

Université de Montréal

**Observation du gradient osmotique associé à
l'activation du cotransporteur Na⁺/glucose
dans les ovocytes de *Xenopus laevis***

Par

François Charron

Département de Physique

Faculté des Arts et des Sciences

**Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès Science (M. Sc.)**

Août 2005

©François Charron



dc
3
U54
2006
V-011

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

**Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures**

**Ce mémoire intitulé :
Observation du gradient osmotique associé à
l'activation du cotransporteur Na⁺/glucose
dans les ovocytes de *Xenopus laevis***

**présenté par
François Charron**

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jean-Yves Lapointe

Dr Raynald Laprade

Dr Alfred Berteloot



Résumé

La détection d'un flux d'eau transmembranaire significatif immédiatement après la stimulation du cotransport est la base expérimentale de l'hypothèse controversée du transport secondairement actif de l'eau. La stœchiométrie proposée pour la forme humaine du cotransporteur Na/glucose (SGLT1) est de 2 Na⁺, 1 glucose et 260 molécules d'eau. Des mesures volumétriques sur des ovocytes de *Xenopus* hautement perméables à l'eau co-exprimant SGLT1 et l'aquaporine 1 (AQP1) peuvent être utilisées pour détecter la présence de gradients osmotiques. La création d'un grand courant de cotransport avec un changement de volume cellulaire minimal est rendue possible en ajoutant 2mM d'alpha-méthyl-glucose (αMG) à la solution extérieure de façon hypertonique. Après 20, 40 et 60 s de cotransport, le retour aux conditions sans sucre et iso-osmotique est accompagné par un gonflement cellulaire mesurable de 0,051, 0,061 et 0,077 nl/s. Ce flux d'eau révèle une hypertonicité interne de 1,51, 1,74 et 2,19 mOsm pour les périodes de cotransport respectives. Dans le cas des ovocytes exprimant uniquement SGLT1, les hypertonicités mesurées peuvent entièrement expliquer les flux d'eau qui accompagnent l'activation du cotransporteur. En utilisant l'injection intracellulaire de Na et une micro-électrode sélective au Na, le coefficient de diffusion intracellulaire a été mesuré à $0,29 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Le coefficient de diffusion intracellulaire de l'αMG a été déterminé en utilisant une injection centrale d'αMG et la détection de l'apparition d'un courant sortant de Na et de glucose par SGLT1. Sa valeur numérique est en moyenne de $0,19 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. L'observation de coefficients de diffusion qui sont de 3 à 5 fois plus faibles que dans des solutions aqueuses physiologiques permet d'expliquer, du moins en partie, l'accumulation d'osmolytes locale détectée expérimentalement durant la première minute suivant le cotransport.

Mots-clés : Cotransport couplé Na⁺/Glucose; Pompe à eau; Électrophysiologie; Volumétrie; Gradient osmotique; Diffusion in vivo; Électrode Na-sélective; Ovocytes de *Xenopus*.

Abstract

Detection of significant transmembrane water flux immediately after cotransporter stimulation is the experimental basis for the controversial hypothesis of secondary-active water transport with a proposed stoichiometry for human Na/glucose cotransporter (SGLT1) of 2 Na⁺, 1 glucose and 260 water molecules. Volumetric measurement on *Xenopus laevis* oocytes co-expressing human SGLT1 and aquaporin (AQP1) can be used to detect with high sensitivity the presence of osmotic gradients. Creating an hypertonic extracellular solution by adding 2 mM alpha-methyl-glucose (αMG) generated a large cotransport current with minimal cell volume changes. After 20, 40 and 60 s of cotransport, return to sugar-free and iso-osmotic conditions was accompanied by a measurable cell swelling averaging 0.051, 0.061 and 0.077 nl/s. These water fluxes reveal internal hypertonicity by 1.51, 1.74 and 2.19 mOsm for the respective cotransport periods. In oocytes expressing only SGLT1, the corresponding hypertonicities can explain a large portion of cotransport-dependent water fluxes. Using intracellular Na injection and Na-selective electrode, the intracellular diffusion coefficient for Na was measured at $0.29 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$. The intracellular diffusion coefficient of αMG was estimated at $0.19 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ using the effect of intracellular αMG injection on the SGLT1-mediated outward current. The observation of intracellular diffusion coefficients that are 3 to 5 times lower than observed in a simple physiologic solution can explain, at least in part, the local osmolyte accumulation experimentally detected in the first minute following cotransport.

Keywords: Na⁺-Glucose coupled cotransport; Water pumping; Electrophysiology; Volumetry; Osmotic gradient; In vivo diffusion; Na-selective electrode; *Xenopus* oocytes.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract	iv
Table des matières.....	v
Liste des figures	vii
Liste des abréviations	viii
Liste des abréviations	viii
Remerciements	ix
Avant-propos.....	1
Chapitre I - Introduction	3
1.1- LES DIFFÉRENTS MODES DE TRANSPORT D'EAU	3
1.1.1- <i>La diffusion passive à travers les membranes lipidiques</i>	3
1.1.2- <i>Le transport de l'eau par l'intermédiaire des aquaporines</i>	5
1.1.3- <i>Le transport d'eau par l'intermédiaire des transporteurs</i>	8
1.2- L'HYPOTHÈSE DU TRANSPORT ACTIF DE L'EAU.....	9
1.2.1- <i>Le « cotransport » de l'eau.....</i>	9
1.2.2- <i>Caractéristiques fonctionnelles et structurales de SGLT1</i>	10
1.2.3- <i>Gonflement instantané suivant la stimulation</i>	13
1.2.4- <i>Effet des ions et des molécules neutres sur le gonflement</i>	14
1.2.5- <i>Perméabilité et stœchiométrie apparente</i>	17
1.2.6- <i>Transport de l'eau contre son gradient</i>	18
1.3- DIFFUSION DANS LE MILIEU CYTOSOLIQUE	19
1.3.1- <i>Modèle de diffusion employé</i>	20
1.3.2- <i>Influence de la présence des autres ions dans la mesure du coefficient de diffusion intracellulaire du sodium</i>	23
1.3.3- <i>État et compartimentation de l'eau dans un ovocyte et la répercussion sur la diffusion</i>	27
Chapitre II – Diffusion intracellulaire dans l'ovocyte de <i>Xenopus laevis</i> et l'hypothèse du cotransport d'eau	31
Chapitre III – Mesure de la diffusion du sodium intracellulaire avec la gramicidine.....	58
3.1- PRINCIPE.....	58
3.2- MATÉRIELS ET MÉTHODES	59
3.3- RÉSULTATS.....	60
Chapitre IV - Discussion.....	63

4.1- PROBLÉMATIQUE	63
4.2- RETOUR SUR L'ACCUMULATION D'OSMOLYTES	63
4.3- PROBLÈME RELIÉ À LA MESURE DU COEFFICIENT DE DIFFUSION	66
4.4- MODÉLISATION DE L'ACCUMULATION D'OSMOLYTES TRANSPORTÉS	71
4.5- CONFRONTATION ENTRE LES ARGUMENTS POUR ET CONTRE LE TRANSPORT ACTIF DE L'EAU	72
Conclusions	75
Appendice 1 : Programme pour le calcul de la diffusion	79
A.1.1- REPRODUIRE LES MESURES VOLUMÉTRIQUES PAR LA DIFFUSION	79
A.1.2- DIFFUSION DU SODIUM DANS UN OVOCYTE	89
A.1.3- DIFFUSION DE L'AMG DANS UN OVOCYTE	96
Appendice 2 : Programme de diffusion (Gramicidine)	103
Bibliographie	110

Liste des figures

Figure 1 : Image 3-D de l'aquaporine 1.....	6
Figure 2 : Schéma de l'aquaporine 1 et du site permettant le bris de la chaîne d'eau avec le motif NPA. (Murata <i>et coll.</i> , 2000).....	7
Figure 3 : L'arbre phylogénique de la famille SLC5.	11
Figure 4 : Topologie présumée de SGLT1.....	11
Figure 5 : Modélisation du gonflement lors d'une stimulation isotonique de SGLT1.	14
Figure 6 : Comparaison de l'augmentation du volume après activation du transport avec ROMK2 ou GLUT2 par rapport à hSGLT1 (Gagnon <i>et coll.</i> , 2004).	16
Figure 7 : Corrélation entre le nombre de molécules d'eau par osmolyte transporté et la perméabilité à l'eau chez les ovocytes exprimant ces cotransporteurs.	18
Figure 8 : Stimulation d'un transport d'eau contre son gradient (Meinild <i>et coll.</i> , 1998).....	19
Figure 9 : Image 3D de l'ADC dans un ovocyte.	28
Figure 10 : Modélisation de la diffusion du sodium	61
Figure 11 : Injection de 46 nl d' α MG 100 mM au centre de l'ovocyte.	68

Liste des abréviations

SGLT	Cotransporteur Na ⁺ /glucose
AQP	Aquaporine
GLUT	Transporteur facilité de glucose
CHIP28	Protéine intégrale formeuse de pore
GAT	Transporteur Na-Cl-GABA
NaDC	Transporteur Na-dicarboxylate
EAAT	Cotransporteur éna-glutamate
KCC	Cotransporteur chlore/potassium
NKCC	Symporteur chlore/potassium/sodium
MCT	Transporteur proton/monocarboxylate
SLC	Solute carrier family
SMIT	Cotransporteur sodium/myo-inositol
CHT	Transporteur choline
AIT	Transporteur iodique apical
SMVT	Transporteur de vitamine sodium dépendant
NIS	Symporteur sodium/iode
ROMK	canal potassique de médulla externe du rein
α MG	alpha-méthyl-glucose
Pz	Phlorizine
SBFI	Sodium-binding benzofuran isophthalate
PEG	Poly éthylène glycol
MTS	Réactif méthaneethiosulfonate
NPA	Motif asparagine-proline-alanine
ADC	Diffusion apparente de l'eau
D	coefficient de diffusion
V _a	Volume accessible

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier mon directeur de recherche, Jean-Yves Lapointe, qui a toujours été disponible peu importe les circonstances pour répondre aux questions que j'ai pu avoir tout au long de ma maîtrise.

Je voudrais aussi souligner la merveilleuse atmosphère qui a régné au sein du laboratoire tout au long de ma maîtrise. Francis, Yoann, Dominique, cette ambiance a été possible grâce à vous, amis et collègues. Un merci tout spécial à Bernadette qui par sa bonne humeur et ses précieux conseils techniques a su me faciliter la vie lors des manipulations. Sans toi, l'atmosphère du laboratoire n'aurait pas été le même...il n'y aurait pas Radio-Canada! Sérieusement, ce fut une véritable joie de travailler avec toi. Ensuite, un gros merci à Pierre avec qui l'on peut jaser ou demander conseil et qui se fera une joie de nous répondre tant que cela ne touche pas aux équations de physique. Merci aussi à Michel pour toutes les pièces réalisées sur mesure qui m'ont été d'une très grande aide.

Merci à mes plus vieux copains, Mike et Jean-François, qui m'ont permis de passer du bon temps et pour toutes les conversations que l'on a pu avoir.

Un gros merci à mes parents, Réal et Louise, pour leur support financier tout au long de mes études, mais surtout pour avoir toujours été là pour m'épauler. Cela va être écrit quelque part maman : « François Charron fils de Louise Allaire ». Entre nous, on se comprend. Merci à mon frère Patrick. Merci aussi à ma belle-famille, surtout Hélène (n'oublie pas VCC).

Finalement, Marie-Claude tu es la personne la plus importante à mes yeux, je voudrais te dire un gros merci pour m'endurer tous les jours. Je veux vraiment que tu saches que tout ceci aurait été impossible sans toi.

Avant-propos

Au début du siècle dernier, l'observation de cellules végétales soumises à un choc hypertonique a mené à la proposition de l'existence d'une membrane lipidique perméable entourant chaque cellule. La perméabilité à l'eau des membranes biologiques est donc une caractéristique de base des membranes qui est aussi vieille que le concept de membrane lui-même.

L'eau, source de vie. L'affirmation résume parfaitement l'importance de cette petite molécule et beaucoup d'efforts sont mis en œuvre pour comprendre sa régulation au sein du métabolisme. Nous ne serons pas surpris d'apprendre que le corps humain est constitué à 70% d'eau et qu'il est vital pour ce dernier de pouvoir en réguler ses entrées et sorties. Par exemple, le corps peut ressentir un manque d'eau et mettre en branle une cascade de réactions qui se traduit par une sensation de soif. Ce signal signifie que notre corps demande d'être hydraté. Lors de la filtration glomérulaire rénale, le tiers de l'eau contenue dans le sang qui arrive par l'artère rénale va entrer dans le système tubulaire d'où elle devra être réabsorbée. Que ce soit pour son absorption si nous la buvons ou sa réabsorption dans le rein, l'eau doit passer une grande barrière énergétique, la membrane biologique.

Cette membrane est constituée de portions moléculaires hydrophiles faisant face au solvant et d'un cœur hydrophobe fait de chaînes aliphatiques. C'est cette dernière partie qui empêche l'eau de pénétrer facilement à l'intérieur des cellules, permettant ainsi de créer une barrière significative au passage de l'eau. L'évolution a permis de mettre au point des protéines membranaires aptes à gérer finement le trafic entre deux compartiments séparés par une membrane. Ainsi, l'eau utilise aussi certaines protéines membranaires permettant d'accélérer son passage à travers la membrane, tout comme pour une majorité de molécules pouvant pénétrer dans une cellule. Cela dit, la membrane n'est pas une cloison étanche que l'eau ne peut traverser.

Le présent mémoire portera sur la confrontation de deux modes de translocation de l'eau à travers une membrane lipidique, soit l'hypothèse du transport passif de l'eau versus l'hypothèse de son transport secondairement actif. Cette partie du mémoire est largement discutée dans la section contenant mon article. Tout d'abord, un historique des différents modes de transport d'eau précédera l'article pour mieux cerner la problématique. Ensuite, nous aborderons le sujet du transport actif de l'eau pour comprendre les motifs et les arguments voulant que l'eau puisse passer la membrane en étant cotransportée. Par la suite, des explications théoriques sur le concept de diffusion intracellulaire seront présentées pour mieux comprendre le déplacement des solutés chargés ou neutres à l'intérieur du cytosol. Pour terminer, après avoir présenté l'article qui constitue le cœur de ce mémoire, des explications supplémentaires seront proposées au sujet du procédé d'analyse du coefficient de diffusion qui n'ont pu être insérées dans l'article et sur une technique additionnelle pour la mesure du coefficient de diffusion.

Chapitre I - Introduction

1.1- Les différents modes de transport d'eau

1.1.1- La diffusion passive à travers les membranes lipidiques

Comme mentionné précédemment, l'eau doit pouvoir circuler et passer à travers une membrane pour être absorbée ou intégrée au métabolisme. La portion lipidique de la membrane n'est pas parfaitement imperméable et l'eau peut généralement réussir à la traverser. Ce phénomène est reconnu comme de la simple diffusion passive. Expérimentalement, le flux d'eau peut être observé en mesurant le volume d'une cellule soumise à un choc osmotique. Comme pour un soluté quelconque, le flux d'eau du compartiment 1 vers le compartiment 2 (J_{1-2}) sera considéré proportionnel à son gradient de concentration (w_1-w_2) et la constante de proportionnalité est appelée perméabilité à l'eau (P_f).

$$J_{1-2} = P_f \times (w_1 - w_2) \quad (1)$$

Si J_{1-2} est en $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ et que le gradient de concentration est en $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$, les unités de P_f sont des $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$. La concentration de l'eau (55M) étant très élevée par rapport à la concentration des solutés, nous préférons utiliser cette dernière pour exprimer w_1-w_2 . Cette transformation classique (Andreoli *et coll.*, 1980) conduit directement à la définition de la pression osmotique ($\pi = RTC$) (van't Hoff, 1877) en fonction de la concentration (C) des solutés. En multipliant le flux J_{1-2} par le volume molaire spécifique de l'eau ($\bar{v}_w = 18 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$), nous obtenons une expression pour le flux de volume (J_{v1-2}) en fonction du gradient de pression osmotique :

$$J_{v1-2} = J_{1-2} \times \bar{v}_w = \frac{P_f \cdot \bar{v}_w}{RT} \times (\pi_2 - \pi_1) \quad (2)$$

où R est la constante des gaz parfaits et T la température.

D'autre part, l'avènement de molécules d'eau marquée isotopiquement (l'eau lourde ou tritiée) dans les années 1930 a conduit à la mesure de la perméabilité à l'eau en absence de gradient osmotique. Dans ce cas, nous mesurons le flux d'eau marquée et comme tout traceur sa diffusion suit la loi de Fick (Fick, 1855) :

$$J_{1-2}^* = -D_w \frac{dC_w^*}{dx} \quad (3)$$

où J_{1-2}^* est le flux d'eau marquée en $\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, D_w le coefficient de diffusion de l'eau à travers la membrane en $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et dC_w^*/dx le gradient de concentration d'eau marquée à travers la membrane. L'intégration de la loi de Fick sur l'épaisseur de la membrane permet d'obtenir une autre forme pour le flux :

$$J_{1-2}^* = P_d \Delta C_w^* \quad (4)$$

où P_d est la perméabilité par diffusion de l'eau. Par conséquent, deux formes de perméabilités peuvent être mesurées dépendamment de la présence d'un gradient osmotique ou d'un gradient d'eau marquée. Si les molécules d'eau diffusent de façon indépendante, la valeur de P_f devrait égaler celle de P_d puisqu'il s'agit dans les deux cas de la diffusion entraînée par un gradient de concentration d'eau (qu'il s'agisse d'eau totale ou d'eau marquée). Un canal à eau à file simple (Zhu *et coll.*, 2004) est un canal spécifique à l'eau où les molécules doivent traverser à la file indienne. La longueur de cette file dépend du nombre de site disponible pour interagir avec les molécules d'eau. Dans ces conditions, les molécules d'eau ne diffusent pas de façon indépendante. Le nombre « n » de sites diminue grandement la capacité de l'eau à diffuser (donc le P_d) puisqu'une molécule marquée doit faire n sauts dans la même direction afin de traverser la membrane. En présence d'un gradient osmotique, il existe un

flux net d'eau dans une direction privilégiée qui génère en quelque sorte un effet d'entraînement « de l'eau sur l'eau » et favorise une grande valeur de P_f . Le traitement mathématique de cette situation révèle que le rapport P_f/P_d permet d'obtenir le nombre de saut que la molécule d'eau doit effectuer pour passer à travers le canal (Finkelstein, 1987).

1.1.2- Le transport de l'eau par l'intermédiaire des aquaporines

L'existence des canaux à eau avait été pressentie bien avant leur identification par Agre en 1991 (Preston et Agre, 1991). En effet, quatre raisons distinctes suggéraient la présence d'un type de transport différent de la simple diffusion à travers les lipides membranaires. Premièrement, le transport de l'eau est plus rapide à travers la membrane que le prédit la théorie de la simple diffusion. Deuxièmement, l'énergie d'activation du transport transmembranaire de l'eau est basse (Vieira *et coll.*, 1970). Troisièmement, les rapports P_f sur P_d sont souvent plus grands que 1 (Paganelli et Solomon, 1957). Quatrièmement, il était possible d'inhiber pharmacologiquement une portion du flux d'eau à travers certaines membranes plasmiques (Macey et Farmer, 1970). C'est seulement en 1989 qu'on démontre précisément que l'eau peut bel et bien passer par une protéine membranaire. Curieusement, il ne s'agit pas de l'aquaporine, mais un transporteur sélectif au glucose (GLUT1) (Fischbarg *et coll.*, 1989). Cependant, cette faculté pour GLUT1 de laisser passer l'eau ne peut pas expliquer tous les flux d'eau rencontrés dans les différents types de cellules constituant un organisme, car certaines cellules sont aptes à créer des flux beaucoup plus importants que ne le permettrait GLUT1.

En 1991, une protéine membranaire baptisée CHIP28 (protéine intégrale formeuse de pore) est enfin isolée et pourrait avoir ce rôle tant recherché depuis des décennies (Preston et Agre, 1991), soit un canal spécifique pour le passage passif de l'eau. Un an plus tard, les soupçons sont confirmés en identifiant le rôle de CHIP28 dans des ovocytes de grenouille (Preston *et coll.*, 1992) : il s'agit bel

et bien d'un canal à eau. La découverte que d'autres protéines pouvaient faciliter le déplacement rapide et sélectif de l'eau a conduit à l'appellation d'aquaporine pour ce type de protéine (Agre *et coll.*, 1993). Aujourd'hui, les aquaporines forment une famille de 10 membres (AQP1-10) qui se partagent une structure primaire similaire et la propriété d'être perméable à l'eau et/ou au glycérol.

En 2000, la première structure cristalline de l'aquaporine a été dévoilée (Murata *et coll.*, 2000) avec une résolution de 3.5Å (fig. 1). Nous constatons que l'aquaporine forme une structure bien ordonnée. Le pore permettant à l'eau de traverser est fait de 6 hélices alpha traversant la membrane complètement et de 2 hélices alpha la traversant que partiellement. Naturellement, la surface des hélices alpha faisant face aux chaînes aliphatiques des lipides membranaires est plutôt hydrophobe. Curieusement, le pore de l'aquaporine 1 (AQP1) est aussi

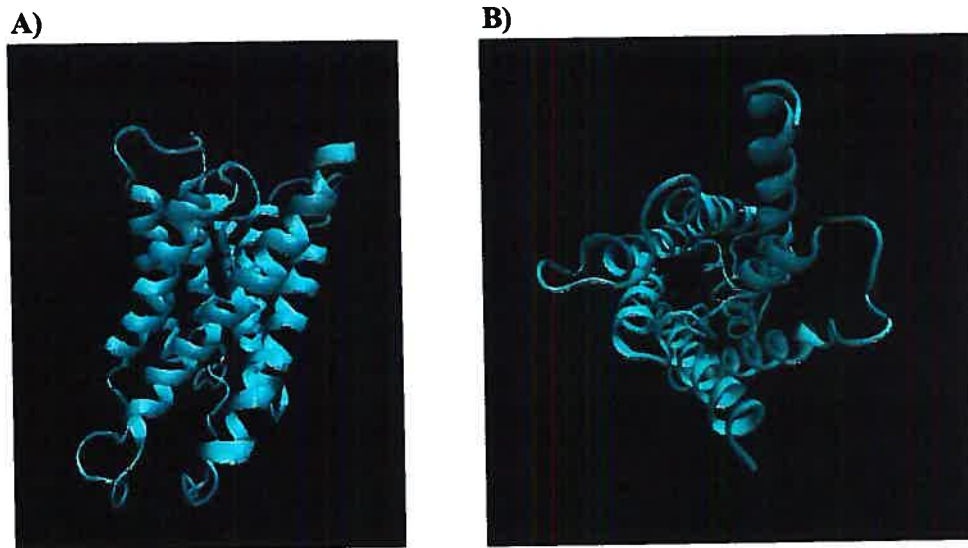


Figure 1 : Image 3-D de l'aquaporine 1.

A) Vue de profil par rapport à la membrane, nous permettant de constater que la partie membranaire est formée d'une série d'hélices alpha. B) Vue du cytoplasme, nous permettant de constater le trou servant de canal et les extrémités N- et C-terminal.

relativement hydrophobe. Ainsi les chaînes latérales de la protéine n'interagissent pratiquement pas avec l'eau se trouvant dans le pore et

permettent un passage rapide de l'eau à travers ce dernier (Ren *et coll.*, 2001). On croit cependant que les carbonyles de la chaîne peptidique permettrait la stabilisation

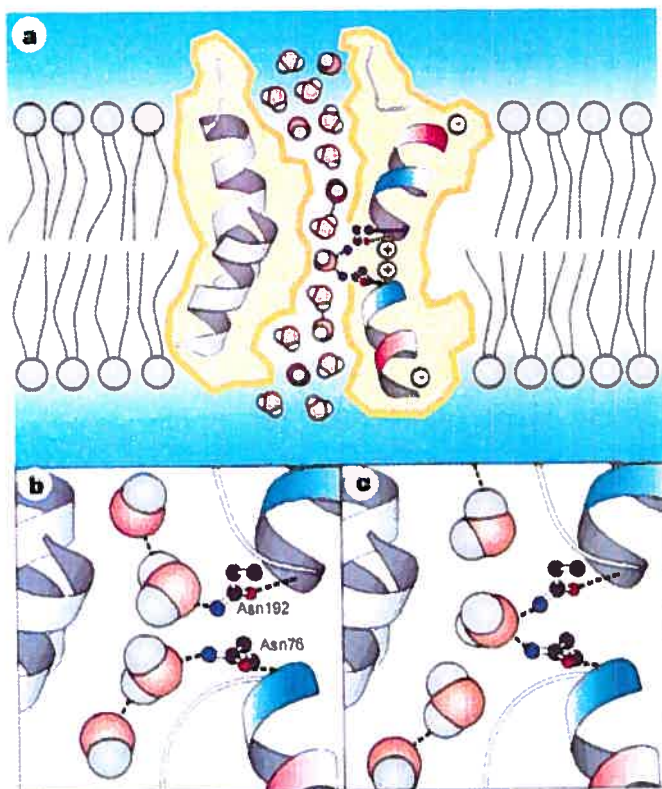


Figure 2 : Schéma de l'aquaporine 1 et du site permettant le bris de la chaîne d'eau avec le motif NPA. (Murata *et coll.*, 2000)

A) Vue de profil du canal de l'AQP1 permettant à l'eau de traverser la membrane. On peut observer l'étranglement au centre du canal permettant le passage de l'eau à la file indienne. B) Agrandissement du site permettant le bris de la chaîne d'eau pour ainsi empêcher la conduction de proton. Nous pouvons observer les asparagines provenant de chacun des motifs NPA de l'AQP1. Dans ce cas, chacune des asparagines interagit avec une molécule d'eau différente et les oriente pour empêcher la formation d'un pont hydrogène entre eux et ainsi couper la conduction de proton. C) Les molécules d'eau se sont déplacées par rapport à B et maintenant les deux asparagines interagissent avec une seule molécule d'eau tout en orientant celle-ci pour ne pas qu'elle forme, encore une fois, un pont hydrogène.

des molécules d'eau dans le pore (Law et Sansom, 2004). De plus, l'aquaporine possède un étranglement dans le pore près de l'extrémité extracellulaire et un motif Asparagine-Proline-Alanine (NPA) au centre servant de filtre de sélectivité pour l'eau (Fig. 2). Comme une chaîne d'eau continue permettrait une conduction indésirable des protons, l'AQP1 utilise l'interaction avec le motif NPA pour briser cette chaîne et interrompre la ligne d'eau. Par conséquent, un proton ne peut pas traverser complètement l'AQP1, car un bris de la continuité de l'alignement des dipôles de l'eau dans la chaîne empêche les protons de sauter d'une molécule d'eau à l'autre au niveau du motif NPA. Cela permet, par exemple, d'avoir une perméabilité à l'eau de $40 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ (Zeuthen et Klaerke, 1999) dans un ovocyte injecté avec AQP1, un facteur ~ 20 fois plus grand qu'un ovocyte non-injecté sans augmenter significativement la perméabilité aux protons.

