal potential was  $-42$  mV in the presence of  $100$  mM  $[\text{Na}^+]_o$  and was reported to move to  $+6$  mV in the presence of  $10$  mM  $[\text{Na}^+]_o$ . Even though the absolute value of  $V_R$  was clearly different from  $E_{\text{Na}}$  and the reported positive change on reducing  $[\text{Na}^+]_o$  was opposite from the expected

change for a  $\text{Na}^+$  selective pathway, the leak current was assumed to be a  $\text{Na}^+$  leak and has been modeled by us and others as representing conformations that the cotransporter might adopt in the absence of substrate (8,24,32,38,39). The ionic nature of the leak current associated to SGLT1 has never been revisited. Taking advantage of a mutant displaying a strong leak current, we felt that we had a good opportunity to better understand the nature of this current.

### 3.7.1 The leak through the C292A mutant

The leak of C292A is clearly cationic selective as reduction of  $[\text{Cl}^-]_o$  from 70 to 6 mM did not produce any change in the leak amplitude nor in its reversal potential. In fact, Fig. 3.4 illustrates the good reproducibility provided by our method to measure Pz-sensitive leak currents in oocytes. The main observation of this study is that a Pz-sensitive leak current can be measured for different monovalent cations provided sufficient  $\text{Na}^+$  is present to allow Pz to bind to its specific site. Under these conditions, adding  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ , or  $\text{K}^+$  produced a stimulation of the leak current and the expected positive shift in the reversal potential. For hyperpolarizing potentials where 15 mM  $\text{Na}^+$  is expected to be sufficient to support efficient Pz binding, it is remarkable to note that the I/V curves of the leak currents observed in the presence of  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ , or  $\text{K}^+$  are all similar (Fig. 3.6 A). In contrast, only  $\text{Na}^+$  can affect the Q/V curve (Fig. 3.6 B) and produce significant conformational changes leading to high affinity glucose cotransport. Although it has been reported that  $\text{Li}^+$  can bind to SGLT1 and can drive glucose into the cell (23), it must do so through conformational changes that are different from the ones produced by  $\text{Na}^+$  binding, as can be inferred from Fig. 3.6 B. Moreover, the fact that  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ , and  $\text{K}^+$  can mediate leak currents that are similar to the leak observed with  $\text{Na}^+$  suggests that the cationic leak current is present for both  $\text{Na}^+$  free and  $\text{Na}^+$  bound cotransporter states. Therefore, because leak currents of similar amplitudes can be observed with cations that do not participate in the conformational changes leading to high affinity substrate cotransport, the translocation of



the Na-loaded cotransporter cannot satisfactorily explain the leak current and there is no reason to include it in future modeling of the cotransport mechanism.

The leak current of C292A was increased significantly by external acidification to  $\text{pH}_o$  6.5 and  $\text{pH}_o$  5.5, and its reversal potential was shifted toward positive membrane potentials (Fig. 3.5). Although protons are permeable through the leak pathway, the proton concentration does not seem to be high enough to mediate a significant portion of the leak current at pH 7.5. In consequence, in the presence of the normal saline solution (pH 7.5), the leak current is expected to be mediated mainly by  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$ . Assuming intracellular concentrations of 10 mM for  $\text{Na}^+$  (18) and 80 mM for  $\text{K}^+$  (40), the calculated  $E_{\text{Na}}$  and  $E_{\text{K}}$  would be +55 mV and -83 mV, respectively. The shifts in  $V_R$  produced by replacing 75 mM NMDG by the same amount of  $\text{Na}^+$  or  $\text{K}^+$  in the external solution (Fig. 3.6 A) can be accounted for by the Goldman-Hodgkin-Katz equation using permeability ratios of 2:1 for  $P_{\text{K}}/P_{\text{Na}}$  and 0.3 for  $P_{\text{NMDG}}/P_{\text{Na}}$ .

### 3.7.2 The leak through the wt SGLT1

Even though the wt SGLT1 generates a leak current three times smaller than the C292A mutant, all the experiments carried out in this study were done using both proteins and support the idea that the leaks observed in wt SGLT1 and in the C292A mutant are similar in nature. As was the case for C292A, our experiments showed that the wt SGLT1 leak was insensitive to  $[\text{Cl}^-]_o$  (data not shown), a result that was also reported for rabbit SGLT1 (7,9). The leak current of wt SGLT1 could also be stimulated by addition of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ , or  $\text{K}^+$  to the external solution. In contrast to C292A, external solution acidification did not produce a significant increase in wt SGLT1 leak current amplitude in the presence of 90 mM  $[\text{Na}^+]_o$  as other cations such as  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  seem to be preferred. This indicates that the selectivity of the leak current is slightly different for wt SGLT1 than for C292A. In Fig. 3.7 A, adding  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ , or  $\text{K}^+$  to a solution already containing 15 mM  $\text{Na}^+$  stimulated a leak current with the following selectivity (at -130 mV):  $\text{Na}^+ \sim \text{Li}^+ < \text{Cs}^+ < \text{K}^+$ . This contrasts with C292A where all these four cations had similar permeability.

### 3.7.3 The leak current and the cotransporter water permeability share a common pathway

We have obtained several lines of evidence that cations and water share a common molecular pathway through the cotransporter. Both permeation pathways are Pz-sensitive and independent of the conformational changes that are specifically triggered by Na<sup>+</sup> binding to its transport site (this study and Duquette (37)). A relationship was found between  $L_P$  and  $I_{Leak}$  for wt SGLT1 and two mutants presenting an increased leak current. A relationship was also observed on paired measurements involving the effect of DTT on wt SGLT1 and the C292A mutant. Nevertheless, the pathways used by water and by cations to cross SGLT1 may not be 100% identical and it is possible that a mutation or a chemical modification could affect the movement of water and cations in variable proportions. At this point, the observation that the water permeability and cationic leak currents are affected in the same direction by two mutations and by a DTT treatment is only suggestive that water and cations may share a common pathway.

Interestingly, in 2008, a high-resolution structure of the *Vibrio parahaemolyticus* Na<sup>+</sup>/galactose symporter (vSGLT) was published (41). vSGLT has a sequence identity of 32% (60% similarity) with hSGLT1. It is interesting to see that water filled vestibules are present on the intra- and extracellular sides of the cotransporter. It is also notable that the amino acid corresponding to human C292 is located near the water-filled cytosolic vestibule in a short linker disrupting the helix forming the sixth transmembrane segment (according to the nomenclature of Abramson and Wright (42)). Mutating this residue to an alanine is likely to introduce some stiffness in this linker and make the sixth transmembrane segment more rigid. This constraint could be the source of the higher ionic leak and water permeability of this mutant and a cause for the incapacity of the C292A mutant to translocate glucose across the membrane at normal pHs.

### 3.8 Conclusion

The leak current associated with SGLT1 was discovered in 1990 and was wrongly referred to as a  $\text{Na}^+$  leak. It was considered to involve the cotransporter states associated with the voltage-dependent conformational changes of the free and  $\text{Na}^+$  bound carrier. This study indicates that the leak current is mediated by a variety of monovalent cations, including cations that do not generate the conformational changes associated to the  $\text{Na}^+$  binding site used for cotransport. A certain relationship between cation and water flux suggests that cations and water molecules may share some common pathway. We propose that the leak current is mediated by a water-filled crevice that crosses the SGLT1 molecule and that is closed when Pz is bound to the cotransporter.

### 3.9 Acknowledgements

This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research (MOP-10580).

### 3.10 References

1. Forster, I., N. Hernando, J. Biber, and H. Murer. 1998. The voltage dependence of a cloned mammalian renal type II  $\text{Na}^+/\text{Pi}$  cotransporter (NaPi-2). *J Gen Physiol* 112:1-18.
2. Eskandari, S., D. D. Loo, G. Dai, O. Levy, E. M. Wright, and N. Carrasco. 1997. Thyroid  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity. *J Biol Chem* 272:27230-27238.
3. Iwamoto, H., R. D. Blakely, and L. J. De Felice. 2006.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , and pH dependence of the human choline transporter (hCHT) in *Xenopus* oocytes: the proton inactivation hypothesis of hCHT in synaptic vesicles. *J Neurosci* 26:9851-9859.

4. MacAulay, N., T. Zeuthen, and U. Gether. 2002. Conformational basis for the Li(+)-induced leak current in the rat gamma-aminobutyric acid (GABA) transporter-1. *J Physiol* 544:447-458.
5. Mager, S., N. Kleinberger-Doron, G. I. Keshet, N. Davidson, B. I. Kanner, and H. A. Lester. 1996. Ion binding and permeation at the GABA transporter GAT1. *J Neurosci* 16:5405-5414.
6. Karakossian, M. H., S. R. Spencer, A. Q. Gomez, O. R. Padilla, A. Sacher, D. D. Loo, N. Nelson, and S. Eskandari. 2005. Novel properties of a mouse gamma-aminobutyric acid transporter (GAT4). *J Membr Biol* 203:65-82.
7. Andrini, O., C. Ghezzi, H. Murer, and I. C. Forster. 2008. The leak mode of type II Na(+)-P(i) cotransporters. *Channels (Austin)* 2.
8. Chen, X. Z., M. J. Coady, F. Jackson, A. Berteloot, and J. Y. Lapointe. 1995. Thermodynamic determination of the Na<sup>+</sup>: glucose coupling ratio for the human SGLT1 cotransporter. *Biophys J* 69:2405-2414.
9. Umbach, J. A., M. J. Coady, and E. M. Wright. 1990. Intestinal Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes is electrogenic. *Biophys J* 57:1217-1224.
10. Coady, M. J., B. Wallendorff, D. G. Gagnon, and J. Y. Lapointe. 2002. Identification of a novel Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter. *J Biol Chem* 277:35219-35224.
11. Mackenzie, B., D. D. Loo, and E. M. Wright. 1998. Relationships between Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter (SGLT1) currents and fluxes. *J Membr Biol* 162:101-106.
12. Gagnon, D. G., P. Bissonnette, and J. Y. Lapointe. 2006. Identification of a disulfide bridge linking the fourth and the seventh extracellular loops of the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *J Gen Physiol* 127:145-158.

13. Martin, M. G., E. Turk, M. P. Lostao, C. Kerner, and E. M. Wright. 1996. Defects in Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter (SGLT1) trafficking and function cause glucose-galactose malabsorption. *Nat Genet* 12:216-220.
14. Wright, E. M. 1998. I. Glucose galactose malabsorption. *Am J Physiol* 275:G879-882.
15. Gagnon, D. G., C. Frindel, and J. Y. Lapointe. 2007. Effect of substrate on the pre-steady-state kinetics of the Na<sup>(+)</sup>/glucose cotransporter. *Biophys J* 92:461-472.
16. Bissonnette, P., J. Noel, M. J. Coady, and J. Y. Lapointe. 1999. Functional expression of tagged human Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J Physiol* 520 Pt 2:359-371.
17. Sawano, A., and A. Miyawaki. 2000. Directed evolution of green fluorescent protein by a new versatile PCR strategy for site-directed and semi-random mutagenesis. *Nucleic Acids Res* 28:E78.
18. Charron, F. M., M. G. Blanchard, and J. Y. Lapointe. 2006. Intracellular hypertonicity is responsible for water flux associated with Na<sup>+</sup>/glucose cotransport. *Biophys J* 90:3546-3554.
19. Bourgeois, F., M. J. Coady, and J. Y. Lapointe. 2005. Determination of transport stoichiometry for two cation-coupled myo-inositol cotransporters: SMIT2 and HMIT. *J Physiol* 563:333-343.
20. Zampighi, G. A., M. Kreman, K. J. Boorer, D. D. Loo, F. Bezanilla, G. Chandy, J. E. Hall, and E. M. Wright. 1995. A method for determining the unitary functional capacity of cloned channels and transporters expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Membr Biol* 148:65-78.
21. Zerangue, N., B. Schwappach, Y. N. Jan, and L. Y. Jan. 1999. A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* 22:537-548.
22. Hirayama, B. A., D. D. Loo, and E. M. Wright. 1994. Protons drive sugar transport through the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter (SGLT1). *J Biol Chem* 269:21407-21410.

23. Hirayama, B. A., D. D. Loo, and E. M. Wright. 1997. Cation effects on protein conformation and transport in the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *J Biol Chem* 272:2110-2115.
24. Chen, X. Z., M. J. Coady, F. Jalal, B. Wallendorff, and J. Y. Lapointe. 1997. Sodium leak pathway and substrate binding order in the Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter. *Biophys J* 73:2503-2510.
25. Oulianova, N., S. Falk, and A. Berteloot. 2001. Two-step mechanism of phlorizin binding to the SGLT1 protein in the kidney. *J Membr Biol* 179:223-242.
26. Falk, S., N. Oulianova, and A. Berteloot. 1999. Kinetic mechanisms of inhibitor binding: relevance to the fast-acting slow-binding paradigm. *Biophys J* 77:173-188.
27. Hilgemann, D. W., D. A. Nicoll, and K. D. Philipson. 1991. Charge movement during Na<sup>+</sup> translocation by native and cloned cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Nature* 352:715-718.
28. Rakowski, R. F. 1993. Charge movement by the Na/K pump in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol* 101:117-144.
29. Mager, S., J. Naeve, M. Quick, C. Labarca, N. Davidson, and H. A. Lester. 1993. Steady states, charge movements, and rates for a cloned GABA transporter expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuron* 10:177-188.
30. Wadiche, J. I., J. L. Arriza, S. G. Amara, and M. P. Kavanaugh. 1995. Kinetics of a human glutamate transporter. *Neuron* 14:1019-1027.
31. Chen, X. Z., M. J. Coady, and J. Y. Lapointe. 1996. Fast voltage clamp discloses a new component of presteady-state currents from the Na<sup>(+)</sup>-glucose cotransporter. *Biophys J* 71:2544-2552.
32. Parent, L., S. Supplisson, D. D. Loo, and E. M. Wright. 1992. Electrogenic properties of the cloned Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter: II. A transport model under nonrapid equilibrium conditions. *J Membr Biol* 125:63-79.
33. Loo, D. D., A. Hazama, S. Supplisson, E. Turk, and E. M. Wright. 1993. Relaxation kinetics of the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5767-5771.

34. Loo, D. D., T. Zeuthen, G. Chandy, and E. M. Wright. 1996. Cotransport of water by the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13367-13370.
35. Duquette, P. P., P. Bissonnette, and J. Y. Lapointe. 2001. Local osmotic gradients drive the water flux associated with Na<sup>(+)</sup>/glucose cotransport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3796-3801.
36. Meinild, A., D. A. Klaerke, D. D. Loo, E. M. Wright, and T. Zeuthen. 1998. The human Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter is a molecular water pump. *J Physiol* 508 (Pt 1):15-21.
37. Duquette, P.-P. 2000. Étude de la force motrice impliquée dans le flux d'eau associé au cotransport Na<sup>+</sup>/glucose. Université de Montréal, Montréal.
38. Falk, S., A. Guay, C. Chenu, S. D. Patil, and A. Berteloot. 1998. Reduction of an eight-state mechanism of cotransport to a six-state model using a new computer program. *Biophys J* 74:816-830.
39. Loo, D. D., B. A. Hirayama, E. M. Gallardo, J. T. Lam, E. Turk, and E. M. Wright. 1998. Conformational changes couple Na<sup>+</sup> and glucose transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7789-7794.
40. Cougnon, M., P. Bouyer, P. Hulin, T. Anagnostopoulos, and G. Planelles. 1996. Further investigation of ionic diffusive properties and of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pathways in *Xenopus laevis* oocyte cell membrane. *Pflugers Arch* 431:658-667.
41. Faham, S., A. Watanabe, G. M. Besserer, D. Cascio, A. Specht, B. A. Hirayama, E. M. Wright, and J. Abramson. 2008. The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na<sup>+</sup>/sugar symport. *Science* 321:810-814.
42. Abramson, J., and E. M. Wright. 2009. Structure and function of Na<sup>(+)</sup>-symporters with inverted repeats. *Curr Opin Struct Biol* 19:425-432.

Reprinted from *Biophysical Journal*, volume 98 (2), Jean-Philippe Longpré, Dominique G. Gagnon, Michael J. Coady and Jean-Yves Lapointe, The actual ionic nature

of the leak current through the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter SGLT1, 231-239, Copyright (2010), with permission from Elsevier.



## **4 Determination of the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter (SGLT1) turnover rate using the ion-trap technique**

Jean-Philippe Longpré et Jean-Yves Lapointe

Biophysical Journal, 5 Janvier 2011; Volume 100 (1): 52-59.

### **4.1 Contribution personnelle**

J'ai effectué toutes les expériences d'électrophysiologie du projet ainsi que l'analyse des résultats. J'ai conçu les figures et écrit un manuscrit qui a ensuite été corrigé par mon directeur de recherche. J'ai participé au processus de révision qui a mené à la publication de l'article.

### **4.2 Résumé**

Le cotransporteur Na<sup>+</sup>/glucose (SGLT1) est une protéine membranaire qui couple le transport de deux ions Na<sup>+</sup> à une molécule de glucose en utilisant le mécanisme d'accès alterné. Selon ce principe, chaque molécule de cotransporteur peut adopter l'une ou l'autre de deux conformations principales : une où les sites de liaison sont accessibles de la solution extracellulaire, et l'autre où les sites de liaison font face à la solution intracellulaire. La vitesse de cotransport (« *turnover rate* » (TOR)) représente le nombre de cycles complets que chaque protéine accomplit par seconde. La détermination du TOR a des conséquences importantes dans le contexte de l'étude du mécanisme de cotransport, car aucune constante de vitesse impliquée dans la génération du cotransport dans une direction donnée (changements de conformation et réactions de liaison et de dissociation) ne peut être plus lente que le TOR mesuré dans les mêmes conditions. De plus, le TOR peut être utilisé afin d'estimer le nombre de molécules de cotransporteur impliquées dans la génération d'une activité fonctionnelle globale donnée. Dans cette étude, nous obtenons une estimation indépendante du TOR de SGLT1 humain exprimé dans des ovocytes de

xénope à l'aide de la technique de la trappe ionique. Cette approche détecte la quantité d'ions qui entrent ou qui sont libérés de l'espace restreint existant entre la membrane plasmique de l'ovocyte et la large pointe d'une électrode sélective. Profitant du fait que hSGLT1 puisse effectuer un transport de H<sup>+</sup>/glucose en absence de Na<sup>+</sup>, une électrode sélective au H<sup>+</sup> nous a permis de déterminer un TOR de  $8,00 \pm 1,3 \text{ s}^{-1}$  en présence de 35 mM  $\alpha$ -méthyl glucose à  $-150 \text{ mV}$  (pH 5,5). Pour le même groupe d'ovocytes, un TOR de  $13,3 \pm 2,4 \text{ s}^{-1}$  fut estimé dans des conditions s'approchant de  $V_{\text{max}}$ , c'est-à-dire en présence de 90 mM Na<sup>+</sup> et 5 mM  $\alpha$ -méthyl glucose. Dans ces circonstances, le courant de cotransport moyen était  $-1.08 \pm 0.61 \text{ }\mu\text{A}$  ( $n = 14$ ), et cette activité provenait de  $3.6 \pm 0.7 \times 10^{11}$  molécules de cotransporteur par ovocyte en moyenne.

### 4.3 Abstract

The Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter (SGLT1) is a membrane protein that couples the transport of two Na<sup>+</sup> ions and one glucose molecule using the so-called alternating access mechanism. According to this principle, each cotransporter molecule can adopt either of two main conformations: one with the binding sites accessible to the extracellular solution and one with the binding sites facing the intracellular solution. The turnover rate (TOR) is the number of complete cycles that each protein performs per second. Determination of the TOR has important consequences for investigation of the cotransport mechanism, as none of the rate constants involved in mediating transport in a given direction (conformational changes and binding and unbinding reactions) can be slower than the TOR measured under the same conditions. In addition, the TOR can be used to estimate the number of cotransporter molecules involved in generating a given ensemble activity. In this study, we obtain an independent estimation of the TOR for human SGLT1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes applying the ion-trap technique. This approach detects the quantity of ions released in or taken up from the restricted space existing between the oocyte plasma membrane and the tip of a large ion-selective electrode. Taking advantage of the fact that hSGLT1 in the absence of Na<sup>+</sup> can cotransport glucose with protons, we used a pH

electrode to determine a TOR of  $8.00 \pm 1.3 \text{ s}^{-1}$  in the presence of 35 mM  $\alpha$ -methyl-glucose at  $-150 \text{ mV}$  (pH 5.5). For the same group of oocytes, a TOR of  $13.3 \pm 2.4 \text{ s}^{-1}$  was estimated under near- $V_{\text{max}}$  conditions, i.e., in the presence of 90 mM  $\text{Na}^+$  and 5 mM  $\alpha$ -methyl-glucose. Under these circumstances, the average cotransport current was  $-1.08 \pm 0.61 \text{ }\mu\text{A}$  ( $n = 14$ ), and this activity was generated by an average of  $3.6 \pm 0.7 \times 10^{11}$  cotransporter molecules/oocyte.

## 4.4 Introduction

Cotransporters constitute a class of membrane proteins that couple the transmembrane transport of several solutes. For example, cotransporters can generate secondary active transport by linking the (thermodynamically) downhill movement of an ion to the uphill movement of a cotransported solute. The archetype of these proteins is the  $\text{Na}^+$ /glucose cotransporter (SGLT1), which was first postulated in 1965 (1) and uses the electrochemical gradient of  $\text{Na}^+$  to drive the absorption of glucose into epithelial cells of the small intestine and the renal proximal tubule. SGLT1 cDNA was cloned in 1987 (2) which allowed its expression in *Xenopus laevis* oocytes and its precise characterization using two-electrode voltage-clamp electrophysiology and voltage-clamp fluorometry (3–7). Unlike ion channels, which fluctuate between states of different conductance, cotransporters must engage in a cycle of conformational changes, going through occluded states to translocate  $\text{Na}^+$  and substrate across the lipid bilayer by exposing their binding sites to one side of the membrane at a time. First introduced by Jardetzky (8), the existence of such an alternating access mechanism during cotransport is now supported by evidence drawn from structural studies (9,10) including the recent crystallization of vSGLT (11), a bacterial homolog of human SGLT1. The rate at which this cycle of conformational changes occurs is called the turnover rate (TOR) and is expressed as the average number of complete cycles/s performed by a single cotransporter molecule. If a cell expresses  $N$  electrogenic cotransporter molecules, the cotransport current ( $I_{\text{Cotr}}$ ) is given by

$$I_{Cotr} = N \times \text{TOR} \times s \times e, \quad (4.1)$$

where  $s$  is the net number of elementary charges ( $e$ ) transported during a complete transport cycle ( $s = 2$  for SGLT1).

Over the last decades, different estimates have been made for the SGLT1 TOR, but they do not agree on a consensus value. The first estimate of TOR was made by Peerce et al. (12) using binding experiments ( $^3\text{H}$  phlorizin and fluorescein isothiocyanate) and glucose uptake data on brush-border membranes prepared from rabbit small intestine. They suggested that the TOR of the  $\text{Na}^+$ /glucose cotransporter was in the range 3–6  $\text{s}^{-1}$ . In the first extended kinetic study of rabbit SGLT1 expressed in oocytes (13), a six-state model was described with a series of rate constants that could reproduce the basic steady-state and pre-steady-state electrophysiological observations. At negative membrane potentials, the intracellular  $\text{Na}^+$  dissociation was suggested to be the rate-limiting step at 10  $\text{s}^{-1}$ , which implies that TOR cannot be faster than 10  $\text{s}^{-1}$ . It is also possible to deduce the TOR of a cotransporter from measurement of the phlorizin-sensitive charge displacement in the absence of substrate (14). Given a few assumptions (see Discussion), the ratio of  $I_{Cotr}$  to the maximal charge displaced ( $Q_{max}$ ) is an estimation of TOR and yields a value of 57  $\text{s}^{-1}$  (14) for very negative membrane potentials. More recently, a study from the same laboratory presented a revised estimation of  $Q_{max}$  with prolonged voltage pulses, which led to a TOR of 28  $\text{s}^{-1}$  (4). This last estimation of TOR would suggest that a typical  $I_{Cotr}$  of 1  $\mu\text{A}/\text{oocyte}$  would imply the presence of  $1.1 \times 10^{11}$  carriers/oocyte. This is much larger than the estimated density of particles associated with SGLT1 protein using freeze-fracture electron microscopy (15).

In an effort to better delimit the TOR of SGLT1 and to contrast it with the rate-limiting steps of different kinetic models, we sought to use a method that is independent of both the  $I_{Cotr}/Q_{max}$  ratio and of the detection of particles putatively representing the presence of SGLT1 in the plasma membrane. The ion-trap technique (ITT), an

experimental approach recently presented by our laboratory (16), offers the possibility of shedding new light on the problem of correctly estimating the value of TOR for hSGLT1.

## 4.5 Materials and Methods

### 4.5.1 Oocyte preparation and injection

Oocytes were surgically removed from *Xenopus laevis* frogs and were individually separated before defolliculation, as described previously (17). One to two days after the procedure, healthy oocytes were injected with 4.6 ng of mRNA coding for human myc-hSGLT1 at a concentration of 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in water. This N-terminus myc-tagged version of human SGLT1 was previously shown to be functionally indistinguishable from the untagged form (17). Oocytes were kept in Barth's solution (in mM, 90 NaCl, 3 KCl, 0.82  $\text{MgSO}_4$ , 0.41  $\text{CaCl}_2$ , 0.33  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , and 5 HEPES, pH 7.6) supplemented with 5% horse serum, 2.5 mM  $\text{Na}^+$  pyruvate, 100 units/ml penicillin, and 0.1 mg/ml streptomycin for 4–5 days before performing electrophysiological experiments.

### 4.5.2 Solutions

When needed, 5 mM  $\alpha$ -methyl-D-glucose ( $\alpha\text{MG}$ , a nonmetabolized glucose analog) was added to the normal saline solution used for electrophysiology (in mM, 90 NaCl, 3 KCl, 0.82  $\text{MgCl}_2$ , 0.74  $\text{CaCl}_2$ , and 10 HEPES, pH 7.5 with Tris). The pH 5.5  $\text{Na}^+$ -free solution used for measurements of  $\text{H}^+/\alpha\text{MG}$  cotransport was identical to the normal saline solution with the exception that it was weakly buffered with 1.5 mM MES and 90 mM NaCl was replaced with 65 mM *N*-methyl-D-glucamine and 50 mM D-mannitol. To inhibit the cotransporter, 0.2 mM phlorizin (Pz) was added. Given the low affinity of SGLT1 for  $\alpha\text{MG}$  at acidic pH (18), where the  $K_m$  is 4 mM at  $-150$  mV, measurement of  $\text{H}^+/\text{glucose}$  cotransport activity was done by adding 5 or 35 mM  $\alpha\text{MG}$  to the acidic solution. When 35 mM  $\alpha\text{MG}$  was used, an equivalent amount of D-mannitol was removed. Unless otherwise mentioned, all chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

### 4.5.3 Electrophysiology and the ion-trap technique

Two-microelectrode voltage-clamp measurements and current filtering (1 kHz) were performed using an OC-725C oocyte clamp (Warner Instrument, Hamden, CT). Data recording was achieved using a Digidata 1322A acquisition system and pClamp 8.2 software (Axon Instruments, Union City, CA). Voltage and current microelectrodes were filled with 1 M KCl and showed a resistance of 1–3 M $\Omega$ . The bath current electrode was an Ag-AgCl pellet and the reference voltage electrode was a 1 M KCl agar bridge.

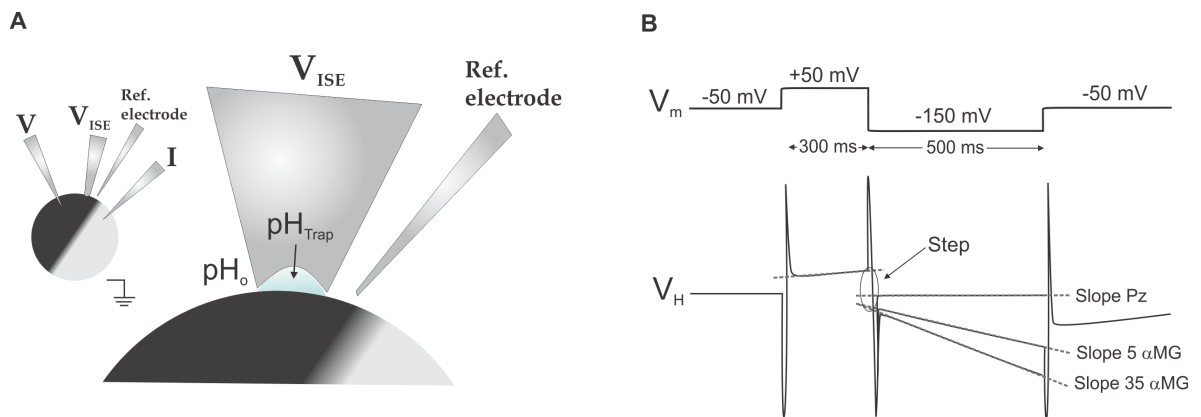


Figure 4.1 Experimental arrangement and pulse protocol used for the ITT.

(A) An oocyte is placed in a bath, observed with a low-power microscope, and impaled with voltage and current electrodes to perform voltage-clamp measurements. An ISE with a large tip diameter (50–100  $\mu\text{m}$ ) is gently pushed against the plasma membrane to create a confined space called a trap between the plasma membrane infolding and the H<sup>+</sup>-selective resin of the ISE. A reference electrode is placed in the bath near the ISE tip to monitor local potential changes and correct the ISE signal ( $V_H$ ) accordingly. (B) Voltage ( $V_m$ ) pulse protocol and expected ISE signals. Straight lines are fitted to the ISE signal at  $-150$  mV and at  $+50$  mV to obtain the two parameters used in the ITT: the slope and the step. The slope is simply the rate at which  $V_H$  changes at  $-150$  mV. The step is the sudden change in  $V_H$  observed at the time that  $V_m$  is changed from  $+50$  to  $-150$  mV.

The ion trap technique (ITT) has been described in detail in a recent publication from this laboratory (16). Briefly, the technique consists in measuring ionic concentrations at the surface of a voltage-clamped oocyte using a large (tip diameter 50–100  $\mu\text{m}$ ) ion-selective electrode (ISE). To improve the accuracy of the measurement when significant currents are circulating in the bath, the signal of the ISE was corrected for any changes in bath potential by using an additional reference microelectrode (filled with 1 M KCl) positioned within 100  $\mu\text{m}$  of the ISE (Fig. 4.1 A). When the large-tip ISE is gently pushed against the oocyte plasma membrane, it creates a small volume of extracellular solution called the trap (height  $\sim 5 \mu\text{m}$ ) (16), which roughly corresponds to the thickness of the observed plasma-membrane invaginations. ITT can be used to measure the steady-state transport of an ion across the membrane lining the trap. For example, a constant inward transport of a given ion will lead to a stable decrease in the trap concentration of this ion within 20–30 s. ITT can also be used to detect the initial rate of change in the trap ionic concentration when the transmembrane transport of a given ion is suddenly changed. This can be done by applying a fast voltage pulse to the oocyte while using the excellent time resolution of the ISE ( $\sim 20$  ms). The initial binding of an ion to a newly exposed binding site of a transporter will result in an abrupt change in local ionic concentration that we call the step. In the following hundreds of milliseconds, the steady-state transmembrane ionic flux is reached, producing a constant change in the voltage of the ISE that we call the slope (Fig. 4.1 B).

As explained below in greater detail, we chose to use pH-sensitive electrodes instead of  $\text{Na}^+$ -sensitive electrodes to improve the accuracy in the determination of the TOR. Electrophysiological and ITT measurements were performed using five sequential repetitions of a voltage pulse protocol with a holding potential of  $-50$  mV and a 300-ms voltage step at  $+50$  mV followed by a 500 ms hyperpolarization at  $-150$  mV (Fig. 4.1 B). To obtain an accurate value of the  $\text{H}^+$ -selective electrode voltage ( $V_{\text{H}}$ ), the drift in  $V_{\text{H}}$  was corrected by subtracting the slope measured at  $-50$  mV before changing the membrane potential using a time window of 700 ms. After this drift correction, a straight line was

fitted to the  $V_H$  measured in the last 200 ms spent at +50 mV and in the last 400 ms spent at -150 mV. The instantaneous step in  $V_H$  upon the sudden voltage change was evaluated by measuring the difference between the two straight lines at the time where the voltage was stepped from +50 to -150 mV (see Fig. 4.1 B). All signals were sampled at a frequency of 1 point/0.15 ms, and the noise level on the  $V_H$  signal was further reduced by averaging 10 consecutive points (the final signal displaying 1 data point/1.5 ms). The final  $V_H$  signal was low-pass filtered using a cut-off frequency of 200 Hz.

#### 4.5.4 Estimating the cotransporter TOR using ITT

It is well established that the transport stoichiometry of SGLT1 is 2 Na<sup>+</sup> ions/glucose molecule (6,19,20) (i.e.,  $s = 2$  in Eq. 4.1), but in the absence of external Na<sup>+</sup>, it also functions as a H<sup>+</sup>/glucose cotransporter (18,21). The transport stoichiometry appears to be conserved (2 H<sup>+</sup> for 1 glucose molecule), as suggested by the sigmoidal activation curve as a function of external proton concentration. SGLT1 was studied in the absence of Na<sup>+</sup> using a weakly buffered acidic external solution (pH 5.5). In the absence of substrate, oocytes expressing SGLT1 displayed Pz-sensitive transient currents of large amplitude (22) that could be integrated to yield a displaced charge  $Q$  for a given voltage pulse  $V$ . An example of such a  $Q$ - $V$  curve is presented in Fig. 4.2 A. The data could be fitted with a Boltzman equation:

$$(Q - Q_+) = Q_{max} / [1 + \exp(V - V_{1/2}) zF/RT] \quad (4.2)$$

where  $Q_{max} = (Q_- - Q_+)$ .  $Q_-$  and  $Q_+$  represent the charge transferred when the oocyte membrane potential moves from the resting potential to a very negative or a very positive potential, respectively. Once fitted, the data of Fig. 4.2 A are characterized by a  $V_{1/2}$  of -94 mV, a  $z$  of 0.45, and a  $Q_{max}$  of 24 nC ( $n = 14$ ). As a negative membrane potential ( $V_m$ ) is known to facilitate extracellular Na<sup>+</sup> or H<sup>+</sup> binding, the cotransporter is assumed to carry a displaceable negative charge that will move with the cation binding site. This is depicted in the kinetic model shown in Fig. 4.2 B, which is generally used to describe the activity of



SGLT1 and other related cotransporters (13,19,23,24). When  $V_m$  is positive, the cotransporter experiences a conformational change that brings it into the C1 configuration (inward-facing configuration). When  $V_m$  is changed to a negative value, the cotransporter moves into configuration C2, where it can bind external protons and reach the C3 configuration (the outward-facing cation-bound configuration). The  $Q$ - $V$  curve reflects these conformational changes and shows that, at +50 mV, the mobile charge has almost reached a limiting value, indicating that most of the cotransporters are in the C1 configuration. When  $V_m$  goes from +50 to -150 mV in the absence of glucose, a fraction,  $f$ , of the cotransporters moves into the C3 configuration. As seen from Fig. 4.2 A, such a voltage pulse would result in the displacement of 65% of the mobile charges (i.e., from 10% inward-facing at +50 mV to 75% outward-facing at -150 mV).

In this ITT experiment, we are measuring the local proton concentration at the external surface of an oocyte in the trap. As  $V_m$  is switched from +50 mV to -150 mV, a fraction  $f$  of the cotransporters suddenly switches to conformation C3, and a number of protons consequently attach to the cotransporter external site. This will produce a sudden increase in the trap pH, which is referred to as the step:

$$\text{step} = \frac{2 \times N_{\text{trap}} \times f}{A \times V_{\text{trap}} \times \beta}, \quad (4.3)$$

where  $A$  is the Avogadro number,  $V_{\text{trap}}$  is the volume of the trap,  $N_{\text{trap}}$  is the number of cotransporters lining the trap, and  $\beta$  is the buffering power of the external solution given in M/pH unit. When  $\alpha$ MG is added to the external solution, it will equilibrate with the trap within 20 s (16), and upon applying a voltage step from +50 to -150 mV, the step will be followed by a progressive alkalinization that will occur at the actual TOR of the cotransporter. This alkalinization rate is called the slope and is given by

$$\text{slope} = \frac{2 \times N_{\text{trap}} \times \text{TOR}}{A \times V_{\text{trap}} \times \beta}. \quad (4.4)$$

Clearly, if the step and the slope are obtained from the same experiment (same  $V_{\text{trap}}$  and same  $N_{\text{trap}}$ ), the slope/step ratio yields  $\text{TOR}/f$ . The TOR can be calculated if  $f$  is estimated from the charge displacement ( $Q$ - $V$  curve) between +50 and -150 mV. If the cotransport current caused by adding  $\alpha\text{MG}$  is measured simultaneously, the number of cotransporters/oocyte can be obtained using Eq. 4.1.

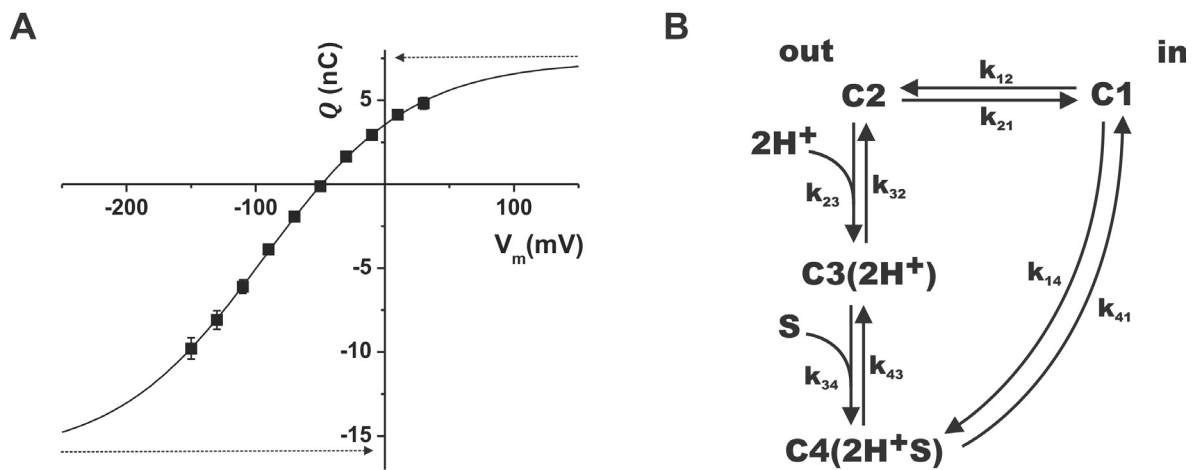


Figure 4.2 Charge displacement in hSGLT1.

(A) Integration of the transient currents associated with hSGLT1 in the absence of glucose yields a  $Q$ - $V$  curve that can be fitted with a Boltzmann equation (see Eq. 4.2). In this example, the  $Q$ - $V$  curve shown is an average from 14 oocytes. It was obtained in 0 mM  $\text{Na}^+$  and 0 mM  $\alpha\text{MG}$  buffer (pH 5.5) and the fitted Boltzmann equation is characterized by a  $V_{1/2}$  of -94 mV, a  $z$  value of 0.45, and a  $Q_{\text{max}}$  of 24 nC. (B) A simplified four-state kinetic model used to account for pre-steady-state and cotransport currents. As previously proposed (13,18,19), the cotransporter binding sites can be exposed to the intracellular (C1) or to the extracellular side of the membrane (C2), where it can bind two cations (here, two protons) to reach state C3. After binding a sugar molecule, state C4 is reached and all the subsequent steps are combined into a single step representing the reorientation of the binding sites toward the intracellular side where sugar and ions are released. The

reorientation of the free binding sites and the cation binding step are assumed to be electrogenic. In the external absence of sugar, but with cations present, a very negative membrane potential would drive the cotransporter into state C3, whereas a very positive potential would drive it into state C1.

#### 4.5.5 Statistics

Data are presented as the average  $\pm$  SE, where  $n$  is the number of oocytes used (one experiment/oocyte and not more than four oocytes from the same donor frog), and are compared using Student's  $t$ -test. In the figures, error bars are not shown when smaller than symbols.

### 4.6 Results

Although it is technically possible to measure the cotransporter TOR using  $\text{Na}^+$ -selective electrodes, we chose to use pH electrodes in  $\text{Na}^+$ -free solutions because this allowed improved accuracy of the TOR determination. This advantage comes from the possibility of using a low buffering power in the external solution, which greatly increases the amplitude of the signal read by the ISE for any given change in transmembrane proton transport. With  $\text{Na}^+$ -selective electrodes, the only way to improve our detection limit would be to reduce the background  $\text{Na}^+$  concentration, which would also decrease the amplitude of the transmembrane  $\text{Na}^+$  transport. For each oocyte studied, the cotransport current was measured in the presence of  $\text{Na}^+$  and 5 mM  $\alpha\text{MG}$  and at pH 5.5 ( $\text{Na}^+$ -free solution) with 5 and 35 mM  $\alpha\text{MG}$ . The TOR in the presence of  $\text{Na}^+$  was calculated from the TOR in the presence of  $\text{H}^+$  using the ratio between the two cotransport rates.

Fig. 4.3 shows a typical pulse protocol with simultaneous current and  $V_{\text{H}}$  measurements for an hSGLT1-expressing oocyte in the presence of  $\text{Na}^+$ -free solutions (pH 5.5) containing 0, 5, and 35 mM  $\alpha\text{MG}$  (Fig. 4.3 A) or 0.2 mM Pz (Fig. 4.3 B), as well as measurements for a noninjected oocyte (Fig. 4.3 C). When hSGLT1 is active, the step amplitude is on the order of 0.4–1 mV, which is comparable to the noise amplitude on a  $V_{\text{H}}$

trace low-pass-filtered at 200 Hz. Such a small change in the voltage of a pH-selective electrode upon changing  $V_m$  from +50 to -150 mV could represent a true change in the local pH and/or a change in the electrical potential of the trap. The most serious possibility for a change in the trap voltage would be that the current going through the membrane area covered by the ISE would generate a voltage drop as it passes through the loose seal created between the ISE and the oocyte membrane. This hypothesis can be ruled out, because in experiments employing 14 oocytes, the step amplitude did not change as a function of the external  $\alpha$ MG concentration used (the step averaged  $-0.52 \pm 0.06$ ,  $-0.52 \pm 0.05$ , and  $-0.55 \pm 0.06$  mV in the presence of 0, 5, and 35 mM  $\alpha$ MG, respectively; see Fig. 4.4). In contrast, the observed current step when the membrane potential was rapidly changed from +50 to -150 mV averaged  $-857 \pm 52$  nA,  $-1220 \pm 86$  nA, and  $-1640 \pm 110$  nA in the presence of 0, 5, and 35 mM  $\alpha$ MG, respectively. In other words, the step amplitude varied by less than 4%, whereas the current amplitude varied by up to twofold. The second observation that supports the hypothesis that the voltage-dependent reorientation of the proton binding sites is responsible for the step is that more than half of the step amplitude disappeared in the presence of Pz. During the experiment shown in Fig. 4.3, A and B, which was repeated for 14 oocytes expressing SGLT1, we measured the step in the presence of a weakly buffered solution at pH 5.5. The step averaged  $-0.52 \pm 0.06$  mV in 0  $\alpha$ MG solution but was only  $-0.21 \pm 0.03$  mV after the addition of 0.2 mM Pz (14 paired measurements). The fact that a statistically significant step remains in the presence of Pz indicates that a large negative voltage step can trigger some nonspecific proton binding to the lipids or to the proteins embedded in the plasma membrane. This is confirmed by the observation that noninjected oocytes generate an average step of  $-0.13 \pm 0.03$  mV ( $n = 4$ ), not statistically different from the step observed in the presence of Pz ( $p = 0.20$  in an unpaired  $t$ -test). To further characterize the step, we verified that the signal was reversible by estimating its value from the OFF pulse transition. Upon returning to -50 mV, a Pz-sensitive step averaging  $-0.15 \pm 0.05$  mV could be detected when 0, 5, or 35 mM  $\alpha$ MG was present, indicating that half of all  $H^+$  bound to the cotransporters are released upon this depolarization.

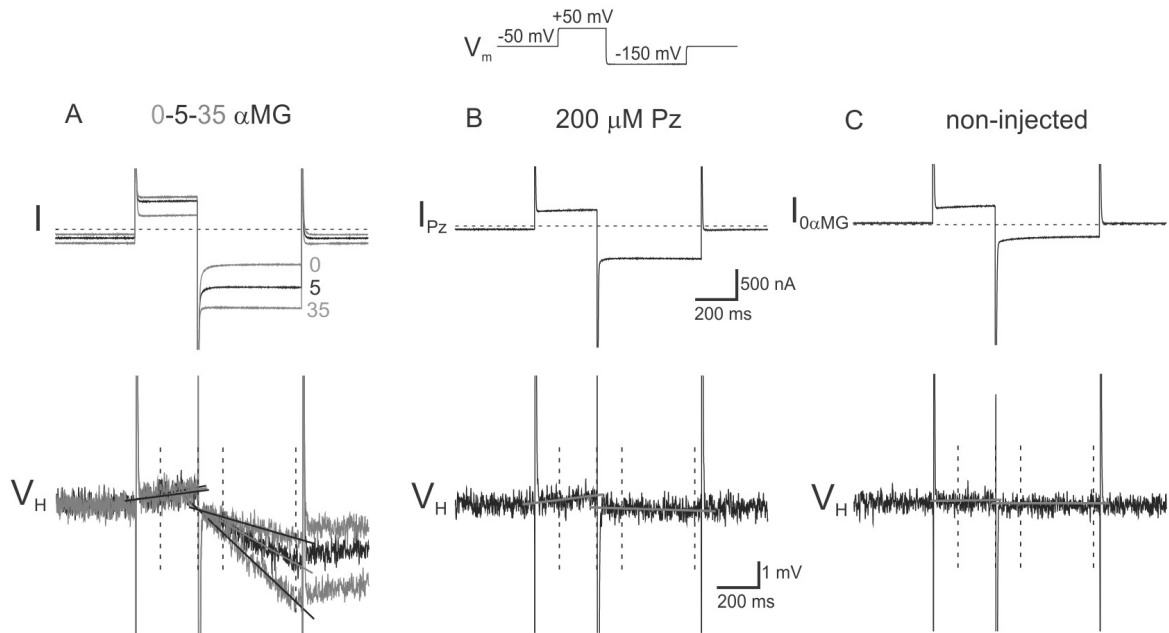


Figure 4.3 Experimental current and pH signals ( $V_H$ ) measured in 0 mM  $\text{Na}^+$  solution, pH 5.5.

The zero current level is represented by the horizontal dashed line in each current recording. Vertical dashed lines on the  $V_H$  pulses indicate the intervals within which the linear fits were done at +50 mV and -150 mV. (A) Superposed results corresponding to 0 (gray), 5 (black), or 35 (gray) mM  $\alpha\text{MG}$ . (B) Current and  $V_H$  recordings in the presence of 200  $\mu\text{M}$  Pz for the same oocyte. (C) Control experiment done on a noninjected oocyte in 0 mM  $\alpha\text{MG}$ .

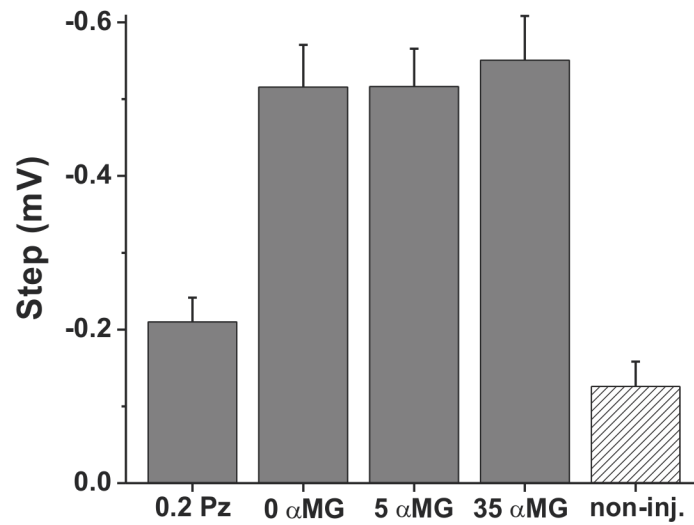


Figure 4.4 Average ( $\pm$  SE) of the rapid pH change (the step) measured as the membrane potential is stepped from +50 to -150 mV.

The measurements performed in the presence of 0, 5, and 35 mM  $\alpha$ MG and 0.2 mM Pz are from the same 14 oocytes (paired measurements). Control experiments in 0 mM  $\alpha$ MG were performed on noninjected oocytes ( $n = 4$ ) and their average is not significantly different from the average step measured in 0.2 mM Pz ( $p = 0.20$ , unpaired Student's  $t$ -test).

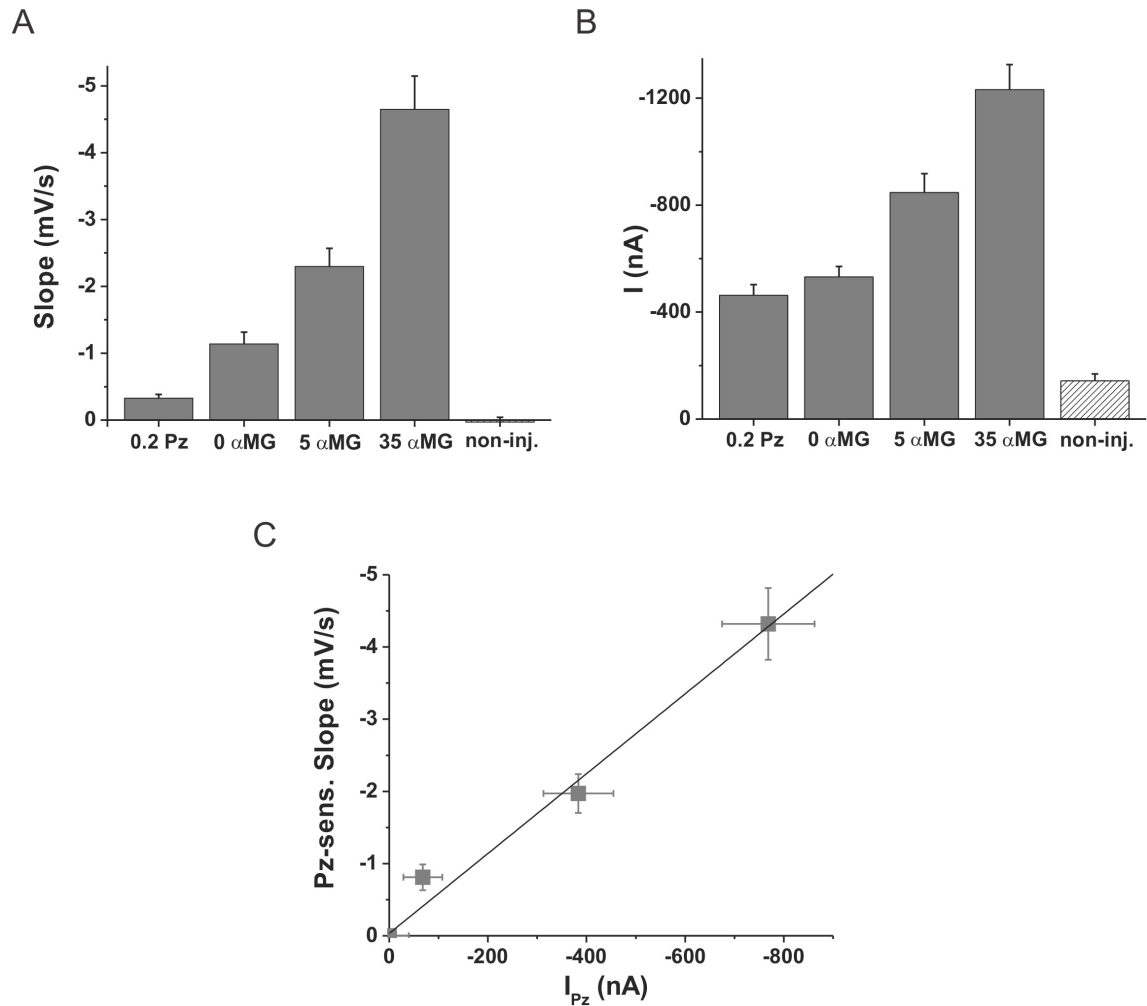


Figure 4.5 Mean values ( $\pm$  SE) of the slope of the  $V_H$  signal and the corresponding oocyte cotransport current at  $-150$  mV.

Measurements done in 0, 5, and 35 mM  $\alpha$ MG and 0.2 mM Pz were paired ( $n = 14$ ). Noninjected oocytes ( $n = 4$ ) were used as a control. (A) Slope of the linear fit of the  $V_H$  signal indicating a steady-state ionic uptake by the membrane patch under the trap. (B) Current recorded simultaneously with slope. (C) Linear correlation between the Pz-sensitive slope and the Pz-sensitive current. Pz-sensitive signals are calculated by subtracting the signal in 0.2 mM Pz from the signal obtained in the presence of either 0, 5, or 35 mM  $\alpha$ MG.

Another interesting attribute of the measurements was the presence of a steady-state alkalinization of the trap when the membrane potential was held at  $-150$  mV (Fig. 4.3 A). The results of this analysis are presented in Fig. 4.5 and demonstrate that the slope is tightly related to the  $H^+$ /glucose cotransport activity. Using 14 oocytes, the average slope in the presence of Pz was  $-0.33 \pm 0.06$  mV  $s^{-1}$ , and it increased progressively to  $-1.14 \pm 0.18$  mV  $s^{-1}$ ,  $-2.30 \pm 0.27$  mV  $s^{-1}$ , and  $-4.65 \pm 0.49$  mV  $s^{-1}$  when it was measured in the presence of 0, 5, and 35 mM  $\alpha$ MG, respectively (Fig. 4.5 A). It is interesting to note that noninjected oocytes did not generate any significant pH slope, averaging  $+0.03 \pm 0.07$  mV  $s^{-1}$  ( $n = 4$ ) when they were maintained at  $-150$  mV. In Fig. 4.5 B, the currents recorded at  $-150$  mV are shown for noninjected oocytes and for hSGLT1-expressing oocytes in the presence of Pz or 0, 5, or 35 mM  $\alpha$ MG. Finally, Fig. 4.5 C shows that a linear correlation exists between the Pz-sensitive slope and the Pz-sensitive current measured at  $-150$  mV. This confirms the presence of proton-glucose cotransport in the presence of glucose and the presence of a leak current in the absence of glucose, which, as we have recently shown (25), is largely mediated by protons at low external pH levels. At pH 7.5, we have also shown that several monovalent cations, including cations that do not interact with the cotransporter cation-binding sites, can mediate as much leak current as  $Na^+$  does. This suggests that the leak pathway is distinct from the  $Na^+$ -selective cotransport pathway and present for both  $Na^+$ -bound and  $Na^+$ -free conformations of the cotransporter.



Tableau 4.I Calculated TOR values associated with different extracellular conditions

| 0 mM Na pH 5.5 |                       |            |                    | 90 mM Na pH 7.5 |                       |            |                    |               |                    |
|----------------|-----------------------|------------|--------------------|-----------------|-----------------------|------------|--------------------|---------------|--------------------|
| 5 $\alpha$ MG  |                       |            |                    | 35 $\alpha$ MG  |                       |            |                    | 5 $\alpha$ MG |                    |
| step           | slope                 | $I$        | TOR                | step            | slope                 | $I$        | TOR                | $I$           | TOR                |
| (mV)           | (mV s <sup>-1</sup> ) | ( $\mu$ A) | (s <sup>-1</sup> ) | (mV)            | (mV s <sup>-1</sup> ) | ( $\mu$ A) | (s <sup>-1</sup> ) | ( $\mu$ A)    | (s <sup>-1</sup> ) |
| -0.31          | -1.18                 | -0.32      | <b>2.71</b>        | -0.34           | -3.53                 | -0.70      | <b>8.00</b>        | -1.08         | <b>13.3</b>        |
| $\pm 0.03$     | $\pm 0.12$            | $\pm 0.04$ | $\pm 0.38$         | $\pm 0.05$      | $\pm 0.33$            | $\pm 0.06$ | $\pm 1.3$          | $\pm 0.61$    | $\pm 2.4$          |

TOR<sub>5 $\alpha$ MG</sub> and TOR<sub>35 $\alpha$ MG</sub> at pH 5.5 are obtained directly from the slope/step ratios multiplied by the correction factor,  $f = 0.65$ , corresponding to the fraction of cotransporters moving in the electrical field of the membrane during a voltage pulse from +50 to -150 mV. This was done for each oocyte, and the mean values are shown ( $n = 14$ ). The steps used for the calculation were obtained by subtracting the step measured in the presence of 0.2 mM Pz from the step in 5 or 35 mM  $\alpha$ MG. The slopes were obtained by subtracting the slope in 0 mM  $\alpha$ MG (pH 5.5) buffer from the slopes measured in the presence of 5 mM  $\alpha$ MG or 35 mM  $\alpha$ MG. Equation 4.1 was used to calculate TOR<sub>5 $\alpha$ MG</sub> when 90 mM Na<sup>+</sup> (pH 7.5) was in the bath.

Based on the results presented above, we can proceed to the calculation of TOR. Since there is a Pz-sensitive proton flux through SGLT1 in the absence of substrate (see the Pz-sensitive slope in the absence of  $\alpha$ MG in Fig. 4.5 A), the cotransporter TOR was estimated using the increase in slope due to the addition of  $\alpha$ MG. The TOR was then obtained at -150 mV by dividing the  $\alpha$ MG-sensitive slope by the Pz-sensitive step and multiplying the result by the correcting factor 0.65, which represents the fraction,  $f$ , of the cotransporters that experienced a conformational change after the voltage step from +50

mV to  $-150$  mV (see Fig. 4.2 A). This was done for each of the 14 oocytes exposed to 35 mM  $\alpha$ MG, and the average TOR was found to be  $8.00 \pm 1.3$  s<sup>-1</sup> (see Table 4.I, where the average step and slope are also given). Applying Eq. 4.1, we can use the TOR and the current caused by the addition of 35 mM  $\alpha$ MG to estimate the number of carriers ( $N$ ) in the plasma membrane of each oocyte, assuming that two protons per transport cycle are translocated. This calculation yielded an average of  $3.6 \pm 0.7 \times 10^{11}$  transporters/oocyte. Using the same analysis, the TOR corresponding to the addition of 5 mM  $\alpha$ MG at pH 5.5 could also be calculated and averaged at  $2.71 \pm 0.38$  s<sup>-1</sup>. Using the current measured in the presence of 5 mM  $\alpha$ MG, the number of transporters in each oocyte was calculated and found to be very close to the number obtained using the measurements with 35 mM  $\alpha$ MG. According to Eq. 4.1, if we assume that the number of cotransporters in a given oocyte is constant as a function of different experimental conditions, the TOR can be evaluated in each case, as it is simply proportional to the measured cotransport current. Using this strategy, we obtained a TOR of  $13.3 \pm 2.4$  s<sup>-1</sup> when 90 mM Na<sup>+</sup> and 5 mM  $\alpha$ MG (pH 7.5) were present. The results are summarized in Table 4.I.

## 4.7 Discussion

Several estimates of SGLT1 TOR have been made over the last decades. The method of calculation using the ratio  $I_{Cotr}/Q_{max}$  obtained by electrophysiology has been used frequently in the cotransporter literature (4,14,26). In principle, the Boltzmann equation (Eq. 4.2) represents a charge movement across the membrane electrical field as a protein is oscillating between two conformational states related by voltage-dependent rate constants. In our case (Fig. 4.2 B), there are at least three conformational states in the absence of substrate, but the Boltzmann equation can still be used for a rough description of the charge movement. If  $z$  is the number of elementary charges ( $e$ ) per transporter that move across the entire electrical field of the membrane,  $Q_{max}$  is given by

$$Q_{max} = N \times z \times e . \quad (4.5)$$

Considering Eqs. 4.1 and 4.5, the ratio  $I_{Cotr}/Q_{max}$  yields the TOR as long as the number of charges cotransported,  $s$ , is equal to the number of mobile charges in the absence of substrate,  $z$ . This has been widely accepted because  $\text{Na}^+$ /glucose kinetic modeling has put forward the idea that the empty carrier possesses a charge of  $-2 e$  that is neutralized when two  $\text{Na}^+$  ions bind to their sites, yielding a situation where all subsequent kinetic steps are considered electroneutral (13,27). However, estimates of the apparent valency of the carrier deduced from Boltzmann fits usually lead to  $z$  values of  $\sim 1$  in the presence of  $\sim 100$  mM  $\text{Na}^+$  (14) (at pH 5.5 in  $\text{Na}^+$ -free solution,  $z = 0.45$  in this study). In contrast, measurements of  $Q_{max}$  and  $N$  in freeze-fracture experiments (15) yield an average of 3.5 charges/transporter. This means that to calculate the TOR using the ratio  $I_{Cotr}/Q_{max}$  requires several corrections where the estimation of the number of charges/transporter ( $z$ ) is crucial. If one uses  $z = 1$ , a stoichiometry  $s$  of 2, and the revised estimate of  $Q_{max}$  presented in Loo et al. (4), the TOR of hSGLT1 in the presence of  $\text{Na}^+$  and a large negative membrane potential would be  $14 \text{ s}^{-1}$ , which agrees with the value of  $13.3 \text{ s}^{-1}$  obtained in the study presented here.

Although it is well established that two  $\text{Na}^+$  ions bind to SGLT1 to drive glucose across the membrane, we have made the assumption that the stoichiometry of  $\text{H}^+$ /glucose cotransport is 2:1. This assumption is indeed supported by experiments with  $\text{H}^+$  activation of glucose transport that yielded a Hill coefficient of 1.5 at  $-50$  mV (21). Consequently, an error in the estimation of the  $\text{Na}^+$ /glucose TOR at pH 7.5 from the TOR evaluated at pH 5.5 could be introduced if the stoichiometry of  $\text{H}^+$ /glucose and  $\text{Na}^+$ /glucose cotransport happened to be different. The advantage of a known ion/glucose stoichiometry if we had used  $\text{Na}^+$ -sensitive electrodes is negated by the better signal/noise ratio for ITT when using  $\text{H}^+$ -sensitive electrodes.

In Table 4.I, an estimate of TOR at pH 5.5 is shown. At pH 5.5, a TOR of  $8.00 \pm 1.3 \text{ s}^{-1}$  at 35 mM  $\alpha\text{MG}$  is directly derived from the slope/step ratio. Fig. 4.4 shows that the step

used in this estimation is related to the presence of SGLT1, because its value is reduced to comparable levels when 0.2 mM Pz is present or when the experiment is done on noninjected oocytes. The step in 0, 5, or 35 mM  $\alpha$ MG is a measurement that represents the number of protons that rapidly leave the trap to bind to the newly available sites on carriers that have just experienced a voltage dependent conformational change. It is interesting to note that the step remains constant in the presence of 0, 5, or 35 mM  $\alpha$ MG, whereas the pre-steady-state charge movement becomes impossible to measure in the presence of increasing concentrations of  $\alpha$ MG, as it becomes largely hidden by an important steady-state cotransport current (22). Measuring the step amplitude with some accuracy is a crucial part of the determination of TOR. It is difficult to establish a limit to the minimal cotransporter density required to estimate TOR with the ITT approach, but we can state that the step could be measured for oocytes expressing only 50% of their maximal activity level. The slope used in the calculation of TOR is also directly related to the presence of SGLT1 at the plasma membrane. The linear relationship between the Pz-sensitive current and the Pz-sensitive slope at pH 5.5 (Fig. 4.5 C) clearly shows that an increase in carrier-mediated current is reflected in an increase in the alkalinization rate of the trap due to the protons that are translocated with glucose. The TOR has also allowed us to estimate, using Eq. 4.1, that  $3.6 \pm 0.7 \times 10^{11}$  transporters are expressed at the plasma membrane of an oocyte. It is interesting to note that this calculation is independent of the membrane area covered by the trap. The numbers of transporters obtained in freeze-fracture electron microscopy were reported to be 0.07, 0.20, and  $0.32 \times 10^{11}$  carriers for three SGLT1-expressing oocytes characterized by  $Q_{max}$  values of 4, 11.5, and 16 nC, respectively (15). In this study, 14 oocytes with an average  $Q_{max}$  of  $25.8 \pm 1.6$  nC (ranging from 15 to 32 nC) were used. After correction for the respective  $Q_{max}$  values, the number of transporters deduced from freeze-fracture appears to be undervalued by fourfold. Note that the freeze-fracture study yields an average of 3.5 charges/particle, which is also 3.5 times larger than the  $z$  value of 1 obtained from a Boltzmann fit of the  $Q$ - $V$  curve. It is possible that the freeze-fracture

approach does not succeed in detecting all SGLT1 particles or that the section studied, corresponding to  $1 \mu\text{m}^2$ , is not representative of a complete oocyte area of  $0.4 \text{ cm}^2$ .