1.1.3- Le transport d'eau par l'intermédiaire des transporteurs

Il s'est avéré que l'aquaporine n'était pas la seule protéine perméable à l'eau, car la régulation de l'eau semble encore plus complexe qu'il n'y paraît. Comme mentionné précédemment, on avait déjà découvert une protéine avant l'aquaporine, GLUT1, dont le rôle était le transport facilité du glucose et qui s'est avérée perméable à l'eau. Depuis, d'autres candidats se sont ajoutés sur la liste des protéines pouvant laisser passer de l'eau de façon passive.

Le protocole utilisé pour détecter la présence d'une perméabilité à l'eau dans un cotransporteur exprimé dans un ovocyte est d'appliquer un choc hypertonique de quelques mOsm et de comparer cette perméabilité à celle d'un ovocyte non-injecté. De cette manière, plusieurs cotransporteurs se sont révélés aptes à augmenter la perméabilité à l'eau dans les membranes qui les exprimaient. Il s'agit du cotransporteur Na-glucose (SGLT1), Na-Cl-GABA (GAT1), cotransporteur Na-dicarboxylate (NaDC1), cotransporteur Na-glutamate (EAAT1) (Loo *et coll.*, 1999; MacAulay *et coll.*, 2002). L'augmentation de la perméabilité dans les membranes d'ovocyte est de l'ordre de grandeur de

GLUT1, soit ~2-3 fois la perméabilité de base de la membrane. Une question reste : quelle est l'utilité physiologique d'avoir des cotransporteurs ayant la possibilité de laisser passer passivement l'eau à travers la membrane? Est-ce une propriété « accidentelle » qui vient de la difficulté à faire une protéine membranaire « étanche » ou est-ce une propriété physiologique qui a été sélectionnée par le processus évolutif pour une raison précise? Pour l'instant, cette question reste sans réponse, car notre compréhension de la régulation du transport de l'eau n'est pas encore assez bonne, sauf que nous pouvons imaginer qu'il s'avère utile d'avoir plusieurs voies pour permettre une régulation fine de cette fonction.

1.2- L'hypothèse du transport actif de l'eau

1.2.1- Le « cotransport » de l'eau

Les voies décrites précédemment pour expliquer le passage de l'eau à travers la membrane font appel à la diffusion passive, sans exception. Cependant, certain transport semble défier l'hypothèse du transport d'eau exclusivement passif. C'est le cas du rein et de sa réabsorption isosmotique. En effet, au niveau du tubule proximal, il y a un grand transport d'eau en absence de tout gradient osmotique mesurable. Plusieurs interprétations ont été proposées au fil des temps telles que l'hypotonie lumenale qui serait trop petite pour être détectée (Andreoli et Schafer, 1978), la formation d'un gradient osmotique dans la voie paracellulaire permettant le passage de l'eau du côté lumenal au côté basolatéral (Sackin et Boulpaep, 1975) et un modèle, plus récent et plus complexe, de recirculation du sodium pour un transport isotonique (Larsen *et coll.*, 2000). En 1991, une autre interprétation vit le jour et les premiers résultats supportant l'hypothèse du cotransport actif d'eau selon un ratio précis furent présentés avec le cotransporteur de K-Cl (Zeuthen, 1991a, b). La controverse a véritablement débuté en 1996 lorsque l'idée du transport d'eau secondairement actif fut étendue au cotransporteur SGLT1 avec un ratio de 2 Na, 1 glucose et ~260

molécules d'eau par cycle de transport (Loo *et coll.*, 1996). Depuis, il semble que plusieurs autres cotransporteurs auraient cette capacité de pouvoir « pomper » l'eau. Il s'agit, entre autres, du cotransporteur chlore/potassium (KCC, ~500 molécules d'eau par paire d'ion), le symporteur sodium/potassium/chlore (NKCC1), le transporteur proton/monocarboxylate (MCT1, ~500 molécules d'eau par cycle), le transporteur sodium/glutamate (EAAT1, ~425 molécules d'eau par cycle) et le transporteur GABA (GAT-1, ~330 molécules d'eau par cycle) (MacAulay *et coll.*, 2004).

Bien que cette hypothèse soit qualifiée de « généralement acceptée » pour certains, il en est tout autrement pour d'autres. En effet, des doutes raisonnables persistent quant au fait que le transport actif d'eau existe, du moins pour SGLT1. Par conséquent, des arguments pour et contre la validité du transport secondairement actif de l'eau commencèrent à s'affronter et seront présentés à la section 1.2.3 à 1.2.6.

1.2.2- Caractéristiques fonctionnelles et structurales de SGLT1

Après analyse de sa séquence, nous remarquons que SGLT1 fait partie d'une famille du nom de SLC5 (solute carrier family). Nous pouvons visualiser les autres membres de cette famille avec l'arbre phylogénique de SGLT1 (fig 3). Ce transporteur utilise le gradient de sodium pour cotransporter le glucose contre son propre gradient de concentration à l'intérieur de la cellule selon un ratio de 2 pour 1 respectivement. Il s'agit donc d'un transporteur électrogénique et il est ainsi possible d'utiliser l'électrophysiologie pour en mesurer le cotransport. De plus, le glucose peut être remplacé par l'alpha-méthyl-glucose (α MG) qui possède une affinité semblable au glucose tout en étant non-métabolisable, ce qui permet de dissocier les activités de transport du métabolisme. SGLT1 est également très sensible à l'inhibiteur phlorizine (Pz) avec une affinité de 0.2 μ M (Bissonnette *et coll.*, 1999).

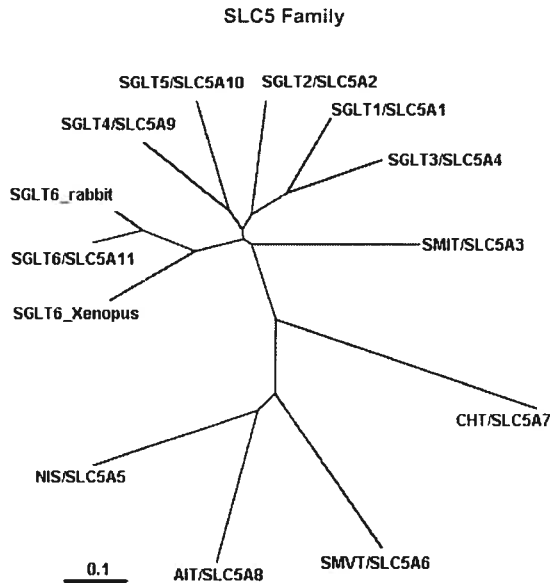


Figure 3 : L'arbre phylogénique de la famille SLC5.

Arbre phylogénique de la famille SLC5 provenant de (Wright et Turk, 2004). Cette famille comprend les SGLT, SMIT (cotransporteur sodium/myo-inositol), CHT (transporteur choline), AIT (transporteur iodique apical) qui a été récemment reconnu comme un transporteur Na/monocarboxylate (SMCT) (Coady *et coll.*, 2004), SMVT (transporteur sodium-dépendant de vitamine) et NIS (symporteur sodium/iode).

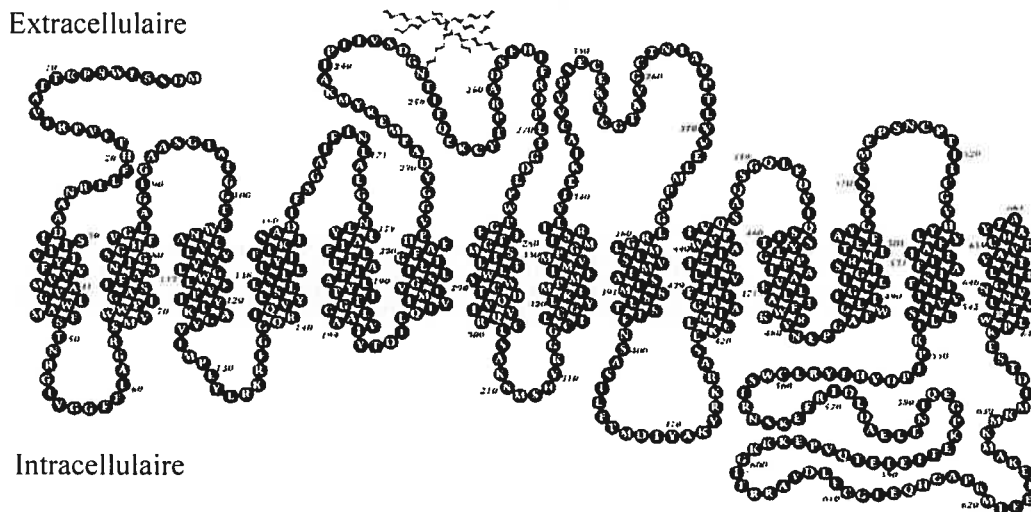


Figure 4 : Topologie présumée de SGLT1.

Nous remarquons que SGLT1 contient 14 segments transmembranaires avec les extrémités C- et N-terminales extracellulaires. De plus, la boucle entre le segment VI et VII est toujours glycosylée (Turk et Wright, 1997).

Le site précis d'interaction du sodium et du glucose dans SGLT1 n'est pas encore connu du fait que la structure 3D de SGLT1 n'a pas encore été obtenue. Pour l'instant, la structure putative est une protéine possédant 14 segments transmembranaires avec les extrémités C- et N-terminales extracellulaires. Cette information a été obtenue à l'aide d'une analyse d'hydrophobicité de la séquence en acides aminés et par l'observation de l'état de glycosylation de SGLT1 lorsqu'un site exogène de glycosylation est introduit à différents endroits dans la protéine. La topologie membranaire découlant de ces études se retrouve à la figure 4.

Tel qu'indiqué à la figure 4, la seule certitude que nous ayons sur la structure de SGLT1 est que la troisième boucle se trouve glycosylée. Par contre, il ne semble pas y avoir de consensus autour de l'état d'oligomérisation du transporteur fonctionnel. De plus, la boucle entre le segment XIII et XIV ne semble pas complètement intracellulaire, car une portion de celle-ci semble clairement accessible de l'extérieur (Gagnon *et coll.*, 2005).

Au niveau fonctionnel, cette protéine possède une perméabilité à l'eau intrinsèque qui permet, par exemple, d'augmenter la perméabilité à l'eau des membranes d'ovocytes où SGLT1 est exprimé. Cette perméabilité s'élève à $3,8 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ (Duquette *et coll.*, 2001), soit une perméabilité deux fois plus grande que celle d'un ovocyte non-injecté. Par contre, nous ne connaissons pas encore le niveau de couplage qu'il y a entre cette perméabilité et le mécanisme de cotransport de SGLT1. L'unique chose qui est connue est que si nous inhibons SGLT1 avec la phlorizine, la perméabilité à l'eau de l'ovocyte revient à un niveau identique à celui d'un ovocyte non-injecté. Par conséquent, la phlorizine peut bloquer la perméabilité à l'eau suggérant une certaine proximité entre les voies de passage de l'eau et celle du glucose. Il est intéressant de remarquer que ce phénomène a aussi été observé pour d'autres cotransporteurs, voir la section 1.1.3.

1.2.3- Gonflement instantané suivant la stimulation

Le premier argument avancé en faveur du transport actif de l'eau avec SGLT1 est que l'augmentation de volume semble suivre la quantité de charges transportées suite à l'activation de SGLT1 (Zeuthen *et coll.*, 1997). Pour y arriver, les auteurs remplacent isotoniqument le mannitol par du α MG, provoquant ainsi un gonflement immédiat lors de l'apparition du courant. Ils argumentent que, comme un gradient osmotique prend du temps à s'établir, il faut que le transport de l'eau soit engendré directement par le transporteur lui-même. Pour arriver à un rapport stœchiométrique entre le nombre de molécules d'eau associées au transport d'une molécule de glucose, les auteurs intègrent le courant pour obtenir la quantité d'ions Na^+ transportés et le traduire en nombre de molécules de glucose (une stœchiométrie de transport de $2\text{Na}^+/1\text{glucose}$), puis compare ce nombre au nombre de molécules d'eau nécessaires pour expliquer le gonflement observé. Ce procédé permet de conclure que, en moyenne, SGLT1 cotransporte $\sim 200\text{-}300$ molécules d'eau par molécule de glucose. Cette expérience a été reprise dans notre laboratoire et nous pouvons aussi observer ce gonflement soudain. Cependant, nous ne croyons pas que la méthode qu'ils emploient pour obtenir le taux de gonflement soit la meilleure, car elle nécessite de faire une régression sur une très petite portion de courbe (par exemple, les 20 premières secondes de cotransport). Ceci est dû au fait qu'il n'est pas rare d'observer une augmentation spontanée du volume de l'ovocyte lors d'un changement de solution. Il s'agirait d'un effet optique ou d'un déplacement de l'ovocyte lors d'un changement de solution qui donneraient l'illusion d'une augmentation ou une diminution de volume. Par conséquent, nous préférons utiliser un plus long intervalle de temps pour mieux connaître la tendance du gonflement. Pour ce faire, nous remplaçons isotoniqument du mannitol par de l' α MG et nous attendons que le gonflement soit en état stationnaire. Ensuite, nous arrêtons SGLT1 en imposant un voltage de 0mV et nous continuons la mesure sur $\sim 120\text{s}$ pour détecter le flux d'eau créé par l'accumulation d'osmolytes sous la membrane lors du transport (Duquette *et coll.*, 2001). Avec cette technique, nous

mesurons sur une plus longue période de temps le comportement du volume. Si le gonflement initial peut en effet être considéré proportionnel au transport de glucose avec une stœchiométrie apparente de 200-300 molécules d'eau par glucose (pointillé, fig. 5), il en va tout autrement lorsque le cotransport est rapidement diminué par une dépolarisation. Par contre, un modèle numérique simulant l'entrée et une lente diffusion d'osmolytes dans un ovocyte peut adéquatement reproduire l'ensemble de l'expérience (droite lisse, fig. 5). Ce modèle permet donc d'expliquer le gonflement observé par la formation d'un gradient osmotique local suite au transport de Na et de glucose et présence d'une lente diffusion intracellulaire.

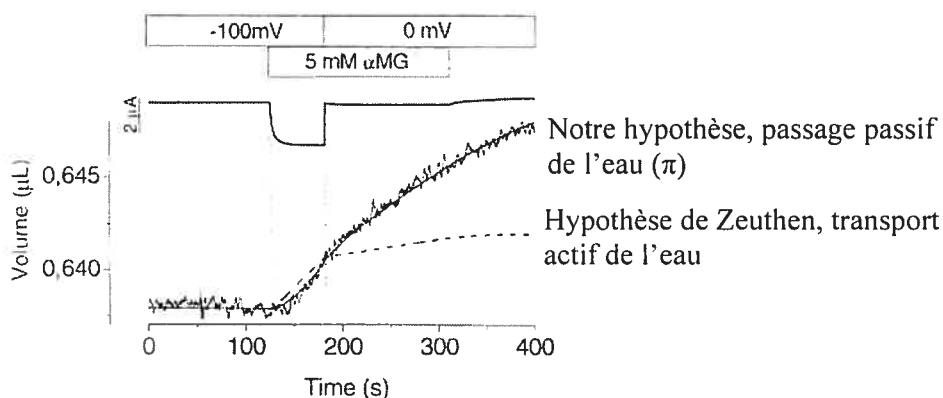


Figure 5 : Modélisation du gonflement lors d'une stimulation isotonique de SGLT1.

Un potentiel de -100 mV est imposé à un ovocyte perfusé avec une solution saline. Une solution contenant 5 mM d' α MG est perfusée isotoniqument au temps $t=120$ s. Lorsque le gonflement devient stationnaire, un potentiel de 0 mV est imposé. Nous remarquons que le modèle n'utilisant que le passage passif de l'eau à travers la membrane permet d'expliquer le gonflement une fois la stimulation arrêtée tandis que le modèle du transport actif de l'eau est incapable de modéliser cette portion de l'expérience (Duquette *et coll.*, 2001).

1.2.4- Effet des ions et des molécules neutres sur le gonflement

Le deuxième argument utilisé pour supporter la présence d'un transport actif de l'eau est qu'un influx cationique passant par un ionophore comme la gramicidine ne peut reproduire le gonflement initial observé après la stimulation d'un courant

de cotransport d'amplitude comparable. Dans le cas, de l'ionophore, il faut quelques dizaines de secondes pour observer la moindre augmentation de volume (Zeuthen *et coll.*, 1997; Meinild *et coll.*, 1998). À première vue, cet argument expérimental semble inattaquable, mais revenons à SGLT1. Il est important de bien saisir qu'il y a de grandes différences entre un ion et une molécule neutre entrant dans l'ovocyte. Par conséquent, SGLT1 ne fait pas entrer uniquement des ions (Na^+) comme la gramicidine, mais aussi une molécule neutre (αMG). Il y a fort à parier qu'une molécule neutre entrant dans l'ovocyte n'ira pas se loger au même endroit qu'une molécule chargée. Ainsi, une molécule neutre s'accumulera sous la membrane et diffusera vers le centre de l'ovocyte. Par contre, l'ion entrant dans le cytoplasme sera forcément accompagné d'un déplacement ionique au niveau de l'électrode de courant qui sert à maintenir l'électroneutralité et, donc, le potentiel membranaire constant. Par exemple, si un ion Na^+ traverse la membrane cellulaire et qu'un ion Cl^- est injecté par l'électrode de courant, il y aura un gain net de 2 osmolytes mais à quel endroit l'osmolarité augmentera-t-elle? Ce qui arrive est que les nouveaux ions présents dans la cellule seront rapidement neutralisés par un déplacement de charge intracellulaire. Si les cations (surtout du K^+) sont plus mobiles que les anions (des protéines chargées), un déplacement de cations s'éloignant du Na^+ et se rapprochant du Cl^- nouvellement entré viendra rétablir l'électroneutralité. Dans cet exemple, c'est près de l'électrode de courant qu'augmentera l'osmolarité. Si les anions étaient plus mobiles que les cations intracellulaires, c'est au niveau de la membrane que l'osmolarité augmenterait. On conçoit donc que le transport d'un ion à travers la membrane plasmique puisse avoir des effets osmotiques bien différents de ceux dû au transport d'une molécule neutre. Des tests ont été réalisés dans notre laboratoire pour comparer les effets d'un transport ionique aux effets d'un transport de substrats neutres (Gagnon *et coll.*, 2004). Le canal potassique de la médulla externe du rein (ROMK2) a été utilisé pour reproduire le résultat obtenu avec la gramicidine et la même conclusion pouvait être tirée, soit que l'entrée d'ions ne provoque pas de gonflement rapide (i.e. dans les premières 30 s). Cependant, la conclusion est tout autre lorsque

nous exprimons GLUT2 puisque la stimulation de ce transporteur avec du glucose provoque un gonflement très rapide (fig. 6). Ainsi, le transport de molécules neutres comme le 2-déoxyglucose (2DG) semble compter pour le gonflement initial tandis que le transport des cations produit un effet sur le

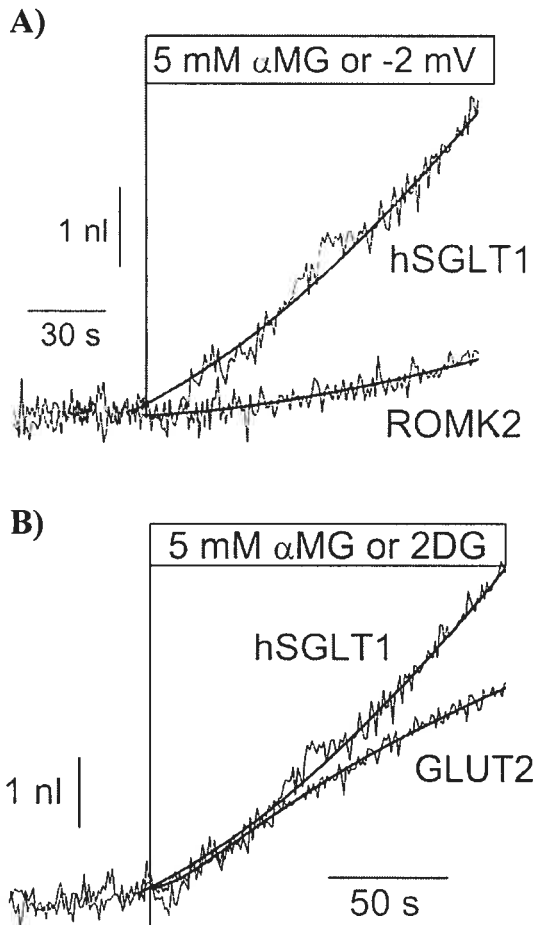


Figure 6 : Comparaison de l'augmentation du volume après activation du transport avec ROMK2 ou GLUT2 par rapport à hSGLT1 (Gagnon *et coll.*, 2004).

A) Les auteurs de cette article ont activé hSGLT1 en ajoutant 5 mM α MG en imposant un potentiel de -50 mV tandis qu'un potentiel plus négatif de 2 mV par rapport au potentiel de repos est utilisé dans le cas de ROMK2. Nous observons aisément que le gonflement engendré par l'activation de ROMK2 nécessite 30s tandis que celui provoqué par hSGLT1 est nettement plus rapide. B) hSGLT1 est activé de la même façon que précédemment tandis que 5 mM de 2-déoxyglucose (2DG) est employé pour GLUT2 en n'imposant aucun potentiel. Nous remarquons, cette fois, un gonflement rapide après l'activation de GLUT2 comme pour hSGLT1.

volume cellulaire qui est un peu différé dans le temps. Ceci nous amène à suggérer que, pour SGLT1, le gonflement initial est surtout engendré par l'accumulation d' α MG tandis que le gonflement observé à l'état stationnaire est dû à l'ensemble des solutés transportés.

1.2.5- Perméabilité et stœchiométrie apparente

Le troisième argument porte sur le nombre de molécules d'eau par cycle de transport qui change considérablement d'un cotransporteur à l'autre : 210 pour hSGLT1 (Meinild *et coll.*, 1998), 50 pour cotransporteur H/acide aminé (Loo *et coll.*, 1996) et 424 pour rSGLT1 (Loo *et coll.*, 2002). L'argument avancé est que si le flux d'eau dépend uniquement de l'accumulation des osmolytes cotransportés, alors, un courant similaire dû au transport actif d'osmolytes devrait engendrer un flux d'eau transmembranaire similaire. Comme nous observons des flux d'eau variant d'un cotransporteur à un autre pour des courants de transports similaires, le transport passif de l'eau ne peut être le mécanisme opérant. Cette argument révélerait la stœchiométrie de chacun des transporteurs pour l'eau. Cependant, il est remarquable de constater que le nombre apparent de molécules d'eau cotransportées par osmolyte semble croître avec l'augmentation de la perméabilité à l'eau induite par les cotransporteurs. Comme en fait foi la figure 7, une relation linéaire semble lier ces deux entités.

En observant la figure 7, il nous semble intuitif que si la perméabilité à l'eau est plus grande, du même coup il y aurait plus d'eau qui pourrait entrer passivement pour diluer les osmolytes cotransportés pour un intervalle de temps donné. Par conséquent, que ce ratio change selon le transporteur ne signifie pas automatiquement qu'un passage passif de l'eau ne puisse pas l'expliquer.

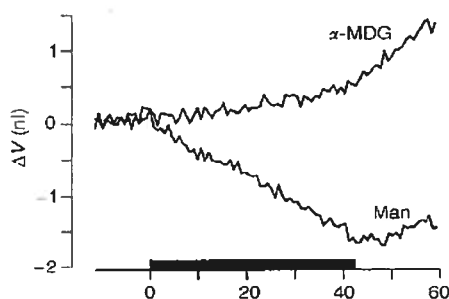


Figure 8 : Stimulation d'un transport d'eau contre son gradient (Meinild *et coll.*, 1998).

10 mOsm d' α MG est appliqué pendant 40 secondes et nous n'observons aucun effet osmotique immédiat (contrairement à 10 mM mannitol) comme si le cotransport d'eau balançait l'hypertonie extracellulaire.

Les auteurs concluent que le cotransport actif d'eau compense exactement les pertes d'eau dues à l'hypertonie de la solution externe. Cette conclusion a été contestée par Lapointe et al (Lapointe *et coll.*, 2002) qui argumentent que le transport d'eau associé à un choc hypertonique est simplement additif au transport d'eau associé à l'activation du cotransporteur. Si un choc hypertonique tend à faire sortir l'eau de l'ovocyte, l'activation du cotransporteur tend à créer un gradient osmotique local qui contrebalance cet effet. Cependant, un phénomène qui est présent dans la figure 8 a servi de base au projet décrit dans ce mémoire et constitue en fait une preuve qu'un gradient osmotique local est bel et bien présent après 40 s de cotransport.