Table 4.I also shows the calculated TOR of  $13.3 \pm 2.4 \text{ s}^{-1}$  at  $-150 \text{ mV}$ , pH 7.5, when  $90 \text{ mM Na}^+$  and  $5 \text{ mM } \alpha\text{MG}$  are present. It should be stressed that no first-order rate constant in the forward direction ( $\text{Na}^+$ /glucose uptake direction) can be slower than the TOR. In a simple case where a protein can adopt two conformations through a forward and a backward rate constant ( $k_f$  and  $k_b$ , respectively), the time constant  $\tau$  associated with the transition is

$$\tau = \frac{1}{k_f + k_b}. \quad (4.6)$$

In the more complex kinetic model shown in Fig. 4.2 B, four time constants are expected, but the value of the longest time constant cannot be  $>1/\text{TOR}$ , i.e.,  $75 \text{ ms}$  ( $1/13.3 \text{ s}$ ) in the case of hSGLT1, since all forward rate constants obey  $k_f \geq \text{TOR}$ . Over the past few years, electrophysiological and fluorometric experiments with extended voltage pulse durations (up to  $500 \text{ ms}$ ) have revealed the presence of slow time constants of  $80$ ,  $110$ , and even  $139 \text{ ms}$  associated with the movements of hSGLT1 at hyperpolarizing potentials in the absence of substrate (4,27). In view of the speed at which the cotransporter is capable of mediating a full cycle, it is doubtful that these slow time constants can be associated with any of the steps required to mediate the cotransport process. Our estimation of the TOR using ITT provides a boundary useful for setting a lower timescale for conformational changes directly related to a cotransport mechanism. The presence of these slow charge movements or slow fluorescence relaxations may be real, but they may be related to processes that occur in parallel with the cotransport mechanism as, for example, a slowly stabilizing leak current or a local molecular rearrangement in the immediate vicinity of an attached fluorophore. The important constraint set by the determination of TOR must be respected in any kinetic model that aims to describe the cotransport behavior of hSGLT1.

## 4.8 Conclusion

This study shows that ITT can be used to obtain a reliable and independent estimate of a cotransporter TOR. The results indicate that the number of hSGLT1 cotransporters expressed in an oocyte is fourfold larger than previously estimated using freeze-fracture experiments. In the presence of  $\text{Na}^+$  and of a saturating substrate concentration, the maximal TOR of hSGLT1 is  $13.3 \pm 2.4 \text{ s}^{-1}$ . This number has significant consequences in the analysis of electrogenic and fluorescence kinetics of cotransporters.

## 4.9 Acknowledgments

This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research (MOP-10580).

## 4.10 References

1. Crane, R. K. 1965.  $\text{Na}^+$ -dependent transport in the intestine and other animal tissues. *Fed Proc* 24:1000-1006.
2. Hediger, M. A., M. J. Coady, T. S. Ikeda, and E. M. Wright. 1987. Expression cloning and cDNA sequencing of the  $\text{Na}^+$ /glucose co-transporter. *Nature* 330:379-381.
3. Meinild, A. K., B. A. Hirayama, E. M. Wright, and D. D. Loo. 2002. Fluorescence studies of ligand-induced conformational changes of the  $\text{Na}^+$ /glucose cotransporter. *Biochemistry* 41:1250-1258.
4. Loo, D. D., B. A. Hirayama, A. Cha, F. Bezanilla, and E. M. Wright. 2005. Perturbation analysis of the voltage-sensitive conformational changes of the  $\text{Na}^+$ /glucose cotransporter. *J Gen Physiol* 125:13-36.
5. Coady, M. J., A. M. Pajor, E. M. Toloza, and E. M. Wright. 1990. Expression of mammalian renal transporters in *Xenopus laevis* oocytes. *Arch Biochem Biophys* 283:130-134.

6. Parent, L., S. Supplisson, D. D. Loo, and E. M. Wright. 1992. Electrogenic properties of the cloned Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter: I. Voltage-clamp studies. *J Membr Biol* 125:49-62.
7. Loo, D. D., B. A. Hirayama, E. M. Gallardo, J. T. Lam, E. Turk, and E. M. Wright. 1998. Conformational changes couple Na<sup>+</sup> and glucose transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7789-7794.
8. Jardetzky, O. 1966. Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature* 211:969-970.
9. Abramson, J., and E. M. Wright. 2009. Structure and function of Na<sup>(+)</sup>-symporters with inverted repeats. *Curr Opin Struct Biol* 19:425-432.
10. Forrest, L. R., and G. Rudnick. 2009. The rocking bundle: a mechanism for ion-coupled solute flux by symmetrical transporters. *Physiology (Bethesda)* 24:377-386.
11. Faham, S., A. Watanabe, G. M. Besserer, D. Cascio, A. Specht, B. A. Hirayama, E. M. Wright, and J. Abramson. 2008. The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na<sup>+</sup>/sugar symport. *Science* 321:810-814.
12. Peerce, B. E., and E. M. Wright. 1984. Sodium-induced conformational changes in the glucose transporter of intestinal brush borders. *J Biol Chem* 259:14105-14112.
13. Parent, L., S. Supplisson, D. D. Loo, and E. M. Wright. 1992. Electrogenic properties of the cloned Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter: II. A transport model under nonrapid equilibrium conditions. *J Membr Biol* 125:63-79.
14. Loo, D. D., A. Hazama, S. Supplisson, E. Turk, and E. M. Wright. 1993. Relaxation kinetics of the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5767-5771.
15. Zampighi, G. A., M. Kreman, K. J. Boorer, D. D. Loo, F. Bezanilla, G. Chandy, J. E. Hall, and E. M. Wright. 1995. A method for determining the unitary

- functional capacity of cloned channels and transporters expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Membr Biol* 148:65-78.
16. Blanchard, M. G., J. P. Longpre, B. Wallendorff, and J. Y. Lapointe. 2008. Measuring ion transport activities in *Xenopus* oocytes using the ion-trap technique. *Am J Physiol Cell Physiol* 295:C1464-1472.
  17. Bissonnette, P., J. Noel, M. J. Coady, and J. Y. Lapointe. 1999. Functional expression of tagged human Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J Physiol* 520 Pt 2:359-371.
  18. Hirayama, B. A., D. D. Loo, and E. M. Wright. 1997. Cation effects on protein conformation and transport in the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *J Biol Chem* 272:2110-2115.
  19. Chen, X. Z., M. J. Coady, F. Jackson, A. Berteloot, and J. Y. Lapointe. 1995. Thermodynamic determination of the Na<sup>+</sup>: glucose coupling ratio for the human SGLT1 cotransporter. *Biophys J* 69:2405-2414.
  20. Bourgeois, F., M. J. Coady, and J. Y. Lapointe. 2005. Determination of transport stoichiometry for two cation-coupled myo-inositol cotransporters: SMIT2 and HMIT. *J Physiol* 563:333-343.
  21. Hirayama, B. A., D. D. Loo, and E. M. Wright. 1994. Protons drive sugar transport through the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter (SGLT1). *J Biol Chem* 269:21407-21410.
  22. Gagnon, D. G., C. Frindel, and J. Y. Lapointe. 2007. Effect of substrate on the pre-steady-state kinetics of the Na<sup>(+)</sup>/glucose cotransporter. *Biophys J* 92:461-472.
  23. Andrini, O., C. Ghezzi, H. Murer, and I. C. Forster. 2008. The leak mode of type II Na<sup>(+)</sup>-P(i) cotransporters. *Channels (Austin)* 2.
  24. Guan, L., and H. R. Kaback. 2006. Lessons from lactose permease. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 35:67-91.



25. Longpre, J. P., D. G. Gagnon, M. J. Coady, and J. Y. Lapointe. 2010. The actual ionic nature of the leak current through the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter SGLT1. *Biophys J* 98:231-239.
26. Forster, I. C., K. Kohler, J. Biber, and H. Murer. 2002. Forging the link between structure and function of electrogenic cotransporters: the renal type IIa Na<sup>+</sup>/Pi cotransporter as a case study. *Prog Biophys Mol Biol* 80:69-108.
27. Loo, D. D., B. A. Hirayama, M. H. Karakossian, A. K. Meinild, and E. M. Wright. 2006. Conformational dynamics of hSGLT1 during Na<sup>+</sup>/glucose cotransport. *J Gen Physiol* 128:701-720.

Reprinted from *Biophysical Journal*, volume 100 (1), Jean-Philippe Longpré and Jean-Yves Lapointe, Determination of the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter (SGLT1) turnover rate using the ion-trap technique, 52-59, Copyright (2011), with permission from Elsevier.

## **5 Simulated annealing reveals the kinetic activity of SGLT1, a member of the LeuT structural family**

Jean-Philippe Longpré, Louis J. Sasseville et Jean-Yves Lapointe

Article soumis à The Journal of General Physiology.

### **5.1 Contribution personnelle**

J'ai fait toutes les expériences d'électrophysiologie et j'ai eu l'idée d'utiliser l'algorithme du recuit simulé dans le but de déterminer les meilleurs paramètres d'un modèle cinétique pouvant décrire les courants de SGLT1. À cette fin, j'ai implémenté un programme dans le langage MATLAB. Louis J. Sasseville m'a fourni une aide technique dans les premières phases du projet. J'ai rédigé la version initiale de l'article qui a ensuite été corrigée par mon directeur de recherche.

### **5.2 Résumé**

Le cotransporteur Na<sup>+</sup>/glucose (SGLT1) est l'archétype des protéines membranaires qui utilisent le gradient électrochimique du Na<sup>+</sup> afin de fournir l'énergie au transport d'un substrat. La structure cristallographique de vSGLT obtenue récemment suggère fortement que l'architecture de SGLT1 est composée des répétitions inversées qui caractérisent la famille structurelle de LeuT, pour laquelle plusieurs structures cristallographiques sont maintenant disponibles. Cependant, il n'existe pas de représentation adéquate des constantes de vitesse associées aux transitions entre les différents états conformationnels de SGLT1. Dans la présente étude, nous avons utilisé le recuit simulé afin d'analyser un large ensemble de courants stationnaires et pré-stationnaires mesurés pour SGLT1 humain à différents potentiels membranaires, et en présence de différentes concentrations de Na<sup>+</sup> et de  $\alpha$ -méthyle-D-glucose ( $\alpha$ MG). Le modèle cinétique le plus simple qui a pu reproduire le déroulement temporel des courants mesurés (jusqu'à une résolution de 2 ms) est un modèle à 7

états ( $C_1$  à  $C_7$ ) dans lequel la liaison des 2 ions  $\text{Na}^+$  ( $C_4 \rightarrow C_5$ ) est hautement coopérative. Dans la direction entrante (influx de  $\text{Na}^+$ /glucose), le modèle est caractérisé par deux changements de conformations électroneutres lents ( $59$  et  $100 \text{ s}^{-1}$ ) qui représentent les réorientations du transporteur libre et du transporteur rempli entre la conformation faisant face à l'extérieur de la membrane et celle faisant face à l'intérieur. De la configuration faisant face à l'intérieur ( $C_1$ ) à celle qui fait face à l'extérieur et qui est liée au  $\text{Na}^+$  ( $C_5$ ), 1,3 charges élémentaires négatives sont déplacées vers l'extérieur. La liaison du glucose extracellulaire ( $C_5 \rightarrow C_6$ ) est électroneutre, mais l'étape suivante ( $C_6 \rightarrow C_7$ ) transporte 0,7 charges positives à l'intérieur de la cellule. L'alignement du modèle à 7 états avec un modèle généralisé suggéré par les données de la famille structurale de LeuT suggère que les étapes électrogéniques sont associées avec le mouvement de portes minces de chaque côté du site de liaison du substrat. À notre connaissance, ce modèle est le premier à fournir une description quantitative du comportement de SGLT1 à une résolution de 2 ms. Ce modèle est hautement symétrique et s'accorde bien avec l'information structurale obtenue de la famille structurale de LeuT.

### 5.3 Abstract

The  $\text{Na}^+$ /glucose cotransporter (SGLT1) is the archetype of membrane proteins which use the electrochemical  $\text{Na}^+$  gradient to drive uphill transport of a substrate. The crystal structure recently obtained for vSGLT strongly suggests that SGLT1 adopts the inverted repeat fold of the LeuT structural family for which several crystal structures are now available. What is largely missing is an accurate view of the rates at which SGLT1 transits between its different conformational states. In the present study, we used simulated annealing to analyze a large set of steady-state and pre-steady state currents measured for human SGLT1 at different membrane potentials, and in the presence of different  $\text{Na}^+$  and  $\alpha$ -methyl-D-glucose ( $\alpha$ MG) concentrations. The simplest kinetic model that could accurately reproduce the time course of the measured currents (down to the 2 ms time range) is a 7-state model ( $C_1$  to  $C_7$ ) where the binding of the 2  $\text{Na}^+$  ions ( $C_4 \rightarrow C_5$ ) is highly cooperative.

In the forward direction ( $\text{Na}^+$ /glucose influx), the model is characterized by two slow, electroneutral conformational changes ( $59$  and  $100 \text{ s}^{-1}$ ) which represent reorientation of the free and of the fully loaded carrier between inside-facing and outside-facing conformations. From the inward-facing ( $C_1$ ) to the outward-facing Na-bound configuration ( $C_5$ ),  $1.3$  negative elementary charges are moved outward. While extracellular glucose binding ( $C_5 \rightarrow C_6$ ) is electroneutral, the next step ( $C_6 \rightarrow C_7$ ) carries  $0.7$  positive charges inside the cell. Alignment of the 7-state model with a generalized model suggested by the structural data of the LeuT fold family suggests that electrogenic steps are associated with the movement of the so-called thin gates on each side of the substrate binding site. To our knowledge, this is the first model that can quantitatively describe the behavior of SGLT1 down to the  $2 \text{ ms}$  time domain. The model is highly symmetrical and in good agreement with the structural information obtained from the LeuT structural family.

## 5.4 Introduction

The  $\text{Na}^+$ /glucose cotransporter (SGLT1) is the archetypical member of a class of membrane proteins that couple the energy stored in the downhill electrochemical gradient of an ion to the translocation of a substrate across the membrane. SGLT1 is expressed at the apical surfaces of epithelial cells of the small intestine and the renal proximal tubule, where it absorbs glucose. It is also expressed in the heart (Zhou et al., 2003) where its role remains to be defined. SGLT1 is believed to function according to the alternating access mechanism. This model, proposed by Jardetzky (Jardetzky, 1966), states that the transporter protein exists in two distinct states where the substrate binding sites are alternatively exposed to each side of the membrane. In 2008, the 3D structure of vSGLT, a prokaryote homologue of SGLT1, was determined in a substrate-bound, inward-facing occluded configuration (Faham et al., 2008). It was immediately realised that vSGLT belonged to the LeuT family of structurally homologous transporters built around a functional core of two inverted repeats of five transmembrane segments each. Members of this family have been found in different configurations including outward facing (LeuT

(Yamashita et al., 2005; Singh et al., 2008), Mhp1 (Weyand et al., 2008), AdiC (Fang et al., 2009; Gao et al., 2009; Gao et al., 2010)) and inward facing (LeuT (Krishnamurthy and Gouaux, 2012), vSGLT (Faham et al., 2008; Watanabe et al., 2010), Mhp1 (Shimamura et al., 2010), BetP (Ressl et al., 2009; Perez et al., 2011), ApcT (Shaffer et al., 2009), CaiT (Schulze et al., 2010), GadC (Ma et al., 2012)) conformations. In each of these configurations, the ion and substrate binding sites may be freely accessible or blocked by so-called “thin gates” that are present on each side of the binding sites. This is shown in Fig. 5.1 where the simple displacement of the thin gates may represent a more complex rearrangement of the access vestibule on each side of the membrane (Krishnamurthy and Gouaux, 2012). While computational studies at the molecular level are beginning to unravel the way vSGLT reorients itself in the membrane to cotransport glucose (Watanabe et al., 2010), the rate at which these conformational changes occur is still unsettled.

The cloning of SGLT1 cDNA (Hediger et al., 1987) and its expression in *Xenopus laevis* oocytes, has allowed extensive functional characterization using electrophysiology (Umbach et al., 1990; Parent et al., 1992a) and voltage-clamp fluorometry (Loo et al., 1998; Meinild et al., 2002). In addition to the steady state  $\text{Na}^+$ /glucose cotransport currents, expression of SGLT1 in oocytes (and, more recently, in mammalian cells) generates strong phlorizin-sensitive transient currents in the absence of glucose (Loo et al., 1993; Hazama et al., 1997; Hummel et al., 2011). These transient currents are thought to reflect electrogenic transitions experienced by the cotransporter when it goes through the glucose-independent steps of the cotransport mechanism, and the time course of these currents can be measured with great accuracy as a function of membrane potential and  $[\text{Na}^+]_o$ . These currents are reminiscent of the gating currents observed in voltage-dependent ionic channels and can be used to estimate values of the parameters describing the cotransport mechanism. The first kinetic model developed for SGLT1 by using detailed two-electrode voltage clamp data was an ordered 6-state mirror symmetry model (Parent et al., 1992b). In this oversimplified model, the mobile binding site was assumed to carry two negative charges which were neutralised by the binding of two  $\text{Na}^+$  ions. Because of this simplifying hypothesis, the

binding of glucose, the translocation of the fully loaded cotransporter and the intracellular unbinding of  $\text{Na}^+$  and glucose were all assumed to be voltage-independent. The basis of this initial model was kept and slightly modified in several subsequent studies (Loo et al., 1993; Hirayama et al., 1996; Hazama et al., 1997; Eskandari et al., 2005). More recently, using a larger set of electrophysiological and fluorescence measurements, a 8-state model was proposed for SGLT1. The set of rate constants suggested in that study (Loo et al., 2006) was primarily qualitative and failed to reproduce the time courses of the transient currents. To our knowledge, none of the kinetic models previously proposed have been able to account quantitatively for the pre-steady state and steady-state kinetics of SGLT1 over a range of  $\text{Na}^+$  concentrations and membrane potentials.

In an effort to find a robust kinetic model, the present work uses a novel approach based on a simulated annealing (SA) algorithm to fit an extended set of electrophysiological data. SA offers the possibility of exploring a large field of rate constants and their voltage-dependence. Also, we chose to rely on a direct fitting approach, i.e. to find parameters that can reproduce the current traces themselves instead of fitting a set of parameters derived from previous multi-exponential fitting of the data. The structure of the kinetic model found is a 7-state model whose connectivity is similar to the model proposed in (Loo et al., 2006), but with distinct voltage sensitivities and rate limiting steps. Interestingly, the model reveals a high degree of symmetry as the two slowest steps are the voltage-independent conformational changes of the free and fully loaded carrier. Voltage-dependent steps come immediately before and after these slow conformational changes.

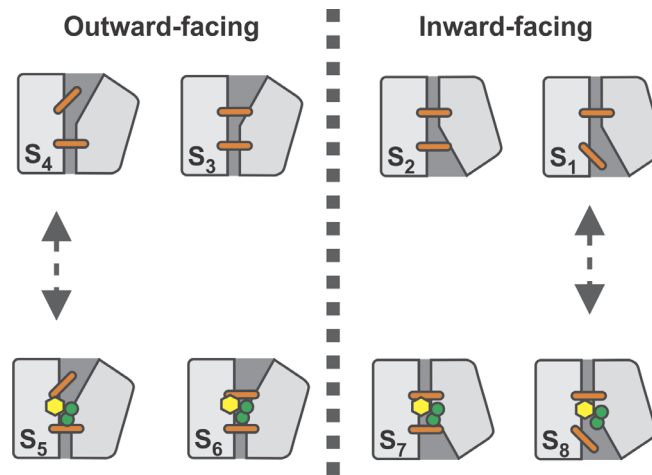


Figure 5.1 Cotransport mechanism of SGLT1 suggested by the structural data of the LeuT fold family.

In state S<sub>1</sub>, the cotransporter is in its inward open conformation. The transition from S<sub>1</sub> to S<sub>2</sub> closes the intracellular thin gate (orange stick), thus occluding the binding sites. A major conformational change (S<sub>2</sub>→S<sub>3</sub>) then reorients SGLT1 to its outward facing state. The subsequent opening of the extracellular thin gate (S<sub>3</sub>→S<sub>4</sub>) makes it possible for SGLT1 to bind Na<sup>+</sup> ions (green circles) and glucose (yellow hexagon) (S<sub>4</sub>→S<sub>5</sub>). The extracellular thin gate is then free to close (S<sub>5</sub>→S<sub>6</sub>), which provokes a structural rearrangement of the fully loaded transporter leading to the intracellular facing occluded state S<sub>7</sub>. This is followed by the opening of the intracellular thin gate (S<sub>7</sub>→S<sub>8</sub>), allowing intracellular release of the substrates (S<sub>8</sub>→S<sub>1</sub>).

## 5.5 Materials and Methods

### 5.5.1 Oocyte preparation and injection

Following surgical removal from *Xenopus laevis* frogs, oocytes were individually isolated prior to enzymatic defolliculation as described previously (Bissonnette et al., 1999). One or two days after the procedure, healthy oocytes were injected with 4.6 ng of

mRNA coding for human myc-SGLT1 at a concentration of 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in water. This N-terminal myc-tagged version of human SGLT1 was previously shown to be functionally indistinguishable from the untagged form (Bissonnette et al., 1999). Oocytes were kept in Barth's solution (in mM: 90 NaCl, 3 KCl, 0.82  $\text{MgSO}_4$ , 0.41  $\text{CaCl}_2$ , 0.33  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 5 HEPes, pH 7.6) supplemented with 5% horse serum, 2.5 mM  $\text{Na}^+$  pyruvate, 100 units/ml penicillin, and 0.1 mg/ml streptomycin for 4-5 days before performing electrophysiological experiments.

### 5.5.2 Solutions

To stimulate the cotransport activity of SGLT1, 5 mM or 0.1 mM of  $\alpha$ -methyl-D-glucose ( $\alpha\text{MG}$ ) was added to the normal saline solution used for electrophysiology (in mM: 90 NaCl, 3 KCl, 0.82  $\text{MgCl}_2$ , 0.74  $\text{CaCl}_2$ , 10 HEPES and adjusted to pH 7.5 with Tris). In cases where a lower extracellular  $\text{Na}^+$  concentration ( $[\text{Na}^+]_o$ ) was needed, the removed quantity of NaCl was isotonicly replaced by *N*-methyl-D-glucamine/HCl. To inhibit the cotransporter, 0.2 mM phlorizin (Pz) was added. Unless otherwise mentioned, all chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

### 5.5.3 Electrophysiology

Two-microelectrode voltage-clamp experiments and current filtering (1 kHz) were done using an OC-725C Oocyte Clamp (Warner Instrument Corp., Hamden, CT). Data recording was achieved using a Digidata 1322A acquisition system and pClamp 8.2 software (Axon Instruments Inc, Union City, CA). Voltage and current microelectrodes were filled with 1 M KCl and exhibited resistances of 1-3  $\text{M}\Omega$ . The bath current electrode was an Ag-AgCl pellet and the reference voltage electrode was a 1 M KCl agar bridge. To perform electrophysiological measurements, oocytes were clamped to a holding potential ( $V_m$ ) of -50 mV and three sequential repetitions of a series of 150 ms voltage steps, ranging from +70 mV to -155 mV (in increments of 25 mV), were applied with an interval of 418 ms between each step. Data was recorded with a sampling rate of 10 points/ms. In the



absence of substrate, SGLT1 pre-steady-state currents were isolated by subtracting the current in 0.2 mM Pz from the corresponding current measured when 90 mM, 50 mM or 10 mM Na<sup>+</sup> was present in the saline solution. Time integration of these Pz-sensitive currents was used to compute the transported charge as a function of the membrane potential ( $Q(V_m)$  curves) as explained previously (Gagnon et al., 2007).

#### 5.5.4 Kinetic modelling of SGLT1 through the direct fitting approach

The currents were simulated using a program written in MATLAB 7.9.0 R2009b (MathWorks, Natick, MA) representing different multi-state kinetic models (source code available upon request). To mimic more closely the experimental conditions, the time course of the membrane potential used in the current simulation was constructed by integrating the membrane capacitive current in response to a voltage step. The average current measured in the presence of 0.2 mM Pz were used as a good approximation of the membrane capacitive currents since the integration of these currents ( $Q$ ) yielded a linear  $Q(V_m)$  relationship. The simulations were done with a time resolution of 20 points/ms except for 12 ms following each voltage change (ON and OFF) where it was set to 100 points/ms. Occupational probabilities for the different states ( $C_1$ ,  $C_2$ , etc.) were calculated by using a set of differential equations which is presented in Eq. 5.1 for a n-state model

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} C_1 \\ C_2 \\ C_3 \\ \vdots \\ C_{(n-1)} \\ C_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -(k_{12} + k_{1n}) & k_{21} & 0 & \dots & 0 & k_{n1} \\ k_{12} & -(k_{21} + k_{23}) & k_{32} & \dots & 0 & 0 \\ 0 & k_{23} & -(k_{32} + k_{34}) & \dots & 0 & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \vdots \\ 0 & 0 & 0 & \dots & -(k_{(n-1)(n-2)} + k_{(n-1)n}) & k_{n(n-1)} \\ k_{1n} & 0 & 0 & \dots & k_{(n-1)n} & -(k_{n(n-1)} + k_{n1}) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} C_1 \\ C_2 \\ C_3 \\ \vdots \\ C_{(n-1)} \\ C_n \end{bmatrix} \quad (5.1)$$

with the voltage-dependent rate constants ( $k_{ij}$ ) expressed using Eyring rate theory as follows

$$k_{ij} = k_{ij0} \exp\left(z_i \alpha_i \frac{FV_m}{RT}\right), \quad (5.2a)$$

$$k_{ji} = k_{ji0} \exp\left(-z_i(1 - \alpha_i) \frac{FV_m}{RT}\right), \quad (5.2b)$$

where  $z_i$  is the valence of the equivalent moveable charge (a negative  $z_i$  representing a negative charge moving toward the extracellular side of the membrane),  $\alpha_i$  represents the asymmetry of the energy barrier,  $F$  is the Faraday constant,  $R$  is the gas constant and  $T$  is the temperature. The description of each step of a given model requires 4 parameters ( $k_{ij0}$ ,  $k_{ji0}$ ,  $z_i$  and  $\alpha_i$ ). In the n-state cyclic model, this represents  $4n-1$  parameters (as one rate constant is adjusted to respect microreversibility). To this set of kinetic parameters, we need to add “N”, the total number of transporters expressed at the membrane of an oocyte. Moreover, as the measurement of the phlorizin-sensitive transient currents requires application of the inhibitor in each condition studied (3  $[\text{Na}^+]_o$  and 2  $[\alpha\text{MG}]_o$ ), we realised that a variable “N” needed to be used in each case because a fraction of the cotransporters could remain inhibited due to imperfect Pz removal.

The parameters of the n-state model that can satisfactorily reproduce SGLT1 activity were obtained by directly fitting the currents using an SA algorithm. The determination of the numerous parameters involved was undertaken in two parts. First, both ON (going from -50 mV to different  $V_m$ ) and OFF (going from different  $V_m$  to -50 mV) pre-steady-state currents were recorded in the presence of 90 mM, 50 mM and 10 mM  $[\text{Na}^+]_o$  (0 mM  $\alpha\text{MG}$  in all cases) and were simultaneously fitted with a reduced model that did not include states representing substrate-bound configurations. The current pulses were baseline corrected to subtract the leak current of SGLT1 based on the recent finding that this current represents a permeation pathway that is independent of the conformational changes associated with  $\text{Na}^+$ /glucose cotransport (Longpre et al., 2010). The experimental

currents were compared to the simulated currents by taking the squared difference between corresponding points in two time windows beginning 2 ms after  $V_m$  was stepped and spanning 42 ms (ON) and 34 ms (OFF) when 90 mM or 50 mM  $\text{Na}^+$  was present. When 10 mM  $\text{Na}^+$  was present, the fitting windows began 1.5 ms after  $V_m$  was stepped and lasted only 35 ms (ON) and 19 ms (OFF) because the current decays were significantly faster than for the other  $[\text{Na}^+]_o$ . To take into account the different lengths of the windows so that each  $[\text{Na}^+]_o$  contributes equally to the fitting process, the sum of the squared differences calculated from each  $[\text{Na}^+]_o$  were added together using a weighted linear combination. This linear combination, corresponding to the global error, was used as a cost function to find the optimal parameter set which could simultaneously reproduce the ON and OFF transient currents of SGLT1 at the three  $[\text{Na}^+]_o$ , using the SA algorithm.

While the parameters found in the absence of  $\alpha\text{MG}$  were maintained constant, the complete n-state model was then used to simulate cotransport currents and find the values of the remaining parameters needed to reproduce the experimental currents obtained when 0.1 mM and 5 mM  $\alpha\text{MG}$  were added to the normal saline solution. These two conditions were fitted simultaneously using the same strategy as in the first part, but with different time windows to take into account the steady-state cotransport currents as well as the transient currents. In the case of 5 mM  $\alpha\text{MG}$  currents, the time windows began 2 ms after  $V_m$  was stepped and lasted 145 ms (in order to measure both the ON transient current and the steady-state cotransport current) and 9 ms (OFF). Two windows were also used when 0.1 mM  $\alpha\text{MG}$  was present, but the length of the window used for comparison of the OFF transients currents was increased to 24 ms to account for the slower decay observed.

### **5.5.5 A Simulated Annealing algorithm**

SA algorithms were introduced in the field of iterative processes in 1983 (Kirkpatrick et al., 1983) to improve convergence towards the global minimum of a cost function and to eliminate reliability issues observed when searches became stuck in local minima. The technique is based on an analogy with the relaxation experienced by

misplaced atoms in a metal when it is heated up and slowly cooled down. To implement the SA algorithm, a “temperature term” is added to the problem. The system is first used at an initial “temperature” where the Metropolis algorithm (see Fig. 5.2 A) is run until the system reaches thermal equilibrium. For our SGLT1 kinetic model, thermal equilibrium is represented by a situation where there are as many accepted random changes of the parameters (according to Fig. 5.2 A) that lower the fitting error as there are that make it larger. The temperature is subsequently decreased slowly, ensuring that thermal equilibrium is reached at each cooling step. As the limit of sufficiently low temperature is approached, the global minimum of the optimization problem is likely to be found. The logical scheme of the Metropolis algorithm was originally developed in 1952 to accurately simulate a group of atoms in equilibrium at a given temperature (Metropolis et al., 1953).

There are a number of important points that need to be stressed when considering the SA algorithm. In the case of our SGLT1 kinetic model, one of the parameters ( $z_i$ ,  $k_{ij0}$ ,  $k_{ji0}$ ) is altered randomly at each iteration of the search (the  $\alpha_i$  are initially set to 0.5). The available domain for each of these parameters is dynamically adjusted throughout a simulation (Fig. 5.2 B) so that the acceptance ratio of the trials stays around 50% in order to adequately sample the parameter space. In simulations where the complete cotransport cycle was considered, we added a Lagrange multiplier to the change in the computed error (“E” is presented in Fig. 5.2 C). This object tends to reject a trial  $z_i$  value that compromises the quality of  $\sum_{i=1}^n z_i = -2$ , even if the new  $z_i$  value implies a lower error. In the end, this ensures that the  $z_i$  values are consistent with the stoichiometry of 2 Na<sup>+</sup> transported per cycle. The initial temperature of the SA must be chosen so that it is neither too high, leading to unnecessary long simulation times, nor too low, which could eventually trap the system in a local minimum from which it cannot escape. This quantity is problem-dependent and is usually determined by trial and error. In our case, the initial temperature was set to  $2 \times 10^{-10}$  (no units to be consistent with  $\Delta E$  of Fig. 5.2 A). Moreover, the cooling schedule must be smooth enough to ensure the convergence to the global minimum. It has been shown that this is guaranteed if the temperature decreases according to a logarithmic

scheme (Geman and Geman, 1984). In this scheme, the temperature decreases by a fixed ratio at each step (in the present case, we used  $T_{i+1} = 0.95T_i$ ). The simulation ends when 200 cooling steps have occurred.

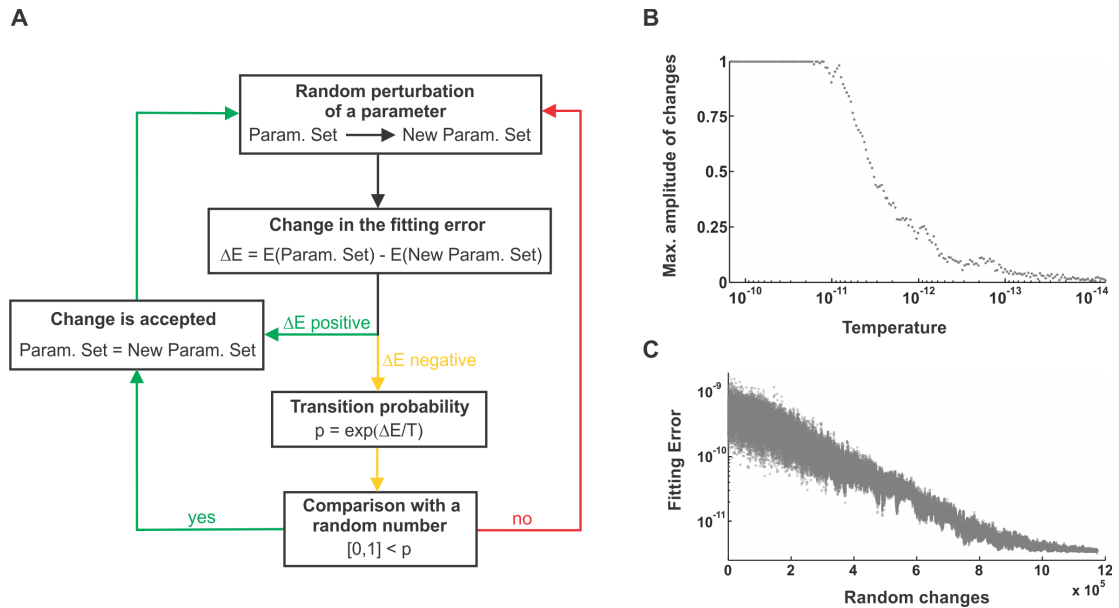


Figure 5.2 The Metropolis algorithm and the principal parameters characterizing a SA run.

(A) A random modification of one of the parameters is made and the resulting fitting error is compared to the error obtained with the original parameter set. If the new error is smaller than the previous one, the new parameter value is accepted. On the other hand, if the new error is larger, it is not necessarily rejected. Instead, a temperature dependent transition probability is calculated and if its value is greater than a random number between 0 and 1, the change is accepted. Then, the loop starts again and a new parameter to be modified is randomly chosen. (B) Dynamic adjustment of the maximal amplitude of random changes applied to the kinetic parameters of the model. The amplitude decreases when the system is cooled down in order to keep an acceptance ratio of approximately 50%. (C) Evolution of the fitting error throughout a simulation.

The SA algorithm was written in the MATLAB language, compiled and executed on the computing server Cottos provided by the Réseau québécois de calcul haute performance. Finding a satisfactory parameter set for a 5-state model while simultaneously considering 3  $[\text{Na}^+]_o$  required  $\sim 3$  days of computation on a single 3 GHz CPU where around a million different parameter combinations are tested. Taking advantage of the computing server, several independent simulations were executed at the same time to confirm that the parameter set that minimizes the fitting error can be repeatedly found.

### 5.5.6 Statistics

Experimental data is presented as average  $\pm$  SEM over the number of oocytes used (one experiment per oocyte). In the figures, error bars are not shown when smaller than symbols. Kinetic parameters found by SA are presented as a rounded average  $\pm$  SD over a number of representative independent simulations.

### 5.5.7 Online Supplemental Material

The online supplemental material contains Fig. 5.7, which shows the simulated transient currents resulting from a 4-state model as compared to experimental data for (A) 90 mM, (B) 50 mM and (C) 10 mM  $[\text{Na}^+]_o$ . Systematic discrepancies can be observed between the simulated and the experimental OFF currents when the membrane potential is going from +20 and +70 mV to -50 mV. The online supplemental material also contains a brief movie depicting the cotransport mechanism of SGLT1 in the presence of 0.5 mM  $\alpha\text{MG}$  ( $\sim K_m^{\alpha\text{MG}}$ ), 90 mM  $[\text{Na}^+]_o$  and a membrane potential of -50 mV. The cartoon represents a true simulation of 210 ms made with the 7-state model and the parameters given in Table 5.I.

## 5.6 Results

The first part of this study sought to identify the simplest kinetic model able to describe SGLT1 pre-steady-state ON and OFF currents, in the absence of  $\alpha\text{MG}$ , as a

function of  $[\text{Na}^+]_o$  and  $V_m$ . The first issue was to determine how many states were required to correctly model the ON and OFF transients at each of the  $[\text{Na}^+]_o$  considered separately (90, 50 and 10 mM), without any assumptions regarding the specific nature of each transition. The current traces to be fitted were averaged from 4 oocytes after having normalised the amplitudes using steady-state cotransport currents measured at -155 mV in the presence of 5 mM  $\alpha$ MG. Using the SA algorithm to directly fit the averaged experimental currents, we reached the conclusion that a 4-state model with symmetrical energy barriers ( $\alpha_i = 0.5$ ) was the minimal structure capable of perfectly reproducing the transient currents and their  $V_m$  dependence at any given  $[\text{Na}^+]_o$ . However, when comparing the parameter sets obtained for each of the three  $[\text{Na}^+]_o$ , only the parameters associated with the  $C_2 \leftrightarrow C_3$  transition ( $k_{230}$ ,  $k_{320}$  and  $z_2$ ) were similar at each  $[\text{Na}^+]_o$ , and it was difficult to identify the Na-dependent reaction rate as neither of the two remaining reactions appeared to have rate constants proportional to either  $[\text{Na}^+]_o$  or  $[\text{Na}^+]_o^2$ . Assuming that the slow and voltage-independent transition ( $C_2 \leftrightarrow C_3$ ) might represent the reorientation of the cotransporter binding sites, we modeled the transition from  $C_3$  to  $C_4$  as the cooperative binding of two  $\text{Na}^+$  ions. SA was then used to optimize simultaneously the transient currents at 90, 50 and 10 mM  $[\text{Na}^+]_o$  in the framework of this more explicit 4-state model. Out of 8 attempts, the best parameter set could simulate the ON transient currents, but there was a small but clear discrepancy in the way the OFF transients settled when returning to -50 mV from a positive  $V_m$  (Fig. 5.7 in the Supplemental Material). This discrepancy was already present at 90 mM  $[\text{Na}^+]_o$  but could be better observed at 50 and 10 mM  $[\text{Na}^+]_o$ .

In the light of these findings, we decided to incorporate one more state to our scheme and to simultaneously fit the ON and OFF transient currents at 90, 50 and 10 mM  $[\text{Na}^+]_o$  in the framework of a 5-state model. Because it is not known whether one or two  $\text{Na}^+$  ions participate in the pre-steady-state kinetics, we considered three different ways of assigning  $[\text{Na}^+]_o$  dependence to the model. In the first case, the binding of a single  $\text{Na}^+$  ion was assigned to the transition  $C_4 \rightarrow C_5$ . In the second case, two  $\text{Na}^+$  ions were assumed to bind sequentially in the steps  $C_3 \rightarrow C_4$  and  $C_4 \rightarrow C_5$ . Finally, in a third scenario, the binding of

the two  $\text{Na}^+$  ions occurred simultaneously (high cooperativity) in the transition from  $C_4$  to  $C_5$  (Fig. 5.3). Of those three models, the one exhibiting a cooperative  $\text{Na}^+$  binding event led to the most accurate and convincing fit of the experimental ON and OFF currents (Fig. 5.4), yielding a fitting error  $\sim 2$  times smaller than the two other models. To be sure that we were not missing any possible improvements in our models, we considered the effect of asymmetric voltage dependencies. Letting the  $\alpha_i$  parameters free to vary between 0 and 1, the results of simulations done for the 5-state models did not generate a significant improvement of the fits that could justify the incorporation of asymmetric barriers. Our results thus suggested that the conformational change in which SGLT1 is empty and reorients itself in the membrane should occur in three distinct steps. Moreover, the parameter set describing our data (Table 5.I) suggested that the transient currents were associated with the movement of -1.3 equivalent charges across the membrane, and that the only voltage-independent transition was the second free carrier reorientation step ( $C_2 \leftrightarrow C_3$ ). It is interesting to note that the rate constants  $k_{230}$  and  $k_{320}$  as well as the voltage dependencies parameterised by  $z_1$ ,  $z_2$  and  $z_3$  were similar to those found while performing the individual fits at each  $[\text{Na}^+]_o$  using the 4-state model, thus reinforcing our conclusion that the presence of an intermediary, slow and voltage-independent step amongst the empty carrier movements seemed to be mandatory. We then integrated both the simulated and experimental OFF current relaxations in order to analyse the charge transfer occurring as a consequence of  $V_m$  steps. The resulting  $Q(V_m)$  curves are depicted in Fig. 5.4, where we observe that the 5-state model reproduced within experimental error the  $[\text{Na}^+]_o$ -dependence of the charge movements.



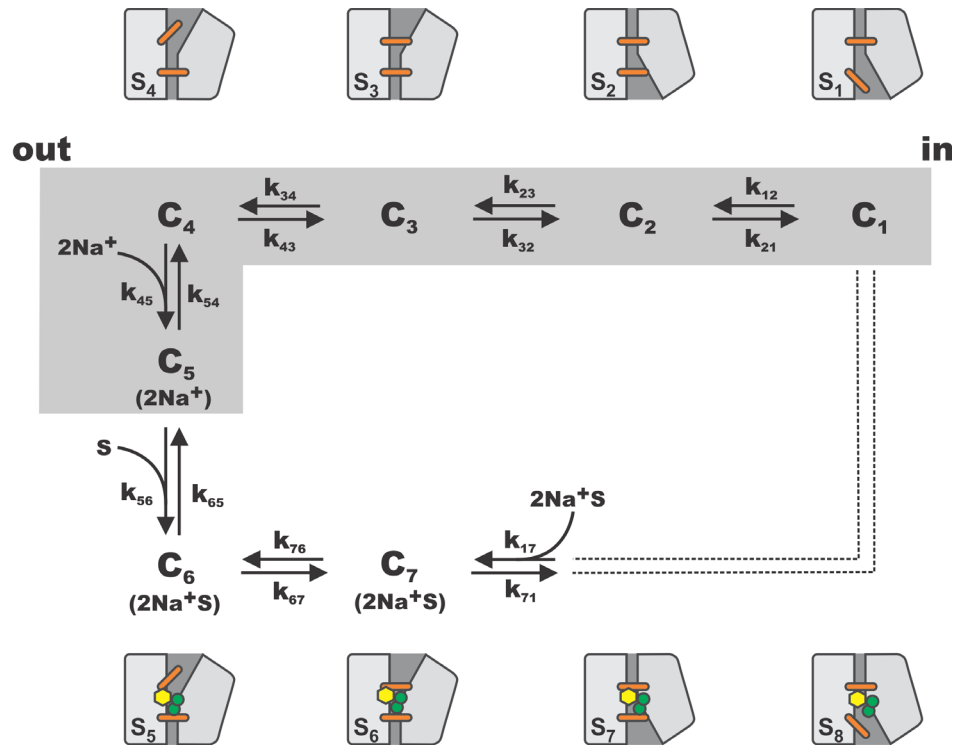


Figure 5.3 Complete 7-state model used to simulate SGLT1 transient and steady-state currents.

Intracellular binding of  $Na^+$  and  $\alpha$ MG have been lumped into a single transition ( $k_{17}$ ). The scheme includes a 5-state model (gray box) which is the simplest structure leading to an accurate fit of the transient currents in the absence of  $\alpha$ MG. The different states suggested by the LeuT structural family are labelled  $S_1$  to  $S_8$  and are presented above and below the kinetic model.

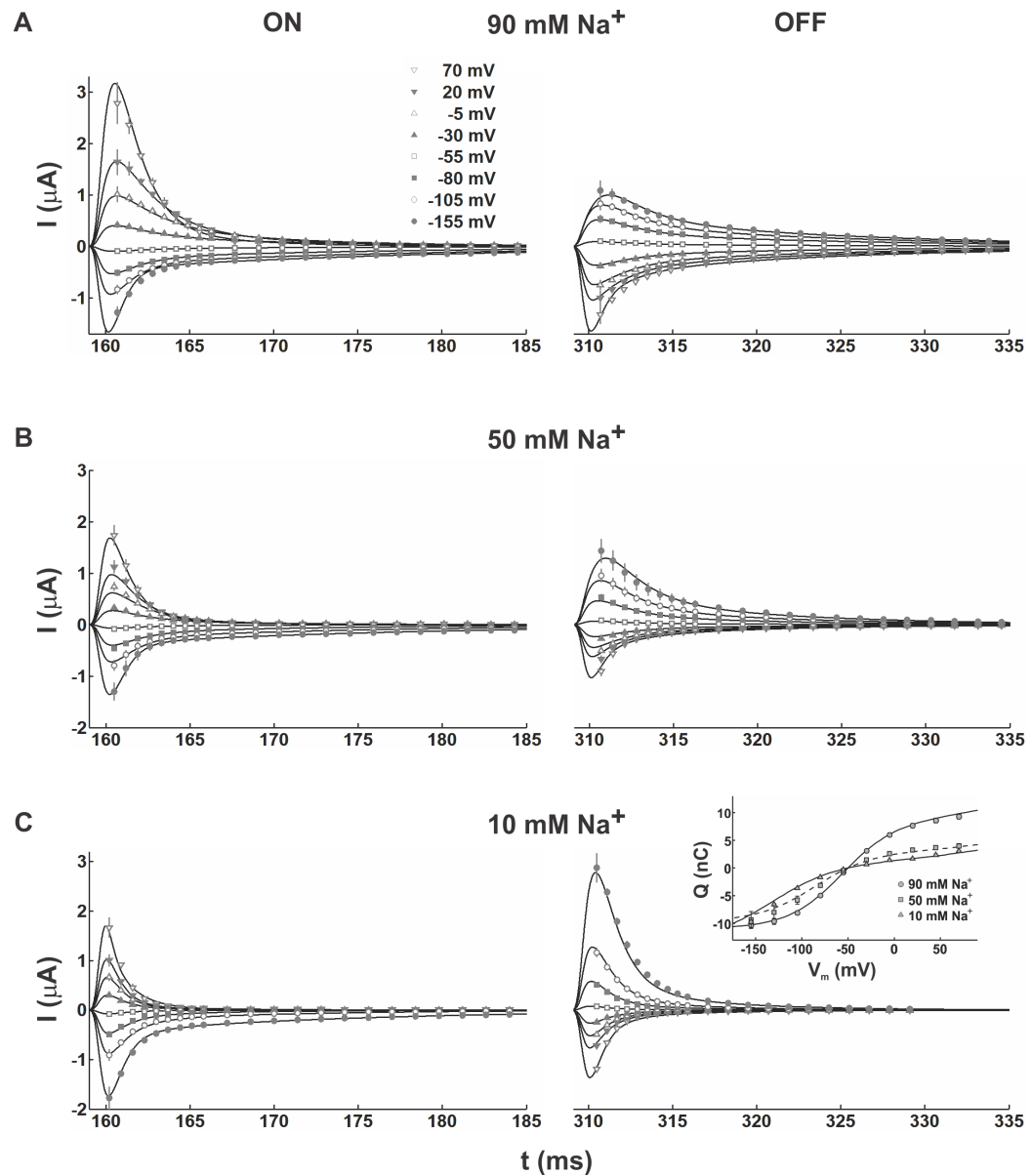


Figure 5.4 Simulation of the pre-steady-state ON and OFF currents (solid lines) using the 5-state model.

The simulation is generated in the presence of (A) 90 mM, (B) 50 mM and (C) 10 mM  $[\text{Na}^+]_o$ . Symbols represent the average experimental data  $\pm$  SEM. (Inset) The  $Q(V_m)$  curves corresponding to the integrals of the simulated and experimental OFF transient currents are compared at 90, 50 and 10 mM  $[\text{Na}^+]_o$ .

Tableau 5.I Rates constants and parameters of the 7-state kinetic model

| parameter                                    | value  | SD     | parameter                                    | value                 | SD                |
|--|--------|--------|--|-----------------------|-------------------|
| $k_{120}$ (s <sup>-1</sup> )                 | 1500   | 110    | $k_{210}$ (s <sup>-1</sup> )                 | 200                   | 35                |
| $k_{230}$ (s <sup>-1</sup> )                 | 59     | 2      | $k_{320}$ (s <sup>-1</sup> )                 | 200                   | 10                |
| $k_{340}$ (s <sup>-1</sup> )                 | 200    | 10     | $k_{430}$ (s <sup>-1</sup> )                 | 1900                  | 55                |
| $k_{450}$ (M <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ) | 600000 | 140000 | $k_{540}$ (s <sup>-1</sup> )                 | 1000                  | 160               |
| $k_{560}$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) | 111000 | 4300   | $k_{650}$ (s <sup>-1</sup> )                 | 82                    | 5                 |
| $k_{670}$ (s <sup>-1</sup> )                 | 300    | 25     | $k_{760}$ (s <sup>-1</sup> )                 | 700                   | 50                |
| $k_{710}$ (s <sup>-1</sup> )                 | 100    | 5      | $k_{170}$ (M <sup>-3</sup> s <sup>-1</sup> ) | 6700000               | 220000            |
| $z_1$  | -0.41  | 0.01   | $N_{90Na}$                                   | $1.35 \times 10^{11}$ | $3.6 \times 10^9$ |
| $z_2$  | 0.00   | 0.001  | $N_{50Na}$                                   | $8.94 \times 10^{10}$ | $2.5 \times 10^9$ |
| $z_3$  | -0.70  | 0.02   | $N_{10Na}$                                   | $1.24 \times 10^{11}$ | $5.5 \times 10^9$ |
| $z_4$  | -0.19  | 0.02   | $N_{0.1\alpha MG}$                           | $7.34 \times 10^{10}$ | $2.1 \times 10^8$ |
| $z_5$  | -0.01  | 0.01   | $N_{5\alpha MG}$                             | $7.93 \times 10^{10}$ | $6.3 \times 10^8$ |
| $z_6$  | -0.66  | 0.02   |  |                       |                   |
| $z_7$  | -0.02  | 0.01   |  |                       |                   |

The 7-state model refers to the scheme presented in Fig. 5.3. The parameters highlighted in gray were obtained using the 5-state model (absence of  $\alpha MG$ ) prior to expansion to the 7-state cotransport model. The  $\alpha_i$  (representing the energy barrier asymmetries) are fixed at 0.5. The rate constant  $k_{170}$  is adjusted to respect microreversibility. In the case of the 5-state model, the standard deviation (SD) was computed using 11 parameter sets reproducing satisfactorily the current traces averaged from 4 oocytes, while 8 parameter sets were used for the 3 additional transitions taking place in the 7-state model.

Having established a model describing the kinetics of SGLT1 in the absence of substrate, we next addressed simulation of steady-state and pre-steady-state currents in the presence of  $\alpha$ MG. The straightforward way of doing that was to incorporate a single new state ( $C_6$ ) into our current scheme in order to represent the binding of glucose ( $C_5 \rightarrow C_6$ ). To keep the model as simple as possible, the states where the cotransporter is facing the intracellular side were all lumped together. This seems to be a reasonable assumption since the experimental conditions mimic the “zero-trans” conditions where intracellular  $\text{Na}^+$  and glucose concentrations are not sufficient to generate a measurable reverse mode of cotransport. This is supported by the previously reported low affinity for intracellular  $\text{Na}^+$  (Quick et al., 2003; Eskandari et al., 2005) and the fact that intracellular  $[\text{Na}^+]_i$  has to be raised to  $\sim 30$  mM to measure an outward  $\text{Na}^+$ /glucose cotransport current upon intracellular glucose injection (Charron et al., 2006). Then, keeping constant the parameters obtained in the absence of glucose (5-state model), we used SA to simultaneously fit the currents (transient + steady-state) measured at 0.1 and 5 mM  $[\alpha\text{MG}]_o$ , in the presence of 90 mM  $[\text{Na}^+]_o$ , and to deduce the remaining unknown parameters of the full 6-state scheme. While the simulated currents adequately reproduced the steady-state currents at 5 mM  $[\alpha\text{MG}]_o$ , the 6-state model failed to fit the steady-state kinetics at 0.1 mM  $[\alpha\text{MG}]_o$ . In view of these limitations, we added one more state ( $C_7$ ) to the scheme following the glucose binding step resulting in a 7-state model (Fig. 5.3). This time, the model adequately described the voltage dependence and amplitude of the steady-state cotransport currents for both  $[\alpha\text{MG}]_o$ , as can be observed in Fig. 5.5, where the simulated currents resulting from the best parameter set (Table 5.I) are compared to the experimental data. The fit of the ON and OFF transient currents were generally satisfactory, despite slight discrepancies at larger  $V_m$  steps in the case of the OFF relaxation at 5 mM  $[\alpha\text{MG}]_o$ . However, this relaxation is a fast event of low amplitude, which represents an experimental challenge to measure. Nevertheless, the presence of 5 mM  $[\alpha\text{MG}]_o$  produced a massive reduction of the transient currents that was very well reproduced by the kinetic model. The corresponding  $Q(V_m)$  curves calculated from the OFF transients at both  $[\alpha\text{MG}]_o$  are plotted in Fig. 5.5, and are in agreement with

experiments within 1 nC for all  $V_m$ . This means that our simulations correctly predict the loss of transferred charge associated with the presence of increasing  $[\alpha\text{MG}]_o$ , which is a well documented feature of SGLT1 (Parent et al., 1992a; Loo et al., 2006; Gagnon et al., 2007).

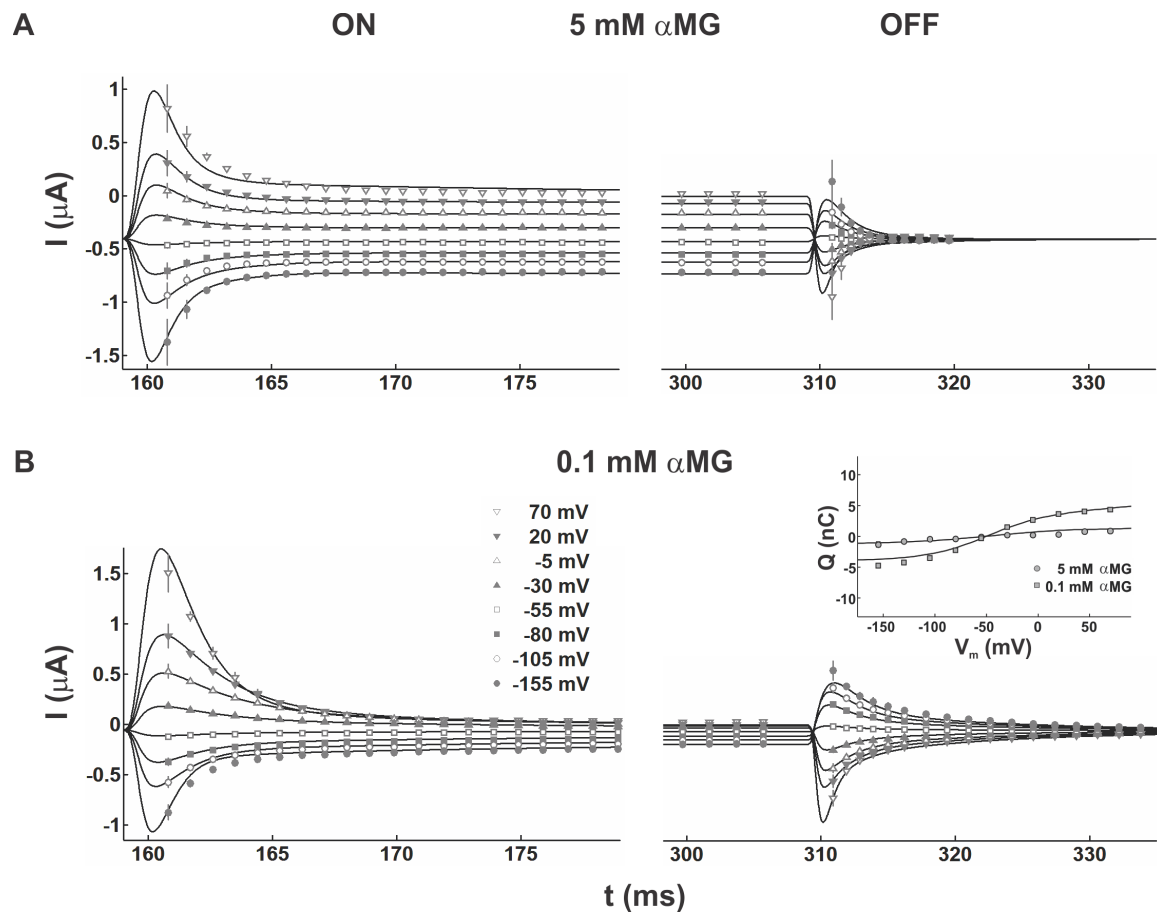


Figure 5.5 The simulated steady-state and pre-steady-state ON and OFF currents in the presence of 90 mM  $[\text{Na}^+]_o$  and  $\alpha\text{MG}$ .

Simulated currents obtained with (A) 5 mM or (B) 0.1 mM  $[\alpha\text{MG}]_o$  are compared to experimental data. (Inset)  $Q(V_m)$  curves obtained from integration of the OFF transient currents in the presence of 90 mM  $[\text{Na}^+]_o$  and 5 mM or 0.1 mM  $[\alpha\text{MG}]_o$ .

Looking at the parameter set of the proposed 7-state model, it should be noted that the outwardly oriented, fully loaded cotransporter experiences a multi-step reorientation ( $C_6$  to  $C_1$ ) which bears certain similarities to the conformational changes experienced by the empty carrier ( $C_1$  to  $C_4$ ). As was the case for the empty cotransporter, the fully-loaded carrier goes through a voltage-dependent conformational change ( $C_6 \rightarrow C_7$ ,  $z_6 = -0.66$ ) which is followed by a slow, voltage-independent step ( $k_{710} = 100 \text{ s}^{-1}$ ). This is in sharp contrast with the conclusions of previous models where all reaction rate constants following  $\text{Na}^+$  binding were assumed to be voltage-independent (Parent et al., 1992b; Loo et al., 2006).

## 5.7 Discussion

The main goal of this study was to find the simplest kinetic model capable of reproducing the presteady-state and steady-state currents of SGLT1 as a function of  $[\text{Na}^+]_o$  and  $[\alpha\text{MG}]_o$ . In the past, partial models with 3 (Loo et al., 1993; Hazama et al., 1997) or 4 states (Krofchick and Silverman, 2003) were proposed together with complete models consisting of 6 to 8 states (Parent et al., 1992b; Eskandari et al., 2005; Loo et al., 2006). As the number of parameters increases (up to 32 parameters for a 8-state model), a systematic method becomes necessary to estimate the values of these parameters and to assess the quality of any given model. The SA algorithm used in the present study has proven to be reliable in solving complicated problems such as this.

### 5.7.1 Model structure and rate-limiting steps

We first established that the minimal scheme leading to a satisfactory reproduction of the measured currents in the absence of  $\alpha\text{MG}$  was a 5-state model. The choice to have four empty carrier states ( $C_1 \leftrightarrow C_4$ ) and to group the binding of the two  $\text{Na}^+$  ions into a single, cooperative transition ( $C_4 \rightarrow C_5$ ) was based on the fact that this model produced the smallest fitting error as compared to any other modelling of the binding events, including where the binding of a single  $\text{Na}^+$  ion was considered. It was surprising to find that lumping

the binding of 2 Na<sup>+</sup> ions together could produce such a good result, as it has previously been argued that this manoeuvre would introduce an artefactual Na<sup>+</sup> dependence in the rate constants of the transition preceding the Na-binding event, making them pseudo-rate constants (Falk et al., 1998). This phenomenon has often been stated as the source of the inability to find a unique parameter set that could reproduce experimental data as a function of [Na<sup>+</sup>]<sub>o</sub> (Loo et al., 1993; Hazama et al., 1997; Krofchick and Silverman, 2003; Loo et al., 2005; Loo et al., 2006). It is possible that the problems reported in these studies stem either from the use of an insufficient number of states (Loo et al., 1993; Hazama et al., 1997; Krofchick and Silverman, 2003) or from the difficulty of assessing the values of the numerous parameters when 5 or more states are considered (Loo et al., 2005; Loo et al., 2006).

In the presence of  $\alpha$ MG, we found that 2 more states were necessary to account for the way in which the presence of a substrate produces steady-state cotransport currents and reduces the transient current amplitudes. The parameters shown in Table 5.I present an interesting element of symmetry which was not found in any of the previous models proposed for SGLT1. In the forward transport cycle (leading to Na<sup>+</sup>/glucose uptake), the 2 slowest reactions are voltage-independent with  $k_{230}$  and  $k_{710}$  at 59 s<sup>-1</sup> and 100 s<sup>-1</sup>, respectively (corresponding to activation energies in excess of 14.5 kcal/mol). These are likely to represent the major conformational changes that occur when the empty cotransporter goes from the inward-facing to the outward-facing configuration ( $k_{23}$ ) and when the fully loaded cotransporter goes from the outward-facing to the inward-facing configuration ( $k_{71}$ ).

Interestingly, these two slow and rate-limiting steps are surrounded by voltage-dependent steps ( $C_1 \leftrightarrow C_2$  and  $C_3 \leftrightarrow C_4$  for the empty carrier, and  $C_6 \leftrightarrow C_7$  for the fully loaded carrier). These transitions are faster and must represent local rearrangements that are necessary to allow the major conformational changes to occur. Comparing the proposed model to the general cotransport scheme of Fig. 5.1, these voltage-sensitive steps could include the displacement of the so-called thin gates on each side of the membrane. In the

case of the fully loaded carrier, only one voltage-dependent step could be identified because of the quasi zero-trans experimental condition. Future studies using increased intracellular  $\text{Na}^+$  and  $\alpha\text{MG}$  concentrations will be necessary to explore the nature and sequence of intracellular  $\text{Na}^+$  and substrate binding steps.

### 5.7.2 Voltage-sensitive steps

An interesting consequence of using SA to find the parameters of the proposed kinetic scheme is the new insight that it provides regarding the charge movements taking place during cotransport. It should be reiterated that in the search process, no assumption was made in selecting which transitions would involve a charge movement, the only restriction being that the sum of their apparent valences must correspond to the net movement of two positive charges across the whole membrane to mimic the entry of two  $\text{Na}^+$  ions into the cell. Our model establishes that the empty carrier translocation (from  $C_1$  to  $C_4$ ) is associated with an overall movement of 1.1 equivalent charges (0.4 charge is associated with the  $C_1 \leftrightarrow C_2$  transition and 0.7 charge is involved with the  $C_3 \leftrightarrow C_4$  transition) across the membrane. This could represent a negative charge moving outside, a positive charge moving inside or a combination of both. Again, comparing the proposed kinetic model with the general cotransport mechanism depicted in Fig. 5.1, transition from  $C_3$  to  $C_4$  could possibly represent a group of reactions associated with the opening of the extracellular thin gate while the transition from  $C_6$  to  $C_7$  would represent the closing of that same gate. It is interesting to see that the charge movements associated with these two reactions are very similar ( $z_3 = 0.7$  for  $C_3 \leftrightarrow C_4$  and  $z_6 = 0.66$  for  $C_6 \leftrightarrow C_7$ ).

It was also found that the binding of the two  $\text{Na}^+$  ions ( $C_4 \rightarrow C_5$ ) was associated with the displacement of  $\sim 0.2$  charge. This could be interpreted as 0.2 positive charges moving inward, which would be consistent with an ion-well effect (i.e.  $\text{Na}^+$  ions crossing a part of the membrane electric field on their way to their binding site). However, we do not think that this is so, as it was found in a previous study (Longpre et al., 2010) that this charge displacement occurred only in the presence of cations that can bind to SGLT1 ( $\text{Na}^+$  or  $\text{H}^+$ ).



Na-dependent (or H-dependent) charge movement would likely be due to a conformational change that occurs only after these specific cations had interacted with their binding sites. Furthermore, considering the large intracellular and extracellular vestibules reported in the structures of vSGLT (Faham et al., 2008) and other Na<sup>+</sup> coupled transporters (Yamashita et al., 2005; Shimamura et al., 2010; Krishnamurthy and Gouaux, 2012), the ion-well hypothesis (where a Na<sup>+</sup> ion would cross a significant portion of the membrane electrical field prior to reaching its binding site) appears unlikely at this point.