1.3- Diffusion dans le milieu cytosolique

Dans l'article qui suit ce chapitre, nous faisons entrer des osmolytes dans l'ovocyte à l'aide de SGLT1. Il semble que les osmolytes ne sont pas rapidement distribués dans tout le volume disponible d'un ovocyte et qu'ils diffusent plutôt lentement par rapport à ce qui se passerait dans une solution aqueuse ordinaire. La démonstration d'un coefficient de diffusion faible permettrait d'appuyer l'hypothèse qu'une accumulation près de la membrane est possible, expliquant du même coup ces grands flux d'eau observés dans les premières secondes

suivant la stimulation de SGLT1. Pour permettre ce genre d'analyse, il a fallu utiliser un modèle mathématique qui pouvait correctement représenter ce qui se passe dans un ovocyte et qui contenait une variable servant à fixer le coefficient de diffusion pour reproduire le déplacement des osmolytes dans les ovocytes. Le modèle utilisé est discuté dans la sous-section suivante et tous les détails se retrouvent en annexe.

De plus, lors de la mesure du coefficient de diffusion d'un ion dans un milieu aussi complexe que le cytosol, il est important de quantifier l'influence des autres ions sur la mesure que nous faisons. Pour y arriver, nous allons appliquer l'équation de Nernst-Planck aux conditions qui prévalent dans le cytosol d'un ovocyte.

1.3.1- Modèle de diffusion employé

Ce qui simplifie énormément les calculs dans le protocole utilisé pour la diffusion, c'est que nous pouvons supposer que la diffusion dans un ovocyte est radiale (symétrie sphérique). Des solutions analytiques pour décrire la diffusion dans une géométrie sphérique ont déjà été publiées dans des livres spécialisés (Crank, 1975) mais leur utilisation comporte un certain nombre d'inconvénients. Premièrement, pour être résolue analytiquement, on a dû fixer des conditions limites particulières au système d'équations décrivant la diffusion en symétrie sphérique. Ainsi, les conditions limites pour l'une des solutions est que la concentration, au temps 0, à l'intérieur de la sphère est nulle et tout au long de la diffusion la concentration extérieur à la sphère reste constante. Une autre solution utilise une concentration variable à l'extérieur de la sphère avec une concentration nulle dans la sphère au temps 0. Cependant, la condition limite qui s'appliquerait à l'expérience que nous réalisons serait plutôt un taux d'entrée constant dans la sphère où les osmolytes peuvent diffuser par la suite. Deuxièmement, ces solutions analytiques s'écrivent à l'aide de sommation infinie, ce qui implique que lors de calcul nous devrions, de toute façon, avoir

qu'une approximation du résultat, car le résultat obtenu sera aussi précis que le nombre de termes de la sommation que nous voudrions garder pour le calcul. Troisièmement, la plus grosse lacune de ces solutions analytiques est leur résolution temporelle et spatiale. Ainsi, le résultat obtenu après calcul est la concentration pour un temps et un rayon donnés. Ainsi, il faudrait faire plusieurs fois le calcul pour obtenir la concentration pour un intervalle de temps et pour tout le volume d'un ovocyte, du centre jusqu'à son rayon. Par conséquent, le calcul exacte du bon coefficient de diffusion deviendrait rapidement très lourd et plusieurs calculs seraient nécessaire pour parvenir à un résultat.

Après avoir tenté de trouver, sans succès, une solution analytique à notre problème, nous avons opté pour une simulation numérique de la diffusion radiale dans un ovocyte en créant un programme où un ovocyte virtuel est divisé en plusieurs couches de volume égal. Ensuite, nous utilisons l'équation de Fick pour distribuer ces osmolytes dans chacune des couches selon un certain coefficient de diffusion. Le but est de pouvoir recréer virtuellement la courbe acquise expérimentalement. Pour les expériences utilisant l'électrophysiologie, un ovocyte virtuel de volume donné est divisé en coquille concentrique avec une épaisseur de 8.5 à 133.7 μm où chacune des coquilles possède un volume de 40 nl. Une fraction de ce volume est considérée comme accessible à l'eau et aux osmolytes. Un seul osmolyte est étudié lors d'une expérience et sa concentration est fixée à 200 mOsm pour chacune des coquilles (C_i) au temps $t=0$. L'uptake d'osmolytes pour la coquille la plus externe (C_1) est calculé, pour chaque incrément de temps (dt) de 0.02s, à partir de la quantité de charge transportée par la mesure du courant de cotransport (I) comme suit :

$$dOsm = \frac{I \times dt}{F} \times opc \quad (5)$$

où $dOsm$ est le nombre de mol d'osmolyte transporté du bain vers la première coquille pendant l'incrément de temps dt , F est la constante de Faraday et opc

est le nombre net d'osmolyte par charge transportée lesquelles entrent dans l'ovocyte par la membrane ou par l'électrode de courant. Lorsque nous utilisons un transport purement ionique généré par un canal potassique (ROMK2), le type d'électrode de courant utilisé génère 0,65 osmolyte par K^+ entrant dans l'ovocyte. Cela indique que, dans le cas de SGLT1, chaque Na^+ entrant dans l'ovocyte est accompagné par 0,65 osmolyte et 0,5 molécule de glucose qui donne un opc de 1,15. Cela permet de calculer un nouveau C_1 pour $t=0+dt$. Ensuite, nous permettons à la diffusion d'avoir lieu entre les autres couches consécutives en utilisant la première loi de Fick :

$$J_{i,i+1} = D \frac{(C_i - C_{i+1})}{(r_i - r_{i+1})} \quad (6)$$

où $J_{i,i+1}$ est le flux d'osmolyte de la couche i à la couche $i+1$, D est le coefficient de diffusion de l'osmolyte et r_i est le rayon de la couche i . Ce flux est utilisé pour calculer l'uptake dans chacune des couches et le nouveau C_i . Finalement, le nouveau C_i est utilisé pour calculer le transport de l'eau à travers la membrane plasmique en utilisant l'équation 2. Ce type de programme a été utilisé lorsque l'entrée de soluté est donnée par un courant de cotransport. Il nécessite l'ajustement de deux paramètres : le coefficient de diffusion intracellulaire (D) et le volume accessible (V_a).

Un programme similaire a été utilisé pour modéliser la diffusion d'un osmolyte quand il est injecté au centre d'un ovocyte et que nous détectons sa concentration à la périphérie de la membrane. La première hypothèse que nous posons est que la diffusion se fait de façon sphérique. Dans ce dernier cas, le courant de cotransport est fixé à 0 pendant tout le temps de modélisation et aucune molécule d'eau passe à travers la membrane. Les valeurs de D et V_a sont encore une fois les seules variables ajustables permettant un lissage de la courbe. Par conséquent, dans les deux cas, le programme permet d'obtenir l'évolution du profil de concentration d'un osmolyte en fonction du temps.

Les limites du programme, dans chacun des cas, résident dans le choix du volume des couches et les incréments de temps. Ces deux facteurs influencent directement le temps de calcul du programme. Ainsi, si le volume des couches est fixé à une plus petite valeur, cela permettrait une plus grande résolution spatiale, alors le nombre de couches augmentera et l'ordinateur devra distribuer les osmolytes entre un plus grand nombre de couches. Par conséquent, un volume de 40 nl a été choisi, donnant ~25 couches pour un ovocyte de 1µL. Ensuite, un incrément de temps (dt) trop petit fait en sorte que l'ordinateur fait beaucoup plus d'itération pour une même période de temps. Pour terminer, les détails de chacun des programmes de diffusion utilisés lors des expériences se trouvent tous en annexe à la fin de ce mémoire.

1.3.2- Influence de la présence des autres ions dans la mesure du coefficient de diffusion intracellulaire du sodium

Dans ce projet de recherche, nous allons tenter d'évaluer le coefficient de diffusion du Na dans le cytosol d'un ovocyte. Comme l'électrodifusion d'un ion est influencée par la nature et la concentration des autres ions présents, la question que l'on se pose est de savoir jusqu'à quel point notre mesure va refléter une propriété qui sera spécifique au Na lui-même. Pour débiter, nous savons que le flux des ions en solution est dicté par l'équation de Nernst-Planck et est proportionnel aux gradients de concentration (dc/dx) et au gradient de potentiel électrique ($d\psi/dx$) (Antropov, 1979).

$$\begin{aligned} \omega_+ &= -\frac{RT}{z_+F} \frac{\mu_+}{c_+} \frac{dc_+}{dx} - \mu_+ \frac{d\psi_D}{dx} \\ \omega_- &= -\frac{RT}{z_-F} \frac{\mu_-}{c_-} \frac{dc_-}{dx} + \mu_- \frac{d\psi_D}{dx} \end{aligned} \quad (7)$$

où ω est la vitesse de migration, R la constante de gaz parfait, T la température, z la charge de la molécule, μ la mobilité de l'ion, c la concentration. Par exemple, si nous ajoutons dans l'eau pure un sel, l'ion le plus rapide sera ralenti par la capacité de l'ion le plus lent à diffuser. En fait, l'ion le plus rapide, en se distançant de l'ion le plus lent, va créer une différence de potentiel ($d\Psi/dx$) qui va le ralentir. Par contre, si nous ajoutons dans une solution concentrée en ions très mobiles une petite quantité d'ions dont nous voulons mesurer le coefficient de diffusion, il est alors théoriquement possible de minimiser ce gradient électrique et d'obtenir un flux d'ion qui est proportionnel à sa mobilité propre. Le cytosol d'un ovocyte est essentiellement composé de K^+ et de gros anions (protéines et macromolécules) peu mobiles. Une bonne approximation serait une solution de K-cyclamate. Si nous y injectons une petite quantité d'une solution de Na-cyclamate isotonique, il y aura initialement un gradient spatial de Na^+ (et de K^+) et aucun gradient anionique. Lorsque le sodium va se déplacer en laissant son contre-ion derrière, le potassium qui est rapide et en forte quantité peut aller remplacer le Na et, ainsi, minimiser les effets du potentiel sur la diffusion. Il est possible de modéliser ce concept assez aisément.

Nous venons d'affirmer qu'il n'y a aucun gradient osmotique d'anions car ils sont trop lents par rapport aux cations et que la solution injectée est considérée isotonique par rapport au cytosol. Cela impose que le gradient osmotique du sodium soit égal et inverse à celui du potassium, ce qui revient à résoudre le système d'équation suivant :

$$\omega_{Na} = -D_{Na} \frac{1}{[Na]} \frac{d[Na]}{dx} - \mu_{Na} \frac{d\Psi}{dx} \quad (8)$$

$$\omega_K = -D_K \frac{1}{[K]} \frac{d[K]}{dx} - \mu_K \frac{d\Psi}{dx} \quad (9)$$

$$\omega_A = -D_A \frac{1}{[A]} \frac{d[A]}{dx} - \mu_A \frac{d\Psi}{dx} \Rightarrow \frac{d[A]}{dx} = 0 \quad (10)$$

$$\frac{d[Na]}{dx} = -\frac{d[K]}{dx} \quad (11)$$

$$[Na]\omega_{Na} + [K]\omega_K - [A]\omega_A = 0 \quad (12)$$

où A signifie anion. En mettant les équations 9 et 10 dans l'équation 12 et en utilisant l'égalité 11, il nous est possible de connaître la façon dont varie le gradient de potentiel en fonction de la mobilité de chacun des ions. Cela donne le résultat :

$$\frac{d\Psi}{dx} = \frac{D_K \frac{d[Na]}{dx} + [Na]\omega_{Na}}{[A]\mu_A + [K]\mu_K} \quad (13)$$

Ensuite, nous remplaçons le gradient de potentiel calculé en 13 pour le mettre dans l'équation 8 et isolons le gradient de concentration du sodium ($d[Na]/dx$).

$$\omega_{Na} = -\frac{d[Na]}{dx} \left(\frac{D_{Na}([A]\mu_A + [K]\mu_K) + [Na]\mu_{Na}D_K}{[A]\mu_A + [K]\mu_K + [Na]\mu_{Na}} \right) \quad (14)$$

Il nous est possible de faire une simplification en sachant que, dans un ovocyte, la concentration de sodium (~5 mM) est beaucoup plus petite que celle du potassium (~95 mM) et des anions (~100mM). D'où nous pouvons écrire :

$$\begin{aligned} & \text{si...}[Na] \ll [K] \text{ et } [A] \\ J_{Na} & \cong -\frac{d[Na]}{dx} \left(D_{Na} + \frac{\mu_{Na}[Na]}{[A]\mu_A + [K]\mu_K} D_K \right) \quad (15) \\ D_{Na, \text{ app}} & = D_{Na} + \frac{\mu_{Na}[Na]}{[A]\mu_A + [K]\mu_K} D_K \end{aligned}$$

Nous constatons, en observant l'équation 15, que nous retrouvons l'équation de Fick, mais que le coefficient de diffusion du sodium n'est pas pur et qu'il est affecté par la diffusion du potassium, nous le nommerons coefficient de diffusion

apparent. Cependant, une seconde approximation peut être effectuée. Les anions se trouvant dans un ovocyte sont de grosses molécules beaucoup plus lentes que l'ion potassium ce qui permet d'obtenir l'approximation qui suit :

$$D_{Na, app} \cong D_{Na} + \frac{\mu_{Na}[Na]}{\mu_K[K]} D_K \quad (16)$$

Finalement, le ratio $(\mu_{Na}[Na]) / (\mu_K[K])$ est d'environ 0,035. Par conséquent, le deuxième terme est négligeable par rapport au premier. Il s'ensuit que, dans ces conditions, la valeur du coefficient de diffusion apparent du sodium ($D_{Na, app}$) est approximativement égale à celui du coefficient de diffusion du sodium (D_{Na}). Cette façon de faire permet de minimiser la séparation de charge qui résulte en une interdépendance entre la mobilité de l'ion dont nous mesurons le coefficient de diffusion et celui de tous les autres ions. Pour terminer avec le coefficient de diffusion, les conditions rencontrées dans le cytosol pour mesurer le coefficient de diffusion du sodium permettent de modifier l'équation 15 :

$$J_{Na} \cong -D_{Na} \frac{d[Na]}{dx} \quad (17)$$

Cette dernière équation est simplement la première loi de Fick. Toutes ces explications sur la diffusion permettent de nous assurer que les conditions précisées plus haut vont faire en sorte que le coefficient de diffusion mesuré pour le Na sera bel et bien celui du sodium et non pas un coefficient de diffusion apparent qui implique la nature particulière des autres ions se trouvant dans le cytoplasme.

1.3.3- État et compartimentation de l'eau dans un ovocyte et la répercussion sur la diffusion

Une dernière propriété mérite d'être discutée avant de présenter l'article; celle de l'état et de la compartimentation de l'eau dans le cytosol. Pour commencer, le volume géométrique de l'ovocyte n'est sûrement pas accessible en sa totalité pour les osmolytes entrant dans le cytosol car une partie de ce volume est occupée par autre chose que de l'eau (c.-à-d. des lipides, protéines, organelles, macromolécules, etc.). Ainsi, un moyen simple et efficace pour déterminer la quantité d'eau dans un ovocyte est de prendre une pesée avant et après sa déshydratation. La différence de masse est celle de l'eau. C'est ainsi que Duquette et coll. (Duquette *et coll.*, 2001) en sont parvenus à la conclusion que 85% du volume total d'un ovocyte est constitué d'eau. Par contre, ce procédé ne permet pas de préciser quelle fraction de cette eau est accessible aux osmolytes. Une partie peut être occluse dans des organelles où les osmolytes n'ont pas accès, une autre peut être en train d'hydrater le site actif d'une protéine ou elle peut tout bonnement servir de solvant. Maintenant, il s'agit de déterminer quelle proportion de l'eau fait partie de cette dernière fraction qui a un rôle actif avec ces osmolytes et qui compose le volume accessible réel. C'est ainsi qu'un volume accessible de 30-40% du volume total a été proposé (Zeuthen *et coll.*, 2002). Pour arriver à ce résultat, les auteurs déterminent la fraction sensible du volume total d'un ovocyte au choc hypo ou hypertonique, car uniquement le volume accessible le serait. Les deux valeurs mentionnées plus haut me semblent excessives, l'une dicte que toute l'eau d'un ovocyte serait accessible aux osmolytes (Duquette et coll.) tandis que l'autre argumente qu'uniquement 50% de l'eau disponible (c.-à-d. 50% du 85%) serait accessible.

Encore de nos jours, la diffusion et le comportement de l'eau intracellulaire restent inconnus. Cependant, certaines études sérieuses tentent d'expliquer le plus fidèlement possible ces phénomènes, mais il faut garder en tête qu'il y a tellement de phénomènes à prendre en compte dans le cytosol que leur analyse

devient rapidement complexe. C'est ainsi, à la différence des résultats précédents qui ne font état que de l'accessibilité de l'eau, qu'une technique a permis de démontrer que l'environnement de l'eau n'est pas le même selon l'endroit où nous l'observons dans un ovocyte. Ceci est déterminé à l'aide de l'imagerie par résonance magnétique (MRI) où le spectre RMN des protons de l'eau se trouvant dans l'ovocyte est analysé pour en cartographier les propriétés. Ces propriétés sont obtenues en analysant les temps de relaxation et permettent de connaître le coefficient de diffusion apparent (ADC) de l'eau (Sehy *et coll.*, 2004). Ces données permettent de réaliser une image 3D de l'ADC de l'eau dans un ovocyte (fig. 9).

Ainsi, nous observons aisément l'hétérogénéité de l'ADC dans un ovocyte. Le noyau, le point blanc de la figure 9, a un ADC très similaire à celle de l'eau pure avec une valeur de $1,7$ et $2,1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ respectivement (Sehy *et coll.*, 2004). Cependant, il en est tout autrement dans le cytosol et il semble être moins homogène que dans le noyau. Ainsi, l'ADC passe de $0,5$ à $1,2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ lorsque nous nous dirigeons du pôle végétal au pôle animal (Sehy *et coll.*, 2004). Par conséquent, nous pouvons aisément affirmer que l'environnement immédiat de chaque molécule d'eau est hétérogène. Une autre équipe a démontré, avec la

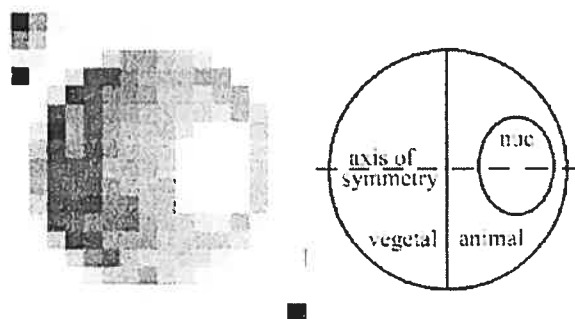


Figure 9 : Image 3D de l'ADC dans un ovocyte.

À gauche, c'est l'image 3D de l'ADC d'un ovocyte après analyse avec le MRI. Plus le pixel est foncé, plus l'ADC est lent. À droite, c'est l'image avec la même orientation qu'à gauche sous forme de schéma. Cela permet d'indiquer l'emplacement de chaque région d'un ovocyte (c.-à-d. le pôle végétal, le pôle animal et le noyau) (Sehy *et coll.*, 2002).

même technique (MRI), que l'eau possède plusieurs états dans la cellule et était distribuée de façon non-homogène. Ainsi, ils ont démontré que 90% de l'eau du noyau et 74,4% de l'eau du pôle animal avaient une mobilité équivalant à celle de l'eau pure. Cependant, uniquement 44,5% de l'eau du pôle végétal pouvait bouger librement (Pauser *et coll.*, 1995). Par conséquent, ces différences dans l'état de l'eau (liée/libre) semblent pouvoir expliquer l'hétérogénéité dans la mobilité de l'eau.

Le mécanisme permettant d'expliquer la mobilité des osmolytes dans le cytosol semble quelque peu plus complexe. Ainsi, le coefficient de diffusion dépend du coefficient de friction où, dans le cas spécial d'un osmolyte de forme sphérique, elle peut s'écrire comme :

$$D = \frac{kT}{6\pi r \eta} \quad (18)$$

C'est l'équation de Stokes-Einstein où r est le rayon de l'osmolyte et η est la viscosité de la solution. Ainsi, si les osmolytes obéissent purement à un mouvement brownien, alors la diffusion devrait dépendre uniquement de la viscosité du milieu. Après étude, il a été démontré que le coefficient de diffusion des osmolytes se trouvant dans le cytosol d'un ovocyte obéissait à cette loi (Sehy *et coll.*, 2002). Plus précisément, 3 facteurs indépendants permettent d'expliquer la viscosité apparente du cytosol, obéissant à la loi de Stokes-Einstein : la viscosité de la solution du cytosol (F_1), les liaisons possibles osmolytes/macromolécules (F_2) et les interactions collisionnelles avec les structures cytoplasmiques (F_3) (Kao *et coll.*, 1993). Dans ce cas, η de l'équation 18 s'écrira η_{app} et nous pourrons relier ces trois facteurs de la façon suivante :

$$\frac{D}{D_0} = F_1 \cdot F_2 \cdot F_3 \quad (19)$$

Ce qui signifie que le ratio des coefficients de diffusion est égal au produit des trois facteurs (F). Kao et coll. ont déterminé que le ratio de coefficient de diffusion dans le cytoplasme de fibroblaste 3T3 est de 25%. Cela représente un facteur de réduction de 4, ce qui n'est pas négligeable pour les analyses subséquentes.

Pour conclure, nous avons démontré que l'état de l'eau se trouvant dans le cytosol d'un ovocyte est variable. L'eau ne reste pas immobile, mais interagit avec son environnement et possède des états qui diffèrent selon l'endroit où elle se trouve dans le cytosol. Par conséquent, la viscosité apparente diffère grandement selon l'endroit où nous nous trouvons dans le cytoplasme.

En résumé, plusieurs facteurs peuvent régir cette viscosité apparente, dont trois semblent ressortir. Tout d'abord, une partie de cette viscosité apparente semble provenir de la viscosité de la solution. Ensuite, chaque molécule d'eau a la possibilité de se lier avec des macromolécules du cytoplasme ralentissant leur diffusion et donnant l'impression d'une plus grande viscosité que celle de la solution. Finalement, d'autres molécules d'eau peuvent entrer en collision avec ces macromolécules, ce qui les ralentira car elles ne pourront pas se déplacer du point A à un point B en ligne droite et sans encombre.

Chapitre II – Diffusion intracellulaire dans l'ovocyte de *Xenopus laevis* et l'hypothèse du cotransport d'eau

Le présent chapitre, contenant l'article *Intracellular hypertonicity is responsible for water flux associated with Na⁺/glucose cotransport*, constitue le cœur de mon mémoire de maîtrise. Cet article a été soumis au *Biophysical Journal* le 27 octobre 2005 et il a été accepté pour publication le 18 janvier 2006.

En tant que premier auteur, j'ai rédigé la première version de l'article qui a été révisée par mes co-auteurs. De plus, j'ai réalisé toutes les manipulations et les analyses subséquentes se trouvant dans cet article.

Comme il nous était impossible d'introduire tous les résultats et toutes les informations détaillés dans cet article, faute d'espace, un chapitre fait suite à celui-ci. De plus, les détails des programmes de diffusion utilisés dans l'article se retrouvent dans l'appendice 1.

**Intracellular hypertonicity is responsible for water flux
associated with Na⁺/glucose cotransport**

François M. Charron, Maxime G. Blanchard
& Jean-Yves Lapointe

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

Corresponding address : Jean-Yves Lapointe
Groupe d'étude des protéines membranaires (GÉPROM)
Université de Montréal
C.P. 6128, succ. centre-ville
Montréal, Québec
H3C 3J7
CANADA
email : jean-yves.lapointe@umontreal.ca

Running Title :Hypertonicity and water cotransport

Keywords: Na⁺-glucose cotransport; Active water transport; Electrophysiology;
Volumetry; Osmolyte; Intracellular diffusion coefficient; Na⁺-selective electrode.

ABSTRACT

Detection of a significant transmembrane water flux immediately following cotransporter stimulation is the experimental basis for the controversial hypothesis of secondary-active water transport involving a proposed stoichiometry for the human Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) of 2 Na⁺, 1 glucose and 264 water molecules. Volumetric measurements of *Xenopus laevis* oocytes coexpressing human SGLT1 and aquaporin (AQP1) can be used to detect osmotic gradients with high sensitivity. Adding 2 mM of the substrate alpha-methyl-glucose (α MG) created mild extracellular hypertonicity and generated a large cotransport current with minimal cell volume changes. After 20, 40 and 60 s of cotransport, the return to sugar-free, isotonic conditions was accompanied by measurable cell swelling averaging 0.051, 0.061 and 0.077 nl/s, respectively. These water fluxes are consistent with internal hypertonicities of 1.5, 1.7 and 2.2 mOsm for these cotransport periods. In the absence of AQP1, the measured hypertonicities were 4.6, 5.0 and 5.3 mOsm for the same cotransport periods. Cotransport-dependent water fluxes, previously assumed to be water cotransport, could be largely explained by hypertonicities of such amplitudes. Using intracellular Na⁺ injection and Na⁺-selective electrode, the intracellular diffusion coefficient for Na⁺ was estimated at $0.29 \pm 0.03 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Using the effect of intracellular α MG injection on the SGLT1-mediated outward current, the intracellular diffusion coefficient of α MG was estimated at $0.15 \pm 0.01 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Although these intracellular diffusion coefficients are much lower than in free aqueous solution, a diffusion model for a single solute in an oocyte would require a diffusion coefficient 3 times lower than estimated to explain the local osmolyte accumulation which was experimentally detected. This either suggests that the diffusion coefficients were overestimated possibly due to the presence of convection or that the diffusion in cytosol of an oocyte is more complex than depicted by a simple model.