### 5.7.3 A film of the cotransport mechanism

Having obtained a set of kinetic parameters that can account for the transient and steady-state currents of SGLT1, we can present a credible visualization of the cotransporter activity under different conditions. To do so, we first considered a single cotransporter molecule whose conformation corresponds to a state “*j*” of our model. The probabilities that it changes conformation to the states “*j* + 1” or “*j* – 1” within a short time increment “*dt*” are given by  $k_{j(j+1)}dt$  and  $k_{j(j-1)}dt$ , respectively. Using a time increment of 0.1 μs, we simulated the conformational behaviour of that single cotransporter molecule for a period of 10 s, in the presence of a low [αMG]<sub>o</sub> of 0.1 mM (~1/10 of the K<sub>m</sub><sup>αMG</sup>) with *V<sub>m</sub>* set to -50 mV (the first 0.5 s are shown in Fig. 5.6 A). The course of the fluctuations performed by SGLT1 between the different states of the model reveals that the cotransporter spends around 40% and 35% of the time in states C<sub>2</sub> and C<sub>5</sub>, respectively. Furthermore, the cotransporter is shown to flicker between Na-bound (C<sub>5</sub>) and Na-free (C<sub>4</sub>) conformations, adopting the C<sub>5</sub> state 6 times more often than C<sub>4</sub>. This illustrates that numerous Na<sup>+</sup> binding and unbinding events take place as the cotransport activity is severely limited by the low [αMG]<sub>o</sub>. Flickering between states C<sub>1</sub> and C<sub>2</sub> also happens, but to a lesser extent.

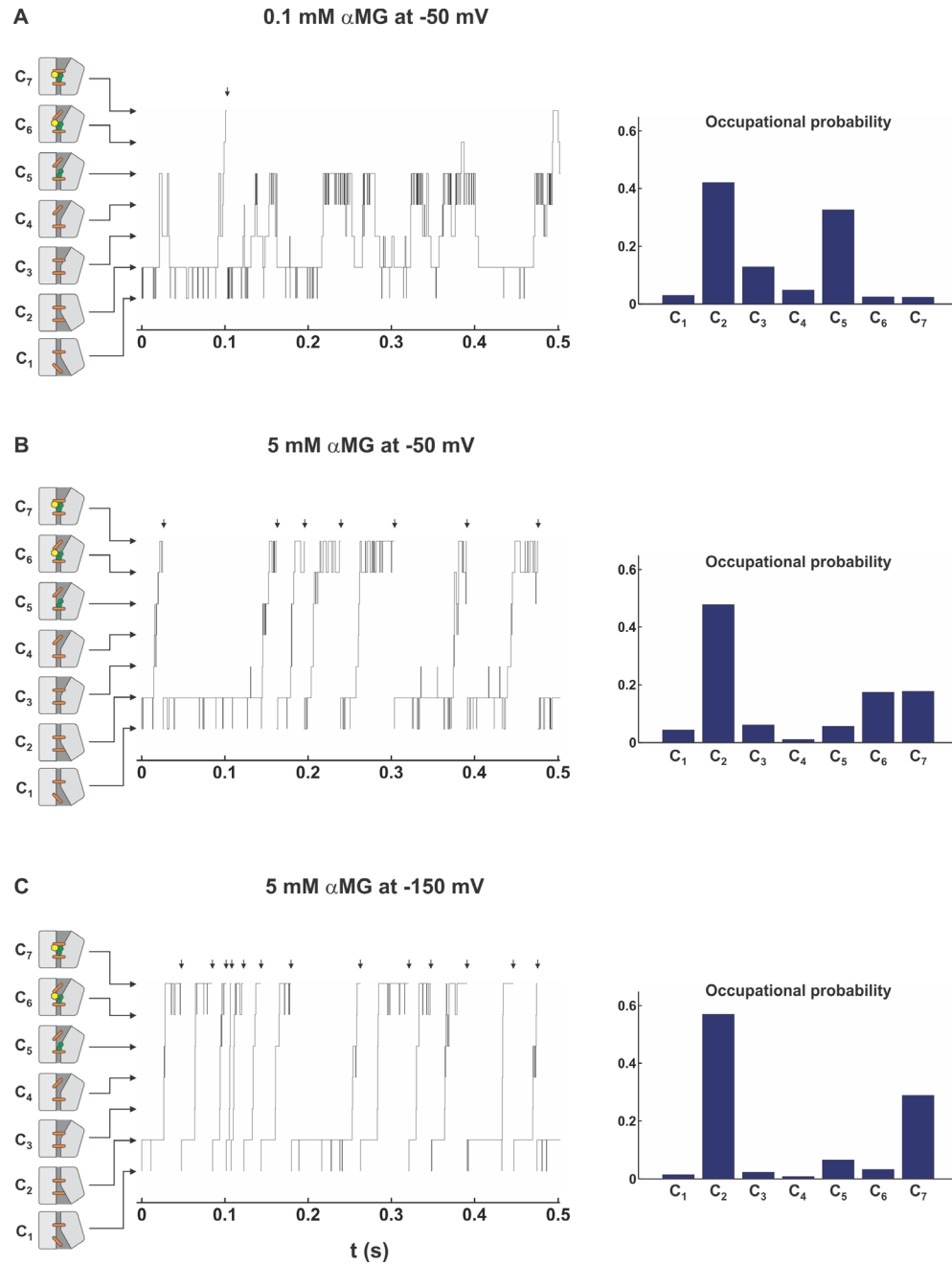


Figure 5.6 The conformational time course of SGLT1 in different conditions.

The time courses were simulated for 10 s (events occurring during the first 0.5 s are depicted) in the presence of 90 mM  $[\text{Na}^+]_o$  and (A) 0.1 mM  $[\alpha\text{MG}]_o$  at -50 mV, (B) 5 mM  $[\alpha\text{MG}]_o$  at -50 mV and (C) 5 mM  $[\alpha\text{MG}]_o$  at -150 mV. Short arrows above each panel

indicate the completion of a cotransport cycle and conformational change from  $C_7$  to  $C_1$ . The occupational probabilities of the 7 states during the 10 s period are shown on the right side of each panel. In addition, conformations suggested by the structural data of the LeuT fold family have been assigned to states  $C_1$  through  $C_7$  to illustrate the behaviour of SGLT1. The so-called thin gates are represented by orange sticks, the green circles and yellow hexagons represent  $\text{Na}^+$  ions and glucose molecules.

When  $[\alpha\text{MG}]_o$  reaches an almost saturating concentration of 5 mM (Fig. 5.6 B), very few oscillations between the Na-bound and Na-free configurations are observed, as the cotransporter now flickers between its two fully loaded states, spending approximately the same amount of time (around 20%) in  $C_6$  (open to the extracellular side) as in  $C_7$  (open to the extracellular side, but occluded). Moreover, SGLT1 is found almost 50% of the time in the  $C_2$  configuration waiting for the rate limiting conformational change ( $k_{23}$ ) to occur. Doing so, it oscillates between the  $C_1$  and  $C_2$  conformations in a manner similar to what was seen in the presence of 0.1 mM  $[\alpha\text{MG}]_o$ .

When the membrane potential is brought to -150 mV (Fig. 5.6 C), the electrogenic transitions  $C_1 \rightarrow C_2$ ,  $C_3 \rightarrow C_4$  and  $C_6 \rightarrow C_7$  are accelerated, which makes the probability of finding SGLT1 in the states  $C_1$ ,  $C_3$  and  $C_6$  practically nil. Under these conditions, the course of conformations adopted by the fully activated cotransporter clearly indicates that it functions in a pseudo 2-state mode (namely  $C_2$  and  $C_7$  states). Its turnover rate (TOR) is mainly limited by the slow conformational changes of the free carrier (transition  $k_{23}$ ) and of the fully loaded carrier ( $k_{71}$ ), which are both voltage-independent steps. For a movie of the cotransport mechanism based on the rate constants presented in Table 5.I, please see the Supplemental Material associated to this article.

It is tempting to argue that events related by some functional symmetry occur during the cotransport cycle. Indeed, when the cotransporter has just released  $\text{Na}^+$  ions and glucose to the intracellular milieu ( $C_7 \rightarrow C_1$ ), it undertakes a voltage-sensitive step ( $C_1 \rightarrow C_2$ ) resulting

in the conformation  $C_2$ , where it faces a voltage-independent and rate limiting step ( $k_{23}$ ). Similarly, following the binding of extracellular  $\text{Na}^+$  and glucose, a voltage-sensitive step ( $C_6 \rightarrow C_7$ ) takes place which brings SGLT1 in state  $C_7$  where it awaits for a slow voltage-independent rate constant ( $k_{71}$ ). As  $k_{71}$  represents lumped transitions including the intracellular release of substrates, it is difficult to identify the specific event responsible for this relatively slow rate constant ( $100 \text{ s}^{-1}$ ).

#### 5.7.4 Turnover rate

Knowing that at  $-150 \text{ mV}$ , in the presence of a saturating  $[\alpha\text{MG}]_o$ , 60% of the cotransporters occupy the state  $C_2$  (Fig. 5.6 C), and that the transition  $C_2 \rightarrow C_3$  occurs at a rate of  $\sim 59 \text{ s}^{-1}$  (Table 5.I), we can estimate the TOR of cotransport at  $-150 \text{ mV}$  to be  $\sim 35 \text{ s}^{-1}$  (considering a small backward transition rate from  $C_3$  to  $C_2$  under these conditions). This TOR is about twice the TOR that we recently evaluated using the ion-trap technique (Longpre and Lapointe, 2011). One of the crucial points in using the ion-trap technique to obtain the TOR is to correctly evaluate a rapid change (a step) of about  $0.5 \text{ mV}$  in the potential of an ion selective electrode. It is possible that the true value of the step is somewhat smaller than was initially estimated.

#### 5.7.5 Differences and similarities with previously suggested models of SGLT1

In the model of SGLT1 originally proposed by Parent et al. (Parent et al., 1992b), it was assumed for simplification purposes that the empty carrier possessed a  $-2e$  charge which was completely neutralised following the binding of 2  $\text{Na}^+$  ions. As a consequence, all the steps following  $\text{Na}^+$  binding were considered to be electroneutral. Furthermore, the parameter set proposed to describe the model predicted that the intracellular release of  $\text{Na}^+$ , taking place at a very slow rate of  $10 \text{ s}^{-1}$  (Parent et al., 1992b), was the rate limiting step of forward  $\text{Na}^+$ /glucose cotransport. These assumptions were kept in all subsequent models proposed over the years by the same laboratory (Loo et al., 1993; Hazama et al., 1997;

Eskandari et al., 2005; Loo et al., 2005; Loo et al., 2006). Accordingly, the 8-state model proposed in 2006 (Loo et al., 2006) was characterised by a rate limiting step representing the intracellular release of  $\text{Na}^+$  which was proposed to occur at a rate of  $5 \text{ s}^{-1}$ . Interestingly, the connectivity of the aforementioned model (see Fig. 9 of (Loo et al., 2006)) is similar to the kinetic scheme presented in the present study. However, the position of the electrogenic steps and the rate limiting conformational changes in the transport cycle are completely different in the two models. Moreover, it can be argued that, in contrast to the present model, the parameter set proposed in (Loo et al., 2006) fails to quantitatively reproduce the time course of the transient current, and therefore cannot account for the diminution of these currents in the presence of increasing  $[\alpha\text{MG}]_o$  (compare Fig. 11 to Fig. 4 in (Loo et al., 2006)).

In previous work from our laboratory (Chen et al., 1996), a 4-state model was used to recreate the pre-steady-state kinetics of SGLT1. In that scheme, the empty carrier reorientation occurred in two steps  $C_1 \leftrightarrow C_2 \leftrightarrow C_3$ , and the binding of a single  $\text{Na}^+$  ion was taken into account in the reaction  $C_3 \rightarrow C_4$ . Despite the fact that this 4-state scheme differs from the one used in the present study, it is interesting to note that the charge movements taking place between the states  $C_1$  and  $C_4$  were characterised by a cumulative valence of -1.35, in close agreement with the valence of -1.3 found in the present study. Also, the 4-state model included a high degree of asymmetry in the transition  $C_2 \leftrightarrow C_3$  as  $k_{23}$  was  $100 \text{ s}^{-1}$  and voltage-independent and  $k_{32}$  was  $280 e^{0.35 FV_m/RT} \text{ s}^{-1}$ . In the present model, this asymmetric transition was replaced by an electroneutral transition  $C_2 \leftrightarrow C_3$  (with  $k_{23} = 59 \text{ s}^{-1}$ ) followed by an electrogenic transition  $C_3 \leftrightarrow C_4$  (with  $k_{43} = 1900 e^{0.35 FV_m/RT} \text{ s}^{-1}$ ). It appears that the presence of an asymmetric transition was due to lumping together voltage-dependent and voltage-independent transitions. More recently, a 5-state model was proposed by our laboratory to rationalise  $\text{Na}^+$ /glucose cotransport (Gagnon et al., 2007). In the absence of substrate, a 4-state scheme where the binding of two  $\text{Na}^+$  ions is modeled in the step  $C_3 \rightarrow C_4$  was used, and all the voltage dependence of the model (-2 equivalent mobile charges) was comprised in the transitions between  $C_1$  and  $C_4$ . Furthermore, glucose

binding occurred in the transition  $C_4 \rightarrow C_5$ , and subsequent reactions were lumped. Although that 5-state model and the present model differ on some major conceptual points, the rate limiting step of cotransport at -150 mV was suggested to be  $k_{23}$ , in accordance with our current results.

## 5.8 Conclusion

In this study, we have used an SA algorithm to establish that a 7-state kinetic model was the simplest scheme describing the activity of SGLT1 up to a 2 ms time resolution as a function of  $V_m$ ,  $[\text{Na}^+]_o$  and  $[\alpha\text{MG}]_o$ . The resulting simulated currents were in direct quantitative agreement with the experimental ON and OFF transient currents, as well as the steady-state  $\text{Na}^+$ /glucose cotransport currents. It was established that the free and fully loaded carrier reorientations are voltage-independent slow steps, and that faster voltage-sensitive structural rearrangements are necessary for these major conformational changes to occur. At -150 mV, in the presence of a saturating  $[\alpha\text{MG}]_o$ , the rate limiting conformational change of cotransport is the voltage-independent free carrier reorientation step  $k_{23}$ , which sets the turnover rate of SGLT1 at  $35 \text{ s}^{-1}$ .

## 5.9 Acknowledgements

This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research (MOP-10580).

## 5.10 References

- Bissonnette, P., J. Noel, M.J. Coady, and J.Y. Lapointe. 1999. Functional expression of tagged human  $\text{Na}^+$ -glucose cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J Physiol.* 520 Pt 2:359-371.
- Charron, F.M., M.G. Blanchard, and J.Y. Lapointe. 2006. Intracellular hypertonicity is responsible for water flux associated with  $\text{Na}^+$ /glucose cotransport. *Biophys J.* 90:3546-3554.

- Chen, X.Z., M.J. Coady, and J.Y. Lapointe. 1996. Fast voltage clamp discloses a new component of presteady-state currents from the Na(+)-glucose cotransporter. *Biophys J.* 71:2544-2552.
- Eskandari, S., E.M. Wright, and D.D. Loo. 2005. Kinetics of the reverse mode of the Na+/glucose cotransporter. *J Membr Biol.* 204:23-32.
- Faham, S., A. Watanabe, G.M. Besserer, D. Cascio, A. Specht, B.A. Hirayama, E.M. Wright, and J. Abramson. 2008. The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na+/sugar symport. *Science.* 321:810-814.
- Falk, S., A. Guay, C. Chenu, S.D. Patil, and A. Berteloot. 1998. Reduction of an eight-state mechanism of cotransport to a six-state model using a new computer program. *Biophys J.* 74:816-830.
- Fang, Y., H. Jayaram, T. Shane, L. Kolmakova-Partensky, F. Wu, C. Williams, Y. Xiong, and C. Miller. 2009. Structure of a prokaryotic virtual proton pump at 3.2 Å resolution. *Nature.* 460:1040-1043.
- Gagnon, D.G., C. Frindel, and J.Y. Lapointe. 2007. Effect of substrate on the pre-steady-state kinetics of the Na(+)/glucose cotransporter. *Biophys J.* 92:461-472.
- Gao, X., F. Lu, L. Zhou, S. Dang, L. Sun, X. Li, J. Wang, and Y. Shi. 2009. Structure and mechanism of an amino acid antiporter. *Science.* 324:1565-1568.
- Gao, X., L. Zhou, X. Jiao, F. Lu, C. Yan, X. Zeng, J. Wang, and Y. Shi. 2010. Mechanism of substrate recognition and transport by an amino acid antiporter. *Nature.* 463:828-832.
- Geman, S., and D. Geman. 1984. Stochastic Relaxation, Gibbs Distributions, and the Bayesian Restoration of Images. *IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence.* PAMI-6:721-741.
- Hazama, A., D.D. Loo, and E.M. Wright. 1997. Presteady-state currents of the rabbit Na+/glucose cotransporter (SGLT1). *J Membr Biol.* 155:175-186.

- Hediger, M.A., M.J. Coady, T.S. Ikeda, and E.M. Wright. 1987. Expression cloning and cDNA sequencing of the Na<sup>+</sup>/glucose co-transporter. *Nature*. 330:379-381.
- Hirayama, B.A., M.P. Lostao, M. Panayotova-Heiermann, D.D. Loo, E. Turk, and E.M. Wright. 1996. Kinetic and specificity differences between rat, human, and rabbit Na<sup>+</sup>-glucose cotransporters (SGLT-1). *Am J Physiol*. 270:G919-926.
- Hummel, C.S., C. Lu, D.D. Loo, B.A. Hirayama, A.A. Voss, and E.M. Wright. 2011. Glucose transport by human renal Na<sup>+</sup>/D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2. *Am J Physiol Cell Physiol*. 300:C14-21.
- Jardetzky, O. 1966. Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature*. 211:969-970.
- Kirkpatrick, S., C.D. Gelatt, Jr., and M.P. Vecchi. 1983. Optimization by simulated annealing. *Science*. 220:671-680.
- Krishnamurthy, H., and E. Gouaux. 2012. X-ray structures of LeuT in substrate-free outward-open and apo inward-open states. *Nature*. 481:469-474.
- Krofchick, D., and M. Silverman. 2003. Investigating the conformational states of the rabbit Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *Biophys J*. 84:3690-3702.
- Longpre, J.P., D.G. Gagnon, M.J. Coady, and J.Y. Lapointe. 2010. The actual ionic nature of the leak current through the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter SGLT1. *Biophys J*. 98:231-239.
- Longpre, J.P., and J.Y. Lapointe. 2011. Determination of the Na<sup>(+)</sup>/glucose cotransporter (SGLT1) turnover rate using the ion-trap technique. *Biophys J*. 100:52-59.
- Loo, D.D., A. Hazama, S. Supplisson, E. Turk, and E.M. Wright. 1993. Relaxation kinetics of the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:5767-5771.
- Loo, D.D., B.A. Hirayama, A. Cha, F. Bezanilla, and E.M. Wright. 2005. Perturbation analysis of the voltage-sensitive conformational changes of the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *J Gen Physiol*. 125:13-36.
- Loo, D.D., B.A. Hirayama, E.M. Gallardo, J.T. Lam, E. Turk, and E.M. Wright. 1998. Conformational changes couple Na<sup>+</sup> and glucose transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:7789-7794.



- Loo, D.D., B.A. Hirayama, M.H. Karakossian, A.K. Meinild, and E.M. Wright. 2006. Conformational dynamics of hSGLT1 during Na<sup>+</sup>/glucose cotransport. *J Gen Physiol.* 128:701-720.
- Ma, D., P. Lu, C. Yan, C. Fan, P. Yin, J. Wang, and Y. Shi. 2012. Structure and mechanism of a glutamate-GABA antiporter. *Nature.* 483:632-636.
- Meinild, A.K., B.A. Hirayama, E.M. Wright, and D.D. Loo. 2002. Fluorescence studies of ligand-induced conformational changes of the Na<sup>(+)</sup>/glucose cotransporter. *Biochemistry.* 41:1250-1258.
- Metropolis, N., A.W. Rosenbluth, M.N. Rosenbluth, and A.H. Teller. 1953. Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. *J. Chem. Phys.* 21:6.
- Parent, L., S. Supplisson, D.D. Loo, and E.M. Wright. 1992a. Electrogenic properties of the cloned Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter: I. Voltage-clamp studies. *J Membr Biol.* 125:49-62.
- Parent, L., S. Supplisson, D.D. Loo, and E.M. Wright. 1992b. Electrogenic properties of the cloned Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter: II. A transport model under nonrapid equilibrium conditions. *J Membr Biol.* 125:63-79.
- Perez, C., C. Koshy, S. Ressler, S. Nicklisch, R. Kramer, and C. Ziegler. 2011. Substrate specificity and ion coupling in the Na<sup>+</sup>/betaine symporter BetP. *EMBO J.* 30:1221-1229.
- Quick, M., J. Tomasevic, and E.M. Wright. 2003. Functional asymmetry of the human Na<sup>+</sup>/glucose transporter (hSGLT1) in bacterial membrane vesicles. *Biochemistry.* 42:9147-9152.
- Ressler, S., A.C. Terwisscha van Scheltinga, C. Vonrhein, V. Ott, and C. Ziegler. 2009. Molecular basis of transport and regulation in the Na<sup>(+)</sup>/betaine symporter BetP. *Nature.* 458:47-52.
- Schulze, S., S. Koster, U. Geldmacher, A.C. Terwisscha van Scheltinga, and W. Kuhlbrandt. 2010. Structural basis of Na<sup>(+)</sup>-independent and cooperative substrate/product antiport in CaiT. *Nature.* 467:233-236.

- Shaffer, P.L., A. Goehring, A. Shankaranarayanan, and E. Gouaux. 2009. Structure and mechanism of a Na<sup>+</sup>-independent amino acid transporter. *Science*. 325:1010-1014.
- Shimamura, T., S. Weyand, O. Beckstein, N.G. Rutherford, J.M. Hadden, D. Sharples, M.S. Sansom, S. Iwata, P.J. Henderson, and A.D. Cameron. 2010. Molecular basis of alternating access membrane transport by the sodium-hydantoin transporter Mhp1. *Science*. 328:470-473.
- Singh, S.K., C.L. Piscitelli, A. Yamashita, and E. Gouaux. 2008. A competitive inhibitor traps LeuT in an open-to-out conformation. *Science*. 322:1655-1661.
- Umbach, J.A., M.J. Coady, and E.M. Wright. 1990. Intestinal Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes is electrogenic. *Biophys J*. 57:1217-1224.
- Watanabe, A., S. Choe, V. Chaptal, J.M. Rosenberg, E.M. Wright, M. Grabe, and J. Abramson. 2010. The mechanism of sodium and substrate release from the binding pocket of vSGLT. *Nature*. 468:988-991.
- Weyand, S., T. Shimamura, S. Yajima, S. Suzuki, O. Mirza, K. Krusong, E.P. Carpenter, N.G. Rutherford, J.M. Hadden, J. O'Reilly, P. Ma, M. Saidijam, S.G. Patching, R.J. Hope, H.T. Norbertczak, P.C. Roach, S. Iwata, P.J. Henderson, and A.D. Cameron. 2008. Structure and molecular mechanism of a nucleobase-cation-symport-1 family transporter. *Science*. 322:709-713.
- Yamashita, A., S.K. Singh, T. Kawate, Y. Jin, and E. Gouaux. 2005. Crystal structure of a bacterial homologue of Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-dependent neurotransmitter transporters. *Nature*. 437:215-223.
- Zhou, L., E.V. Cryan, M.R. D'Andrea, S. Belkowski, B.R. Conway, and K.T. Demarest. 2003. Human cardiomyocytes express high level of Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter 1 (SGLT1). *Journal of cellular biochemistry*. 90:339-346.

## **5.11 Supplemental Material**

Simulated annealing reveals the kinetic activity of SGLT1, a member of the LeuT structural family

Jean-Philippe Longpré, Louis J. Sasseville and Jean-Yves Lapointe

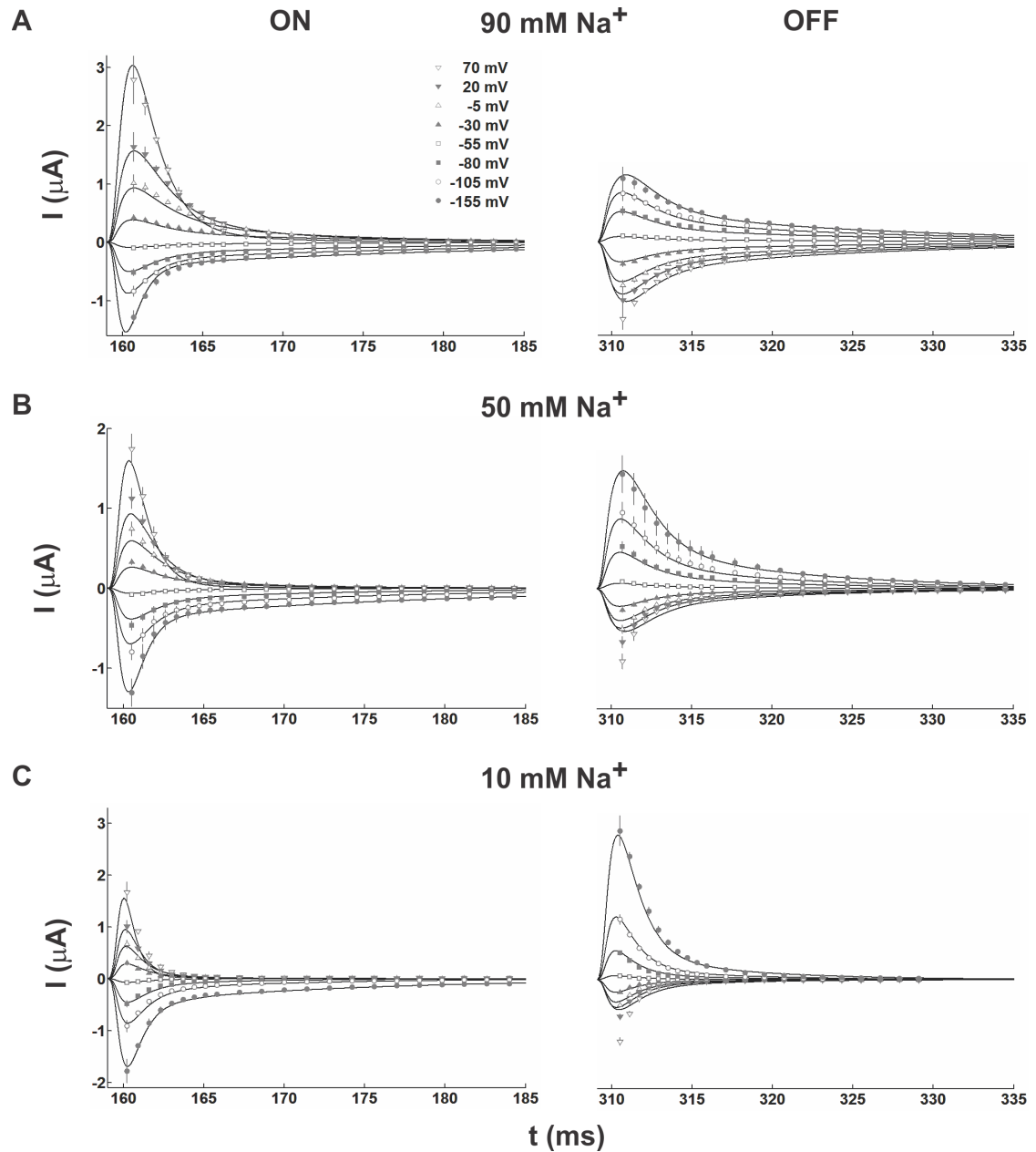


Figure 5.7 The simulated transient currents resulting from a 4-state model where the transition  $C_3 \rightarrow C_4$  represents the cooperative binding of two Na<sup>+</sup> ions.

Results are compared to experimental data for (A) 90 mM, (B) 50 mM and (C) 10 mM  $[\text{Na}^+]_o$ . Note the systematic discrepancies between the simulated and the experimental OFF currents when the membrane potential is going from +20 and +70 mV to -50 mV.

### Supplemental Movie Legend

The movie depicts the cotransport mechanism of SGLT1 in the presence of 0.5 mM  $\alpha$ MG ( $\sim K_m^{\alpha MG}$ ), 90 mM  $[Na^+]_o$  and a membrane potential of -50 mV. The cartoon represents a true simulation of 210 ms made with the 7-state model and the parameters given in Table 5.I. Each transition from one state to the other is depicted as a continuous displacement arbitrarily set to last 2 ms which is the resolution limit of our experimental results.

## 6 Discussion

Dans cette thèse, nous avons étudié divers aspects de la fonction de SGLT1. Afin de poser un regard critique sur les résultats que nous avons obtenus, les éléments de cette discussion seront regroupés autour des thèmes suivants. Nous présenterons ce que nous avons appris sur la nature ionique du courant de fuite de SGLT1 ainsi que sur l'effet de la mutation C292A en situant ces résultats dans le contexte de ce qui est connu des courants de fuite chez d'autres transporteurs, notamment dans la famille SLC5. Nous tenterons également de comprendre comment les caractéristiques du courant de fuite se comparent à celles de la perméabilité à l'eau passive de SGLT1. Par la suite, nous comparerons les différents estimés du TOR de SGLT1 à celui que nous avons obtenu à l'aide de l'ITT en faisant ressortir les implications qu'un tel estimé peut avoir sur le mode de fonctionnement du cotransporteur. Enfin, nous examinerons les prédictions engendrées par le modèle cinétique de SGLT1 que nous avons développé en se servant du SA et d'une approche de lissage direct des courants.

### 6.1 Le courant de fuite de SGLT1

Dans le but de déterminer quels ions participaient au courant de fuite SGLT1, nous avons analysé le comportement du  $V_R$  et de l'amplitude de ce courant suite à des variations de la concentration extracellulaire de divers ions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) en se basant sur la théorie du potentiel de Nernst. Pour pallier à la faible amplitude du courant de fuite, qui représente 5 à 10% du courant maximal de cotransport  $\text{Na}^+$ /glucose, nous avons eu la chance de pouvoir utiliser le mutant C292A de SGLT1. Ce mutant avait été partiellement caractérisé dans une étude antérieure où on avait constaté qu'il générait un fort courant de fuite (Gagnon et al., 2006). C292A nous offrait ainsi la possibilité d'étudier le courant de fuite avec plus de facilité, en plus de nous permettre de corroborer les résultats obtenus avec SGLT1 sauvage.