INTRODUCTION

Until the mid 1990's, the dogma that water transport through biological membranes was always passive had never been seriously contested. Water is known to permeate biological membranes via diffusion across the phospholipid bilayer or by using several types of membrane proteins including the different forms of aquaporin (1-3). In 1996, a study proposed that water can be pumped in a secondary active manner using the rabbit Na⁺-glucose cotransporter (SGLT1) in a strictly stoichiometric ratio of 2 Na⁺ ions, 1 glucose molecule and ~260 water molecules (4). According to subsequent studies, such a phenomenon was not restricted to SGLT1 and a variety of cotransporters were proposed to carry from 50 to 400 water molecules per turnover (5). We challenged this interesting hypothesis by showing that, in our hands, the swelling induced by the addition of glucose to an oocyte expressing the human SGLT1 is not instantaneous and by calculating that the osmotic gradient detected after several minutes of cotransport was quantitatively sufficient to explain all of the glucose-induced cell swelling (6). In addition, by independently expressing a solute transporter (GLUT1) and a cationic channel (ROMK2), we have shown that the sum of the passive water fluxes associated with glucose and potassium transport matches the cell swelling due to SGLT1 when transporting corresponding amounts of glucose and Na⁺ (7). This has led to a certain controversy (7-15) which can be summarized by asking the following question: is it possible to observe water transport (J_w) in the absence of an osmotic gradient ($\Delta\pi$)? Quantitatively, the size of the $\Delta\pi$ expected is J_w/P_f where P_f is the membrane osmotic permeability. In the case of human SGLT1, the cell swelling typically observed after 30 s of maximal Na⁺/glucose cotransport corresponds to a $\Delta\pi$ of 4 mOsm (7). According to authors defending the water cotransport hypothesis, all of the cell swelling observed during the first minute of Na⁺/glucose cotransport stimulation is due to water cotransport and occurs in the absence of any significant $\Delta\pi$ (9). This hypothesis contends that a significant osmotic gradient caused by transported solute accumulation starts to develop after the first minute and reaches a steady-state condition in 5 to 10 min. At this time, the osmotic gradient would account for 2/3 of the cell swelling and water cotransport would account for the rest (9). In contrast to this line of thought, we contend that all water transport is passive and that the osmotic gradient starts to develop as soon as cotransport is activated. It is recognized that low intracellular diffusion coefficients for Na⁺ and for glucose are required to explain why an osmotic gradient of several mOsm can be generated within the first minute of cotransport.

The first part of the present study establishes a sensitive way of detecting osmotic gradients by using oocytes co-expressing human SGLT1 and aquaporin 1 (AQP1). The second part of the study involves using micro-injection of Na⁺ and glucose into the center of the oocyte while measuring their peripheral concentrations electrophysiologically in order to estimate their intracellular diffusion coefficients.

MATERIALS AND METHODS

Oocyte preparation. *Xenopus laevis* oocytes, stage V-VI, were harvested as recently described by our laboratory (16). SGLT1 mRNA was obtained from transcription of human SGLT1 cDNA (17,18), while the human form of AQP1 was kindly provided by J.M. Verbavatz (CEA/Saclay, Gif-sur-Yvette Cedex, France). 4.6 ng of SGLT1 mRNA (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) were injected into oocytes with a Drummond microinjector (Broomall, PA). Oocytes were then kept 5-7 days at 18°C in Barth's solution containing (in mM) 90 NaCl, 3 KCl, 0.82 MgCl_2 , 0.74 CaCl_2 , 10 Hepes, 5% (v/v) horse serum, pH was titrated to 7.6 with Tris[hydroxymethyl]aminomethane (Tris). AQP1 mRNA (4.6 ng) was injected only 1-2 days prior to the day of experiment. Expression of AQP1 was tested with a hypotonic shock and oocytes coexpressing AQP1 and SGLT1 were found to have an average water permeability of $4.9 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$, which is more than 7 times the permeability of the SGLT1-expressing oocytes used in the present study.

Volumetry. Oocyte volume was measured with a previously described (7) apparatus. Briefly, the cross section of an oocyte was measured with an inverted microscope 5 times per second using a CCD camera and a 3X objective. Software was used to count the number of pixels corresponding to the oocyte cross section. Prior to analysis, 5 consecutive data points were averaged to give one measurement per second. Analysis programs for obtaining swelling rates and other measurements were written using Matlab 6.5 (MathWorks, Inc., Natick, MA). The hypertonic shock was applied by adding 2 mM (oocytes coexpressing SGLT1 and AQP1) or 5 mM (oocytes expressing only SGLT1) αMG or mannitol to the Barth's solution. Moreover, to rapidly stop SGLT1 after removing αMG when AQP1 was present, 50 μM phlorizin (Pz, the specific inhibitor of SGLT1) was directly added to the Barth's solution. This concentration represents 380 times its K_i value (19).

Two-microelectrode voltage clamp and intracellular Na^+ -selective electrodes. The two-microelectrode voltage clamp method was used as previously described (6) and data were recorded using Clampex 8.1 (Axon Instruments) software. For simultaneous voltage-clamp and volumetry experiments, the voltage electrode was filled with 1 M KCl and the current electrode was filled with a solution containing (in mM) 70 K-gluconate, 15 KCl, 10 NaCl and 10 Hepes. During inward current compensation, this type of current electrode produces a reduced injection of Cl^- from the electrode to the cell. The data were taken at a rate of 200 Hz with a membrane voltage of -50 mV . For intracellular Na^+ measurements, the oocytes were not clamped and a single voltage electrode containing 1 M KCl was used. Na^+ -selective microelectrodes were made with a Na^+ -selective resin (Fluka, Sodium ionophore 1-cocktail A), (20). The electrodes were pulled on a Flaming/Brown micropipette puller (Model P-97 from Sutter instrument Co.) and they have a resistance of 2 $\text{M}\Omega$ when filled with 1 M KCl. The electrode tip was immersed in a solution of 5% (v/v) dichlorodiphenylsilane in acetone for 20 s. After silanization, the tip was rapidly rinsed with acetone and the electrodes were incubated overnight at 80°C. Prior to an experiment, the tip was filled with the Na^+ -selective resin and the rest of the electrode was filled with a solution of 100 mM NaCl. The signal corresponding to the Na^+ concentration was obtained by subtraction of the oocyte potential from the Na^+ -

selective electrode potential. The selective electrodes were calibrated with three different concentrations of sodium containing (in mM) 5 NaCl/95 KCl, 10 NaCl/90 KCl or 100 NaCl/2 KCl with 0.82 MgCl₂, 10 Hepes and pH was adjusted to 7.6 with Tris. Using the calibration solutions, the selectivity ratio for Na⁺ over K⁺ was approximately 100. The Na solution used for intracellular injection contains 100 mM Na-cyclamate and 100 μM EGTA. This solution was used to increase intracellular Na⁺ concentration without adding significant amount of Cl⁻ or Ca²⁺ to the cytosolic solution. The injection of Na⁺ was performed only after the Na⁺-selective potential was observed to be stable for at least 1 min. Data were taken every 5 ms.

For measurement of the Na⁺ diffusion coefficient in aqueous solution, a distant Ag/AgCl electrode was used to ground the bath solution. An injection pipette filled with (in mM) 750 NaCl and 1899 sucrose (yielding a viscosity of 16 cP) was extended to the bottom of a chamber filled with a solution containing (in mM) 5 NaCl, 95 KCl and 1840 sucrose (15 cP). The bath has a minimum radius of 1 cm, a height of 1 cm and was completely filled with the previously described solution. The injected solution was kept slightly more dense than the bath solution to ensure that the injected solution would tend to remain at the bottom of the bath. A Na⁺-selective microelectrode was positioned 1 mm distant from the side of the injection pipette to detect the time-dependent increase in the bath Na⁺ concentration following the injection of 10 nl of the Na⁺ solution. The apparent intracellular Na⁺ diffusion coefficient was obtained by measuring the steady-state increase in Na⁺ concentration that was reached a few minutes after bath Na⁺ injection.

To determine the glucose diffusion coefficient, outward currents through SGLT1 were measured after glucose injection (10 nl of a 500 mM αMG solution) in an oocyte displaying an increased intracellular Na⁺ concentration caused by two hours incubation in a K⁺- and Ca²⁺-free solution containing (in mM) 90 NaCl, 3 NMDG, 0.82 MgCl₂, 10 Hepes at pH 7.6 (21). The outward current was detected at +50 mV in a low Na⁺ solution containing (in mM) 10 NaCl, 83 NMDG, 0.82 MgCl₂, 0.74 CaCl₂, 10 Hepes at pH 7.6. In this case, the two microelectrodes for voltage clamp were filled with 1 M KCl and a pulse protocol was applied every 30 s with potential ranging from -75 mV to +50 mV in increments of 25 mV, with the oocytes clamped at -50 mV between series of measurements. The injection of αMG was done right after the tenth pulse at t=300 s. To ensure that the outward currents measured actually arose from SGLT1, some oocytes were perfused with a low Na⁺ solution containing Pz, the injection of αMG was performed as before and Pz was removed at t=750 s.

Volumetric analysis. To obtain instantaneous swelling rates, experimental volume curves were first fitted with an empiric equation that can mimic the time course of the volume measurement for a given experimental period. The linear portion of the volume vs time curves during an osmotic shock with mannitol ($\Delta\pi$, in mol/cm³) was simply fitted with a straight line for oocytes expressing SGLT1 to obtain P_f , the water permeability, from the following equation:

$$\frac{dV}{dt} = - \bar{v}_w S P_f \Delta\pi \quad (1)$$

where \bar{v}_w is the specific volume of water ($18 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$) and S is a standard oocyte surface area (0.4 cm^2).

In the case of oocytes coexpressing SGLT1 and AQP1, the volume vs time curves during a purely osmotic shock was not linear and the initial shrinking rate was obtained by fitting the curve with the following exponential equation.

$$\frac{dV}{dt} = m_0 + dm(1 - \exp(-t/\tau)) \quad (2)$$

This represents a cell swelling rate that goes from m_0 to $m_0 + dm$ with a characteristic time constant of τ . For a given experimental period, the values for the 3 parameters that minimized the chi-square were obtained using Origin 6.1 (software of OriginLab Corporation). The following equation was used to fit the cell volume changes following glucose withdrawal from oocytes expressing SGLT1:

$$\frac{dV}{dt} = m_0 + \frac{dm_a}{1 + e^{-k_a(t-t_a)}} + dm_b(1 - \exp(-t/\tau_b)) \quad (3)$$

This represent an initial cell swelling rate described by a Boltzmann equation that goes from m_0 to $m_0 + dm_a$ at $t-t_a$ with a rate constant of k_a . The swelling rate (dV/dt) is then allowed to go from $m_0 + dm_a$ to a final value of $m_0 + dm_a + dm_b$ with an exponential time course characterized by a time constant " τ_b ". For a given experimental period, the 7 parameters that minimize the chi-square were found to provide a smooth curve that closely followed the experimental points. In the case of oocytes expressing both SGLT1 and AQP1, Eq 3 could not be used because volume change were rapid during the first few seconds following glucose withdrawal and much slower afterwards, which generated a sharp bend in the volume vs time curve (see Fig 1B). In this case, the slope of the volume vs time curve could be satisfactorily fitted with a double Boltzmann equation as follows:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{dm_a}{1 + e^{-k_a(t-t_a)}} + \frac{dm_b}{1 + e^{-k_b(t-t_b)}} \quad (4)$$

This equation describes a swelling rate that goes from "0" to $dm_a + dm_b$ with two steps occurring at distinct time points (t_a and t_b) and with distinct rate constants (k_a and k_b). Adjustment of these six arbitrary parameters was found sufficient to provide a satisfactory fit to the experimental curves.

Diffusion model. A virtual oocyte of a given volume was first divided into the required number of concentric shells each representing a constant volume of 40 nl. A typical 1 μl oocyte would then be divided in 25 shells with thickness ranging from 134 μm in the center to 8.5 μm in the periphery. A fraction V_A of the volume is considered to be freely accessible to water and osmolytes. A single type of osmolyte is considered and its

concentration in each shell (C_i) is set to 200 mOsm at $t=0$. For each time increment (dt) of 0.02 s, osmolyte uptake into the most external shell (C_1) is calculated from the amount of charge carried by the measured cotransport current (I) as follows:

$$dOsm = \frac{I \times dt}{F} \times opc \quad (5)$$

where $dOsm$ is the number of mol of solute accumulated during a time increment dt , F is the Faraday constant and opc is the net number of osmolytes per transported charge which are entering the oocyte through the plasma membrane or through the current-injecting electrode. When measuring a purely ionic transport generated through a K channel (ROMK2), the type of current-injecting electrode used generated 0.65 osmolyte for each K^+ ion entering the oocyte. This indicates that, in the case of SGLT1, each Na^+ entering the oocyte is accompanied by 0.65 osmolyte and 0.5 glucose molecule which yields an opc of 1.15. This was used to calculate a new C_1 for $t=0+dt$. Then diffusion was allowed to occur between consecutive shells using Fick's first law:

$$J_{i,i+1} = D \frac{(C_i - C_{i+1})}{(r_i - r_{i+1})} \quad (6)$$

where $J_{i,i+1}$ is the flux of osmolyte from shell i to shell $i+1$, D is the osmolyte diffusion coefficient and r_i is the radius of shell i . These fluxes are used to calculate the net uptake into each shell and a new C_i . Finally, the new C_1 is used to calculate water transport across the plasma membrane using Eq. (1). The program was written with Matlab 6.5 and was used to reproduce cell volume during an experiment where hypertonic α MG was used to stimulate a cotransport current. As the water permeability was measured for each oocyte, only 2 parameters needed to be adjusted: the intracellular diffusion coefficient (D) and the accessible volume fraction V_A which was found to vary within very tight limits ($0.45 < V_A < 0.65$).

The same program was used to model a wide variety of diffusion process exhibiting spherical symmetry, yielding the Na^+ diffusion coefficient both in bulk aqueous solution and in an oocyte where 10 nl Na cyclamate solution (100 mM) was injected into the center shell of the oocyte and the Na^+ concentration was measured at the periphery with a Na^+ -selective microelectrode. In this latter case, the cotransport current was set at 0 throughout the modeling and no water transport was calculated across the plasma membrane. The same approach was used to model α MG diffusion (10 nl central injection of a 500 mM α MG solution) from the point of injection to the plasma membrane where it was detected as a phlorizin-sensitive outward current periodically measured at +50 mV. The values of D and V_A were adjusted manually until a satisfactory fit was obtained for the time course of either the oocyte volume, the peripheral Na^+ concentration or the appearance of a glucose-dependent outward current.

RESULTS

Detection of transport-dependent osmotic gradients:

In order to facilitate the detection of transport-dependent intracellular osmolyte accumulation and to minimize the dilution caused by the concomitant cell swelling, we sought to reproduce the experiment published by Meinild *et al* in 1998 (22). In that experiment, 10 mM α MG was added hypertonicity to the bathing solution to simultaneously produce a hypertonic shock and a large cotransport current through the rabbit SGLT1 protein. In our hands, the water efflux caused by the hypertonic shock was much stronger than the water influx caused by the activation of the human Na^+ /glucose cotransporter. We thus compromised by using the protocol illustrated in Fig 1A where an oocyte expressing SGLT1 was first exposed to a hypertonic solution containing 5 mM mannitol before being successively exposed to 5 mM α MG for 20, 40 and 60 s exposures, with stabilization periods in isotonic Barth's solution between each cotransport period. The large effect produced by the hypertonic shock with mannitol allows calculation of the oocyte Pf (see Eq. 1) which averaged $6.5 \pm 0.8 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$, in good agreement with previous measurements by this laboratory and others for oocytes expressing human SGLT1 (6,10,23). In contrast with the observations published by Meinild *et al.*, addition of 5 mM α MG always produced an initial cell shrinkage (due to the hypertonic shock) which was progressively reversed after 10-15 s of cotransport. Interestingly, after each of the cotransport periods, when the oocyte was returned to isotonic Barth's solution, a large cell swelling was consistently observed. This behavior was also present in the article of Meinild *et al.* (22) but was not analyzed. Upon α MG removal, the cotransporter no longer cotransports Na^+ and glucose (and water if the water cotransport hypothesis is true) into the cell and, as the extracellular solution is isotonic, the large cell swelling observed has to be due to the presence of an intracellular hypertonicity that has developed during the cotransport period.

The sensitivity of this experiment can be greatly improved by increasing the oocyte Pf through coexpression of SGLT1 with AQP1 (24). This is shown in Fig 1B where the hypertonic shock caused by addition of 2 mM mannitol generates a rapid cell shrinkage which is consistent with an increased Pf (average $\text{Pf} = 49 \pm 5 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ $n = 10$, i.e. more than 7 times the Pf of SGLT1-expressing oocytes). The fact that, under these circumstances, the passive phlorizin-sensitive water permeability of SGLT1 represents less than 10% of the total Pf allowed us to terminate the transport period more abruptly by adding 50 μM Pz to the isotonic Barth's solution instead of simply removing α MG. Strongly supporting experiments performed with SGLT1, oocytes coexpressing SGLT1 and AQP1 display very fast cell swelling upon return of the oocyte to an isotonic, phlorizin-containing solution (see Fig 1B).

A quantitative analysis of the type of experiments shown in Fig 1A and 1B can be performed after fitting the volume curves with an appropriate equation as explained in Materials and Methods. An example of a fitting result is presented in Fig 2 for an oocyte expressing both SGLT1 and AQP1. First, it is obvious that, due to the large Pf of the expressed AQP1, the shrinking rate produced by the addition of 2 mOsm mannitol does not remain constant with time. The cell shrinkage was fitted with an exponential function

from which the initial slope was used to accurately calculate the oocyte Pf. Eq 4 was used to precisely fit each phase of the volume changes after the cotransport period was finished. Knowing Pf and the time derivative of the volume curve (from Eq 4), it is possible to calculate the amplitude of the local osmotic gradient throughout this period. The result of this type of analysis is shown in Fig 3A for a series of 10 oocytes expressing SGLT1. The osmotic gradients measured 5 s after the termination of the cotransport periods are 4.6 ± 0.9 , 5.0 ± 0.7 and 5.3 ± 0.5 mOsm for 20, 40 and 60 s cotransport periods, respectively (mean \pm SEM, $n=10$ oocytes obtained from 3 different donors). In the case of oocytes coexpressing SGLT1 and AQP1, Fig 3B shows that the swelling rate experimentally observed 5 s after the cotransport period has been terminated by addition of Pz indicates that osmotic gradients of 1.5 ± 0.2 , 1.7 ± 0.3 and 2.2 ± 0.2 mOsm were present after transport periods of 20 s, 40 s and 60 s, respectively (mean of 12 oocytes obtained from 3 different donors). It should be noted that the osmotic gradients calculated after different cotransport periods are estimated while cotransport is either blocked with Pz or inactivated by the absence of glucose. In consequence, the cell swelling used to calculate these gradients cannot depend on the capacity of SGLT1 to perform secondary active water transport.

If it is assumed that water transport is always passive, the build-up of the osmotic gradients during cotransport stimulation can be calculated from the slope of the volume vs time curve. If the assumption is correct, the predicted rise in intracellular osmolarity should lead to the osmolarity measured at the beginning of the period where cotransport is inactivated. Each volume vs time trace during cotransport activation was fitted and the dV/dt 's were calculated with Eq 2 at 5 s intervals. Using the Pf obtained for each experiment, the build-up of the osmolarity gradient was estimated and the results are shown in Fig 3A and 3B (grey filled circles) for the experiments performed with oocytes expressing SGLT1 or SGLT1+AQP1 and for a cotransport periods of 60 s. For oocytes expressing only SGLT1, the build-up of intracellular osmolarity matches the osmolarity gradient detected in the post-cotransport period. This indicates that the intracellular osmolarity detected during the first few seconds of the post-cotransport period is exactly the value required to explain all of the volume change observed during the cotransport period in the presence of a 5 mOsm hypertonic α MG solution. In the case of oocytes coexpressing SGLT1 and AQP1, the gradients detected in the post-cotransport period correspond to 67% and 70% of the intracellular osmolarity gradient calculated after 40s and 60s, respectively. This suggests that, at least 67 and 70% of the cell volume changes associated with cotransport activation are passive after 40 s or 60 s of cotransport. This contrasts with the prediction of the water cotransport hypothesis which purports that 0% of the water transport would be passive during the first min of cotransport.

Modeling osmolyte accumulation:

It is now evident that a significant osmotic gradient can be experimentally detected across the plasma membrane at the end of cotransport periods as short as 20 s. We have used the oocyte model described in the Materials and Methods section to estimate the size of the intracellular diffusion coefficient that would be required in order to accumulate these quantities of transported osmolytes near the plasma membrane. This model was applied to oocytes expressing SGLT1 alone because the high water permeability of AQP1 generates larger water fluxes that contribute to dilute the cotransport-dependent osmotic gradient and, consequently, tend to reduce the influence of slow intracellular diffusion. An example of the application of this model is shown in Fig 4. The model was fitted to the data for each oocyte using the Pf measured for that oocyte, and the average value for the number of osmolytes per charge (*opc*) was 1.37 ± 0.54 . The accessible volume was fixed at 61% in agreement with the values obtained by measuring the steady-state increase in intracellular Na^+ concentration after Na cyclamate injection (see below). The only parameter which required adjustment was the diffusion coefficient, which averaged $0.05 \pm 0.02 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ($n=10$ experiments with 20 s cotransport periods). Modeling the experiments with cotransport periods of 40s and 60s yielded average diffusion coefficients of $0.05 \pm 0.01 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ and $0.06 \pm 0.01 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, respectively ($n=10$ experiments). These values are about 10 times smaller than the diffusion coefficient for glucose in free aqueous solution (25). This result can be compared with the prediction based on the water cotransport hypothesis. The lower smooth curve in Fig 4 is obtained using the measured cotransport current, a stoichiometry of 264 water molecules per glucose molecule transported and the measured Pf for this oocyte. The time course of the change in αMG concentration was estimated from the time course of the cotransport current using an αMG affinity of 0.77 mM. It can be seen that during the 20s cotransport period, the putative water cotransport is largely neutralized by the effect of external hypertonicity (+5 mOsm). Following replacement of the hypertonic αMG solution by the isotonic saline solution, a minimal cell swelling is observed for a short period of about 20s. This is in clear contrast with the prolonged cell swelling which was experimentally observed in the present study (Fig 1, 2 and 4) and in the previous studies of Meinild *et al* (22).

Measurements of diffusion coefficient:

The Na^+ intracellular diffusion coefficient was measured as described in the Materials and Methods section using a central 10 nl intracellular injection of a 100 mM Na-cyclamate solution and a Na^+ -selective electrode positioned at the periphery of the oocyte cytoplasm. An example of Na^+ concentration ($[\text{Na}^+]_i$) measurement is shown in Fig 5A (upper, jagged line). In 17 oocytes obtained from 3 different donors, the average intracellular $[\text{Na}^+]_i$ was 8.5 ± 0.5 mM. Fig 5A presents the average of 12 measurements of the change in $[\text{Na}^+]_i$ during the injection of Na-cyclamate. The transport model was used to fit the time course of the change in $[\text{Na}^+]_i$ for each experiment of the type shown in Fig 5A. The total increase in $[\text{Na}^+]_i$ is consistent with a freely accessible volume of $61 \pm 5\%$ and the average intracellular diffusion coefficient for Na^+ was estimated at $0.29 \pm 0.03 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. In contrast, when 10 nl of water are injected into the center of the oocyte, the measured $[\text{Na}^+]_i$ was observed to decrease by 0.4 mM which is consistent

with the starting $[Na^+]_i$, the volume injected and an accessible oocyte volume of 61% (lower jagged line in Fig 5A).

The α MG diffusion coefficient was also measured in the oocyte cytosol using a 10 nl injection of 500 mM α MG at the center of an oocyte expressing SGLT1. When the injected α MG reaches the membrane, the outward current will increase and, given the low intracellular sugar affinity (26,27) it should change in proportion with the local α MG concentration in the vicinity of the membrane (square symbols, Fig 5B). The specificity of the measurements can be demonstrated by the fact that the change in the outward current measured is fully sensitive to the presence of external Pz. For this analysis, an accessible volume of 61% was used and the smooth line in Fig 5B was obtained with the diffusion model by adjusting the α MG diffusion coefficient to best fit the experimental data. In average, for 11 experiments with oocytes from 3 different donors, the intracellular diffusion coefficient for α MG was $0.15 \pm 0.01 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

Finally, we checked that measurement of Na^+ diffusion coefficient was possible in free solution by using microinjectors, Na^+ -selective microelectrodes and diffusion distances of the order of 1 mm. In particular, we wanted to check for the presence of convection effects as the 10 nl aliquots were injected. Convection effects were readily observed if Na^+ diffusion was attempted in simple saline solutions. These effects were characterized by rapid and unstable Na^+ concentration changes. It was found that the solution viscosity had to be increased to at least 15 cP (adding 1840 mM sucrose) in order to make the convection effect much smaller. Such an experiment is shown in Fig 5C where Na^+ concentration is measured with a Na^+ -selective microelectrode located 1.0 mm away from an injection pipette which was used to release 10 nL of a 750 mM NaCl solution. Fig 5C shows an average of 4 experiments of this type. It can be seen that about 350 s are required to obtain a steady-state rate of Na^+ concentration increase. Using the diffusion model, the diffusion coefficients required to reach the observed rate of increase in the Na^+ concentration average $0.09 \pm 0.04 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ($n=4$). If the experimental measurement is compared with the diffusion model prediction, it can be seen that the measured Na^+ concentration rises much faster than expected (Fig 5C) during the first 300 s after NaCl injection. This is believed to be due to some convective effect that makes that a small quantity of Na^+ appears faster than expected in the vicinity of the Na^+ -electrode. After 300 s, this convective effect has largely ended and the local Na^+ concentration changes at a rate that is consistent with the diffusion coefficient reported above. Interestingly, the Na^+ diffusion coefficient is $1.33 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (25) in a dilute Na^+ solution. If the viscosity of water is 0.9548 cP (25), the Na^+ diffusion coefficient in 15 cP sucrose solution is calculated to be $0.084 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. This is less than 6% smaller than the experimentally estimated coefficient.