### 6.1.1 Nature ionique du courant de fuite du mutant C292A

Les expériences d'électrophysiologie que nous avons réalisées sur le mutant C292A ont permis de démontrer que le  $\text{Na}^+$  n'était que partiellement impliqué dans le courant de fuite, puisque une augmentation de  $[\text{Na}^+]_o$  de 5 à 90 mM générait un déplacement du  $V_R$  de seulement +18 mV au lieu des ~72 mV attendus pour une conductance où seul le  $\text{Na}^+$  est impliqué. Suite à cela, il a été établi que les ions qui constituaient cette fuite devaient être des cations, car aucune modulation du  $V_R$  n'était associée à une variation de la  $[\text{Cl}^-]_o$  entre 6 et 70 mM. Dans cette veine, nous avons décidé d'investiguer l'effet des protons, sachant qu'ils peuvent interagir avec SGLT1 (Hirayama et al., 1994, 1997). Il fut remarquable de constater qu'une acidification de pH 7,5 à pH 5,5 stimulait fortement l'amplitude du courant de fuite tout en déplaçant son  $V_R$  de +23 mV par unité de pH (au lieu de +58 mV), indiquant un rôle important des protons dans la fuite aux valeurs de pH plus acides que pH 6,5, car le passage de pH 7,5 à pH 8,5 laissait la position du  $V_R$  inchangée. Afin d'identifier les cations qui, en plus du  $\text{Na}^+$ , seraient responsables du courant de fuite à pH 7,5 nous avons considéré l'implication du  $\text{K}^+$ , du  $\text{Li}^+$  et du  $\text{Cs}^+$ . En conservant toujours une base de 15 mM  $\text{Na}^+$  pour permettre à la Pz de se lier correctement, des courants de fuite d'amplitude similaire furent observés en ajoutant 75 mM  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$  ou  $\text{Cs}^+$ , alors que seul l'ajout de 75 mM  $\text{Na}^+$  engendrait un effet significatif sur la courbe  $Q(V_m)$  par rapport à celle mesurée à 15 mM  $\text{Na}^+$ . Nos résultats indiquaient donc que seul le  $\text{Na}^+$  avait la capacité de générer des changements de conformations importants pouvant mener au cotransport  $\text{Na}^+$ /glucose à haute affinité, malgré le fait que tous les cations considérés étaient capables de traverser SGLT1-C292A et de produire des courants de fuite presque identiques. Ce dernier point nous permis d'inférer que le courant de fuite était indépendant de la conformation du cotransporteur (lié au  $\text{Na}^+$  ou non). Il devenait alors possible de proposer que le  $\text{Na}^+$  et le  $\text{K}^+$  pouvaient être les principaux cations qui génèrent le courant de fuite à pH 7,5 en présence de notre solution saline normale où  $[\text{Na}^+] = 90$  mM et  $[\text{K}^+] = 3$  mM. En effet, considérant des concentrations intracellulaires de 10 et 80 mM pour le  $\text{Na}^+$  et le  $\text{K}^+$ , respectivement, on peut calculer que les  $V_R$  de courants purs attribuables à chacun de

ces cations devraient être +55 et -83 mV, respectivement. Le déplacement de  $V_R$  que nous avons mesuré en remplaçant 75 mM NMDG par 75 mM  $\text{Na}^+$  ou  $\text{K}^+$  peut être rationalisé à l'aide de l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz dans laquelle des perméabilités relatives de 2:1 pour  $P_{\text{K}}/P_{\text{Na}}$  et de 0,3 pour  $P_{\text{NMDG}}/P_{\text{Na}}$  sont utilisées.

### 6.1.2 Nature ionique et voie de perméation du courant de fuite de SGLT1

Dans le but de s'assurer que les conclusions tirées de l'étude du mutant C292A n'étaient pas un effet secondaire attribuable à la mutation, toutes les expériences réalisées avec le mutant ont été répétées avec les courants de faible amplitude de la protéine sauvage. Ces nouvelles expériences nous démontrèrent que, comme dans le cas du mutant, une variation de  $[\text{Na}^+]_o$  de 5 à 90 mM engendrait un déplacement sous-nernstien du  $V_R$  (+10 mV), tandis que la  $[\text{Cl}^-]_o$  ne provoquait aucune modulation du courant de fuite ou de son  $V_R$ . L'acidification causée par le passage d'une solution saline de pH 7,5 à pH 5,5 était associée à un déplacement significatif du  $V_R$  de +40 mV, mais à une augmentation modeste d'environ 50 nA du courant de fuite. Comme dans le cas du mutant C292A, le même  $V_R$  fut enregistré à pH 8,5 et pH 7,5, indiquant un rôle significatif des protons dans le courant de fuite seulement aux pH plus acides que pH 6,5. Nous avons également observé que l'ajout de 75 mM  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$  ou  $\text{Cs}^+$  à une base de 15 mM  $\text{Na}^+$  stimulait le courant de fuite de façon significative, mais avec la sélectivité suivante à -130 mV ( $\text{K}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Li}^+ \approx \text{Na}^+$ ), plus marquée que celle du mutant où tous les ions provoquaient un effet presque identique, et bien différente de la sélectivité ionique de SGLT1 pour le cotransport cation/glucose ( $\text{Na}^+ \gg \text{Li}^+ > \text{Cs}^+ \approx \text{K}^+$ ). De plus, le mouvement de charge produit par la protéine sauvage en réponse à un saut de potentiel était de 2 à 3 fois plus grand que chez le mutant dans toutes les conditions, mais comme prévu, seule la présence de 90 mM  $\text{Na}^+$  pouvait créer le transfert de charge associé aux changements de conformation menant au cotransport  $\text{Na}^+$ /glucose à haute affinité. Il est intéressant de noter que même si il est connu que le  $\text{Li}^+$  peut générer un certain cotransport  $\text{Li}^+$ /glucose (Hirayama et al., 1997), nos résultats indiquent que ce cation doit le faire par le biais de changements de conformations distincts de ceux produits par la liaison  $\text{Na}^+$ . D'autre part, la similarité entre les courants



dus à l'addition de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Cs}^+$  appuie l'idée qu'ils ne dépendent pas des changements de conformation que seule une forte  $[\text{Na}^+]_o$  peut permettre. Ceci suggère que les cations monovalents qui composent le courant de fuite traversent SGLT1 en utilisant une voie de perméation sensible à la Pz de type canal qui est présente dans toutes les conformations du cotransporteur. Le courant de fuite ne serait donc pas attribuable au mécanisme d'accès alterné des sites de liaison, contrairement à ce qui est généralement accepté chez presque tous les membres de la famille SLC5.

Les caractéristiques du courant de fuite énoncées jusqu'à maintenant ne sont pas sans rappeler celles de la perméabilité à l'eau passive ( $L_p$ ) de SGLT1. En effet, on a montré que la  $L_p$  était bloquée par la Pz (Loo et al., 1996; Loo et al., 1999; Duquette et al., 2001) et qu'elle était peu dépendante du  $\text{Na}^+$  (Loo et al., 1999; Sasseville et al., 2011) et du potentiel membranaire (Duquette, 2000; Sasseville et al., 2011). Il était alors raisonnable de considérer la possibilité que le courant de fuite et la  $L_p$  puissent partager la même voie de perméation à travers SGLT1. Dans le but de démontrer la véracité de cette hypothèse, nous avons d'abord tenté de corrélérer l'effet inhibiteur connu du dithiothréitol (DTT) sur le courant de fuite (Gagnon et al., 2006) à un effet possible sur la  $L_p$ . Dans le cas du mutant et de la protéine sauvage, des réductions significatives du courant de fuite et de la  $L_p$  furent observées suite à une incubation en présence de 10 mM DTT. Nous avons ensuite eu l'idée de vérifier s'il existait une corrélation entre les courants de fuite des mutants C292A et C610A, de forte amplitude par rapport à SGLT1, et leurs  $L_p$ . Après correction pour les plus faibles niveaux d'expression de ces deux mutants qui purent être déterminés à l'aide de l'immuno-colorimétrie, il fut effectivement constaté que les amplitudes accrues des courants de fuite de C292A et de C610A étaient associées à de plus importantes  $L_p$  que dans le cas de SGLT1. Ces résultats amenaient ainsi de la crédibilité au fait que les caractéristiques communes observées pour le courant de fuite et la  $L_p$  pouvaient réellement être indicatives d'une voie de perméation très similaire pour l'eau et les cations fuyants à travers SGLT1.

Ces conclusions contrastent avec le constat que des  $E_a$  semblables sont mesurées pour le courant de fuite (19 kcal mol<sup>-1</sup> (Loo et al., 1999)) et le cotransport Na<sup>+</sup>/glucose (25 kcal mol<sup>-1</sup> (Hazama et al., 1997)), tandis qu'on estime la  $E_a$  de la perméabilité à l'eau passive à 5 kcal mol<sup>-1</sup> (Loo et al., 1999). Tout d'abord, l'interprétation stipulant que la sensibilité accrue à la température d'un taux de transport, qui se traduit par une  $E_a$  élevée, soit nécessairement associée à la présence d'un mécanisme impliquant des changements de conformation est discutable. Au sens de l'équation d'Arrhénius, une  $E_a$  élevée par rapport aux fluctuations thermiques ( $RT \sim 0,6$  kcal mol<sup>-1</sup> à température ambiante) est simplement indicative d'un faible taux de transport, indépendamment du mécanisme de perméation. Il n'est donc pas contradictoire de penser qu'une haute valeur de  $E_a$  pour le courant de fuite ne soit pas nécessairement associée à des changements de conformation majeurs. D'autre part, il est raisonnable de soutenir que la nature distincte des interactions que les molécules d'eau et les cations entretiennent avec les résidus bordant leur voie de perméation puisse être la source des  $E_a$  différentes pour le courant de fuite et la  $L_p$ .

Une étude structurale récente s'est intéressé à la voie de perméation qu'emprunterait l'eau dans un modèle par homologie de hSGLT1 construit à partir de vSGLT (Sasseville et al., 2011). Pour ce faire, on a utilisé une technique basée sur un algorithme Monte Carlo grand-canonique (Woo et al., 2004), selon laquelle un sous-volume du système est traité explicitement, dans ce cas-ci situé autour du site de liaison du glucose, afin d'y insérer des molécules d'eau, tandis que le reste du système est traité comme un réservoir caractérisé par un potentiel chimique constant. L'insertion d'une molécule d'eau dans le sous-volume provoque un changement d'énergie libre qui est soumis à un algorithme de Metropolis afin de décider si la nouvelle configuration est acceptée ou rejetée.

Ces simulations ont révélé la présence d'une voie de perméation stable, contenant une centaine de molécules d'eau, qui traverse le vestibule intracellulaire ainsi que le site de liaison du sucre, mais qui ne suit pas la voie de perméation putative du substrat dans la région située entre le site de liaison du sucre et la face extracellulaire du transporteur. Il

serait donc concevable qu'une voie de perméation puisse exister pour l'eau, et éventuellement aussi pour les cations, même lorsque les sites du cotransporteur sont orientés vers l'intérieur de la cellule. Ceci est cohérent avec l'idée que nous avançons selon laquelle une voie de perméation passive existe à travers SGLT1 indépendamment des changements de conformation impliqués dans le mécanisme d'accès alterné des sites de liaison générant le cotransport.

Le modèle par homologie de hSGLT1 proposé dans (Sasseville et al., 2011) nous permet également d'établir que le résidu C292 se trouve dans la portion brisée du STM 6 (Figure 6.1), à proximité du site de liaison du substrat. Bien que la voie de perméation pour l'eau suggérée dans l'étude structurale (Sasseville et al., 2011) ne soit pas bordée par C292, la stimulation de la perméabilité à l'eau provoquée par la mutation C292A que nous avons mesurée pourrait être due à un effet indirect. Étant donné la position sensible du résidu C292, il est probable que sa mutation en alanine, quoique conservative, ait une influence non négligeable sur la conformation de hSGLT1.

Relativement à nos résultats sur la nature ionique du courant de fuite, il est intéressant de noter que plusieurs transporteurs produisent des courants de fuite attribuables à des ions qui ne sont pas tous impliqués dans le cotransport. C'est notamment le cas chez GAT1, où des courants de fuites inhibés de façon non compétitive par le  $\text{Na}^+$  (Kanner, 2003), qui est normalement couplé au GABA lors du cotransport, peuvent être enregistrés en présence de  $\text{Li}^+$  (Mager et al., 1996; MacAulay et al., 2002; Kanner, 2003; Meinild et al., 2009), de  $\text{Cs}^+$  (Mager et al., 1996) ou de  $\text{K}^+$  (Kanner, 2003). De plus, on sait que le  $\text{Li}^+$  peut se lier à GAT1 et provoquer un changement de conformation, distinct de celui causé par la liaison du  $\text{Na}^+$ , qui ouvre une conductance au  $\text{Li}^+$  de type canal (MacAulay et al., 2002). Chez GAT4, on a observé des courants de fuite mutuellement exclusifs en présence de  $\text{Li}^+$  et de  $\text{Cl}^-$  qui sont aussi inhibés par le  $\text{Na}^+$  et qui traverseraient le transporteur en utilisant un mode de perméation de type canal (Karakossian et al., 2005). Une inhibition par le  $\text{Na}^+$  extracellulaire a également été constatée chez SMCT1, bien que dans ce cas elle

dépende du voltage et permette l'existence d'un courant de fuite anionique aux potentiels positifs (Coady et al., 2010).

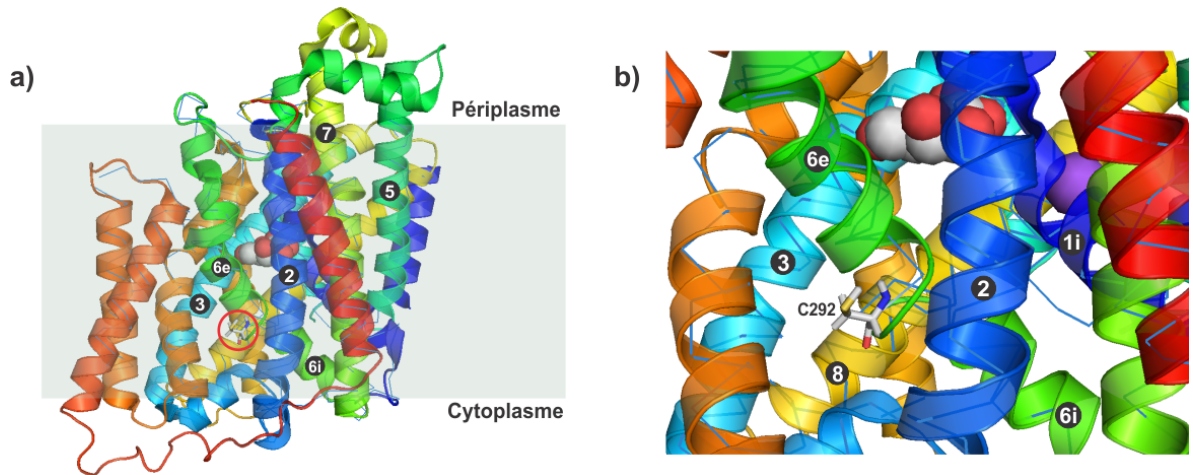


Figure 6.1 La structure de vSGLT (hélices) et le modèle par homologie de hSGLT1 (ruban bleu) sont superposés afin d'illustrer la position du résidu C292.

L'ion  $\text{Na}^+$  (violet) et le galactose (blanc et rouge) sont représentés par des sphères. (a) Vue d'ensemble avec le résidu C292 entouré en rouge. (b) Gros plan sur l'environnement du résidu C292.

### 6.1.3 Précisions concernant l'effet du glucose sur le mutant C292A

La caractérisation initiale que nous avons faite du mutant C292A a révélé qu'une acidification du milieu extracellulaire à pH 6,5 et pH 5,5 faisait croître l'amplitude du courant de fuite et du courant dû à l'addition de glucose, ce dernier étant presque inexistant à pH 7,5. Un projet récent nous a mené à vouloir s'assurer que le courant associé à la présence de glucose extracellulaire à pH acide était bien la conséquence d'une activité de cotransport. Pour ce faire, nous avons effectué des expériences simultanées d'électrophysiologie à deux microélectrodes et de transport de glucose radioactif. En soustrayant le courant de base mesuré en présence d'une solution saline au courant produit par l'ajout de 0,5 mM  $\alpha\text{MG}$  ( $^{14}\text{C}$  à 1  $\mu\text{l/ml}$ ), puis en intégrant le résultat, il est possible

d'estimer la quantité de charges entrée dans l'ovocyte grâce au  $\alpha$ MG. Une comparaison avec la quantité de  $\alpha$ MG radioactif qui s'est accumulée dans l'ovocyte pendant l'expérience permet de déduire s'il existe une corrélation entre le transport de charge et de  $\alpha$ MG. Il fut étonnant de constater que, contrairement à SGLT1 sauvage où la perméation d'une molécule de  $\alpha$ MG était reliée au transport de  $1,70 \pm 0,08$  charges (à pH 7,5), la quantité de  $\alpha$ MG radioactif présente dans un ovocyte donné exprimant le mutant C292A était proche de celle mesurée chez des ovocytes témoins, peu importe le pH, et n'était aucunement corrélée à la stimulation du courant observée lors d'une acidification (Figure 6.2). Ces résultats nous indiquaient que les protons ne restauraient pas la capacité à cotransporter le  $\alpha$ MG du mutant C292A, mais plutôt que le  $\alpha$ MG engendrait une stimulation du courant de fuite, dont nous avons déjà observé la forte amplitude.

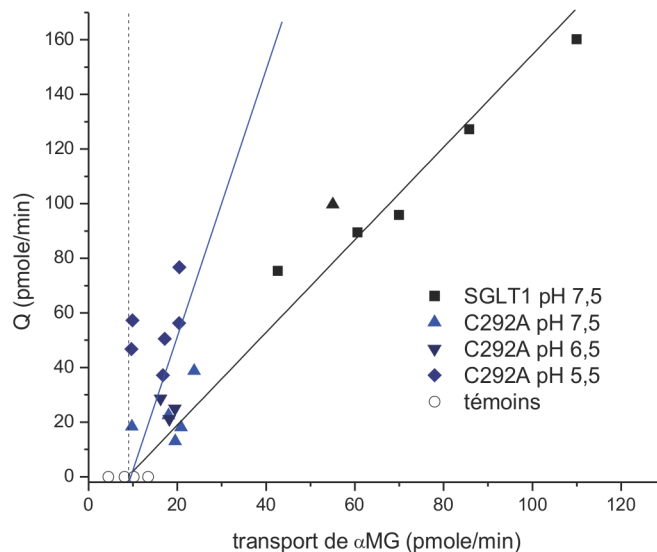


Figure 6.2 Électrophysiologie et transport radioactif sur SGLT1 sauvage et C292A.

Comparaison des quantités de charge et de  $\alpha$ MG radioactif accumulées dans des ovocytes exprimant SGLT1 (pH 7,5 (carrés)) ou le mutant C292A (pH 7,5 (triangles), pH 6,5 (triangles inversés) et pH 5,5 (losanges)). La ligne pointillée correspond au niveau de transport radioactif moyen des ovocytes témoins. Les lignes pleines noires et bleues sont

des lissages linéaires des données de SGLT1 sauvage et de C292A (tous les pH) dont les pentes correspondent à  $1,70 \pm 0,08$  et à  $5,00 \pm 0,46$  charges/ $\alpha$ MG, respectivement.

## 6.2 Le TOR de SGLT1

C'est le désir d'estimer le TOR de SGLT1 à l'aide d'un outil indépendant des approches communément utilisées dans la littérature qui fut à l'origine de notre intérêt pour l'ITT dans le cadre de ce projet. En effet, une estimation adéquate de la fréquence à laquelle une molécule de SGLT1 complète un cycle de cotransport est importante dans la mesure où aucun événement directement relié à l'activité de cotransport ne peut avoir lieu plus lentement que la limite inférieure fixée par le TOR. En se basant sur une étude récente de notre laboratoire dans laquelle l'ITT avait été mis de l'avant (Blanchard et al., 2008), nous avons développé un protocole expérimental qui nous permettrait d'évaluer le TOR de SGLT1.

### 6.2.1 Caractérisation des signaux obtenus avec l'ITT

Au moment de débiter les manipulations, nous avons la possibilité d'étudier l'activité de cotransport de SGLT1 en la stimulant avec un gradient de  $\text{Na}^+$  ou de  $\text{H}^+$  (Hirayama et al., 1994, 1997). Les mesures d'ITT qui sont présentées dans le deuxième article de cette thèse ont toutes été effectuées à l'aide d'électrodes sélectives (eS) aux  $\text{H}^+$ , car leur utilisation offrait la possibilité d'améliorer le rapport signal/bruit simplement en abaissant le pouvoir tampon de nos solutions (1,5 mM MES dans un milieu sans  $\text{Na}^+$  à pH 5,5), tandis que dans le cas d'eS au  $\text{Na}^+$  la seule option consistait à diminuer  $[\text{Na}^+]_o$  jusqu'à environ 10 mM, ce qui se répercutait négativement sur l'amplitude du courant de cotransport.

Le signal typique fourni par les eS au  $\text{H}^+$  ( $V_H$ ) lors de nos expériences comportait deux caractéristiques intéressantes (Figure 4.3). Lors du saut de potentiel membranaire de +50 mV à -150 mV contenu dans notre protocole, nous mesurons un changement initial

instantané de  $V_H$  qui fut nommé le « *step* ». Ce dernier était suivi d'un taux d'augmentation stationnaire du pH de la trappe, quantifiée par la pente de  $V_H$ , qui était causée par le maintien du potentiel membranaire à -150 mV. Il nous fallut alors s'assurer que le « *step* » et la pente étaient bien des conséquences de la présence de SGLT1 dans le morceau de membrane plasmique pressé sous l'eS. Nous craignions que le « *step* », ordinairement de 0,4 à 1 mV, puisse être la conséquence d'un changement du potentiel de la trappe attribuable au courant qui traversait l'espace situé entre le bout de l'eS et la membrane plasmique lorsque SGLT1 générait un courant à travers cette dernière. Ce doute fut éliminé par le constat que l'amplitude du « *step* » demeurait constante, à 4 % près, lorsque l'amplitude du courant de cotransport  $H^+/\alpha MG$  variait d'un facteur deux. De plus, la présence de Pz supprimait plus de la moitié du « *step* », qui devenait alors similaire au « *step* » mesuré avec un ovocyte témoin, nous indiquant qu'un saut de voltage hyperpolarisant d'amplitude considérable pouvait engendrer la liaison non spécifique de  $H^+$  à des lipides ou à d'autres protéines présentes dans la membrane plasmique. Ces résultats appuyaient fortement l'idée que le « *step* » représentait un réel changement de pH soudain attribuable à des  $H^+$  qui quittaient la trappe pour venir se lier à SGLT1 suite à une hyperpolarisation exposant les sites de liaison du transporteur à la face externe de la membrane. Cette interprétation du « *step* » nous rappelait celle qui est souvent faite afin d'expliquer les courants transitoires de SGLT1, à la différence que ces derniers disparaissent en présence de  $\alpha MG$  (Gagnon et al., 2007), étant masqués par un courant de cotransport de forte amplitude. Le « *step* », qui demeurait le même en présence ou en absence de  $\alpha MG$ , nous permettait ainsi de détecter la liaison des  $H^+$  à SGLT1 provoquée par un changement de conformation sensible au voltage que nous ne pouvions pas mesurer en électrophysiologie à deux microélectrodes.

La pente décrivant le changement stationnaire du pH de la trappe, quant à elle, fut associée à l'activité de SGLT1 grâce à son inhibition complète par la Pz, ainsi qu'au fait qu'elle était corrélée linéairement à l'amplitude du courant de cotransport  $H^+/\alpha MG$ , en plus d'être nulle chez des ovocytes témoins. Il est intéressant de noter que la présence de cette

pente confirmait que SGLT1 était apte à effectuer un cotransport  $H^+/\alpha MG$  en absence de  $Na^+$ . De plus, le fait qu'une pente soit aussi mesurable en absence de  $\alpha MG$  soutenait une des conclusions établies dans le premier projet de cette thèse, soit que le courant de fuite de SGLT1 est majoritairement dû à un flux de protons lorsque  $pH_o \leq 6,5$ .

## 6.2.2 Estimation du TOR et du nombre de transporteurs à la membrane plasmique

Ayant en main des enregistrements de  $V_H$  à 0, 5 et 35 mM  $\alpha MG$  dans lesquels le « *step* » et la pente étaient étroitement reliées à la fonction de SGLT1, il devenait possible de calculer le TOR du cotransporteur. En effet, selon les équations 4.3 et 4.4, le TOR pouvait être estimé en prenant le rapport de la pente due à l'addition de  $\alpha MG$  sur le « *step* » sensible à la Pz, puis en multipliant le résultat par le facteur  $f = 0,65$  afin de tenir compte du fait que, en comparant la courbe  $Q(V_m)$  obtenue en absence de  $\alpha MG$  avec le  $Q_{max}$  tiré d'un lissage à une fonction de Boltzmann, seulement 65 % des transporteurs se réorientaient dans la membrane suite au saut de +50 mV à -150 mV. Le TOR découlant de cette analyse serait donc indépendant de la surface couverte par la trappe. En considérant l'équation 1.4, nous pouvions aller plus loin et utiliser les TOR obtenus à 5 et 35 mM  $\alpha MG$  (Tableau 4.I) pour estimer  $N$  à ces deux  $[\alpha MG]_o$ . Il était aussi raisonnable de croire que le  $N$  qui caractérisait un ovocyte à pH 5,5 en absence de  $Na^+$  demeurerait le même peu importe les conditions expérimentales. En ajoutant à ce raisonnement le fait que l'équation 1.4 nous dictait que le TOR était simplement proportionnel au  $I_{Cotr}$  mesuré dans une condition donnée, nous pouvions ainsi calculer le TOR de SGLT1 en présence de  $Na^+$  et de 5 mM  $\alpha MG$  à pH 7,5. La validité de cet estimé du TOR reposait cependant sur l'hypothèse que la stœchiométrie de 2:1 établie pour le cotransport  $Na^+/\text{glucose}$  était identique à celle du cotransport  $H^+/\text{glucose}$ , ce qui était soutenu uniquement par des expériences d'activation du cotransport par les  $H^+$  caractérisées par un coefficient de Hill de 1,5 à -50 mV (Hirayama et al., 1994). Par contre, l'erreur qui pouvait provenir d'une différence de stœchiométrie entre



les deux modes de cotransport ne justifiait pas l'utilisation d'une eS au  $\text{Na}^+$ , sachant qu'une eS au  $\text{H}^+$  engendrait un rapport signal/bruit beaucoup plus intéressant.

Tel que nous l'avons énoncé dans la section 1.2.3, les estimés du TOR de l'activité de cotransport  $\text{Na}^+$ /glucose présentés dans la littérature reposent presque tous sur le rapport  $I_{Cotr}/Q_{\max}$ . De plus, on suppose que le nombre de charges cotransportées par cycle (la stœchiométrie) est le même que la quantité de charges mobiles qui constituent la valence apparente de SGLT1 en absence de substrat. Par surcroît, un lissage de la courbe  $Q(V_m)$  à une fonction de Boltzmann mène à une valence de  $z \sim 1$  à 90 mM  $\text{Na}^+$  (Loo et al., 1993), tandis qu'une comparaison entre les  $Q_{\max}$  de trois ovocytes (4, 11,5 et 16 nC) et leurs  $N$  respectifs ( $0,07$ ,  $0,2$  et  $0,32 \times 10^{11}$ ) obtenus à l'aide d'expériences de microscopie électronique sur des membranes cryo-décapées suggère que  $z \sim 3,5$  (Zampighi et al., 1995). Notons que le TOR doit aussi être calculé avec prudence dans le cas de  $\text{NaPi-IIa}$ , où on trouve une valence d'environ  $0,5-0,7$  en présence de 100 mM  $\text{Na}^+$  à l'aide de la courbe  $Q(V_m)$ , ce qui contraste avec les mesures indiquant qu'une charge nette traverse la membrane lors du cotransport (Forster et al., 1998). En choisissant une valence de  $z \sim 1$  pour SGLT1, l'estimé le plus récent de son TOR,  $28 \text{ s}^{-1}$  (Loo et al., 2005), est ralenti à  $14 \text{ s}^{-1}$  et devient comparable au  $13,3 \pm 2,4 \text{ s}^{-1}$  que nous avons mesuré avec l'ITT. Cette valeur est similaire à celles qui ont été publiées pour d'autres transporteurs, comme par exemple les  $\text{NaPi-II}$  ( $12-35 \text{ s}^{-1}$  (Forster et al., 1997; Forster et al., 1998)), GAT1 ( $6-13 \text{ s}^{-1}$  (Mager et al., 1993)) et NIS ( $36 \text{ s}^{-1}$  (Eskandari et al., 1997)).

L'utilisation de l'ITT nous a aussi permis d'établir qu'environ  $3,6 \pm 0,7 \times 10^{11}$  molécules de SGLT1 étaient exprimées à la membrane plasmique d'un ovocyte caractérisé par un  $Q_{\max}$  de  $25,8 \pm 1,6 \text{ nC}$ . Lorsque l'on compare cet estimé de  $N$  à celui mesuré dans les expériences de cryo-décapage, en tenant compte des valeurs de  $Q_{\max}$  de chacun, on trouve que notre estimé est environ quatre fois plus grand. Ceci suggère que les expériences de cryo-décapage sous-estiment  $N$  et pourrait expliquer pourquoi la valence déduite de ces expériences est 3,5 fois plus grande que celle associée à un lissage de la courbe  $Q(V_m)$  à une fonction de Boltzmann en présence de 90 mM  $\text{Na}^+$ .

### 6.2.3 Implications fonctionnelles du TOR

La principale conséquence du TOR est que toutes les constantes de vitesse d'ordre un présentes dans un modèle cinétique visant à reproduire l'activité de cotransport  $\text{Na}^+$ /glucose entrant de SGLT1 ( $k_f$ ) doivent obéir à  $k_f \geq 13 \text{ s}^{-1}$ , contrairement à ce qui est recensé dans la littérature (Loo et al., 2006). Le constat que des mouvements de charge relaxant en plus de 100 ms puissent être mesurés lorsque SGLT1 est soumis à des sauts de voltage de 500 ms (Loo et al., 2005) n'est pas en désaccord avec cette conclusion, mais indique simplement que cette cinétique lente pourrait être la manifestation de changements de conformations qui ne sont pas directement reliés au mécanisme de cotransport  $\text{Na}^+$ /glucose, ou encore à un courant de fuite mettant un certain temps à se stabiliser.

## 6.3 Modélisation cinétique de SGLT1

Au moment où nous réalisons les travaux présentés dans cette thèse, il n'existait pas de modèle cinétique général capable de reproduire précisément les courants transitoires et stationnaires de SGLT1 en fonction de  $[\text{Na}^+]_o$  et de  $[\alpha\text{MG}]_o$ . Le besoin pour un tel modèle devenait d'autant plus pertinent à cause de l'émergence de données cristallographiques concernant les membres de la famille structurale de LeuT (Abramson and Wright, 2009; Krishnamurthy et al., 2009; Boudker and Verdon, 2010; Forrest et al., 2011). Cet ensemble de structures soutenait l'idée que l'activité de cotransport de SGLT1 était attribuable au mécanisme d'accès alterné. L'élaboration d'un modèle cinétique avait donc le potentiel d'apporter des connaissances sur la dynamique des changements de conformation qui ne pouvaient être déduites des structures 3D. Nous avons alors eu l'idée d'utiliser le SA (Kirkpatrick et al., 1983), une technique d'optimisation robuste qui nous permettrait de déterminer les paramètres et la structure du modèle cinétique le plus simple décrivant adéquatement l'activité de SGLT1 en fonction de  $V_m$ , de  $[\text{Na}^+]$  et de  $[\alpha\text{MG}]_o$ .

### 6.3.1 Construction du modèle

Au tout début de ce projet de modélisation, nous avons voulu tirer profit du SA en tant qu'algorithme d'échantillonnage aléatoire afin de déterminer si un modèle à 4 états comprenant un événement de liaison coopératif de 2 ions  $\text{Na}^+$  ( $C_3 \rightarrow C_4$ ), tel que proposé dans (Gagnon et al., 2007), menait à une reproduction adéquate de la dépendance en  $[\text{Na}^+]_o$  des courants transitoires de SGLT1, ou si 2 événements de liaison séquentiels ( $C_3 \rightarrow C_4$ ,  $C_4 \rightarrow C_5$ ) étaient nécessaires, comme plusieurs études le suggéraient (Hazama et al., 1997; Falk et al., 1998; Krofchick and Silverman, 2003; Loo et al., 2005). Pour atteindre cet objectif, nous avons cherché à minimiser l'erreur provenant de la comparaison directe entre les courants simulés et expérimentaux, plutôt que d'effectuer un lissage des constantes de temps provenant d'une combinaison linéaire de décroissances exponentielles. Notons que ce projet nous donnait aussi l'occasion d'appliquer un résultat intéressant découlant de notre étude du courant de fuite, soit que ce courant traversait vraisemblablement SGLT1 en utilisant un chemin indépendant de celui constitué des changements de conformation associés au cotransport  $\text{Na}^+$ /glucose. Ceci faisait en sorte que nous devions considérer des schémas cinétiques dans lesquels les ions  $\text{Na}^+$  ne pouvaient pas être transportés par SGLT1 en absence de glucose, c'est-à-dire dépourvus des réactions  $C_4 \leftrightarrow C_1$  ou  $C_5 \leftrightarrow C_1$ .