DISCUSSION

The aim of the present study was two-fold : 1) measure the size of the osmotic gradient generated within the first minute of Na⁺/glucose cotransport, and 2) explain the generation of this osmotic gradient by slow intracellular diffusion of Na⁺ and glucose. We will discuss these points separately.

Presence of a transport-dependent osmotic gradient

Increasing the water permeability of an oocyte with AQP1 enables the detection of osmotic gradients with improved sensitivity. The most direct evidence for the presence of an osmotic gradient after cotransport periods as short as 20 s is the observation of a vigorous cell swelling that occurs as the cotransport period is terminated by the addition of a Pz-containing isotonic extracellular solution (see Fig 1B). Even in the absence of AQP1, the cell swelling can be observed once cotransport is terminated (see Fig 1A). However, the cotransporter cannot be stopped instantaneously at the end of the cotransport period and averages of 6 and 20 s are required for reducing the cotransport current to less than 20% of its initial value by either adding Pz or removing glucose, respectively. Careful analysis of Fig 3 A and B shows that a large fraction of the osmotic gradient (and its associated cell swelling) is still present at a time when 80% of the cotransport current has disappeared.

If one compares Fig 1A of the present study and Fig 2 of Meinild *et al.* (22) (both using human SGLT1), one can notice a few differences between the reported observations. In the case of Meinild *et al.*, activation of the cotransporter by 10 mM α MG can apparently generate an immediate water flux that compensates the concomitant 10 mOsm hypertonic shock. In our case, the 5 mOsm hypertonic shock is always more potent than the cotransport mediated water flux and an initial cell shrinkage was systematically observed in the first 20 to 40 s of the cotransport period. This is not due to the difference in α MG concentrations since, with an affinity of 0.77 mM, SGLT1 must have been maximally stimulated in both cases. Further analysis shows that the oocyte used by Meinild *et al.* was generating an unusually high cotransport current of 2.4 μ A (estimated from the integrated current shown in their Fig 2B) and an unusual low Pf for an oocyte putatively expressing SGLT1 at an extremely high density.. We found only one additional publication, also by Meinild *et al.* (28), presenting this type of experiment. In the Fig 5 of this paper, the effect of an hypertonic application of 10 mM citrate for the Na-dicarboxylate cotransporter is presented. In this case, and in agreement with our observations, an initial shrinking was observed before cotransport-dependent cell swelling starts to compensate. In all cases (the present study, (22,28)), returning to iso-osmotic and substrate-free solution is associated with a very significant cell swelling. The rate of cell swelling after cotransport period of 60 s was consistent with intracellular hypertonicities of 13 mOsm for the hSGLT1-expressing oocyte (22) and 6 mOsm for NaDC1 cotransporter (28).

Fig 3 A and B clearly show that the osmotic gradient detected in the post-cotransport period is fully consistent with the rate of cell swelling observed during the first minute of cotransport if all water flux is assumed to be passive. In other words, the intracellular

hypertonicity required to account for the observed swelling rate after 60s of cotransport matches the true hypertonicities experimentally measured immediately after inhibiting the cotransporter. In contrast, according to the water cotransport hypothesis, all water transport in the first minute of cotransport is stoichiometrically coupled to the Na^+ /sugar cotransport (9) and the hypertonicity measured at the end of this period is consequently predicted to be negligible. In the case of oocytes expressing AQP1+SGLT1, the hypertonicity measured immediately after inhibiting cotransport with phlorizin is only 70% of the calculated hypertonicity at the end of the cotransport period (see Fig 3B). A part of this difference can be explained by the fact that the effect of phlorizin on Pf (expected to cause an underestimation of $\Delta\pi$ by 7%, see (6,23)) has not been taken into account. In summary, an osmotic gradient can be experimentally detected well within the first minute of cotransport and the size of this osmotic gradient is fully consistent with the size required to explain cotransport-dependent cell swelling as a completely passive mechanism.

Low intracellular diffusion coefficients

In our effort to measure the diffusion of Na^+ in water a convection current was obvious for viscosities ranging from 1 cP to 6 cP. Even at 15 cP, the initial rise in Na^+ concentration measured between 50 and 300 s is still somewhat faster than expected (see Fig 5C). This is why we choose to rely on the steady-state $d[\text{Na}^+]/dt$ that could be observed between 300 and 600 s. Theoretically, after the injection of a concentrated NaCl solution, the value of $d[\text{Na}^+]/dt$ is expected to go from “0” to a maximal value and return to “0” as a function of time. Using the Fick’s Second Law, it can be shown that the maximal value of $d[\text{Na}^+]/dt$ is strictly proportional to the Na diffusion coefficient. Using this type of analysis and comparing the slope of the linear part of the $[\text{Na}^+]$ vs t curve to the slope predicted by our diffusion model, we found that the diffusion coefficient for Na^+ averaged $0.09 \pm 0.04 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. This result follows the Stoke-Einstein equation which dictates that the diffusion coefficient of a solute is inversely proportional to the viscosity of the solution. As noted in the Results section, our measurement is within 6% of this theoretical prediction. Interestingly, the viscosity of an oocyte cytosol is expected to be between 10 and 30 cP (29). This supports the applicability of our protocol for measuring intracellular diffusion coefficients using intracellular injection and diffusion distances on the order of 1 mm. It also suggests that convective flow is likely to be more important in the initial phase of the Na^+ concentration rise than in the later phase. This is probably what explains the difference between the experimental observations and the predictions from a strictly diffusive model for the first 50s after intracellular injection (see Fig 5A). Because of the possibility that convective flow may play a role in the early detection of peripheral Na^+ or glucose concentrations, it was decided to adjust the theoretical prediction to best fit changes during the final half of measurements involving Na^+ or glucose injection.

Slow intracellular diffusion and osmolyte accumulation

For both Na^+ and glucose, the intracellular diffusion coefficients were found to be 4 to 5 times smaller than the values reported in free aqueous solutions. In contrast, when the diffusion model was used to reproduce the cell swelling that follows a cotransport period of 20 s (see Fig 4), the required diffusion coefficient for an idealized, transported solute

(representing both glucose and Na^+) was $0.05 \pm 0.02 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$, which is 3 times smaller than the slowest diffusion coefficient measured (i.e. $0.15 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ for glucose). This either indicates that our experimental determination of intracellular diffusion coefficients has led to an overestimation of the true values or, that the model used to account for intracellular diffusion in an oocyte does not reflect the complexity of the problem. Aside from the inherent differences in the behavior of neutral and charged solutes, as has already been discussed in a previous publication (7), it is important to mention that the diffusion model assumes that the oocyte cytosol is homogeneous. For example, it was not taken into account that the position of the nucleus in the animal pole would affect (speed up or slow down) diffusion on that side of the oocyte. Also, it was not taken into account that the possible damage produced around the injection pipette could represent a “fast track” for the diffusion of the injected solute.

CONCLUSION

Osmotic gradients are clearly present within the first minute of cotransport and they have been experimentally detected in a manner that is independent of the properties of SGLT1. The osmotic gradients are of the size required to explain a dominant portion (from 70 to 100%) of the cotransport-dependent cell swelling. The intracellular diffusion coefficients estimated for Na^+ and glucose are about 5 times smaller than in free solution but are still not low enough to explain the observed osmolyte accumulation using a simple diffusion model of an oocyte. This can either reflect some overestimation in the actual intracellular diffusion coefficients or a failure of our simple diffusion model to account for the complexity of diffusion in an oocyte.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by CIHR (MOP-10580) and F.C. received a scholarship from “le Fonds Québécois de la recherche sur la nature et les technologies” (FQRNT).

BIBLIOGRAPHY

1. 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.
2. Hernandez, J. A. and J. Fischbarg. 1992. Kinetic analysis of water transport through a single-file pore. *J Gen Physiol* 99:645-662.
3. Hu, P., S. Meyers, F. X. Liang, F. M. Deng, B. Kachar, M. L. Zeidel, and T. T. Sun. 2002. Role of membrane proteins in permeability barrier function: uroplakin ablation elevates urothelial permeability. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F1200-1207.
4. Loo, D. D., T. Zeuthen, G. Chandy, and E. M. Wright. 1996. Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13367-13370.
5. MacAulay, N., S. Hamann, and T. Zeuthen. 2004. Water transport in the brain: role of cotransporters. *Neuroscience* 129:1031-1044.
6. Duquette, P. P., P. Bissonnette, and J. Y. Lapointe. 2001. Local osmotic gradients drive the water flux associated with Na⁽⁺⁾/glucose cotransport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3796-3801.
7. 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⁺/glucose cotransport. *Biophys J* 86:125-133.
8. Lapointe, J. Y., M. P. Gagnon, D. G. Gagnon, and P. Bissonnette. 2002. Controversy regarding the secondary active water transport hypothesis. *Biochem Cell Biol* 80:525-533.
9. Zeuthen, T., A. K. Meinild, D. D. Loo, E. M. Wright, and D. A. Klaerke. 2001. Isotonic transport by the Na⁺-glucose cotransporter SGLT1 from humans and rabbit. *J Physiol* 531:631-644.
10. Zeuthen, T., E. Zeuthen, and D. A. Klaerke. 2002. Mobility of ions, sugar, and water in the cytoplasm of *Xenopus* oocytes expressing Na⁽⁺⁾-coupled sugar transporters (SGLT1). *J Physiol* 542:71-87.
11. Loo, D. D., E. M. Wright, and T. Zeuthen. 2002. Water pumps. *J Physiol* 542:53-60.
12. Schultz, S. G. 2001. Epithelial water absorption: osmosis or cotransport? *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3628-3630.

13. Spring, K. R. 1999. Epithelial Fluid Transport--A Century of Investigation. *News Physiol Sci* 14:92-98.
14. Reuss, L. and B. H. Hirst. 2002. Water transport controversies--an overview. *J Physiol* 542:1-2.
15. Reuss, L. 1996. 'Active' water transport? *J Physiol* 497 (Pt 1):1.
16. Bourgeois, F., M. J. Coady, and J. Y. Lapointe. 2004. Determination of transport stoichiometry for two cation-coupled myo-inositol cotransporters: SMIT2 and HMIT. *J Physiol*.
17. Hediger, M. A., E. Turk, and E. M. Wright. 1989. Homology of the human intestinal Na⁺/glucose and *Escherichia coli* Na⁺/proline cotransporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:5748-5752.
18. Bissonnette, P., J. Noel, M. J. Coady, and J. Y. Lapointe. 1999. Functional expression of tagged human Na⁺-glucose cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J Physiol* 520 Pt 2:359-371.
19. Coady, M. J., F. Jalal, P. Bissonnette, M. Cartier, B. Wallendorff, G. Lemay, and J. Lapointe. 2000. Functional studies of a chimeric protein containing portions of the Na⁽⁺⁾/glucose and Na⁽⁺⁾/myo-inositol cotransporters. *Biochim Biophys Acta* 1466:139-150.
20. Steiner, R. A., M. Oehme, D. Ammann, and W. Simon. 1979. Neutral carrier sodium ion-selective microelectrode for intracellular studies. *Analytical chemistry* 51:351-353.
21. Jaisser, F., P. Jaunin, K. Geering, B. C. Rossier, and J. D. Horisberger. 1994. Modulation of the Na,K-pump function by beta subunit isoforms. *J Gen Physiol* 103:605-623.
22. Meinild, A., D. A. Klaerke, D. D. Loo, E. M. Wright, and T. Zeuthen. 1998. The human Na⁺-glucose cotransporter is a molecular water pump. *J Physiol* 508 (Pt 1):15-21.
23. 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.
24. Zeuthen, T. and D. A. Klaerke. 1999. Transport of water and glycerol in aquaporin 3 is gated by H⁽⁺⁾. *J Biol Chem* 274:21631-21636.
25. Lide, D. R. 2004. Handbook of chemistry and physics.

26. 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.
27. Sauer, G. A., G. Nagel, H. Koepsell, E. Bamberg, and K. Hartung. 2000. Voltage and substrate dependence of the inverse transport mode of the rabbit Na⁽⁺⁾/glucose cotransporter (SGLT1). *FEBS Lett* 469:98-100.
28. Meinild, A. K., D. D. Loo, A. M. Pajor, T. Zeuthen, and E. M. Wright. 2000. Water transport by the renal Na⁽⁺⁾-dicarboxylate cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol* 278:F777-783.
29. Valentine, M. T., Z. E. Perlman, T. J. Mitchison, and D. A. Weitz. 2005. Mechanical properties of *Xenopus* egg cytoplasmic extracts. *Biophys J* 88:680-689.

Legends:

Figure 1: Oocyte volume measurements during the hypertonic application of mannitol or α -methyl-glucose (α MG). Panel A) shows the volume of an oocyte expressing the Na^+ /glucose cotransporter (SGLT1) which was exposed to 5 mM mannitol and then to 5 mM α MG for 3 different time periods (20, 40, 60 s), the recordings from which have been superimposed (both current and volume measurements). The currents at -50 mV and the volume measurements are aligned to the moment of α MG addition. Panel B) shows the same type of experiment but with an oocyte coexpressing SGLT1 and aquaporin (AQP1). Because of the larger water permeability of this type of oocyte, 2mM mannitol or α MG were used and the cotransport was stopped after 20, 40, 60 s by simultaneous addition of phlorizin (Pz, 50 μ M) and removal of α MG.

Figure 2: Example of curve fitting results for a typical oocyte coexpressing SGLT1 and AQP1. The oocyte was exposed to a brief hypertonic shock (2 mM mannitol); later the cotransport current was stimulated for 20 s by the hypertonic addition of 2 mM α MG. The smooth line labeled 1 is obtained from fitting a simple exponential function to the volume reduction caused by the hypertonic shock. The smooth line labeled 2 is drawn from Eq 2 and mimics the cell shrinkage due to a combined hypertonic shock and stimulation of Na^+ /glucose cotransport. Finally, the curve labeled 3 represents a double Boltzmann equation (obtained from Eq 4) fitting the rapid cell swelling that follows the cotransport inhibition and the return to an isotonic solution.

Figure 3: Progression of changes in intracellular hypertonicity following cotransport periods of 20 (triangles), 40 (squares) and 60 s (circles). Panel A) represents changes in intracellular tonicities as averaged from 10 different SGLT1-expressing oocytes. The data shown in gray represent the calculated changes in intracellular hypertonicities during the cotransport periods of 60 s with the assumption that all water transport is passive. The data shown in black represents the changes in hypertonicity after cotransport has been halted by removal of substrate. Panel B) presents the average changes in intracellular hypertonicities for 12 oocytes expressing SGLT1 and AQP1. The data shown in black represents the changes in hypertonicity after cotransport has been halted by simultaneous removal of substrate and addition of inhibitor.

Figure 4: Modeling cell swelling during and after hypertonic application of 5 mM α MG for 20 s to an oocyte expressing SGLT1. A simulation of the passive water transport is presented with diffusion coefficients set at $0.030 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (top smooth curve). The accessible volume fraction was set at 0.61 and the number of osmolytes per transported charge was 1.37. A simulation of active water cotransport was done (bottom smooth curve) using a stoichiometry of 264 water molecules per turnover and the water permeability measured for this oocyte ($9 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$).

Figure 5: Experimental determination of diffusion coefficients for Na^+ and for α MG. Injections were done at points indicated by the arrow mark in all cases. Panel A) represents the average of 12 measurements of Na^+ concentration in the periphery of an oocyte following the central injection of 10 nl of 100 mM sodium cyclamate at $t=300$ s .

As the resting $[\text{Na}^+]$ varies between oocytes, changes from the resting $[\text{Na}^+]$ are shown for reasons of clarity. The rise in Na^+ concentration was fitted with the diffusion model and gave an average diffusion coefficient of $0.29 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (smooth line). The bottom jagged trace represents the Na^+ concentration after a central injection of 10 nl water (mean of 3 oocytes). B) Determination of the diffusion coefficient for αMG . αMG was injected (10 nl of 500 mM αMG solution) in the center of oocytes expressing SGLT1. The αMG concentration in the plasma membrane vicinity was detected by measuring the electrogenic efflux of Na^+ and αMG through SGLT1 by using brief voltage clamps at +50 mV every 30 s (open squares). The αMG concentration, assumed to be proportional to the outward current, was fitted with the diffusion model and gave an average diffusion coefficient of $0.15 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (smooth line over the open squares). An experiment employing Pz was used as a control to show that the αMG signal was specific to SGLT1; Pz was removed after 12 minutes (line with triangles). C) Determination of the diffusion coefficient for Na^+ in a viscous sucrose solution. 10 nl of 750 mM sodium chloride with a viscosity of 16 cP was injected into the center of a bath containing a saline solution of 15 cP viscosity and a Na^+ -selective electrode was used to measure the sodium concentration at 1 mm from the injection site (jagged line). The steady-state rise in Na^+ concentration (average of 4 experiments, error bars represent SEM measured at every min) was fitted with a linear equation (dashed line) in order to be comparable to the predictions of the diffusion model. Three different diffusion coefficients were used: 0.8 (D1), 0.9 (D2) and $1.0 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (D3). Each curve was used as calibration curve which the linear part was fit with a linear regression (dash lines). The average diffusion coefficient found from 4 similar experiments was $0.09 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

Figure 1:

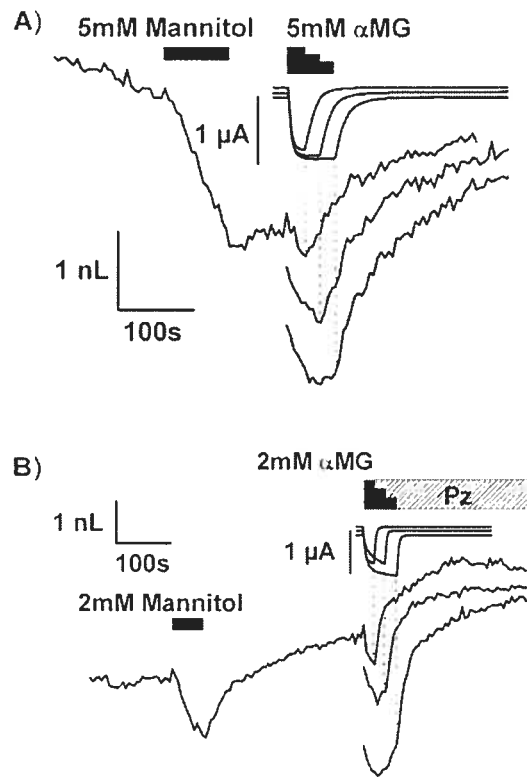


Figure 2:

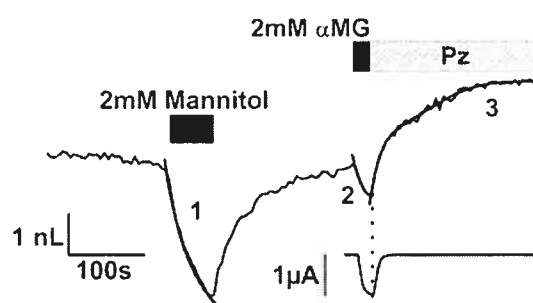


Figure 3:

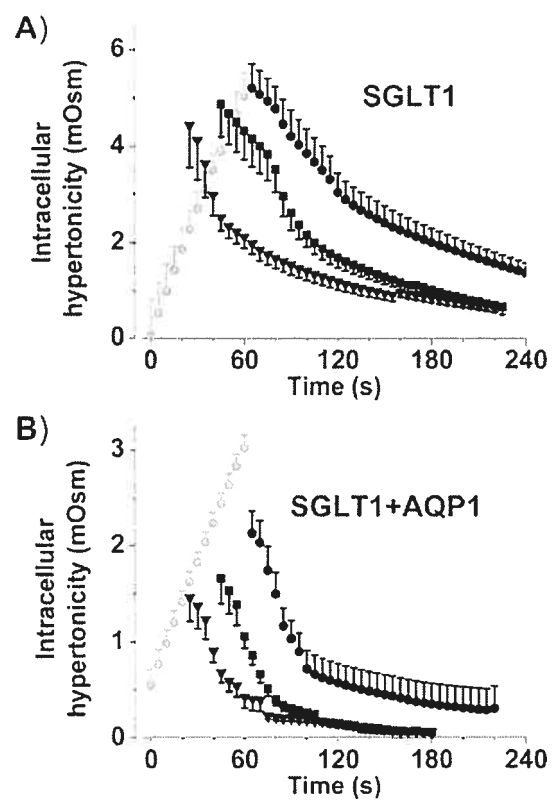


Figure 4:

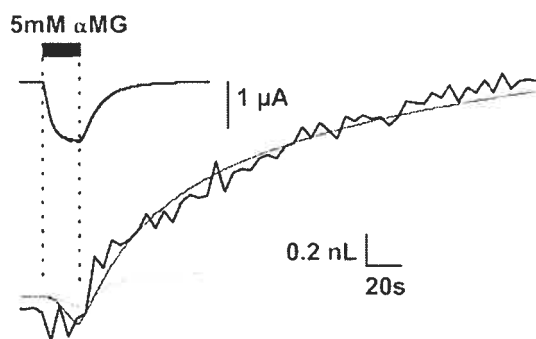
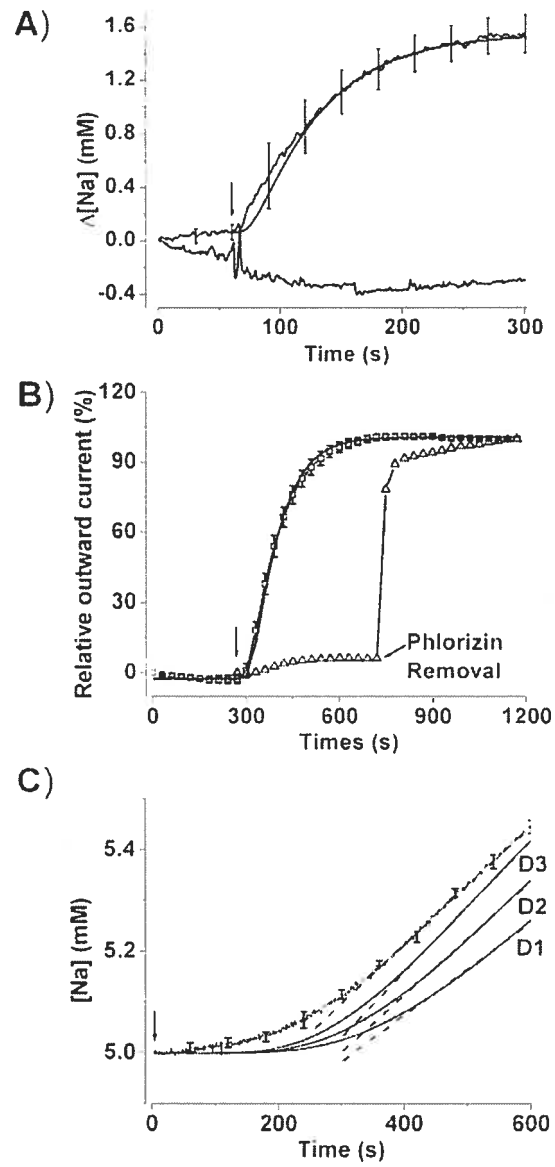


Figure 5:



Chapitre III – Mesure de la diffusion du sodium intracellulaire avec la gramicidine

3.1- Principe

Une méthode moins invasive d'ajouter du sodium intracellulaire est de le faire entrer par une protéine membranaire au lieu de l'injecter. La protéine utilisée est la gramicidine D, un ionophore sélectif pour les cations qui peut produire de grands courants et qui s'insère facilement dans la membrane. Donc, la gramicidine permet le passage du sodium pendant un bref instant lors de l'imposition d'un potentiel négatif et d'augmenter sa concentration à proximité de la membrane. Ensuite, nous appliquons le potentiel de repos de l'ovocyte pour arrêter l'entrée du sodium et nous le laissons diffuser dans le volume accessible où une électrode sélective au sodium est placée au centre de l'ovocyte.

En fait, cette expérience est la première que nous ayons tentée pour expliquer l'accumulation d'osmolytes sous la membrane par un coefficient de diffusion du sodium que nous proposons être plus faible dans le cytosol qu'en solution aqueuse. Le but était de faire entrer, le plus ponctuellement possible, du sodium dans l'ovocyte et de mesurer, en son centre, l'augmentation de la concentration de sodium en appliquant soudainement un potentiel négatif (-125 mV) à un ovocyte dont la membrane contient de la gramicidine. Ces résultats n'ont pas été retenus, car lors de l'imposition du potentiel un bruit électrique (voir pic de la fig. 10) était détecté et l'analyse devait être réalisée seulement sur la portion finale de la courbe. De plus, on ne pouvait garantir que 100% du courant entrant était effectivement dû à l'entrée de Na^+ . Cependant, l'analyse de ces résultats est tout de même possible et permet de donner une idée de l'ordre de grandeur de ce coefficient de diffusion. Le détail du programme utilisé pour la diffusion du sodium avec la gramicidine se retrouve dans l'appendice 2.

3.2- Matériels et Méthodes

Les électrodes sélectives au Na^+ étaient calibrées avec des solutions contenant trois concentrations différentes de sodium. Cela permet de connaître les valeurs P (perméabilité au Na de l'électrode sélective) et k (constante servant au positionnement vertical de la courbe) du programme (Eq. 20) afin de pouvoir convertir les mesures en mV en concentrations (mM). Ces solutions contiennent (en mM) : 5 Na/95 K, 10 Na/90 K ou 100 Na/2 K avec 0,82 MgCl_2 , 10 Hepes et le pH est fixé à 7,6 avec du Tris. Il est important de ne pas mettre de calcium dans ces solutions, car l'électrode sélective au sodium y est très sensible. Pour les expériences de diffusion dans l'ovocyte, nous ajoutons 0,74 mM de CaCl_2 à une partie du volume de la solution de calibration contenant 10 mM de sodium pour permettre une meilleure viabilité à l'ovocyte. L'ionophore, gramicidine D, est dissout dans le DMSO pour une concentration finale de 11g/L (solution stock). Ensuite, nous ajoutons 6 mg/L de gramicidine D (concentration saturante en solution aqueuse) provenant de la solution stock et 0,74 mM de CaCl_2 à une partie du volume des solutions de calibration contenant 5 et 100 mM de sodium.