Ainsi, après de multiples tentatives d'optimisation de nos données expérimentales effectuées en lissant les relaxations OFF des courants transitoires à 10, 50 et 90 mM  $[\text{Na}^+]_o$  simultanément, il fut étonnant de constater que notre implémentation du SA n'arrivait pas à trouver un ensemble de paramètres satisfaisant, même en utilisant le modèle à 5 états incluant 2 étapes de liaison individuelles des ions  $\text{Na}^+$ . Les meilleures solutions que nous trouvions pouvaient recréer de façon sommaire les courants transitoires à 90 et 10 mM  $[\text{Na}^+]_o$ , mais il subsistait toujours un problème quant à l'amplitude du pic initial des courants qui suivent les sauts de potentiels, ce qui se traduisait en une dépendance en  $[\text{Na}^+]_o$  incorrecte de la charge mobile ( $Q_{max}$ ). En effet, cette dernière était acceptable à 10 mM, mais trop grande à 50 mM et trop faible à 90 mM  $[\text{Na}^+]_o$ , nous indiquant que le SA trouvait un compromis ne correspondant pas à la réalité de nos données expérimentales. Ces

résultats nous amenèrent à douter de la capacité du SA à identifier un ensemble de paramètres unique dans le contexte d'une optimisation simultanée de plusieurs  $[\text{Na}^+]_o$ . Afin de vérifier la validité de la technique, nous avons eu l'idée de simplifier le problème et de tenter de lisser les relaxations des courants à chaque  $[\text{Na}^+]_o$  individuellement. Heureusement, les ensembles de paramètres engendrés par cette stratégie pouvaient reproduire de façon presque parfaite les courants transitoires OFF si un modèle possédant au moins 4 états était utilisé. En voulant pousser plus loin cette stratégie afin de tenter de décrire les relaxations ON et OFF simultanément, il fut encourageant de constater que le SA était toujours capable de trouver des ensembles de paramètres associées à une description extrêmement satisfaisante de nos résultats. De ce fait, nous avons pu établir qu'un modèle à 4 états caractérisé par des barrières d'énergie symétriques ( $\alpha_i = 0,5$ ) était la structure la plus simple expliquant les courants transitoires de SGLT1 en présence d'une  $[\text{Na}^+]_o$  à la fois. Par contre, en analysant les meilleurs ensembles de paramètres obtenus pour chaque  $[\text{Na}^+]_o$ , seuls les paramètres décrivant le changement de conformation indépendant du voltage  $C_2 \leftrightarrow C_3$  étaient similaires à toutes les  $[\text{Na}^+]_o$ , et il n'était pas trivial d'identifier parmi les autres transitions une constante de vitesse qui était proportionnelle à  $[\text{Na}^+]_o$  ou à  $[\text{Na}^+]_o^2$ . En réfléchissant aux résultats différemment, nous avons émis l'hypothèse que l'aptitude du SA à lisser adéquatement les courants à une  $[\text{Na}^+]_o$ , comparativement à son incapacité dans le cas d'un optimisation simultanée de plusieurs  $[\text{Na}^+]_o$ , n'était peut-être pas uniquement due à la plus grande simplicité du problème à optimiser. En effet, le nombre de transporteurs trouvé par le SA n'était pas le même à chaque  $[\text{Na}^+]_o$ , une dimension qui avait été ignorée dans nos premières tentatives d'optimisation simultanées des courants transitoires (où le même N caractérisait les trois  $[\text{Na}^+]_o$ ) et qui risquait de fournir une explication à la dépendance en  $[\text{Na}^+]_o$  incorrecte de la charge mobile ( $Q_{max}$ ) simulée dans ce cas.

En suivant ce raisonnement, nous avons entrepris d'optimiser de nouveau toutes les  $[\text{Na}^+]_o$  avec un ensemble unique de paramètres, mais cette fois en introduisant un N distinct à chaque  $[\text{Na}^+]_o$ , libre d'être modulé par le SA. Cette proposition était soutenue par une étude suggérant que le taux auquel la Pz se détache de SGLT1 se voit accéléré en présence

de faibles  $[\text{Na}^+]_o$  (Oulianova et al., 2001). Plusieurs structures de modèles comprenant 4, 5 ou 6 états et incorporant de diverses façons des événements de liaison d'ions  $\text{Na}^+$  furent mises à l'épreuve à l'aide de cette tactique. Cette recherche fructueuse nous permis de déduire qu'un modèle constitué d'un minimum de 5 états était la structure la plus simple engendrant une reproduction adéquate des courants transitoires ON et OFF de SGLT1 en fonction de  $V_m$  et de  $[\text{Na}^+]_o$  (Figure 5.4), car les modèles à 4 états peinaient à mimer les relaxations se produisant lors de sauts de potentiels positifs, un effet qui était amplifié aux faibles  $[\text{Na}^+]_o$  (Figure 5.7). Parmi les modèles à 5 états étudiés, celui décrivant le plus fidèlement nos données expérimentales présentait 4 états de réorientation du transporteur libre, suivi d'une étape de liaison coopérative des 2 ions  $\text{Na}^+$  menant à l'état  $C_5$  (Figure 5.3). Les différents  $N$  associés aux  $[\text{Na}^+]_o$  respectaient les valeurs qui avaient été identifiées lors des optimisations individuelles. De plus, celles-ci étaient cohérentes avec la séquence de perfusion des solutions utilisée lors de nos expériences considérant la dépendance en  $[\text{Na}^+]_o$  du taux de dissociation de la Pz. En effet, toutes les expériences contribuant à la moyenne des courants utilisée pour l'optimisation ont été effectuées dans le même ordre, soit 90, 50 et 10 mM  $[\text{Na}^+]_o$ , incluant la perfusion de Pz suite à chacune des trois conditions.

Ayant entre les mains un modèle décrivant les courants transitoires de SGLT1 en absence de substrat, nous étions prêts à généraliser ce schéma afin de simuler les cinétiques transitoires et stationnaires provoquées par l'addition de glucose (0,1 et 5 mM  $\alpha\text{MG}$ ). Pour atteindre cet objectif, la stratégie la plus simple consistait à ajouter un état représentant SGLT1 lié au glucose ( $C_6$ ), puis à regrouper les changements de conformation et les événements de liaison intracellulaires subséquents en une seule transition ( $C_6 \leftrightarrow C_1$ ). Par la suite, le SA déterminerait les paramètres relatifs aux étapes  $C_5 \leftrightarrow C_6$  et  $C_6 \leftrightarrow C_1$ , ainsi que  $N_{0,1\alpha\text{MG}}$  et  $N_{5\alpha\text{MG}}$ , en gardant constants les paramètres des transitions  $C_1$  à  $C_5$ . Cependant, le meilleur ensemble de paramètres associé à la présence de cet état supplémentaire ne menait pas à une restitution correcte des courants de cotransport aux deux  $[\alpha\text{MG}]_o$  étudiées. L'ajout d'un état supplémentaire ( $C_7$ ) s'avéra être une mesure suffisante, puisque le modèle

qui en résulte (Figure 5.3) avait la capacité de fournir des prédictions très satisfaisantes (Figure 5.5).

Notons que nous avons choisi de simplifier les transitions électrogéniques du modèle en les décrivant à l'aide de barrières d'énergie symétriques ( $\alpha_i = 0,5$ ), car le fait de laisser le SA trouver les  $\alpha_i$  optimaux ( $0 \leq \alpha_i \leq 1$ ) engendrait des résultats qui n'étaient pas associés à une amélioration significative de la qualité du lissage par rapport au cas où  $\alpha_i = 0,5$ . De plus, l'utilisation de barrières asymétriques faisait en sorte que plusieurs ensembles de paramètres arrivaient à décrire de façon satisfaisante les courants de SGLT1, alors que l'emploi de barrières symétriques générerait un seul ensemble de paramètres se démarquant des autres de par sa faible erreur de lissage. Ceci soulignait le caractère superflu des degrés de liberté liés à l'introduction de barrières asymétriques.

### 6.3.2 Nature des transitions du modèle

En observant les paramètres de notre modèle à 7 états (Tableau 5.I), il est intéressant de noter que la solution identifiée par le SA diffère du dogme simplificateur suggéré par le laboratoire de Wright (Parent et al., 1992b), selon lequel le transporteur libre possède une charge intrinsèque de  $-2e$  qui est complètement neutralisée suite à la liaison des ions  $\text{Na}^+$ , faisant en sorte que toutes les étapes subséquentes du mécanisme de cotransport deviennent électroneutres. En effet, notre ensemble de paramètres prédit plutôt que la réorientation du transporteur libre ( $C_1$  à  $C_4$ ) implique le mouvement de 1,1 charges équivalentes à travers la membrane ( $z_1 + z_2 + z_3$ ), tandis que la liaison des 2 ions  $\text{Na}^+$  ( $C_4 \rightarrow C_5$ ) fait intervenir le mouvement de 0,2 charge ( $z_4$ ). Selon cette vision, un premier changement de conformation sensible voltage ( $C_1 \rightarrow C_2$ ) s'effectue lorsque le transporteur vide fait face à l'intérieur de la cellule, ce qui engendre la réorientation lente et indépendante du voltage des sites de liaison et du vestibule de SGLT1 ( $C_2 \rightarrow C_3$ ), puis le mouvement est complété par une dernière transition dépendante du voltage ( $C_3 \rightarrow C_4$ ) qui prépare le transporteur à recevoir les ions  $\text{Na}^+$ . Parmi les autres transitions du cycle de cotransport, seul le changement de conformation  $C_6 \leftrightarrow C_7$ , caractérisé par une valence de

0,66 ( $z_6$ ), est sensible au voltage membranaire. La signification de cette étape n'est pas claire, mais nous croyons qu'elle pourrait représenter des mouvements d'occlusion associés au déplacement d'une porte mince similaires à ceux se produisant lors de la transition  $C_3 \leftrightarrow C_4$ , qui font intervenir 0,7 ( $z_3$ ) charges.

### 6.3.3 Film du mécanisme de cotransport

Afin d'aller encore plus loin dans l'interprétation de nos résultats, il nous paraissait intéressant de se servir des constantes de vitesse du modèle pour simuler le parcours conformationnel de SGLT1. En s'imaginant une molécule de cotransporteur dans un état " $j$ " de notre modèle, il devenait possible de calculer la probabilité qu'une isomérisation vers les états adjacents " $j - 1$ " et " $j + 1$ " se produise pendant un intervalle de temps " $dt$ " en considérant les expressions  $k_{j(j-1)}dt$  et  $k_{j(j+1)}dt$ , respectivement. Ainsi, en utilisant une résolution de 0,1  $\mu$ s, nous avons simulé le comportement de SGLT1 pendant 10 s (les premières 500 ms sont présentées à la Figure 5.6). Lorsqu'une faible  $[\alpha\text{MG}]_o$  de 0,1 mM était présente à un  $V_m$  de -50 mV, le transporteur réalisait d'importantes fluctuations entre les états  $C_4$  et  $C_5$ , signifiant qu'à cause de la faible probabilité de lier une molécule de glucose, un grand nombre d'événements de liaison et de dissociation des ions  $\text{Na}^+$  avait lieu. La forme liée au  $\text{Na}^+$  était toutefois favorisée, puisque SGLT1 l'adoptait 35% du temps, comparativement à moins de 5% d'occupation pour la conformation  $C_4$ . Quelques fluctuations relatives à la transition  $C_1 \leftrightarrow C_2$  furent aussi observées, mais ces dernières étaient beaucoup moins fréquentes que dans le cas de la liaison du  $\text{Na}^+$ , révélant clairement que le transporteur passait plus de 40% de son temps dans l'état  $C_2$ .

En augmentant  $[\alpha\text{MG}]_o$  jusqu'à 5 mM, nous avons simulé le parcours de SGLT1 à des  $V_m$  de -50 et de -150 mV. À ces deux  $V_m$ , le cotransporteur ne fluctue plus entre les conformations  $C_4$  et  $C_5$ , car il est maintenant capable de lier le glucose facilement. À -50 mV, SGLT1 oscille plutôt entre ses deux états liés au  $\text{Na}^+$  et au glucose ( $C_6 \leftrightarrow C_7$ ) qui sont tous deux occupés presque 20% du temps. Des oscillations similaires à celles observées en présence de 0,1 mM  $[\alpha\text{MG}]_o$  ont toujours lieu alors que le cotransporteur attend 50% du

temps dans l'état  $C_2$  que le changement de conformation indépendant du voltage ( $k_{23}$ ) se produise. À -150 mV, la dépendance en voltage des réactions  $C_1 \rightarrow C_2$ ,  $C_3 \rightarrow C_4$  et  $C_6 \rightarrow C_7$  fait en sorte que SGLT1 n'adopte pratiquement jamais les conformations  $C_1$ ,  $C_3$  et  $C_6$ . Dans ces conditions où le transporteur est pleinement fonctionnel, on le retrouve principalement dans les états  $C_2$  et  $C_7$  où il passe 60% et 30% de son temps, respectivement, à cause des transitions indépendantes du voltage  $k_{23}$  et  $k_{71}$  qui limitent la vitesse du cycle de cotransport. En vertu de ces conclusions, on constate que le mécanisme de cotransport de SGLT1 semble teinté d'une symétrie fonctionnelle, puisque les changements de conformation  $C_1 \rightarrow C_2$  et  $C_6 \rightarrow C_7$  sont caractérisés par des dépendances en voltage presque identiques ( $z_3 = -0,70$ ,  $z_6 = -0,66$ ), et qu'ils précèdent tous deux des étapes lentes et insensibles au voltage, soient  $C_2 \rightarrow C_3$  et  $C_7 \rightarrow C_1$ , respectivement.

### 6.3.4 Fréquence des cycles de cotransport

Les constantes de vitesse et les probabilités d'occupation des états de notre modèle cinétique nous permettent d'estimer la fréquence à laquelle les cycles de cotransport complets ont lieu en présence d'une concentration saturante de  $[\alpha\text{MG}]_0$  et d'un  $V_m$  de -150 mV. Sachant que dans ces conditions 60% des transporteurs se trouvent dans la conformation  $C_2$ , qu'une proportion minime adopte l'état  $C_3$ , et que la réaction  $C_2 \rightarrow C_3$  est caractérisée par une constante de vitesse d'environ  $60 \text{ s}^{-1}$ , on peut calculer que le TOR devrait être  $36 \text{ s}^{-1}$ . Cet estimé est plus rapide que la fréquence de  $13 \text{ s}^{-1}$  que nous avons obtenue avec l'ITT. Nous croyons cependant que l'estimé découlant de notre modèle cinétique est plus fiable, car la détermination du TOR via l'ITT fait intervenir la mesure du « *step* », un changement de  $V_H$  rapide de l'ordre de  $500 \mu\text{V}$ . En effet, il se peut que la faible amplitude de ce signal engendre une erreur faisant diverger la mesure du « *step* » de sa valeur véritable, ou encore que la portion sensible à la Pz ait été surestimée à cause d'événements de liaison supplémentaires de protons sur des portions de SGLT1 différentes des sites de liaisons associés au mécanisme de cotransport  $\text{H}^+$ /glucose.



Un autre élément important sur lequel repose l'estimation du TOR à l'aide de l'ITT est le facteur  $f$ . Ce dernier représente la fraction des transporteurs qui lient soudainement les  $H^+$  lorsque  $V_m$  passe de +50 mV à -150 mV, et a été évalué à 65% en se basant sur la courbe  $Q(V_m)$  à 0 mM  $[Na^+]_o$ , 0 mM  $[\alpha MG]_o$  et pH 5,5 (Figure 4.2). En analysant les probabilités d'occupation des états de notre modèle cinétique à 90 mM  $[Na^+]_o$  en absence de substrat, nous constatons que 90% des transporteurs se redistribuent vers l'état  $C_5$  lors d'une hyperpolarisation de +50 mV à -150 mV, une fraction presque identique au 92% pouvant être déduit de la courbe  $Q(V_m)$  dans les mêmes conditions. Ce parallèle nous permet donc de présumer que la fraction de 65% évaluée à partir de la courbe  $Q(V_m)$  en  $H^+$  correspond bien au pourcentage de transporteurs qui se redistribuent vers l'état lié aux  $H^+$  quand  $V_m$  passe de +50 mV à -150 mV.

### 6.3.5 Perméabilité à l'eau des états

En corrélant les prédictions de notre modèle cinétique avec les résultats des expériences de volumétrie présentés dans (Sasseville et al., 2011), il devient possible d'évaluer la perméabilité à l'eau relative des états occupés par SGLT1 en absence de  $\alpha MG$ . D'une part, la volumétrie nous informe que, à -50 mV, la perméabilité à l'eau de SGLT1 est plus grande en absence de  $[Na^+]_o$  ( $2,2 \pm 0,4 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ ) qu'en présence de 67,5 mM  $[Na^+]_o$  ( $1,8 \pm 0,3 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ ). En analysant les probabilités d'occupation des états de notre modèle à -50 mV, on constate que passer de 90 mM  $[Na^+]_o$  à 10 mM  $[Na^+]_o$  engendre une redistribution des transporteurs de l'état  $C_5$ (40%→1%) vers les états  $C_2$ (40%→63%) et  $C_3$ (12%→22%), tandis que la population des états  $C_1$  et  $C_4$  n'est que très faiblement modulée. L'ensemble de ces résultats suggère que les états  $C_2$  et  $C_3$  seraient plus perméables à l'eau que l'état  $C_5$ .

D'autre part, faire varier le potentiel membranaire de -100 mV à -20 mV en présence de 67,5 mM  $[Na^+]_o$  a pour effet d'augmenter la perméabilité à l'eau de SGLT1 qui passe de  $2,1 \pm 0,2 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$  à  $3,2 \pm 0,3 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ . Dans le contexte de notre modèle cinétique, une variation du potentiel membranaire de -100 mV à -20 mV en présence de 90 mM

$[\text{Na}^+]_o$  fait bouger les transporteurs de  $C_5(74\% \rightarrow 18\%)$  vers  $C_2(12\% \rightarrow 54\%)$  et  $C_3(5\% \rightarrow 19\%)$ , laissant la proportion des transporteurs qui occupent les états  $C_1$  et  $C_4$  presque inchangée. Ces résultats viennent soutenir l'interprétation faite plus haut selon laquelle il apparaît cohérent d'avancer que les états  $C_2$  et  $C_3$  soient plus perméables à l'eau que l'état  $C_5$ , même si l'état  $C_5$  semble tout de même être la source d'une proportion importante de la perméabilité à l'eau mesurée à  $-100$  mV, alors qu'il regroupe 74% des transporteurs.

### 6.3.6 Effet du glucose sur les courants transitoires

L'origine des courants transitoires de SGLT1 et leur dépendance en  $V_m$  et  $[\alpha\text{MG}]_o$  sont des aspects de la fonction du cotransporteur qui peuvent être étudiés à l'aide des probabilités d'occupation des différents états de notre modèle cinétique. À cet effet, on remarque qu'en absence de glucose (Figure 6.3 A), plus de 50% des transporteurs occupent l'état  $C_2$  lorsque le  $V_m$  est maintenu à  $+70$  mV, tandis qu'environ 25% et 20% sont en  $C_1$  et  $C_3$ , respectivement. En hyperpolarisant la membrane jusqu'à  $-150$  mV, on observe une rééquilibration majeure de l'occupation des états alors que 90% des transporteurs se retrouvent dans la conformation liée aux ions  $\text{Na}^+$ . Ce faisant, des courants transitoires importants sont générés par les transitions associées à des mouvements de charges. La Figure 6.4 A présente les courants partiels provenant des changements de conformation électrogéniques compris entre  $C_1$  et  $C_5$  suite à un saut de  $V_m$  de  $+70$  à  $-150$  mV. La transition  $C_1 \leftrightarrow C_2$  ( $z_1 = -0,41$ ), qui s'estompe en quelques ms seulement, contribue toutefois à sculpter le pic initial du courant total grâce à sa forte amplitude. L'apport majeur au courant transitoire provient de la réaction  $C_3 \leftrightarrow C_4$  ( $z_3 = -0,70$ ), dont la décroissance épouse plutôt fidèlement la relaxation totale. La transition  $C_4 \leftrightarrow C_5$  ( $z_4 = -0,19$ ), quant à elle, ne participe que légèrement au courant total à cause de sa très faible amplitude.

La présence d'une  $[\alpha\text{MG}]_o$  saturante de 5 mM inhibe grandement la charge transférée lors d'un saut de  $V_m$ . À  $+70$  mV, la distribution de probabilités des états de SGLT1 demeure la même qu'en absence de substrat. Cependant, lorsque la membrane est

hyperpolarisée à -150 mV, la proportion des transporteurs occupant la conformation  $C_2$  augmente de 10% pour atteindre 60%, tandis que l'état  $C_7$  se retrouve peuplé à près de 30%, une situation bien différente de celle rencontrée en absence de glucose. En observant les relaxations partielles présentes à la Figure 6.4 C, on constate que les courants relatifs aux transitions  $C_1$  à  $C_5$  sont similaires à ceux simulés en absence de glucose, mais qu'ils se stabilisent tous à une valeur stationnaire différente de zéro. Ce comportement cache toute relaxation subséquente à l'établissement de cette nouvelle ligne de base, faisant en sorte que la valeur de l'intégrale d'un courant donné se voit diminuée. Selon ce raisonnement, il devient clair que la contribution à la charge transférée de la transition  $C_6 \leftrightarrow C_7$ , introduite grâce à l'addition de 5 mM  $[\alpha\text{MG}]_o$ , est presque négligeable.

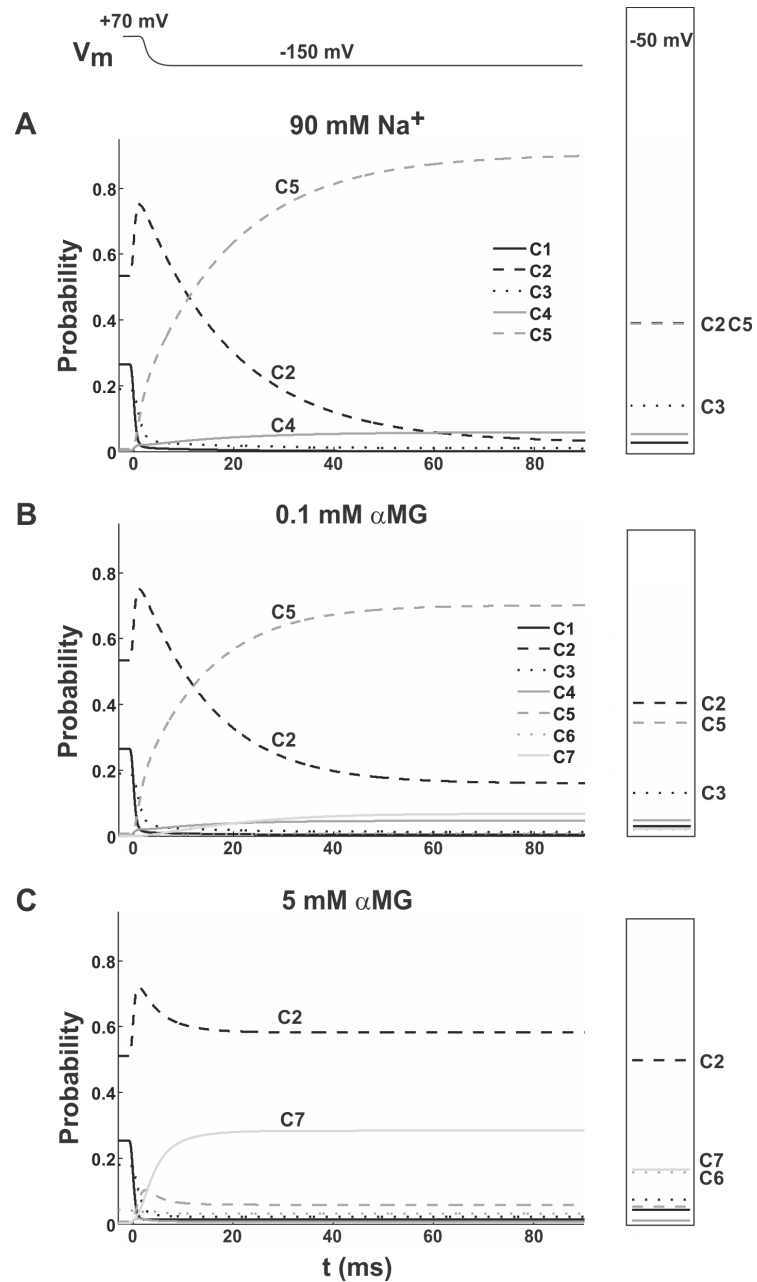


Figure 6.3 Probabilités d'occupation des états du modèle en fonction du temps en réponse à une hyperpolarisation de +70 mV à -150 mV.

(A) Décours temporel des probabilités en présence de 90 mM  $[\text{Na}^+]_o$  et sans substrat. (B) Probabilités lorsque 0,1 mM  $[\alpha\text{MG}]_o$  est ajouté à la solution extracellulaire. (C) Probabilités en présence de 5 mM  $[\alpha\text{MG}]_o$ .

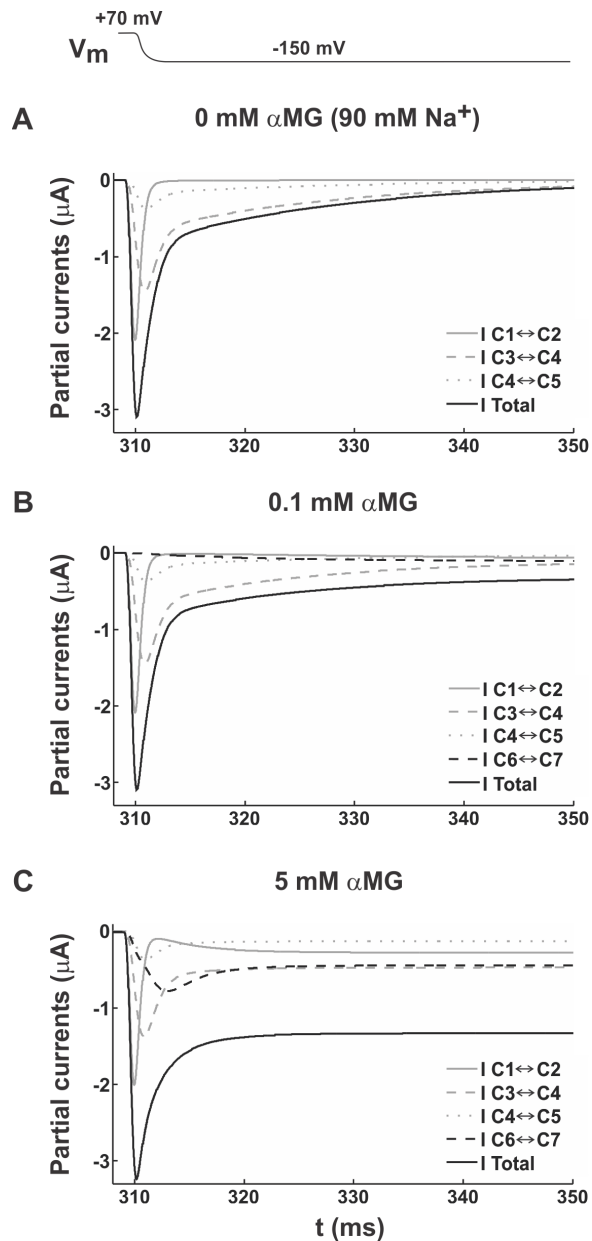


Figure 6.4 Courants partiels provenant des transitions électrogéniques individuelles du modèle.

Les courants illustrés ont été simulés en présence de 90 mM  $[\text{Na}^+]_o$  et (A) 0 mM  $[\alpha\text{MG}]_o$ , (B) 0,1 mM  $[\alpha\text{MG}]_o$  et (C) 5 mM  $[\alpha\text{MG}]_o$ . Les courants en (B) et (C) ont été normalisés au nombre de transporteurs trouvés à 90 mM  $[\text{Na}^+]_o$  ( $N_{90\text{Na}}$  Tableau 5.I) afin de comparer adéquatement l'effet de l'addition de  $\alpha$ MG.

# Conclusions et perspectives

## Conclusions

Les travaux effectués au cours de ce doctorat ont permis d'améliorer la description de plusieurs aspects relatifs à la fonction de SGLT1. En utilisant l'électrophysiologie à deux microélectrodes, la technique de la trappe ionique et le recuit simulé, nous avons pu étudier la nature ionique du courant de fuite, obtenir un estimé de la vitesse des cycles de cotransport, ainsi qu'identifier la structure et déterminer les paramètres d'un modèle cinétique décrivant l'activité du cotransporteur en fonction du  $V_m$ , de  $[\text{Na}^+]_o$  et de  $[\alpha\text{MG}]_o$ .

Nous avons appris que le courant de fuite de SGLT1 était de nature cationique, car en plus d'être perméable aux ions  $\text{Na}^+$ , il permettait le passage d'une variété de cations comme les  $\text{K}^+$ , les  $\text{Li}^+$ , les  $\text{Cs}^+$ , et même les  $\text{H}^+$  lorsque  $\text{pH}_o < 6,5$ . Cependant, à  $\text{pH}_o$  physiologique, seuls les ions  $\text{Na}^+$  engendraient des mouvements de charge significatifs, suggérant que le courant de fuite traversait SGLT1 en suivant un chemin indépendant des changements de conformation propres au mécanisme de cotransport  $\text{Na}^+$ /glucose. En effectuant des expériences de volumétrie, nous avons découvert une certaine corrélation entre l'amplitude du courant de fuite et la perméabilité à l'eau passive de SGLT1, nous amenant à proposer que les cations et les molécules d'eau empruntaient une voie possiblement commune pour traverser SGLT1.

Dans un second projet, la technique de la trappe ionique nous a permis de mesurer le TOR du cotransporteur. En utilisant une électrode sélective possédant une pointe de large diamètre (~100 nm) pressée sur la membrane plasmique d'un ovocyte afin de circonscrire un petit espace de solution (la trappe), nous avons pu enregistrer des changements de concentration ionique locaux se produisant de façon concomitante à l'activité électrogénique de SGLT. Nous avons ainsi déduit qu'à -150 mV, en présence de 90 mM  $\text{Na}^+$  et d'une  $[\alpha\text{MG}]_o$  saturante de 5 mM, SGLT1 était caractérisé par un TOR de  $13 \text{ s}^{-1}$  attribuable à la présence de  $3,6 \times 10^{11}$  transporteurs à la membrane plasmique d'un ovocyte.

Finalement, nous avons utilisé l'algorithme du recuit simulé dans le but de construire un modèle cinétique simple capable de reproduire directement les courants transitoires ON et OFF ainsi que les courants stationnaires de SGLT1. Le SA nous a permis d'identifier le meilleur ensemble de paramètres d'un modèle à 7 états décrivant l'activité de SGLT1 en fonction du  $V_m$ , de  $[\text{Na}^+]_o$  et de  $[\alpha\text{MG}]_o$ . En se basant sur ce modèle, nous avons pu simuler le parcours conformationnel de SGLT1 et ainsi se faire une image crédible de son comportement en fonction du temps. Selon notre modèle, l'étape limitante du mécanisme de cotransport  $\text{Na}^+$ /glucose à -150 mV est la réorientation du cotransporteur libre dans la membrane.

### **Perspectives**

Certains projets futurs pourraient être initiés grâce aux techniques mises à l'épreuve dans cette thèse. Par exemple, la capacité de l'ITT à mesurer des changements de concentration locaux associés à l'addition de substrat à  $V_m$  constant, d'une façon indépendante des courants obtenus en électrophysiologie à deux microélectrodes, rend possible l'étude de mécanismes de transport électroneutres. Plus directement, l'ITT pourrait aussi servir à déterminer le TOR de d'autres cotransporteurs électrogéniques.

L'algorithme du SA, quant à lui, est à la source de projets qui sont déjà en cours de planification dans notre laboratoire. On pense notamment à l'étude du mode de transport inverse de SGLT1. En effet, en réalisant des expériences dans lesquelles on injecterait du  $\text{Na}^+$  et du glucose à l'intérieur d'un ovocyte, il serait possible de mesurer des courants sortants qui serviraient à élucider les détails de la transition indépendante du voltage  $C_7 \leftrightarrow C_1$  contenue dans notre modèle à 7 états. Ces données pourraient être considérées dans une optimisation simultanée comprenant aussi les courants du mode de transport entrant. Nous croyons que le SA possède la robustesse nécessaire à ce genre d'entreprise, puisque nous avons utilisé l'algorithme avec succès dans le cadre de l'optimisation simultanée de 5 conditions expérimentales (résultats non publiés). Le SA risque aussi de s'avérer d'une

grande utilité dans l'élaboration de modèles cinétiques de d'autres transporteurs comme SMI2 et SGLT2.