Trois électrodes percent la membrane de l'ovocyte : les électrodes de courant et de potentiel pour permettre d'imposer un voltage et une électrode sélective au sodium située au centre de l'ovocyte. La gramicidine est insérée dans la membrane d'un ovocyte en l'incubant dans une solution de 5 mM sodium contenant la gramicidine sans imposer de voltage membranaire. La faible concentration en sodium a pour but de minimiser son entrée dans la cellule assurant une concentration interne pour le sodium aussi stable que possible. Après 5-6 minutes, l'insertion de la gramicidine est assez importante pour générer d'importants courants ($\sim 4\mu\text{A}$ à -125 mV) et produire une entrée de sodium ponctuelle, i.e. une entrée de sodium se faisant sur un court intervalle de temps. Ensuite, nous faisons perfuser la solution de 100 mM sodium contenant la gramicidine, nous attendons 30 secondes pour que le changement de solution soit complet et nous imposons un potentiel membranaire de -125 mV pendant 30

secondes. Nous avons choisi de garder la gramicidine présente durant cette période, car nous avons observé qu'en son absence le courant diminue rapidement comme si l'ionophore était internalisé ou retournait en solution. Sa présence permet de garder un meilleur courant pendant ces 30 secondes. La forte concentration de sodium et le potentiel très négatif fait en sorte que nous maximisons la force électromotrice favorisant l'entrée de sodium. Par conséquent, nous pouvons supposer que le courant est très majoritairement sodique pour les analyses subséquentes. Après ces 30 secondes, nous perfusions une solution contenant 10 mM sodium sans gramicidine pour le reste de l'expérience. La gramicidine est enlevée pour minimiser les entrées ou sorties de sodium. Nous utilisons une concentration de 10 mM sodium (et non 5 mM), car la concentration de sodium est plus près de 10 mM après la stimulation avec la gramicidine.

3.3- Résultats

La figure 10A montre, pour une expérience typique, l'augmentation de la concentration de sodium suite à l'imposition d'un potentiel de -125 mV en présence de gramicidine. La figure 10B présente la moyenne de l'augmentation de la concentration centrale de Na^+ telle qu'obtenue pour 10 ovocytes de 3 grenouilles différentes. Le coefficient de diffusion obtenu est de $0,56 \pm 0,07 \times 10^{-5}$ cm^2/s ($n=10$) l'erreur est le SEM. Cette valeur est ~ 2 fois plus grande que celle mesurée par l'injection, les raisons pouvant expliquer cette différence seront mentionnées dans la discussion.

Avant de terminer, il est important de bien comprendre les limitations de cette technique. Lorsque nous activons le circuit d'imposition du potentiel à l'ovocyte, de grands courants sont injectés et l'électrode sélective en est fortement affectée. Notre électrode sélective prend malheureusement plusieurs secondes avant de revenir à une lecture stable de la concentration de Na^+ .

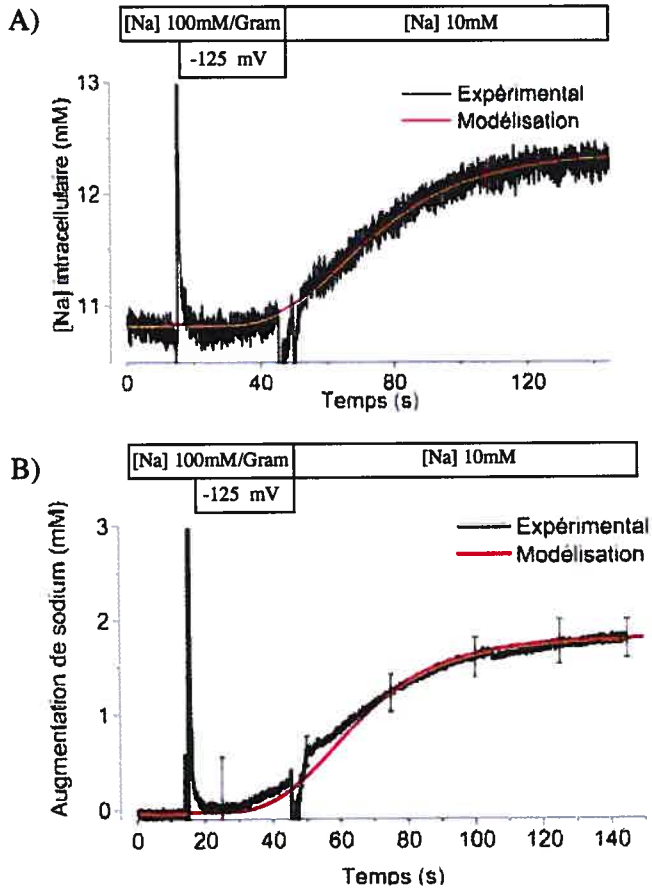


Figure 10 : Modélisation de la diffusion du sodium

Utilisation de la gramicidine pour faire entrer le sodium dans le milieu intracellulaire. A) Modélisation (rouge) avec un ovocyte typique de la diffusion (noire) intracellulaire du sodium. B) Moyenne des 10 expériences faites avec la gramicidine.

Le fait qu'elle prenne plus d'une fraction de seconde pour se stabiliser est probablement dû à sa très grande résistance qui approche les 40 GΩ. Cela se traduit par les énormes pics que nous retrouvons dans la figure 10 A et B. En plus de ce problème, nous remarquons dans la figure 10 B une augmentation de la concentration de sodium qui semble soudainement avoir lieu après l'imposition du voltage i.e. après le pic. Il est impossible de croire qu'une augmentation aussi rapide puisse avoir lieu. Après vérification, nous avons remarqué que si nous imposons un voltage de -125 mV à un circuit équivalent à un ovocyte, le potentiel lu par l'appareil sélectif différait de 1 mV de l'appareil d'imposition de

voltage. Nous nous souviendrons que le signal sélectif provient de la soustraction du signal lu par l'appareil d'imposition de voltage à celui de l'appareil sélectif. De plus, avec de petites concentrations de sodium (5-8 mM), 1 mV n'est pas négligeable et c'est la raison pour laquelle le signal augmente soudainement pendant l'imposition d'un voltage (fig 10B après l'imposition du voltage). Cet écart ne peut pas être supprimé en calibrant les appareils, car il n'est même pas de 1% (1 mV sur 125 mV) et change légèrement entre chaque mesure. Pour toutes ces raisons, nous devons nous concentrer sur la partie finale de la courbe de diffusion et perdre l'information sur l'augmentation initiale de la concentration de sodium.

De plus, pour la figure 10 B, nous remarquons après le second pic que le tracé semble linéaire pour quelques secondes. Selon moi, il s'agit d'un mélange de deux signaux : l'augmentation de la concentration et la re-stabilisation de l'électrode sélective suite à l'artéfact qui accompagne le retrait du voltage imposé. Cette dernière fait en sorte qu'avec le modèle de diffusion, on tentera surtout de reproduire la fin de la courbe que son début. Donc, nous sommes en droit de croire uniquement la portion finale de la courbe et c'est pour ces raisons que nous gardions ces résultats seulement pour nous donner un ordre de grandeur du coefficient de diffusion.

Chapitre IV - Discussion

4.1- Problématique

L'argument central qui permettrait de rejeter définitivement l'hypothèse du transport secondairement actif de l'eau par SGLT1 serait de démontrer expérimentalement la présence de ce gradient d'osmolarité au moment où l'eau traverse la membrane. Cette tâche est ardue, car il faut mesurer rapidement et précisément de petites accumulations. De plus, il arrive qu'une même courbe expérimentale puisse être interprétée de façon satisfaisante selon l'une ou l'autre des deux écoles de pensée. Le but de ce travail était donc de concevoir une expérience dont les résultats ne pourraient être cohérents qu'avec une seule des deux hypothèses. Cette expérience est présentée dans l'article joint à ce mémoire. Si l'accumulation d'osmolytes suite à une courte période de transport était négligeable, le volume cellulaire ne devrait pas augmenter rapidement avec le retour de la perfusion d'une solution isotonique après la période de stimulation de SGLT1. Lorsque nous arrêtons la stimulation de SGLT1 et que le courant de cotransport devient pratiquement nul, le présumé transport d'eau secondairement actif devrait aussi s'arrêter. Dans ces conditions, si nous détectons un gonflement, il ne peut être que le résultat d'un transport passif qui indique la présence d'un gradient osmotique à travers la membrane de l'ovocyte. La question qui se pose alors est de savoir si cette accumulation d'osmolytes est quantitativement suffisante pour expliquer, de façon passive, la totalité du transport d'eau associé au cotransport de Na et de glucose.

4.2- Retour sur l'accumulation d'osmolytes

Tout d'abord, nous pouvons nous demander pourquoi l'accumulation d'osmolytes prédite durant la période de transport ne concorde pas exactement avec l'accumulation mesurée au moment d'arrêter le cotransport (fig. 3 de l'article). Il

faut comprendre que ces courbes se font en deux étapes : une exponentielle est utilisée pour lisser la courbe volume_vs_temps lors de la stimulation hypertonique de SGLT1 alors qu'une exponentielle plus une Boltzmann ou une double Boltzmann sont respectivement utilisées pour les expériences avec SGLT1 ou SGLT1/AQP1 lors du lissage de la mesure du volume qui suit le retrait de l' α MG. Nous varions les paramètres de ces équations pour un ajustement optimal de la courbe de lissage à la mesure expérimentale compte tenu de son niveau de bruit. Si la courbe suit assez bien l'ensemble de la mesure expérimentale, on observe que c'est au début et à la fin de ces segments que l'ajustement est le moins bon. Il convient donc de prendre les pentes initiales et finales avec prudence. Ce phénomène est très simple à comprendre, mais impossible à contourner dans notre cas. Lors d'un lissage, le logiciel n'a pas de difficulté à déterminer la tendance des données se trouvant au milieu de la courbe, car il y a des données à gauche et à droite des points à considérer. Cependant, l'ajustement des données aux extrémités ne subit pas les mêmes contraintes. Comme le sommet entre les deux courbes de la fig 3 se trouve à la jonction de ces deux extrémités, cela peut expliquer encore une fois que la correspondance ne soit pas parfaite. En plus, ce phénomène sera plus important si nous voulons lisser une courte portion de courbe, comme la stimulation de 20 secondes. Dans ce cas, le logiciel n'a que 20 points pour permettre de calculer une pente qui part d'une valeur maximale et qui est progressivement réduite par l'accumulation d'osmolytes transportés. Cela fait beaucoup d'informations à aller chercher avec peu de points, expliquant que la déviation risque d'être plus importante pour les intervalles de temps plus courts. En conclusion, il est possible d'expliquer assez simplement pourquoi nous avons obtenu une jonction imparfaite entre la prédiction du gradient osmotique présent à la fin de la période de cotransport et le gradient osmotique expérimentalement observé dans la période post-cotransport.

Revenons sur un résultat obtenu concernant la quantité d'osmolytes accumulées sous la membrane et donnant les valeurs respectives de ~ 5 et ~ 2 mOsm pour les

expériences avec SGLT1 seul ou avec SGLT1 et AQP1. Il est troublant de remarquer que les accumulations d'osmolytes mesurées correspondent quantitativement à la grandeur des chocs hypertoniques qui ont été appliqués dans chacun des cas. Ceci n'est pas vraiment une coïncidence puisque la grandeur des chocs hypertonique a été justement choisie pour neutraliser les effets de l'activation du cotransport sur le volume cellulaire. Dans des expériences préliminaires, nous avons rapidement remarqué qu'une hypertonicité de 10 mOsm, telle qu'utilisée par l'équipe de Zeuthen, produisait un rétrécissement cellulaire qui dominait largement les effets de gonflement dû à l'activation de SGLT1. C'est pour cette raison que nous avons ramené l'hypertonicité de nos solutions de transport à 5 mOsm. De même, en présence de SGLT1 et de l'AQP1, une hypertonicité de 5 mOsm était bien supérieure à la valeur nécessaire pour contrer les effets du cotransport. Il n'est donc pas surprenant que les hypertonicités intracellulaires mesurées en présence de SGLT1 ou de SGLT1 et AQP1 soient similaires aux hypertonicités des solutions qui ont été choisies pour contrer les effets du cotransport.

Cependant, une seconde question peut être soulevée : comment se fait-il que la présence de l'aquaporine fait diminuer le gradient osmotique local généré par l'activation du cotransport? Nous croyons qu'en présence de l'AQP1, la perméabilité à l'eau des ovocytes est tellement forte qu'un gradient osmotique, qu'il soit dû à la présence d'une solution hypertonique ou à un transport d'osmolytes, est rapidement neutralisé par un flux d'eau rapide. La présence de l'aquaporine limite donc l'accumulation d'osmolytes transportés de sorte que le transport tend rapidement vers un transport effectivement isotonique.

La force du type d'expérience rapportée à la fig. 3 de l'article réside dans le fait que la partie faisant suite à l'arrêt de la stimulation de SGLT1 est totalement indépendante du fait que SGLT1 puisse cotransporter l'eau ou non. Le fait est que dans cette portion de l'expérience, SGLT1 ne fonctionne plus et que tout flux d'eau observé durant cette période doit être le fruit d'un transport passif. Dans un

deuxième temps, comme l'osmolarité intracellulaire détectée lorsque le cotransport vient d'être arrêté est quantitativement suffisante pour expliquer les flux de volume en présence de cotransport et d'une solution hypertonique, nous n'avons pas d'autre choix que d'affirmer que, durant la stimulation de SGLT1, l'hypothèse d'un transport d'eau actif n'est pas nécessaire.

4.3- Problème relié à la mesure du coefficient de diffusion

La gramicidine :

La première expérience, pour déterminer le coefficient de diffusion d'un ion comme le sodium, fut celle utilisant la gramicidine comme moyen pour faire entrer le sodium dans l'ovocyte. Cela semblait être l'expérience idéale. Il suffisait de trouver un pore (la gramicidine) permettant l'entrée massive de sodium pendant un court intervalle de temps. Ensuite, nous avons diminué le potentiel pour arrêter l'entrée du sodium à travers la gramicidine et permettre au sodium ayant pénétré dans le cytosol de l'ovocyte de diffuser jusqu'à l'obtention d'une concentration uniforme. Une sonde (l'électrode sélective au Na) permet de suivre à partir du centre de l'ovocyte l'évolution de la concentration et un programme de diffusion basé sur la loi de Fick permet d'en reproduire la forme à l'aide de véritables variables physiques. Malheureusement, certains aspects hors de notre contrôle ont fait en sorte que le programme ne reproduit pas tout à fait la réalité.

Comme mentionné précédemment, lorsque nous calculons la quantité d'osmolytes ayant entré dans le cytosol en intégrant la courbe de courant, nous supposons que le flux d'ions traversant la gramicidine est purement de sodium même si la gramicidine n'est pas très sélective entre le Na et le K. Nous avons tenté de maximiser les conditions qui favorisent l'entrée de Na (potentiel à -125 mV, grande concentration extracellulaire de Na et faible concentration de K). De plus, le programme exploite la symétrie sphérique. Par contre, si l'expérience ne suit pas cette symétrie, le programme sera dans l'impossibilité de reproduire fidèlement la réalité expérimentale. Ainsi, nous avons supposé que le sodium

entre de façon homogène tout autour de l'ovocyte pour s'accumuler uniformément et se diriger vers le centre de l'ovocyte selon son coefficient de diffusion. Cependant, des mesures prises à l'aide de l'électrode sélective en périphérie de l'ovocyte indiqueraient plutôt une insertion inhomogène de la gramicidine qui serait influencée par le flux de la solution du bain. Par conséquent, il n'y a pas d'accumulation uniforme sous la membrane, la symétrie de notre modèle est par ce fait perdue et il n'est plus fiable. Aucune expérience directe sur l'hétérogénéité de la distribution de la gramicidine n'a été tentée, car les expériences qui ont suivi avec les injections ont donné de bien meilleurs résultats. Comme la distribution peut varier d'une expérience à l'autre et puisque nous ne connaissons pas les sites privilégiés par la gramicidine, l'augmentation de la concentration détectée par la sonde peut en être biaisée. À ce stade, la valeur obtenue à l'aide de ce type d'expérience ne peut servir qu'à donner l'ordre de grandeur du coefficient de diffusion que nous recherchons.

L'injection :

Après avoir travaillé un certain temps et nous être assurés de l'existence de l'accumulation d'osmolytes, nous voulions comprendre et expliquer le phénomène qui régit cette accumulation rapide. Pour ce faire, nous nous sommes tournés vers la mesure du coefficient de diffusion intracellulaire pour le Na et pour le glucose. L'avantage de la technique que nous avons utilisée réside dans le fait que nous mesurons le coefficient de diffusion réel de la molécule ou de l'ion d'intérêt et non pas celui d'un fluorophore qui nécessiterait, par exemple, une certaine extrapolation pour prédire la diffusion d'une molécule beaucoup plus petite ou portant une charge. Il nous a été possible de reproduire parfaitement la courbe expérimentale du sodium et de l' α MG à l'aide de notre modèle. Cependant, la prise de ces mesures n'était pas triviale car le phénomène de convection peut devenir très important lorsque nous mesurons la diffusion à l'échelle du mm. L'injection d'un grand volume (e.g. 46 nl dans un ovocyte d'environ 1000 nl), entraînerait un flux de convection important qui ferait que le déplacement des osmolytes ne serait plus totalement dépendant de la diffusion.

Par contre, l'injection d'un petit volume, 10 nl, limitait la poussée du piston sur le liquide et minimisait la formation d'un flux de convection. Par exemple, l'expérience présentée dans l'article utilise une injection de 10 nl d' α MG 500 mM, tandis qu'initialement nous avons utilisé une injection de 46 nl d' α MG 100 mM (Fig 11). Cette expérience consiste à placer une pipette d'injection contenant une solution d' α MG 100 mM au centre d'un ovocyte exprimant SGLT1. Au temps $t=280s$, nous injectons 46 nl de cette solution au centre de l'ovocyte et nous imposons un potentiel de +50 mV à tous les 30 s pour mesurer le courant sortant. Entre les impulsions de voltage, le potentiel est maintenu à -50 mV. Ainsi, au fur et à mesure que l' α MG atteint la membrane de l'ovocyte contenant SGLT1, les courants sortants augmentent et cette augmentation est supposée représenter le coefficient de diffusion de l' α MG. Un contrôle pour vérifier l'origine du courant sortant a été réalisé en inhibant SGLT1 avec la présence de Pz dans la solution extérieure. Pour ce contrôle, l'injection se fait de la même façon, sauf que cette fois SGLT1 est inhibé. Après avoir attendu un temps suffisamment long pour permettre à l' α MG de diffuser dans tout le cytosol, la Pz est retirée ($t=700s$).

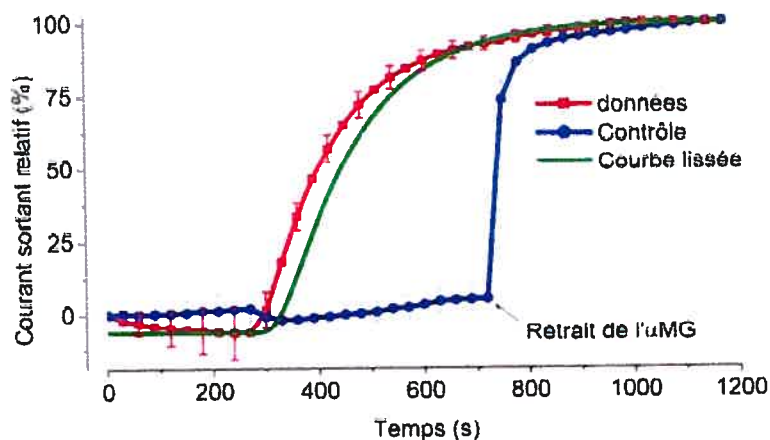


Figure 11 : Injection de 46 nl d' α MG 100 mM au centre de l'ovocyte.

Nous remarquons que la prédiction du modèle (vert) ne s'ajuste pas bien aux valeurs expérimentales (rouge). Plusieurs facteurs peuvent en expliquer la cause. L'injection a lieu à $t=280s$.

Cela permet de révéler le courant sortant et que l'injection à bel et bien fonctionnée. De plus, cela démontre que le signal observé est spécifique à SGLT1. Lorsque nous observons cette figure, nous remarquons qu'initialement le modèle ne suit pas la courbe expérimentale. Nous pensons que cette différence proviendrait d'un flux de convection créé par l'injection, de l'hétérogénéité du cytoplasme de l'ovocyte et/ou de la création d'un chemin rapide autour de l'aiguille d'injection qui entre jusqu'au centre de l'ovocyte.

Le premier phénomène mentionné est la création d'un flux de convection lors de l'injection. L'injection créerait un flux d'osmolytes faisant en sorte qu'il arrive à l'électrode sélective ou à la membrane plus rapidement que la prédiction par la simple diffusion. Ce flux s'amenuiserait rapidement, pour faire finalement place à la diffusion pure et c'est pour cette raison que nous arriverions à reproduire théoriquement la partie finale de la courbe. Nous avons tenté de déterminer si l'injection créait réellement un flux de convection en utilisant une goutte d'eau comme substitut à l'ovocyte et en y injectant une solution colorée. Nous nous sommes vite rendu compte que la solution colorée se déplaçait de façon coordonnée en générant des 'filaments' qui se déplaçaient facilement sur une distance de 1 mm. La convection est donc un mode de transport dominant à cette échelle et c'est seulement si la viscosité de la solution est augmentée à 15 cP (solution aqueuse de sucrose de 1840 mM) que le flux de convection est minimisé (fig. 5 C de l'article). L'avantage principal de travailler dans une goutte d'eau est de pouvoir clairement voir à l'intérieur pour bien positionner les électrodes et placer la pointe de l'injecteur parfaitement au centre par exemple. De plus, nous pouvons modifier la constitution de la goutte pour mesurer les effets de la viscosité, de la force ionique et de la grosseur des molécules sur le coefficient de diffusion des molécules injectées. Ce qui nous soulage est que la viscosité du cytosol a été évaluée à 10-30 cP (Valentine *et coll.*, 2005), ce qui contribue à minimiser les effets de convection dans un ovocyte. Finalement, cette expérience nous a permis de valider notre protocole expérimentale sur la

diffusion dans les ovocytes et vérifier l'effet du flux de convection sur nos mesures.

Le deuxième phénomène fait appel aux différents chemins que les osmolytes peuvent parcourir pour traverser un ovocyte. Comme mentionné dans l'introduction, il ne fait aucun doute qu'il existe une hétérogénéité dans le cytosol d'un ovocyte (Dascal, 1987; Sehy *et coll.*, 2002; Sehy *et coll.*, 2004). De plus, le noyau se retrouve du côté animal de l'ovocyte, ce qui pourrait influencer le coefficient de diffusion de ce côté. Par conséquent, nous pourrions supposer que les molécules injectées pourraient emprunter des voies rapides et des voies lentes, par exemple selon le pôle animal ou végétal de la cellule. Dans ce cas, nous pourrions obtenir des résultats différents si nous utilisons comme détecteur une électrode sélective se trouvant à un endroit précis dans l'ovocyte ou un cotransporteur (SGLT1) distribué également des deux côtés de l'ovocytes. Dans le premier cas, nous observerions un coefficient de diffusion représentatif de l'emplacement de l'électrode alors que dans le second, nous obtiendrions plutôt une moyenne des coefficients de diffusions dans l'ensemble de l'ovocyte. Nous sommes conscients de cette limitation et c'est pourquoi nous ne considérerons la mesure du coefficient de diffusion que comme une évaluation un peu grossière des phénomènes possiblement complexes qui se passent dans le cytosol d'une cellule vivante.

Le troisième phénomène est un cas particulier de la possibilité que nous venons de considérer. En insérant l'injecteur au centre de l'ovocyte, il est possible que nous créions un passage entre le cytoplasme et la paroi de l'électrode d'injection. La pression engendrée par l'injection ferait en sorte qu'une partie du liquide remonterait dans ce passage vers la surface de l'ovocyte. Ce phénomène serait surtout important pour les expériences utilisant SGLT1 comme moyen de détection puisque la présence d'une voie de diffusion rapide augmenterait le coefficient de diffusion moyen que nous mesurons dans ces conditions. Après plusieurs secondes, l' α MG se trouvant au centre commencerait à arriver à la

membrane par diffusion à travers la portion cytosolique restée intacte. C'est pour cette raison que nous avons toujours préféré ajuster le modèle avec la partie finale de la courbe de diffusion (fig. 11) puisque cette portion a moins de chance d'être influencée par la convection qui produit des effets plus précoces.

En conclusion, l'injection d'un plus petit volume a permis de résoudre, du moins en partie, le problème que nous avons illustré à la Fig. 11. Cela semble indiquer que le phénomène principal provoquant la déviation du modèle lors de l'injection de 46 nl serait causé par des flux de convection. Ainsi, l'injection d'un plus gros volume créerait dans l'ovocyte un flux d' α MG provoquant son arrivée prématurée au bord de la membrane, d'où une augmentation initiale de la concentration d' α MG plus rapide que prédite par le modèle de diffusion. Après quelques secondes, ce flux de convection s'amenuiserait pour faire place à la simple diffusion. Ainsi, il est rassurant de constater que, malgré qu'une injection de 46 nl produise une augmentation de concentration périphérique plus rapide que pour une injection de 10 nl, les valeurs de coefficient de diffusion obtenues sont assez similaires ($0,16 \times 10^{-5} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ et $0,19 \times 10^{-5} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ pour une injection de 46 nl et 10 nl, respectivement) à condition de se concentrer sur la portion finale de la courbe lors de l'injection de 46 nl. De plus, l'expérience de l'injection dans une goutte d'eau nous a permis d'observer que l'injection d'un grand volume crée un flux de convection très visible. En clair, pour mesurer le bon coefficient de diffusion dans une cellule, il faut minimiser le flux de convection que nous pouvons créer lors de l'injection de la molécule étudiée.

4.4- Modélisation de l'accumulation d'osmolytes transportés

S'il ne fait aucun doute que les osmolytes transportés s'accumulent rapidement sous la membrane de l'ovocyte et que cette accumulation est quantitativement suffisante pour expliquer les flux d'eau observés, il nous faut reconnaître que les coefficients de diffusion mesurés ne sont pas suffisamment petits pour expliquer l'accumulation rapide de ces osmolytes. En utilisant notre modèle simple de

l'ovocyte, nous aurions besoin d'un coefficient de diffusion 3 fois plus petit que celui mesuré pour l' α MG pour expliquer les courbes de volume (fig 1 et 2 de l'article) observée lors de la stimulation du cotransport. D'autres phénomènes physiques, qui ne sont pas considérés par notre modèle, sont possiblement nécessaires pour expliquer ce qui arrive à un osmolyte qui vient d'être transporté à travers la membrane. Il est possible que les méthodes de mesure utilisées ne nous donnent qu'une valeur globale du coefficient de diffusion et que d'importantes variations radiales (sous la membrane plasmique vs au centre de l'ovocyte) ou latérales (côté végétal vs côté animal) ne puissent être négligées. Alternativement, il se pourrait que la protéine SGLT1 relâche ses ions Na^+ et/ou sa molécule de glucose dans un micro-environnement où ces solutés demeurent osmotiquement actif pendant un certain temps avant de diffuser dans le reste de l'ovocyte (Leung *et coll.*, 2000; MacAulay *et coll.*, 2002). Il faut bien réaliser que notre but n'était pas de comprendre les détails de la diffusion dans un ovocyte mais de vérifier si le transport de l'eau pouvait effectivement s'effectuer sans gradient d'osmolarité. Notre conclusion est que le transport de l'eau se fait en présence d'un gradient osmotique de grandeur suffisante pour l'expliquer complètement et que la diffusion dans un ovocyte est plus complexe que prédite par un modèle simple où le cytoplasme est représenté comme un milieu homogène.

4.5- Confrontation entre les arguments pour et contre le transport actif de l'eau.

Le premier argument avancé pour appuyer cette hypothèse repose sur l'observation d'un gonflement immédiat suite à la stimulation du transporteur SGLT1. Cet argument peut être rapidement écarté, car la régression employée pour obtenir le taux de gonflement dans les premières secondes ne représente pas suffisamment d'augmentation de volume (par rapport à l'amplitude du bruit) pour déterminer une pente crédible. Plus on s'intéresse à des temps courts (de 0 à 20s) plus l'incertitude sur la pente augmente et plus il est hasardeux de

prétendre avoir observé un gonflement « immédiat » après l'ajout du substrat cotransporté.

Le deuxième argument est qu'un canal ionique ne peut pas reproduire le gonflement initial observé avec SGLT1. Les deux écoles de pensée sont d'accord sur ce point, cependant l'erreur faite par les partisans du transport actif de l'eau est de ne pas avoir considéré le transport de molécules neutres. La diffusion d'un ion ne suit pas les mêmes règles que la diffusion d'une molécule neutre. Ce test a été réalisé dans notre laboratoire (Gagnon *et coll.*, 2004) et nous avons rapporté l'observation d'un gonflement rapide lorsque nous stimulons l'entrée de glucose par le transporteur facilité GLUT2. Ainsi, le gonflement observé avec SGLT1 est en partie dû à l'entrée d'ions (Na), qui a un effet à long terme, et en partie dû à l'entrée de molécules neutres (α MG), qui joue un rôle rapidement après la stimulation de SGLT1.

Le troisième argument est qu'aucun des prétendus cotransporteurs d'eau ne possède la même stœchiométrie pour l'eau car, selon les défenseurs du transport actif d'eau, pour un courant similaire le même ratio devrait être observé quelle que soit la protéine si l'eau était transportée de façon passive. Cette observation n'est pas correcte. Il faut plutôt regarder du côté de la perméabilité à l'eau qu'offre chacun des transporteurs. Ainsi, c'est cette dernière qui donne l'apparence d'une stœchiométrie variant d'un transporteur à un autre. Nous avons pu remarquer à la fig. 7 qu'il y avait une relation linéaire entre la stœchiométrie calculée et la perméabilité à l'eau des ovocytes exprimant tel ou tel cotransporteur. Ainsi, c'est la perméabilité propre de chacun des cotransporteurs qui semble faire en sorte que plus ou moins d'eau accompagne le transport des substrats. L'observation d'une « stœchiométrie apparente » variée pour différents cotransporteurs n'est donc pas incompatible avec la possibilité que le transport d'eau soit essentiellement passif.

Le dernier argument est le fameux transport d'eau contre son gradient chimique. Celui-ci est l'élément central qui est à l'origine du présent mémoire, tous les autres arguments ayant été contrés dans notre laboratoire. Ainsi, les défenseurs du transport actif de l'eau affirment qu'il est possible de démontrer la présence d'un flux d'eau contre son gradient de concentration en appliquant un choc hypertonique à l'aide du substrat même du cotransporteur exprimé. Cependant, ils se sont arrêtés aux effets observés pendant le choc hypertonique et non à ceux, plus intéressants, qui se produisent après ce choc. Pendant que SGLT1 est actif, l'expérience des dernières années nous montre qu'il est souvent possible d'expliquer les flux d'eau par l'une ou l'autre des deux hypothèses qui se confrontent. Par contre, le comportement après le retrait du glucose hypertonique est plus révélateur car, à ce moment-là, le cotransporteur n'est plus actif et les flux d'eau doivent pouvoir s'expliquer de façon essentiellement passive. Si l'eau qui accompagne le cotransport est dépendante d'un gradient osmotique local, ce gradient devrait persister pendant un certain temps après que le cotransport soit arrêté. Si le transport de l'eau est réellement secondairement actif, alors il devrait s'arrêter en même temps que le cotransport de Na et de glucose. Par conséquent, le comportement de la courbe du volume cellulaire au moment d'arrêter de cotransport et de revenir à une solution extracellulaire isotonique permet de trancher une fois pour toutes sur le mécanisme réel du transport de l'eau accompagnant le fonctionnement de SGLT1. Il s'avère qu'un important gonflement suit le choc hypertonique appuyant l'hypothèse du transport passif de l'eau. De plus, l'amplitude du gradient osmotique détecté s'est avérée être cohérente avec les changements de volumes observés durant la période de cotransport en milieu hypertonique (fig. 3 de l'article). Non seulement le gradient osmotique local est présent et détectable mais il a l'amplitude nécessaire pour expliquer l'ensemble du transport d'eau accompagnant l'activation de SGLT1.

Conclusions

En conclusion, nous avons pu démontrer qu'il y a bel et bien une accumulation possible d'osmolytes sous la membrane pour des temps d'exposition aussi courts que 20 secondes. De plus, cette accumulation est suffisante pour expliquer tous les flux d'eau après la stimulation de SGLT1. Cette démonstration est nécessaire et suffisante pour invalider l'hypothèse d'un transport actif de l'eau dans le cas de SGLT1. En effet, l'hypothèse d'un passage passif de l'eau à travers la membrane permet d'expliquer complètement les flux d'eau lorsque SGLT1 est stimulé. De plus, ce n'est pas le seul argument qui abonde dans ce sens. Comme mentionné auparavant, tous les arguments concernant SGLT1 et son cotransport actif de l'eau ont été contredits avec la même conclusion : le passage de l'eau à travers une bicouche lipidique ou SGLT1 est passif.

Nous avons tenté d'expliquer l'accumulation d'osmolytes sous la membrane par le fait que leurs coefficients de diffusion devaient être plus lents dans le cytosol qu'en solution diluée. Nous avons découvert que les diffusions du sodium et du glucose (fig. 5 de l'article) dans le milieu intracellulaire étaient bel et bien plus lentes d'un facteur 4 à 5. Pourtant, le coefficient de diffusion nécessaire pour expliquer le flux d'eau suite à l'arrêt de la stimulation de SGLT1 (fig. 4 de l'article) devrait être encore 3 fois plus faible que celui du glucose mentionné ci-dessus. Par conséquent, la mesure d'un coefficient de diffusion plus faible pour les osmolytes n'explique pas complètement l'accumulation réelle se trouvant sous la membrane.

La conclusion que l'eau suit passivement le cotransport de Na et de glucose ne s'applique présentement que dans le cas de SGLT1 humain puisque toutes nos expériences n'ont été faites qu'avec ce cotransporteur. Il y a cependant fort à parier que cette conclusion sera aussi valide pour les autres membres de la famille SLC5 car il est peu probable que les mécanismes de transport diffèrent

du principe qui a été établi pour SGLT1. Il serait cependant souhaitable que des expériences soient planifiées pour vérifier ce point dans le futur.

Des améliorations sur les expériences réalisées dans ce mémoire pourrait être faites. À la lumière des résultats obtenus pour la diffusion d'un osmolyte dans un goutte d'eau et la présence pressentie d'un flux de convection, il serait possible de diminuer la présence de ce flux dans les ovocytes en augmentant la viscosité de la solution à injecter. Comme la viscosité du cytoplasme d'un ovocyte, par rapport à celle de l'eau pure, est déjà assez grande ~10-30 cP (Valentine *et coll.*, 2005), nous pourrions nous permettre d'augmenter le viscosité de la solution d'injection à l'aide du polyéthylène glycol par exemple (PEG). La viscosité supplémentaire de cette solution apporterait, lors de l'injection, une réduction considérablement du déplacement non désiré (flux de convection) provoquer par la poussé du piston sur le liquide à injecter. Par conséquent, le volume injecté se retrouverait uniquement au centre de l'ovocyte et il s'en suivrait une diffusion sphérique des osmolytes injectés.

D'autres types d'expériences pourraient être réalisés pour améliorer la précision de la mesure du coefficient de diffusion. Une idée intéressante serait de pouvoir avoir une expérience où nous pourrions suivre visuellement la diffusion des osmolytes. Pour se faire, nous devrions utiliser des fluorophores, mais comme nous l'avons mentionné précédemment, l'extrapolation du coefficient de diffusion d'une petite molécule comme le sodium à partir du coefficient de diffusion d'un gros fluorophore n'est pas, à notre avis, la meilleure solution. Cependant, il serait possible de tirer avantage des fluorophores en les utilisant comme sonde sensible à la concentration d'un osmolyte pour en détecter la concentration locale dans tout le cytoplasme de l'ovocyte. Ce type de sonde existe pour le sodium et il s'agit du SBF1 (sodium-binding benzofuran isophthalate) (Peti-Peterdi *et coll.*, 2002a; Peti-Peterdi *et coll.*, 2002b). Cette sonde est très sensible au sodium ambiant pour des concentrations de 0 à 100 mM. C'est le ratio de fluorescence mesurés pour des longueurs d'onde d'excitation de 340nm et 380

nm) avec une longueur d'onde d'émission de 510 nm qui permet de convertir le signal enregistré en concentration de sodium ($[Na]_i$). L'expérience serait de préalablement injecter le SBFI dans l'ovocyte et attendre qu'il diffuse dans tout l'ovocyte. Ensuite, nous injectons le sodium au centre de l'ovocyte et nous suivons, à l'aide d'un microscope confocal, la diffusion du sodium dans tout l'ovocyte. Nous convertissons le signal en $[Na]_i$ et un programme similaire à celui employé dans ce mémoire permettrait de lisser les données expérimentales. De plus, cette technique pourrait permettre de détecter la présence d'un flux de convection lors de l'injection, à l'aide des images de fluorescence obtenues. Dans ce cas, nous observerions un volume, au centre de l'ovocyte, plus ou moins sphérique dû au flux de convection provoqué par la pression engendrée par le piston de l'injecteur. Un autre avantage de cette technique serait la possibilité d'observer la distribution du sodium dans tout le volume de l'ovocyte pendant sa diffusion ce qui permettrait de voir si la diffusion se fait uniformément ou s'elle à lieu de façon hétérogène.

Tel que mentionné précédemment, la conclusion de ce mémoire sur l'hypothèse du transport actif de l'eau peut difficilement être extrapolée aux protéines de transport à l'extérieur de la famille SLC5. Par conséquent, des expériences sur ces protéines pourraient être menées pour voir si l'hypothèse du transport passif de l'eau peut aussi être appliquée pour ces autres mécanismes de transport.

Pour terminer, tout le monde est d'accord sur le fait que SGLT1 augmente la perméabilité à l'eau d'un ovocyte lorsqu'il y est exprimé. Cependant, personne, pour le moment, ne connaît le mécanisme utilisé par SGLT1 pour générer une si grande perméabilité passive à l'eau. Plusieurs choix s'offrent à nous. Une des questions principales est de savoir si l'eau emprunte la même voie que le Na et le glucose ou si l'eau utilise une voie de perméation parallèle et indépendante. Pour se faire, il faudrait faire des mesures de perméabilité à l'eau à l'aide d'un montage de volumétrie sur des mutants de SGLT1 et comparer les modifications de perméabilité à l'eau aux modifications de transport de Na et de glucose. Nous

pourrions alors identifier un acide aminé qui est important dans le passage de l'eau à travers SGLT1 et qui affecterait ou non le transport des autres solutés. De plus, à l'aide d'une mutation cystéine, nous pourrions utiliser les réactifs méthaneithiosulfonate (MTS) pour étudier l'ajout d'un encombrement ou les effets d'un changement de charge (MTSES⁻ ou MTSET⁺) sur la perméabilité à l'eau de la protéine.

Appendice 1 : Programme pour le calcul de la diffusion

Comme mentionné précédemment, l'utilisation des équations de diffusion résolues dans une sphère s'avère très complexe. Pour cette raison, nous avons développé notre propre algorithme qui est une solution numérique du problème. Nous utilisons des équations très simples, mais ce calcul est fait plusieurs centaines de fois, d'où l'importance d'utiliser un ordinateur. Pour des raisons évidentes, il n'était pas possible de mettre ce programme dans l'article. De plus, de petites modifications doivent être apportées pour chaque type d'expérience de diffusion. Par conséquent, ce chapitre portera sur les 3 programmes utilisés pour modéliser la diffusion du sodium et du α MG par volumétrie et injection.

A.1.1- Reproduire les mesures volumétriques par la diffusion

Débutons avec le programme permettant la modélisation de l'augmentation de volume après 20 secondes de stimulation de SGLT1 avec un choc hypertonique de 5 mOsm d' α MG. Le programme est écrit pour le logiciel Matlab 6.5. Chaque programme contient 5 sections délimitées par le symbole %-----% couvrant toute la ligne. De plus, les sections peuvent contenir des commentaires qui suivent le symbole %. Les lignes du programme se terminent après le symbole « ; ».

La première section est « mettre en mémoire les fichiers nécessaires ». Cette partie permet de charger les résultats de courant et de volume pris lors de l'expérimentation.

La seconde section porte le nom de « fixer les paramètres ». Cette section, permet la saisi du temps initial de stimulation de SGLT1 et celui de la fin de l'expérience. Cela permet de mettre les contraintes de temps au programme. De plus, comme nous voulons reproduire le gonflement d'un ovocyte, celui-ci doit pouvoir virtuellement laisser passer de l'eau. Ainsi, nous entrons une

perméabilité membranaire mesurée avec le choc au mannitol sur chaque ovocyte. Pour que les osmolytes virtuels puissent se déplacer, nous entrons un coefficient de diffusion. Le volume n'étant pas complètement accessible, nous devons aussi tenir compte de la fraction de volume auquel le sodium aurait accès. Nous utilisons la valeur calculée à l'aide de l'injection de sodium, soit 0,6.

La troisième section est la « fabrication d'un ovocyte virtuel et initialisation... ». Elle sert à configurer la géométrie d'un ovocyte virtuel. Tout d'abord, le vrai volume de chaque ovocyte est entré pour permettre une résolution qui collera plus à la réalité de chaque ovocyte. Ensuite, nous séparons l'ovocyte en plusieurs couches concentriques de 40 nl. Le nombre de couches va varier d'un ovocyte à l'autre, selon son volume total. Après, nous caractérisons chacune de ces couches en calculant leur rayon et leur épaisseur, ce qui permet de connaître leur volume total. Les couches sont créées et numérotées du centre vers la membrane, pour plus de simplicité. Cependant, nous ajoutons une équation pour inverser la numérotation pour que le calcul de la section 4 soit plus facile. Finalement, nous créons une matrice de gradient de concentration, pour reproduire numériquement le choc hypertonique de 5 mM α MG. Pour plus de réalisme, nous faisons correspondre l'augmentation d'osmolarité avec l'augmentation de courant en tenant compte de l'affinité du cotransporteur, cela permet au choc de ne pas être de type onde carrée. Il est intéressant de noter que nous utilisons un incrément de temps de 0,02 seconde, mais pourquoi? La raison en est fort simple : si nous utilisons un plus gros incrément, le programme devient instable dans ses calculs et donne de faux résultats, alors qu'un plus petit incrément fait en sorte que le calcul devient rapidement très lourd.

La quatrième section est le programme de diffusion proprement dit et est intitulée « diffusion des osmolytes dans l'ovocyte virtuel ». C'est le cœur du programme de diffusion. À $t=0$, nous enregistrons les valeurs initiales de concentration des osmolytes. Pour le second temps, nous faisons entrer les osmolytes cotransportés dans la première couche du bord en intégrant la matrice de

courant. Ensuite, nous distribuons les osmolytes entre les différentes couches selon la première loi de Fick. Pour la première couche, celle se trouvant en périphérie de la membrane, nous comparons son osmolarité à celle se trouvant à l'extérieur et selon l'équation 2, un flux d'eau entrant sera possible si l'osmolarité intérieure est plus grande que celle de l'extérieur. Ensuite, le volume de cette première couche est réajusté avec l'entrée de ce flux d'eau. Une fois toutes les variables initialisées, une boucle reprend les mêmes équations jusqu'à ce que le programme atteigne le temps de fin d'expérience entré à la deuxième section. Cette boucle fait deux itérations (nommé moment 1 et moment 2) par cycle, permettant ainsi l'accélération du temps de calcul. Finalement, une équation mathématique, du nom de rem, permet l'enregistrement de la concentration se trouvant dans chacune des couches à tous les 50 itérations.

Enfin, la dernière section est la mise en graphique des résultats théorique et expérimental pour comparaison.

En conclusion, le but de l'exercice est de trouver le coefficient de diffusion qui va permettre de reproduire le plus fidèlement possible les résultats expérimentaux, car toutes les autres valeurs sont fixes pour un ovocyte donné. Le programme pour l'expérience utilisant la volumétrie donne :

```
% ----- %
% Modélisation de la diffusion d'osmolytes après un choc      %
% hypertonique lors du transport de glucose (SGLT1)          %
% ----- %
%***** On met en mémoire les fichiers nécessaires          %*****%

% Fichier de courant:
ButtonName=questdlg('Avez-vous déjà un vecteur courant?', ...
    'Pour commencer...', ...
    'OUI','NON','NON');

switch ButtonName,
case 'NON',
```

```

prompt = {'Quel est le fichier donnant l'intensité en fonction du temps ( $\mu$ A)?'};
title = 'Quel est le fichier donnant l'intensité en fonction du temps?';
lines = 1; def = {'courant23.atf'}; answer = inputdlg(prompt, title,lines,def);

reponse=char(answer(1)); int=load(sscanf(reponse,'%s'));
Intensite=-int(:,1); % Remet le courant positif
clear int;

case 'OUI',
end % switch

% Fichier de volume:
ButtonName=questdlg('Avez-vous déjà un vecteur volume?', ...
    'Pour commencer...', ...
    'OUI','NON','NON');

switch ButtonName,
case 'NON',

    prompt = {'Quel est le fichier donnant le volume en fonction du temps
(pixel)?'};
    title = 'Quel est le fichier donnant le volume en fonction du temps?';
    lines = 1; def = {'volume_SGLT1_23.txt'}; answer = inputdlg(prompt,
title,lines,def);

    reponse=char(answer(1)); vol=load(sscanf(reponse,'%s'));
    volume=vol(:,1);
    clear vol reponse;

case 'OUI',
end % switch

% ----- %
%***** Fixer les paramètres de l'expérience. *****%

% Paramètres de temps:
prompt={'temps début','temps fin'};
def={'0','300'}; %Temps en seconde
dlgTitle='paramètres de l'expérience';
lineNo=1;
reponse=inputdlg(prompt,dlgTitle,lineNo,def);

t_depart=str2num(char(reponse(1)));
t_fin=str2num(char(reponse(2)));

```

```

% Paramètres de perméabilité membranaire:
dt=0.021868;   %Delta t en seconde
w=18.2;        %Volume molaire spécifique de l'eau en cm3/mol
s=0.4;         %Surface d'un ovocyte en cm2

prompt={'Veuillez entrer la valeur de Lp en cm/s' };
def={'15.5E-4'}; %En cm/s
dlgTitle='Perméabilité (Lp)';
lineNo=1;
reponse=inputdlg(prompt,dlgTitle,lineNo,def);

Lp=str2num(char(reponse(1)));

% Paramètres du coefficient de diffusion et fraction du volume accessible:
prompt={'Quel coefficient de diffusion (D, m^2/s)?','Fraction accessible'};
def={'0.3E-10','0.60'};
dlgTitle='paramètres contraignants du modèle';
lineNo=1;
reponse=inputdlg(prompt,dlgTitle,lineNo,def);

D=str2num(char(reponse(1)));
fraction_accessible=str2num(char(reponse(2)));

% ----- %
%***** Fabrication d'un ovocyte virtuel et initialisation      %*****%
%***** de ses paramètres de forme, de concentration          %*****%
%***** d'osmolytes et de ses couches.                          %*****%

% Création d'un vecteur temps pour reproduire le temps de l'expérience:
temps=0:dt:t_fin; %Incrément de 0,02s

% Volume initial de l'ovocyte virtuel:
vol_initial=0.8755;

% Dimension des couches:
Vtot_couche=40; %En nl, volume de chacune des couches
nombre_couche=floor((vol_initial*1000)/Vtot_couche)

% Rayon de chacune des couches:
vol_couche(1:nombre_couche)=0;
rayon_0=0;

for n= 1 : nombre_couche;
rayon(n)=(((Vtot_couche+(4*pi/3)*(rayon_0^3)*1E12)*(3/(4*pi)))
*(1E-12))^(1/3); %En m
rayon_0=rayon(n);

```

```

        vol_couche(n)=(Vtot_couche*1E-12)*fraction_accessible; %En m
        n=n+1;
    end

% L'épaisseur des couches:
    dr_couche(1)=(rayon(2)-0)/2; %En m
    m=2;
    while m < nombre_couche;
        dr_couche(m:(nombre_couche-1))=(rayon(m+1)-rayon(m-1))/2; %En m
        m=m+1;
    end

%Inverser les rayons et les épaisseurs des couches:
    r=rayon(:);

    for u= 1 : nombre_couche;
        rayon(u)=r(nombre_couche-u+1);
        u=u+1;
    end

    dr=dr_couche(:);

    for v= 1 : nombre_couche-1;
        dr_couche(v)=dr(nombre_couche-v);
        v=v+1;
    end

% Arrivée progressive du choc osmotique suivant la loi de
% Michaelis-Menten:
    km= 0.77; % km de SGLT1 en mMol
    I_stab=1.466; %Courant maximum obtenu
    G=5; %[AMG] ajouté en mMol

    lmax=(I_stab*(G+km))/G;

    for time=500:3500,
        Gt(time-499)=km/((lmax/Intensite(time))-1);
    end

    osm=1.15; %nombre d'osmolytes par unité de courant pour SGLT1

% Initialisation du nombre de cycles que le programme devra faire:
    longueur=t_fin*50;

% ----- %
% ***** Diffusion des osmolytes dans l'ovocyte virtuel *****%

```

```

% Concentration d'osmolytes intracellulaire au départ:
Ci(1,t_fin*50)=zeros;
Ci(1,:)=193; % Osmolarité initiale à l'intérieure de l'ovocyte (en mOsm)
C=zeros(1,nombre_couche);
C(1,:)=Ci(1,1);

for g=500:3500,
    Ci(1,g)=Ci(1,1)+Gt(g-499);
end

% Deuxième dt, couche 1 (en mMol):
C(2,1)=(1./vol_couche(1)).*((C(1,1).*vol_couche(1))
+dt.*(osm.*Intensite(2).*0.000001/96490-(C(1,1)-C(1,2))
.*D.*4.*pi.*(rayon(1)).^2./dr_couche(1)));

% Deuxième dt, couches 2 à avant dernière couche (en mMol):
C(2,2:(nombre_couche-1))=C(1,2:(nombre_couche-1))
+D*dt*4*pi./vol_couche(2:(nombre_couche-1)).*((C(1,1:(nombre_couche-2))
-C(1,2:(nombre_couche-1)))./dr_couche(1:(nombre_couche-2))
.*(rayon(1:(nombre_couche-2))).^2-(C(1,2:(nombre_couche-1))
-C(1,3:(nombre_couche)))./dr_couche(2:(nombre_couche-1))
.*(rayon(2:(nombre_couche-1)).^2));

% Deuxième dt, dernière couche (en mMol):
C(2,nombre_couche)=C(1,nombre_couche)+dt*(4*D*pi
/dr_couche(nombre_couche-1)).*((C(1,(nombre_couche-1))
-C(1,(nombre_couche))).*(rayon(nombre_couche-1)).^2
./vol_couche(nombre_couche));

% Deuxième dt, gonflement :
gonflement(1)=0; % En µl
gonflement(2)=Lp*s*w*dt*(C(2,1)-Ci(1,2))./1000; %En µl

% Deuxième dt, volume total :
Vtot(1)=vol_initial; %En µl
Vtot(2)=gonflement(2)+Vtot(1); %En µl

% Deuxième dt, nouveau volume de la couche 1 :
Vc1(1)=vol_couche(1); % En m^3
Vc1(2)=Vc1(1)+gonflement(2)*10^(-9); % En m^3

% Deuxième dt, nouveau dr :
dr_nouv(1)=0; % En m
dr_nouv(2)=((Vtot(2)*10^(-9)*3/4/pi).^(1/3)-rayon(1))/2+dr_couche(1); % En m