## Bibliographie

- Abramson, J., and E.M. Wright. 2009. Structure and function of Na(+)-symporters with inverted repeats. *Curr Opin Struct Biol.* 19:425-432.
- Accardi, A., and C. Miller. 2004. Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of ClC Cl<sup>-</sup> channels. *Nature.* 427:803-807.
- Agre, P., G.M. Preston, B.L. Smith, J.S. Jung, S. Raina, C. Moon, W.B. Guggino, and S. Nielsen. 1993. Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. *Am J Physiol.* 265:F463-476.
- Andrini, O., C. Ghezzi, H. Murer, and I.C. Forster. 2008. The leak mode of type II Na(+)-P(i) cotransporters. *Channels (Austin).* 2.
- Bacconi, A., S. Ravera, L.V. Virkki, H. Murer, and I.C. Forster. 2007. Temperature dependence of steady-state and presteady-state kinetics of a type IIb Na<sup>+</sup>/P<sup>i</sup> cotransporter. *J Membr Biol.* 215:81-92.
- Bezanilla, F. 2000. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev.* 80:555-592.
- Bezanilla, F. 2008. How membrane proteins sense voltage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:323-332.
- Birnir, B., D.D. Loo, and E.M. Wright. 1991. Voltage-clamp studies of the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter cloned from rabbit small intestine. *Pflugers Arch.* 418:79-85.
- Blanchard, M.G., J.P. Longpre, B. Wallendorff, and J.Y. Lapointe. 2008. Measuring ion transport activities in *Xenopus* oocytes using the ion-trap technique. *Am J Physiol Cell Physiol.* 295:C1464-1472.
- Boudker, O., R.M. Ryan, D. Yernool, K. Shimamoto, and E. Gouaux. 2007. Coupling substrate and ion binding to extracellular gate of a sodium-dependent aspartate transporter. *Nature.* 445:387-393.
- Boudker, O., and G. Verdon. 2010. Structural perspectives on secondary active transporters. *Trends in pharmacological sciences.* 31:418-426.

- Bourgeois, F., M.J. Coady, and J.Y. Lapointe. 2005. Determination of transport stoichiometry for two cation-coupled myo-inositol cotransporters: SMIT2 and HMIT. *J Physiol.* 563:333-343.
- Calado, J., Y. Sznajder, D. Metzger, A. Rita, M.C. Hogan, A. Kattamis, M. Scharf, V. Tasic, J. Greil, F. Brinkert, M.J. Kemper, and R. Santer. 2008. Twenty-one additional cases of familial renal glucosuria: absence of genetic heterogeneity, high prevalence of private mutations and further evidence of volume depletion. *Nephrol Dial Transplant.* 23:3874-3879.
- Cao, Y., S. Mager, and H.A. Lester. 1997. H<sup>+</sup> permeation and pH regulation at a mammalian serotonin transporter. *J Neurosci.* 17:2257-2266.
- Caplan, D.A., J.O. Subbotina, and S.Y. Noskov. 2008. Molecular mechanism of ion-ion and ion-substrate coupling in the Na<sup>+</sup>-dependent leucine transporter LeuT. *Biophys J.* 95:4613-4621.
- Celik, L., B. Schiott, and E. Tajkhorshid. 2008. Substrate binding and formation of an occluded state in the leucine transporter. *Biophys J.* 94:1600-1612.
- Chao, E.C., and R.R. Henry. 2010. SGLT2 inhibition--a novel strategy for diabetes treatment. *Nat Rev Drug Discov.* 9:551-559.
- Charron, F.M., M.G. Blanchard, and J.Y. Lapointe. 2006. Intracellular hypertonicity is responsible for water flux associated with Na<sup>+</sup>/glucose cotransport. *Biophys J.* 90:3546-3554.
- Chen, X.Z., M.J. Coady, F. Jackson, A. Berteloot, and J.Y. Lapointe. 1995. Thermodynamic determination of the Na<sup>+</sup>: glucose coupling ratio for the human SGLT1 cotransporter. *Biophys J.* 69:2405-2414.
- Chen, X.Z., M.J. Coady, F. Jalal, B. Wallendorff, and J.Y. Lapointe. 1997. Sodium leak pathway and substrate binding order in the Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter. *Biophys J.* 73:2503-2510.
- Chen, X.Z., M.J. Coady, and J.Y. Lapointe. 1996. Fast voltage clamp discloses a new component of presteady-state currents from the Na<sup>(+)</sup>-glucose cotransporter. *Biophys J.* 71:2544-2552.

- Choe, S., J.M. Rosenberg, J. Abramson, E.M. Wright, and M. Grabe. 2010. Water permeation through the sodium-dependent galactose cotransporter vSGLT. *Biophys J.* 99:L56-58.
- Coady, M.J., M.H. Chang, F.M. Charron, C. Plata, B. Wallendorff, J.F. Sah, S.D. Markowitz, M.F. Romero, and J.Y. Lapointe. 2004. The human tumour suppressor gene SLC5A8 expresses a Na<sup>+</sup>-monocarboxylate cotransporter. *J Physiol.* 557:719-731.
- Coady, M.J., B. Wallendorff, F. Bourgeois, F. Charron, and J.Y. Lapointe. 2007. Establishing a definitive stoichiometry for the Na<sup>+</sup>/monocarboxylate cotransporter SMCT1. *Biophys J.* 93:2325-2331.
- Coady, M.J., B. Wallendorff, F. Bourgeois, and J.Y. Lapointe. 2010. Anionic leak currents through the Na<sup>+</sup>/monocarboxylate cotransporter SMCT1. *Am J Physiol Cell Physiol.* 298:C124-131.
- Coady, M.J., B. Wallendorff, D.G. Gagnon, and J.Y. Lapointe. 2002. Identification of a novel Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter. *J Biol Chem.* 277:35219-35224.
- Crane, R.K. 1965. Na<sup>+</sup> -dependent transport in the intestine and other animal tissues. *Fed Proc.* 24:1000-1006.
- Dai, G., O. Levy, and N. Carrasco. 1996. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature.* 379:458-460.
- de Carvalho, F.D., and M. Quick. 2011. Surprising substrate versatility in SLC5A6: Na<sup>+</sup>-coupled I<sup>-</sup> transport by the human Na<sup>+</sup>/multivitamin transporter (hSMVT). *J Biol Chem.* 286:131-137.
- Diez-Sampedro, A., S. Eskandari, E.M. Wright, and B.A. Hirayama. 2001a. Na<sup>+</sup>-to-sugar stoichiometry of SGLT3. *Am J Physiol Renal Physiol.* 280:F278-282.
- Diez-Sampedro, A., B.A. Hirayama, C. Osswald, V. Gorboulev, K. Baumgarten, C. Volk, E.M. Wright, and H. Koepsell. 2003. A glucose sensor hiding in a family of transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:11753-11758.
- Diez-Sampedro, A., E.M. Wright, and B.A. Hirayama. 2001b. Residue 457 controls sugar binding and transport in the Na<sup>(+)</sup>/glucose cotransporter. *J Biol Chem.* 276:49188-49194.

- Dumont, J.N. 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol.* 136:153-179.
- Duquette, P.-P. 2000. Étude de la force motrice impliquée dans le flux d'eau associé au cotransport Na<sup>+</sup>/glucose. Université de Montréal, Montréal. xii, 54 f. pp.
- Duquette, P.P., P. Bissonnette, and J.Y. Lapointe. 2001. Local osmotic gradients drive the water flux associated with Na<sup>(+)</sup>/glucose cotransport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:3796-3801.
- Eskandari, S., D.D. Loo, G. Dai, O. Levy, E.M. Wright, and N. Carrasco. 1997. Thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity. *J Biol Chem.* 272:27230-27238.
- Eskandari, S., E.M. Wright, and D.D. Loo. 2005. Kinetics of the reverse mode of the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *J Membr Biol.* 204:23-32.
- Eyring, H. 1935. The activated complex in chemical reactions. *J. Chem. Phys.* 3:107-115.
- Faham, S., A. Watanabe, G.M. Besserer, D. Cascio, A. Specht, B.A. Hirayama, E.M. Wright, and J. Abramson. 2008. The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na<sup>+</sup>/sugar symport. *Science.* 321:810-814.
- Fairman, W.A., R.J. Vandenberg, J.L. Arriza, M.P. Kavanaugh, and S.G. Amara. 1995. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature.* 375:599-603.
- Falk, S., A. Guay, C. Chenu, S.D. Patil, and A. Berteloot. 1998. Reduction of an eight-state mechanism of cotransport to a six-state model using a new computer program. *Biophys J.* 74:816-830.
- Fang, Y., H. Jayaram, T. Shane, L. Kolmakova-Partensky, F. Wu, C. Williams, Y. Xiong, and C. Miller. 2009. Structure of a prokaryotic virtual proton pump at 3.2 Å resolution. *Nature.* 460:1040-1043.
- Fischbarg, J., K.Y. Kuang, J.C. Vera, S. Arant, S.C. Silverstein, J. Loike, and O.M. Rosen. 1990. Glucose transporters serve as water channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:3244-3247.

- Forrest, L.R., R. Kramer, and C. Ziegler. 2011. The structural basis of secondary active transport mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 1807:167-188.
- Forrest, L.R., and G. Rudnick. 2009. The rocking bundle: a mechanism for ion-coupled solute flux by symmetrical transporters. *Physiology (Bethesda)*. 24:377-386.
- Forrest, L.R., Y.W. Zhang, M.T. Jacobs, J. Gesmonde, L. Xie, B.H. Honig, and G. Rudnick. 2008. Mechanism for alternating access in neurotransmitter transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:10338-10343.
- Forster, I., N. Hernando, J. Biber, and H. Murer. 1998. The voltage dependence of a cloned mammalian renal type II Na<sup>+</sup>/Pi cotransporter (NaPi-2). *J Gen Physiol*. 112:1-18.
- Forster, I.C., K. Kohler, J. Biber, and H. Murer. 2002. Forging the link between structure and function of electrogenic cotransporters: the renal type IIa Na<sup>+</sup>/Pi cotransporter as a case study. *Prog Biophys Mol Biol*. 80:69-108.
- Forster, I.C., C.A. Wagner, A.E. Busch, F. Lang, J. Biber, N. Hernando, H. Murer, and A. Werner. 1997. Electrophysiological characterization of the flounder type II Na<sup>+</sup>/Pi cotransporter (NaPi-5) expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Membr Biol*. 160:9-25.
- Gagnon, D.G., P. Bissonnette, and J.Y. Lapointe. 2006. Identification of a disulfide bridge linking the fourth and the seventh extracellular loops of the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *J Gen Physiol*. 127:145-158.
- Gagnon, D.G., C. Frindel, and J.Y. Lapointe. 2007. Effect of substrate on the pre-steady-state kinetics of the Na<sup>(+)</sup>/glucose cotransporter. *Biophys J*. 92:461-472.
- Gagnon, M.P., P. Bissonnette, L.M. Deslandes, B. Wallendorff, and J.Y. Lapointe. 2004. Glucose accumulation can account for the initial water flux triggered by Na<sup>+</sup>/glucose cotransport. *Biophys J*. 86:125-133.
- Ganapathy, V., M. Thangaraju, E. Gopal, P.M. Martin, S. Itagaki, S. Miyauchi, and P.D. Prasad. 2008. Sodium-coupled monocarboxylate transporters in normal tissues and in cancer. *AAPS J*. 10:193-199.
- Gao, X., F. Lu, L. Zhou, S. Dang, L. Sun, X. Li, J. Wang, and Y. Shi. 2009. Structure and mechanism of an amino acid antiporter. *Science*. 324:1565-1568.

- Gao, X., L. Zhou, X. Jiao, F. Lu, C. Yan, X. Zeng, J. Wang, and Y. Shi. 2010. Mechanism of substrate recognition and transport by an amino acid antiporter. *Nature*. 463:828-832.
- Geman, S., and D. Geman. 1984. Stochastic Relaxation, Gibbs Distributions, and the Bayesian Restoration of Images. *IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence*. PAMI-6:721-741.
- Grossman, T.R., and N. Nelson. 2003. Effect of sodium lithium and proton concentrations on the electrophysiological properties of the four mouse GABA transporters expressed in *Xenopus* oocytes. *Neurochem Int*. 43:431-443.
- Gurdon, J.B., C.D. Lane, H.R. Woodland, and G. Marbaix. 1971. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature*. 233:177-182.
- Hager, K., A. Hazama, H.M. Kwon, D.D. Loo, J.S. Handler, and E.M. Wright. 1995. Kinetics and specificity of the renal Na<sup>+</sup>/myo-inositol cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J Membr Biol*. 143:103-113.
- Hazama, A., D.D. Loo, and E.M. Wright. 1997. Presteady-state currents of the rabbit Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter (SGLT1). *J Membr Biol*. 155:175-186.
- Hediger, M.A., M.J. Coady, T.S. Ikeda, and E.M. Wright. 1987. Expression cloning and cDNA sequencing of the Na<sup>+</sup>/glucose co-transporter. *Nature*. 330:379-381.
- Hirayama, B.A., D.D. Loo, and E.M. Wright. 1994. Protons drive sugar transport through the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter (SGLT1). *J Biol Chem*. 269:21407-21410.
- Hirayama, B.A., D.D. Loo, and E.M. Wright. 1997. Cation effects on protein conformation and transport in the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *J Biol Chem*. 272:2110-2115.
- Hopfer, U., K. Nelson, J. Perrotto, and K.J. Isselbacher. 1973. Glucose transport in isolated brush border membrane from rat small intestine. *J Biol Chem*. 248:25-32.
- Hummel, C.S., C. Lu, D.D. Loo, B.A. Hirayama, A.A. Voss, and E.M. Wright. 2011. Glucose transport by human renal Na<sup>+</sup>/D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2. *Am J Physiol Cell Physiol*. 300:C14-21.

- Huntley, S.A., D. Krofchick, and M. Silverman. 2004. Position 170 of Rabbit Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter (rSGLT1) lies in the Na<sup>+</sup> pathway; modulation of polarity/charge at this site regulates charge transfer and carrier turnover. *Biophys J.* 87:295-310.
- Jardetzky, O. 1966. Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature.* 211:969-970.
- Kanai, Y., W.S. Lee, G. You, D. Brown, and M.A. Hediger. 1994. The human kidney low affinity Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter SGLT2. Delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose. *J Clin Invest.* 93:397-404.
- Kanner, B.I. 2003. Transmembrane domain I of the gamma-aminobutyric acid transporter GAT-1 plays a crucial role in the transition between cation leak and transport modes. *J Biol Chem.* 278:3705-3712.
- Karakossian, M.H., S.R. Spencer, A.Q. Gomez, O.R. Padilla, A. Sacher, D.D. Loo, N. Nelson, and S. Eskandari. 2005. Novel properties of a mouse gamma-aminobutyric acid transporter (GAT4). *J Membr Biol.* 203:65-82.
- Kimmich, G.A., and J. Randles. 1984. Sodium-sugar coupling stoichiometry in chick intestinal cells. *Am J Physiol.* 247:C74-82.
- Kirkpatrick, S., C.D. Gelatt, Jr., and M.P. Vecchi. 1983. Optimization by simulated annealing. *Science.* 220:671-680.
- Komoroski, B., N. Vachharajani, D. Boulton, D. Kornhauser, M. Geraldles, L. Li, and M. Pfister. 2009a. Dapagliflozin, a novel SGLT2 inhibitor, induces dose-dependent glucosuria in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 85:520-526.
- Komoroski, B., N. Vachharajani, Y. Feng, L. Li, D. Kornhauser, and M. Pfister. 2009b. Dapagliflozin, a novel, selective SGLT2 inhibitor, improved glycemic control over 2 weeks in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Pharmacol Ther.* 85:513-519.
- Krishnamurthy, H., C.L. Piscitelli, and E. Gouaux. 2009. Unlocking the molecular secrets of sodium-coupled transporters. *Nature.* 459:347-355.
- Krofchick, D., S.A. Huntley, and M. Silverman. 2004. Transition states of the high-affinity rabbit Na<sup>(+)</sup>/glucose cotransporter SGLT1 as determined from measurement and analysis of voltage-dependent charge movements. *Am J Physiol Cell Physiol.* 287:C46-54.

- Krofchick, D., and M. Silverman. 2003. Investigating the conformational states of the rabbit Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *Biophys J.* 84:3690-3702.
- Lahjouji, K., R. Aouameur, P. Bissonnette, M.J. Coady, D.G. Bichet, and J.Y. Lapointe. 2007. Expression and functionality of the Na<sup>(+)</sup>/myo-inositol cotransporter SMIT2 in rabbit kidney. *Biochim Biophys Acta.*
- Lauger, P., and P. Jauch. 1986. Microscopic description of voltage effects on ion-driven cotransport systems. *J Membr Biol.* 91:275-284.
- Li, J., and E. Tajkhorshid. 2009. Ion-releasing state of a secondary membrane transporter. *Biophys J.* 97:L29-31.
- Li, J., and E. Tajkhorshid. 2011. A gate-free pathway for substrate release from the inward-facing state of the Na<sup>(+)</sup>-galactose transporter. *Biochim Biophys Acta.*
- Lo, B., and M. Silverman. 1998. Cysteine scanning mutagenesis of the segment between putative transmembrane helices IV and V of the high affinity Na<sup>+</sup>/Glucose cotransporter SGLT1. Evidence that this region participates in the Na<sup>+</sup> and voltage dependence of the transporter. *J Biol Chem.* 273:29341-29351.
- Loo, D.D., S. Eskandari, K.J. Boorer, H.K. Sarkar, and E.M. Wright. 2000. Role of Cl<sup>-</sup> in electrogenic Na<sup>+</sup>-coupled cotransporters GAT1 and SGLT1. *J Biol Chem.* 275:37414-37422.
- Loo, D.D., A. Hazama, S. Supplisson, E. Turk, and E.M. Wright. 1993. Relaxation kinetics of the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:5767-5771.
- Loo, D.D., B.A. Hirayama, A. Cha, F. Bezanilla, and E.M. Wright. 2005. Perturbation analysis of the voltage-sensitive conformational changes of the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *J Gen Physiol.* 125:13-36.
- Loo, D.D., B.A. Hirayama, E.M. Gallardo, J.T. Lam, E. Turk, and E.M. Wright. 1998. Conformational changes couple Na<sup>+</sup> and glucose transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:7789-7794.
- Loo, D.D., B.A. Hirayama, M.H. Karakossian, A.K. Meinild, and E.M. Wright. 2006. Conformational dynamics of hSGLT1 during Na<sup>+</sup>/glucose cotransport. *J Gen Physiol.* 128:701-720.



- Loo, D.D., B.A. Hirayama, A.K. Meinild, G. Chandy, T. Zeuthen, and E.M. Wright. 1999. Passive water and ion transport by cotransporters. *J Physiol.* 518 ( Pt 1):195-202.
- Loo, D.D., T. Zeuthen, G. Chandy, and E.M. Wright. 1996. Cotransport of water by the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:13367-13370.
- Lu, C.C., and D.W. Hilgemann. 1999. GAT1 (GABA:Na<sup>+</sup>:Cl<sup>-</sup>) cotransport function. Steady state studies in giant *Xenopus* oocyte membrane patches. *J Gen Physiol.* 114:429-444.
- MacAulay, N., T. Zeuthen, and U. Gether. 2002. Conformational basis for the Li<sup>(+)</sup>-induced leak current in the rat gamma-aminobutyric acid (GABA) transporter-1. *J Physiol.* 544:447-458.
- Mackenzie, B., D.D. Loo, and E.M. Wright. 1998. Relationships between Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter (SGLT1) currents and fluxes. *J Membr Biol.* 162:101-106.
- Mackenzie, B., M.L. Ujwal, M.H. Chang, M.F. Romero, and M.A. Hediger. 2006. Divalent metal-ion transporter DMT1 mediates both H<sup>+</sup> -coupled Fe<sup>2+</sup> transport and uncoupled fluxes. *Pflugers Arch.* 451:544-558.
- Mager, S., N. Kleinberger-Doron, G.I. Keshet, N. Davidson, B.I. Kanner, and H.A. Lester. 1996. Ion binding and permeation at the GABA transporter GAT1. *J Neurosci.* 16:5405-5414.
- Mager, S., C. Min, D.J. Henry, C. Chavkin, B.J. Hoffman, N. Davidson, and H.A. Lester. 1994. Conducting states of a mammalian serotonin transporter. *Neuron.* 12:845-859.
- Mager, S., J. Naeve, M. Quick, C. Labarca, N. Davidson, and H.A. Lester. 1993. Steady states, charge movements, and rates for a cloned GABA transporter expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuron.* 10:177-188.
- Meinild, A., D.A. Klaerke, D.D. Loo, E.M. Wright, and T. Zeuthen. 1998. The human Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter is a molecular water pump. *J Physiol.* 508 ( Pt 1):15-21.
- Meinild, A.K., D.D. Loo, S. Skovstrup, U. Gether, and N. MacAulay. 2009. Elucidating conformational changes in the gamma-aminobutyric acid transporter-1. *J Biol Chem.* 284:16226-16235.
- Meng, W., B.A. Ellsworth, A.A. Nirschl, P.J. McCann, M. Patel, R.N. Girotra, G. Wu, P.M. Sher, E.P. Morrison, S.A. Biller, R. Zahler, P.P. Deshpande, A. Pullockaran,

- D.L. Hagan, N. Morgan, J.R. Taylor, M.T. Obermeier, W.G. Humphreys, A. Khanna, L. Discenza, J.G. Robertson, A. Wang, S. Han, J.R. Wetterau, E.B. Janovitz, O.P. Flint, J.M. Whaley, and W.N. Washburn. 2008. Discovery of dapagliflozin: a potent, selective renal sodium-dependent glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *J Med Chem.* 51:1145-1149.
- Metropolis, N., A.W. Rosenbluth, M.N. Rosenbluth, and A.H. Teller. 1953. Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. *J. Chem. Phys.* 21:6.
- Mitchell, P. 1972. Chemiosmotic coupling in energy transduction: a logical development of biochemical knowledge. *J Bioenerg.* 3:5-24.
- Nelson, D.L., M.M. Cox, and A.L. Lehninger. 2000. Lehninger principles of biochemistry. In. Worth Publishers, New York.
- Noskov, S.Y., and B. Roux. 2008. Control of ion selectivity in LeuT: two Na<sup>+</sup> binding sites with two different mechanisms. *J Mol Biol.* 377:804-818.
- Oulianova, N., S. Falk, and A. Berteloot. 2001. Two-step mechanism of phlorizin binding to the SGLT1 protein in the kidney. *J Membr Biol.* 179:223-242.
- Panayotova-Heiermann, M., D.D. Loo, J.T. Lam, and E.M. Wright. 1998. Neutralization of conservative charged transmembrane residues in the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter SGLT1. *Biochemistry.* 37:10522-10528.
- Panayotova-Heiermann, M., D.D. Loo, M.P. Lostao, and E.M. Wright. 1994. Sodium/D-glucose cotransporter charge movements involve polar residues. *J Biol Chem.* 269:21016-21020.
- Panayotova-Heiermann, M., D.D. Loo, and E.M. Wright. 1995. Kinetics of steady-state currents and charge movements associated with the rat Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *J Biol Chem.* 270:27099-27105.
- Pantazopoulou, A., and G. Diallinas. 2007. Fungal nucleobase transporters. *FEMS Microbiol Rev.* 31:657-675.
- Parent, L., S. Supplisson, D.D. Loo, and E.M. Wright. 1992a. Electrogenic properties of the cloned Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter: I. Voltage-clamp studies. *J Membr Biol.* 125:49-62.

- Parent, L., S. Supplisson, D.D. Loo, and E.M. Wright. 1992b. Electrogenic properties of the cloned Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter: II. A transport model under nonrapid equilibrium conditions. *J Membr Biol.* 125:63-79.
- Perez, C., C. Koshy, S. Ressler, S. Nicklisch, R. Kramer, and C. Ziegler. 2011. Substrate specificity and ion coupling in the Na<sup>+</sup>/betaine symporter BetP. *EMBO J.* 30:1221-1229.
- Prasad, P.D., and V. Ganapathy. 2000. Structure and function of mammalian sodium-dependent multivitamin transporter. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 3:263-266.
- Quick, M., J. Tomasevic, and E.M. Wright. 2003. Functional asymmetry of the human Na<sup>+</sup>/glucose transporter (hSGLT1) in bacterial membrane vesicles. *Biochemistry.* 42:9147-9152.
- Ressler, S., A.C. Terwisscha van Scheltinga, C. Vonrhein, V. Ott, and C. Ziegler. 2009. Molecular basis of transport and regulation in the Na<sup>(+)</sup>/betaine symporter BetP. *Nature.* 458:47-52.
- Ribeiro, F.M., S.A. Black, V.F. Prado, R.J. Rylett, S.S. Ferguson, and M.A. Prado. 2006. The "ins" and "outs" of the high-affinity choline transporter CHT1. *J Neurochem.* 97:1-12.
- Ryan, R.M., and J.A. Mindell. 2007. The uncoupled chloride conductance of a bacterial glutamate transporter homolog. *Nat Struct Mol Biol.* 14:365-371.
- Ryan, R.M., A.D. Mitrovic, and R.J. Vandenberg. 2004. The chloride permeation pathway of a glutamate transporter and its proximity to the glutamate translocation pathway. *J Biol Chem.* 279:20742-20751.
- Santer, R., M. Kinner, C.L. Lassen, R. Schneppenheim, P. Eggert, M. Bald, J. Brodehl, M. Daschner, J.H. Ehrich, M. Kemper, S. Li Volti, T. Neuhaus, F. Skovby, P.G. Swift, J. Schaub, and D. Klaerke. 2003. Molecular analysis of the SGLT2 gene in patients with renal glucosuria. *J Am Soc Nephrol.* 14:2873-2882.
- Sasseville, L.J., J.E. Cuervo, J.Y. Lapointe, and S.Y. Noskov. 2011. The structural pathway for water permeation through sodium-glucose cotransporters. *Biophys J.* 101:1887-1895.

- Schulze, S., S. Koster, U. Geldmacher, A.C. Terwisscha van Scheltinga, and W. Kuhlbrandt. 2010. Structural basis of Na(+)-independent and cooperative substrate/product antiport in CaiT. *Nature*. 467:233-236.
- Shaffer, P.L., A. Goehring, A. Shankaranarayanan, and E. Gouaux. 2009. Structure and mechanism of a Na+-independent amino acid transporter. *Science*. 325:1010-1014.
- Shimamura, T., S. Weyand, O. Beckstein, N.G. Rutherford, J.M. Hadden, D. Sharples, M.S. Sansom, S. Iwata, P.J. Henderson, and A.D. Cameron. 2010. Molecular basis of alternating access membrane transport by the sodium-hydantoin transporter Mhp1. *Science*. 328:470-473.
- Singh, S.K., C.L. Piscitelli, A. Yamashita, and E. Gouaux. 2008. A competitive inhibitor traps LeuT in an open-to-out conformation. *Science*. 322:1655-1661.
- Singh, S.K., A. Yamashita, and E. Gouaux. 2007. Antidepressant binding site in a bacterial homologue of neurotransmitter transporters. *Nature*. 448:952-956.
- Sobczak, K., N. Bangel-Ruland, G. Leier, and W.M. Weber. 2010. Endogenous transport systems in the *Xenopus laevis* oocyte plasma membrane. *Methods*. 51:183-189.
- Stefani, E., and F. Bezanilla. 1998. Cut-open oocyte voltage-clamp technique. *Methods Enzymol*. 293:300-318.
- Stumpel, F., R. Burcelin, K. Jungermann, and B. Thorens. 2001. Normal kinetics of intestinal glucose absorption in the absence of GLUT2: evidence for a transport pathway requiring glucose phosphorylation and transfer into the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:11330-11335.
- Tazawa, S., T. Yamato, H. Fujikura, M. Hiratochi, F. Itoh, M. Tomae, Y. Takemura, H. Maruyama, T. Sugiyama, A. Wakamatsu, T. Isogai, and M. Isaji. 2005. SLC5A9/SGLT4, a new Na+-dependent glucose transporter, is an essential transporter for mannose, 1,5-anhydro-D-glucitol, and fructose. *Life Sci*. 76:1039-1050.
- Tsakaguchi, H., T. Tokui, B. Mackenzie, U.V. Berger, X.Z. Chen, Y. Wang, R.F. Brubaker, and M.A. Hediger. 1999. A family of mammalian Na+-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature*. 399:70-75.

- Uldry, M., and B. Thorens. 2004. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch.* 447:480-489.
- Umbach, J.A., M.J. Coady, and E.M. Wright. 1990. Intestinal Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes is electrogenic. *Biophys J.* 57:1217-1224.
- Walden, M., A. Accardi, F. Wu, C. Xu, C. Williams, and C. Miller. 2007. Uncoupling and turnover in a Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup> exchange transporter. *J Gen Physiol.* 129:317-329.
- Watanabe, A., S. Choe, V. Chaptal, J.M. Rosenberg, E.M. Wright, M. Grabe, and J. Abramson. 2010. The mechanism of sodium and substrate release from the binding pocket of vSGLT. *Nature.* 468:988-991.
- Weber, W.M. 1999. Endogenous ion channels in oocytes of *xenopus laevis*: recent developments. *J Membr Biol.* 170:1-12.
- Weyand, S., T. Shimamura, S. Yajima, S. Suzuki, O. Mirza, K. Krusong, E.P. Carpenter, N.G. Rutherford, J.M. Hadden, J. O'Reilly, P. Ma, M. Saidijam, S.G. Patching, R.J. Hope, H.T. Norbertczak, P.C. Roach, S. Iwata, P.J. Henderson, and A.D. Cameron. 2008. Structure and molecular mechanism of a nucleobase-cation-symport-1 family transporter. *Science.* 322:709-713.
- Woo, H.J., A.R. Dinner, and B. Roux. 2004. Grand canonical Monte Carlo simulations of water in protein environments. *The Journal of chemical physics.* 121:6392-6400.
- Wright, E.M. 1998. I. Glucose galactose malabsorption. *Am J Physiol.* 275:G879-882.
- Wright, E.M. 2001. Renal Na<sup>(+)</sup>-glucose cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol.* 280:F10-18.
- Wright, E.M., B.A. Hirayama, and D.F. Loo. 2007. Active sugar transport in health and disease. *J Intern Med.* 261:32-43.
- Wright, E.M., D.D. Loo, and B.A. Hirayama. 2011. Biology of human sodium glucose transporters. *Physiol Rev.* 91:733-794.
- Wright, E.M., D.D. Loo, B.A. Hirayama, and E. Turk. 2004. Surprising versatility of Na<sup>+</sup>-glucose cotransporters: SLC5. *Physiology (Bethesda).* 19:370-376.
- Wright, E.M., and E. Turk. 2004. The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch.* 447:510-518.

- Wright, E.M., E. Turk, and M.G. Martin. 2002. Molecular basis for glucose-galactose malabsorption. *Cell Biochem Biophys.* 36:115-121.
- Yamashita, A., S.K. Singh, T. Kawate, Y. Jin, and E. Gouaux. 2005. Crystal structure of a bacterial homologue of Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-dependent neurotransmitter transporters. *Nature.* 437:215-223.
- Yao, X., and A.M. Pajor. 2000. The transport properties of the human renal Na<sup>(+)</sup>-dicarboxylate cotransporter under voltage-clamp conditions. *Am J Physiol Renal Physiol.* 279:F54-64.
- Yernool, D., O. Boudker, Y. Jin, and E. Gouaux. 2004. Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature.* 431:811-818.
- Zampighi, G.A., M. Kreman, K.J. Boorer, D.D. Loo, F. Bezanilla, G. Chandy, J.E. Hall, and E.M. Wright. 1995. A method for determining the unitary functional capacity of cloned channels and transporters expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Membr Biol.* 148:65-78.
- Zerangue, N., B. Schwappach, Y.N. Jan, and L.Y. Jan. 1999. A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron.* 22:537-548.
- Zeuthen, T., A.K. Meinild, D.A. Klaerke, D.D. Loo, E.M. Wright, B. Belhage, and T. Litman. 1997. Water transport by the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter under isotonic conditions. *Biol Cell.* 89:307-312.
- Zeuthen, T., A.K. Meinild, D.D. Loo, E.M. Wright, and D.A. Klaerke. 2001. Isotonic transport by the Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter SGLT1 from humans and rabbit. *J Physiol.* 531:631-644.
- Zhang, R., W. Skach, H. Hasegawa, A.N. van Hoek, and A.S. Verkman. 1993. Cloning, functional analysis and cell localization of a kidney proximal tubule water transporter homologous to CHIP28. *J Cell Biol.* 120:359-369.
- Ziegler, C., E. Bremer, and R. Kramer. 2010. The BCCT family of carriers: from physiology to crystal structure. *Mol Microbiol.* 78:13-34.