```



```

% Troisième dt, toutes les couches (en mMol):
C(3,1)=(1./Vc1(2)).*((C(2,1).*Vc1(1))
+dt.*(osm.*Intensite(3).*0.000001/96490-(C(2,1)-C(2,2))
.*D.*4.*pi.*(rayon(1)).^2./dr_nouv(2)));

C(3,2:(nombre_couche-1))=C(2,2:(nombre_couche-1))
+D*dt*4*pi./vol_couche(2:(nombre_couche-1)).*((C(2,1:(nombre_couche-2))
-C(2,2:(nombre_couche-1)))./dr_couche(1:(nombre_couche-2))
.*(rayon(1:(nombre_couche-2))).^2-(C(2,2:(nombre_couche-1))
-C(2,3:(nombre_couche)))./dr_couche(2:(nombre_couche-1))
.*(rayon(2:(nombre_couche-1)).^2));

C(3,nombre_couche)=C(2,nombre_couche)+dt*(4*D*pi
/dr_couche(nombre_couche-1)).*((C(2,(nombre_couche-1))
-C(2,(nombre_couche))).*(rayon(nombre_couche-1)).^2)
./vol_couche(nombre_couche);

% Troisième dt, gonflement:
gonflement(3)=Lp*s*w*dt*(C(3,1)-Ci(1,3))./1000; % En µl
Vtot(3)=gonflement(3)+Vtot(2); % En µl
Vc1(3)=Vc1(2)+gonflement(3)*10^(-9); % En m^3
dr_nouv(3)=((Vtot(3)*10^(-9)*3/4/pi).^(1/3)-rayon(1))/2+dr_couche(1); % En m
Vtotal(1:3)=Vtot(1:3); % En µl

% On fait diffuser pour tout le temps restant par incrément dt
E(1:520,1)=0; %Matrice de sauvegarde des volumes à tous les dt
E(1,:)=vol_initial;
k=4; %compteur
i=2; %compteur

tic
while k < longueur,

% moment 1, en mMol:
C(2,1)=(1./Vc1(3)).*((C(3,1).*Vc1(2))
+dt.*(osm.*Intensite(k).*0.000001/96490-(C(3,1)-C(3,2))
.*D.*4.*pi.*(rayon(1)).^2./dr_nouv(3)));

C(2,2:(nombre_couche-1))=C(3,2:(nombre_couche-1))
+D*dt*4*pi./vol_couche(2:(nombre_couche-1)).*((C(3,1:(nombre_couche-2))
-C(3,2:(nombre_couche-1)))./dr_couche(1:(nombre_couche-2))
.*(rayon(1:(nombre_couche-2))).^2-(C(3,2:(nombre_couche-1))
-C(3,3:(nombre_couche)))./dr_couche(2:(nombre_couche-1))
.*(rayon(2:(nombre_couche-1)).^2));

```

```

C(2,nombre_couche)=C(3,nombre_couche)+dt*(4*D*pi
/dr_couche(nombre_couche-1))*((C(3,(nombre_couche-1))
-C(3,(nombre_couche)))*(rayon(nombre_couche-1)).^2)
./vol_couche(nombre_couche);

gonflement(2)=Lp*s*w*dt*(C(2,1)-Ci(1,k))./1000; % En µl
Vtot(2)=gonflement(2)+Vtot(3); % En µl
Vc1(2)=Vc1(3)+gonflement(2)*10^(-9); % En m^3
dr_nouv(2)=((Vtot(2)*10^(-9)*3/4/pi).^(1/3)-rayon(1))/2+dr_couche(1);%En m
Vtotal(k)=Vtot(2); % En µl

% moment 2, en mMol:
C(3,1)=(1./Vc1(2)).*((C(2,1).*Vc1(3))
+dt.*(osm.*Intensite(k+1).*0.000001/96490-(C(2,1)-C(2,2))
.*D.*4.*pi.*(rayon(1)).^2./dr_nouv(2)));

C(3,2:(nombre_couche-1))=C(2,2:(nombre_couche-1))
+D*dt*4*pi./vol_couche(2:(nombre_couche-1)).*((C(2,1:(nombre_couche-2))
-C(2,2:(nombre_couche-1)))./dr_couche(1:(nombre_couche-2))
.*(rayon(1:(nombre_couche-2))).^2-(C(2,2:(nombre_couche-1))
-C(2,3:(nombre_couche)))./dr_couche(2:(nombre_couche-1))
.*(rayon(2:(nombre_couche-1)).^2));

C(3,nombre_couche)=C(2,nombre_couche)+dt*(4*D*pi
/dr_couche(nombre_couche-1))*((C(2,(nombre_couche-1))
-C(2,(nombre_couche)))*(rayon(nombre_couche-1)).^2)
./vol_couche(nombre_couche);

gonflement(3)=Lp*s*w*dt*(C(3,1)-Ci(1,k+1))./1000; % En µl
Vtot(3)=gonflement(3)+Vtot(2); % En µl
Vc1(3)=Vc1(2)+gonflement(3)*10^(-9); % En m^3
dr_nouv(3)=((Vtot(3)*10^(-9)*3/4/pi).^(1/3)-rayon(1))/2+dr_couche(1);%En m
Vtotal(k+1)=Vtot(3); % En µl

% Pour alléger la matrice de sauvegarde, seulement
% les valeurs se trouvant à tous les 50 dt seront sauvegardées:
if rem(k,50) == 0
    E(i)=Vtotal(k);
    i=i+1;
end

k=k+2;
end
toc

% ----- %

```

```
%***** Mettre en graphique le modèle avec la vraie expérience*****%
%***** pour fins de comparaison *****%

% Matrice de temps au bon taux:
    temps1=temps.*50;   %Pour passer des temps de 50Hz a 1Hz

% Graphique:
    hold on
    plot(temps1(1,305:604),volume(305:604),'r-',temps1(1,305:604),E(1:300),'b-');
    axis([305 604 vol_initial-0.004 vol_initial+0.004]);
    hold off

    TITLE('Modélisation versus expérimentation')
    xlabel('temps (s)')
    ylabel('Gradient osmotique (mOsm)')

% ----- %
% FIN DE LA MODÉLISATION
```

A.1.2- Diffusion du sodium dans un ovocyte

Après avoir tenté d'expliquer le gain de volume par un coefficient de diffusion comprenant celui du Na et de l' α MG, nous avons tenté de mesurer séparément leur coefficient de diffusion intracellulaire. La technique employée est décrite dans l'article.

Le programme utilisé pour analyser la diffusion du sodium intracellulaire est très similaire au programme que nous venons de présenter, mais quelques différences apparaissent. Tout d'abord, dans la première section, nous ne faisons que charger les concentrations de sodium mesurées avec l'électrode sélective au sodium. Ensuite, nous convertissons les mesures de voltage de l'électrode sélective en concentrations en mM avec l'équation suivante :

$$[S] = \frac{10^{\frac{[S]-K}{58}} - 100P}{1-P} \quad (20)$$

où [S] est la concentration du substrat mesuré, P la perméabilité de ce substrat et K une constante servant au positionnement vertical de la courbe. Cette itération permet d'obtenir la calibration de l'électrode Na-sélective et convertir nos concentrations en mM. La deuxième section fait appel aux mêmes paramètres que le premier programme. Nous fixons L_p à zéro pour ne pas permettre de flux d'eau à travers la membrane. Il n'est pas nécessaire, car nous faisons une injection isotonique et le négliger permet de gagner du temps au niveau des calculs dans la section de diffusion. Ce qui diffère dans la troisième section est qu'il faut entrer le volume et la concentration de la solution injectée. De plus, comme la diffusion se fait du centre vers le bord, il n'est pas nécessaire d'inverser la numérotation des couches. La section 4 est analogue au programme précédent, sauf pour l'entrée des osmolytes qui se fait par injection. Nous devons calculer le nombre de moles d'osmolytes injecté et nous l'ajoutons aux osmolytes de la couche injectée de volume connu. Finalement, la dernière

section est la même. Le programme pour la modélisation du sodium par injection va comme suit :

```

% ----- %
% Modélisation de la diffusion de sodium dans %
% un ovocyte (injection) %
% ----- %
%***** On met en mémoire le fichier contenant la concentration %*****%
%***** du sodium au centre de l'ovocyte en fonction du temps. %*****%

ButtonName=questdlg('Avez-vous déjà un vecteur concentration?', ...
    'Pour commencer...', ...
    'OUI','NON','NON');

switch ButtonName,
case 'NON',

    prompt = {'Fichier donnant la concentration de sodium en fonction du temps
(mV)?'};
    title = 'Quel est le fichier donnant la concentration en fonction du temps?';
    lines = 1; def = {'Concentration.atf'}; answer = inputdlg(prompt, title,lines,def);

    reponse=char(answer(1)); Conc=load(sscanf(reponse,'%s'));
    Concentration=Conc(:,2);
    clear Conc;

case 'OUI',
end % switch

% On fait la conversion des unités de la concentration
% de sodium soit: mV a mMol.
% C'est l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz.
prompt={'Perméabilité (P): P(K)/P(Na)', 'Constante (K)'};
def={'0.00541', '-136.43365'};
dlgTitle='Paramètres de calibration de la concentration de sodium';
lineNo=1;
reponse=inputdlg(prompt,dlgTitle,lineNo,def);

P=str2num(char(reponse(1)));
K=str2num(char(reponse(2)));

Concentration=(10.^((Concentration-K)./58)-100*P)./(1-P);
Concsize=size(Concentration,1);

% ----- %

```

```

%***** Fixer les paramètres de l'expérience.                *****%

% Paramètres de temps:
prompt={'Moment de l'injection','Fin de l'expérience' };
def={'60','350'};      % Temps en seconde
dlgTitle='Paramètres de l'expérience';
lineNo=1;
reponse=inputdlg(prompt,dlgTitle,lineNo,def);

t_depart=str2num(char(reponse(1)));
t_fin=str2num(char(reponse(2)))+10;

% Incrément de temps pour les calculs
dt=0.02;      % En secondes

% Paramètres de coefficient de diffusion et fraction du volume accessible:
prompt={'Quel coefficient de diffusion (D, m^2/s)?','Quelle fraction accessible
(Va)?'};
def={'2E-10','0.6'};
dlgTitle='Paramètres contraignants du modèle';
lineNo=1;
reponse=inputdlg(prompt,dlgTitle,lineNo,def);

D=str2num(char(reponse(1)));
fraction_accessible=str2num(char(reponse(2)));

% ----- %
%***** Fabrication d'un ovocyte virtuel et initialisation      *****%
%***** de ses paramètres de forme, de concentration de sodium *****%
%***** et de ses couches.                                       *****%

% Création d'un vecteur temps pour reproduire le temps de l'expérience:
temps=0:0.02:t_fin;

% Volume initial de l'ovocyte virtuel et la couche injectée:
prompt={'Volume initial','Dans quelle couche avez-vous injecté?'};
def={'52900','1'};
dlgTitle='Volume initial (pixel) et # de la couche';
lineNo=1;
reponse=inputdlg(prompt,dlgTitle,lineNo,def);

vol_initial=str2num(char(reponse(1)));
vol_initial=(7.98E-8)*((vol_initial)^(3/2));
couche_inj=str2num(char(reponse(2)));

% Caractérisation de l'injection:

```

```

prompt={'Volume injecté (nL)', 'Concentration injectée (mMol)'};
def={'10', '100'};
dlgTitle='Veuillez indiquer le volume de substrat injecté et sa concentration' ;
lineNo=1;
reponse=inputdlg(prompt,dlgTitle,lineNo,def);

vol_inject=str2num(char(reponse(1)));
conc_inject=str2num(char(reponse(2)));

% Dimension des couches:
Vtot_couche=40; %En nl, volume de chacune des couches
nombre_couche=floor((vol_initial*1000)/Vtot_couche)

% Rayon de chacune des couches:
vol_couche(1:nombre_couche)=0;
rayon_0=0;
n=1;
while n < couche_inj;
    rayon(n)=(((Vtot_couche+(4*pi/3)*(rayon_0^3)*1E12)*(3/(4*pi))))
    *(1E-12))^(1/3); %En m
    rayon_0=rayon(n);
    vol_couche(n)=(Vtot_couche*1E-12)*fraction_accessible; %En m
    n=n+1;
end

rayon(couche_inj)=(((Vtot_couche+vol_inject+(4*pi/3)*(rayon_0^3)*1E12)
*(3/(4*pi))))^(1/3); %En m
rayon_0=rayon(couche_inj);
vol_couche(n)=(Vtot_couche*fraction_accessible+vol_inject)*1E-12; %En
m
n=n+1;

while n <= nombre_couche;
    rayon(n)=(((Vtot_couche+(4*pi/3)*(rayon_0^3)*1E12)*(3/(4*pi))))
    *(1E-12))^(1/3); %En m
    rayon_0=rayon(n);
    vol_couche(n)=(Vtot_couche*1E-12)*fraction_accessible; %En m
    n=n+1;
end

% L'épaisseur des couches:
dr_couche(1)=(rayon(2)-0)/2; % En m
m=2;
while m < nombre_couche;
    dr_couche(m:(nombre_couche-1))=(rayon(m+1)-rayon(m-1))/2; % En m
    m=m+1;

```

```

end

% Concentration initiale du sodium intracellulaire:
prompt={'Quelle est la concentration initiale du sodium intracellulaire' };
def={'-87.427'};
dlgTitle='Concentration de sodium initiale (mV)';
lineNo=1;
reponse=inputdlg(prompt,dlgTitle,lineNo,def);

Ci=str2num(char(reponse(1)));      % [Na] en mV
Ci=(10.^((Ci-K)./58)-100*P)./(1-P); % Convertie [Na] de mV à mMol

% Initialisation du nombre de cycles que le programme devra faire:
longueur=t_fin*50;

% ----- %
%***** Diffusion du sodium dans l'ovocyte virtuel *****%

% Concentration, en mMol, dans toutes les couches au temps 0:
C=zeros(1,nombre_couche);
C(1,:)=Ci;
C(1,couche_inj)=(Vtot_couche*fraction_accessible*Ci+conc_inject*vol_inject)
/(Vtot_couche*fraction_accessible+vol_inject);

% Deuxième dt, couche 1 (en mMol):
C(2,1)=(1./vol_couche(1)).*((C(1,1).*vol_couche(1))
+dt.*(-(C(1,1)-C(1,2)).*D.*4.*pi.*(rayon(1)).^2./dr_couche(1)));

% Deuxième dt, couches 2 à avant dernière couche (en mMol):
C(2,2:(nombre_couche-1))=C(1,2:(nombre_couche-1))
+D*dt*4*pi./vol_couche(2:(nombre_couche-1)).*((C(1,1:(nombre_couche-2))
-C(1,2:(nombre_couche-1)))./dr_couche(1:(nombre_couche-2))
.*(rayon(1:(nombre_couche-2))).^2-(C(1,2:(nombre_couche-1))
-C(1,3:(nombre_couche)))./dr_couche(2:(nombre_couche-1))
.*(rayon(2:(nombre_couche-1)).^2));

% Deuxième dt, dernière couche (En mMol):
C(2,nombre_couche)=C(1,nombre_couche)+dt*(4*D*pi
/dr_couche(nombre_couche-1))*((C(1,(nombre_couche-1))
-C(1,(nombre_couche))).*(rayon(nombre_couche-1)).^2
./vol_couche(nombre_couche));

% Troisième dt, toutes les couches (en mMol):
C(3,1)=(1./vol_couche(1)).*((C(2,1).*vol_couche(1))
+dt.*(-(C(2,1)-C(2,2)).*D.*4.*pi.*(rayon(1)).^2./dr_couche(1)));

```



```

C(3,2:(nombre_couche-1))=C(2,2:(nombre_couche-1))+D*dt*4*pi
./vol_couche(2:(nombre_couche-1)).*((C(2,1:(nombre_couche-2))
-C(2,2:(nombre_couche-1)))/dr_couche(1:(nombre_couche-2))
.*(rayon(1:(nombre_couche-2))).^2-(C(2,2:(nombre_couche-1))
-C(2,3:(nombre_couche)))/dr_couche(2:(nombre_couche-1))
.*(rayon(2:(nombre_couche-1)).^2));

```

```

C(3,nombre_couche)=C(2,nombre_couche)+dt*(4*D*pi
/dr_couche(nombre_couche-1))*((C(2,(nombre_couche-1))
-C(2,(nombre_couche)))*(rayon(nombre_couche-1)).^2)
./vol_couche(nombre_couche);

```

```

% On fait diffuser pour tout le temps restant par incrément dt (en mMol)
E(1:520,1:nombre_couche)=0; %Matrice de sauvegarde des [Na] à tous les
dt

```

```

k=4; %compteur
i=1; %compteur

```

```

tic

```

```

while k < longueur

```

```

% moment 1:

```

```

C(2,1)=(1./vol_couche(1)).*((C(3,1).*vol_couche(1))
+dt.*(-(C(3,1)-C(3,2)).*D.*4.*pi.*(rayon(1)).^2./dr_couche(1)));

```

```

C(2,2:(nombre_couche-1))=C(3,2:(nombre_couche-1))+D*dt*4*pi
./vol_couche(2:(nombre_couche-1)).*((C(3,1:(nombre_couche-2))
-C(3,2:(nombre_couche-1)))/dr_couche(1:(nombre_couche-2))
.*(rayon(1:(nombre_couche-2))).^2-(C(3,2:(nombre_couche-1))
-C(3,3:(nombre_couche)))/dr_couche(2:(nombre_couche-1))
.*(rayon(2:(nombre_couche-1)).^2));

```

```

C(2,nombre_couche)=C(3,nombre_couche)+dt*(4*D*pi
/dr_couche(nombre_couche-1))*((C(3,(nombre_couche-1))
-C(3,(nombre_couche)))*(rayon(nombre_couche-1)).^2)
./vol_couche(nombre_couche);

```

```

% moment 2:

```

```

C(3,1)=(1./vol_couche(1)).*((C(2,1).*vol_couche(1))
+dt.*(-(C(2,1)-C(2,2)).*D.*4.*pi.*(rayon(1)).^2./dr_couche(1)));

```

```

C(3,2:(nombre_couche-1))=C(2,2:(nombre_couche-1))+D*dt*4*pi
./vol_couche(2:(nombre_couche-1)).*((C(2,1:(nombre_couche-2))
-C(2,2:(nombre_couche-1)))/dr_couche(1:(nombre_couche-2))
.*(rayon(1:(nombre_couche-2))).^2-(C(2,2:(nombre_couche-1))
-C(2,3:(nombre_couche)))/dr_couche(2:(nombre_couche-1))
.*(rayon(2:(nombre_couche-1)).^2));

```

```

C(3,nombre_couche)=C(2,nombre_couche)+dt*(4*D*pi
/dr_couche(nombre_couche-1))*((C(2,(nombre_couche-1))
-C(2,(nombre_couche)))*(rayon(nombre_couche-1)).^2)
./vol_couche(nombre_couche);

% Pour alléger la matrice de sauvegarde, seulement les
% valeurs se trouvant à tous les 50 dt seront sauvegardées:
    if rem(k,50) == 0
        E(i,:)=C(2,:);
        i=i+1;
    end

    k=k+2;
end
toc

% ----- %
%***** Mettre en graphique le modèle avec la vraie expérience *****%
%***** pour fins de comparaison *****%

% Matrice de temps au bon taux:
q=round((longueur-1)/5); %Intervalle de 50Hz a 10Hz
p=round(q./10); %Intervalle de 10Hz a 1Hz
temps1=temps.*5; %Matrice temps de 50Hz a 10Hz
temps10=temps.*50; %Matrice temps de 50Hz a 1Hz

% Graphique:
hold on
plot(temps1(1:q),Concentration(1:q),'r-'
,temps10(1,61:p+60),E(1:p,1:nombre_couche),'b-');
axis([t_depart-15 t_fin Ci-0.2 Ci+2]);
hold off

TITLE('Modélisation versus expérimentation')
xlabel('temps (s)')
ylabel('Concentration de sodium (mMol)')

% ----- %
% FIN DE LA MODÉLISATION

```

A.1.3- Diffusion de l' α MG dans un ovocyte

Le même type d'expérience a été réalisé avec l' α MG. Cette fois-ci, c'est la protéine SGLT1 qui servira de sonde pour détecter la concentration d' α MG lorsque cette molécule entre en contact avec l'intérieur de la membrane plasmique.

Comme cette expérience ressemble énormément à celle de l'injection de sodium, le programme utilisé ressemble énormément au précédent à l'exception d'un petit détail technique. Pour la détection d' α MG par SGLT1, nous ne pouvons convertir son courant en concentration. Ce détail est dû à l'ignorance de la concentration sodique dans l'ovocyte après son incubation pour en faire augmenter la concentration. La concentration de sodium est importante pour faire le lien entre la concentration de l' α MG et le courant sortant, car le km de l' α MG dépend de la concentration de sodium. Ainsi, dans la section 4, un facteur est ajouté pour faire correspondre le début et la fin de la courbe théorique avec la courbe expérimentale. Dans cette optique, la valeur du volume accessible ne veut rien dire car nous ignorons la concentration d' α MG finale. Par conséquent, nous ne faisons que reproduire le temps d'augmentation de concentration qui est dicté par son coefficient de diffusion.

Le programme pour l' α MG est comme suit :

```
% ----- %
% Modélisation de la diffusion du GLUCOSE          %
% dans un ovocyte (injection)                     %
% ----- %
%***** On met en mémoire le fichier contenant la concentration   %*****%
%***** du sodium au centre de l'ovocyte en fonction du temps.    %*****%

ButtonName=questdlg('Avez-vous déjà un vecteur concentration?', ...
    'Pour commencer...', ...
    'OUI','NON','NON');

switch ButtonName,
```

```

case 'NON',

    prompt = {'Fichier donnant la concentration du glucose en fonction du temps
(mV)?'};
    title = 'Quel est le fichier donnant la concentration en fonction du temps?';
    lines = 1; def = {'Concentration.txt'}; answer = inputdlg(prompt, title,lines,def);

    reponse=char(answer(1)); Conc=load(sscanf(reponse,'%s'));
    Concentration(:,1)=Conc(:,1);
    Concentration(:,2)=Conc(:,2);
    clear Conc;

case 'OUI',
end % switch

Concsize=size(Concentration,1);

% ----- %
%***** Fixer les paramètres de l'expérience.          *****%

% Paramètres de temps:
prompt={'Moment de l'injection','Fin de l'expérience' };
def={'270','1170'};      % Temps en seconde
dlgTitle='Paramètres de l'expérience';
lineNo=1;
reponse=inputdlg(prompt,dlgTitle,lineNo,def);

t_depart=str2num(char(reponse(1)));
t_fin=str2num(char(reponse(2)))+10;

% Incrément de temps pour les calculs
dt=0.02;      %en secondes

% Paramètres de coefficient de diffusion et fraction du volume accessible:
prompt={'Quel coefficient de diffusion (D, m^2/s)?','Quelle fraction accessible
(Va)?'};
def={'1E-10','0.5'};
dlgTitle='Paramètres contraignants du modèle';
lineNo=1;
reponse=inputdlg(prompt,dlgTitle,lineNo,def);

D=str2num(char(reponse(1)));
fraction_accessible=str2num(char(reponse(2)));

% ----- %
%***** Fabrication d'un ovocyte virtuel et initialisation          *****%

```

```

%***** de ses paramètres de forme, de concentration du glucose *****%
%***** et de ses couches. *****%

% Création d'un vecteur temps pour reproduire le temps de l'expérience:
    temps=0:0.02:t_fin;

% Volume initial de l'ovocyte virtuel et la couche injectée:
    prompt={'Volume initial','Dans quelle couche avez-vous injecté? ' };
    def={'53800','1'};
    dlgTitle='Volume initial (pixel) et # de la couche';
    lineNo=1;
    reponse=inputdlg(prompt,dlgTitle,lineNo,def);

    vol_initial=str2num(char(reponse(1)));
    vol_initial=(7.98E-8)*((vol_initial)^(3/2));
    couche_inj=str2num(char(reponse(2)));

% Caractérisation de l'injection:
    prompt={'Volume injecté (nL)','Concentration injectée (mMol)'};
    def={'46','100'};
    dlgTitle='Veuillez indiquer le volume de substrat injecté et sa concentration' ;
    lineNo=1;
    reponse=inputdlg(prompt,dlgTitle,lineNo,def);

    vol_inject=str2num(char(reponse(1)));
    conc_inject=str2num(char(reponse(2)));

% Dimension des couches:
    Vtot_couche=40; %En nl, volume de chacune des couches
    nombre_couche=floor((vol_initial*1000)/Vtot_couche)

% Rayon de chacune des couches:
    vol_couche(1:nombre_couche)=0;
    rayon_0=0;
    n=1;
    while n < couche_inj;
        rayon(n)=(((Vtot_couche+(4*pi/3)*(rayon_0^3)*1E12)*(3/(4*pi)))
            *(1E-12))^(1/3); %En m
        rayon_0=rayon(n);
        vol_couche(n)=(Vtot_couche*1E-12)*fraction_accessible; %En m
        n=n+1;
    end

    rayon(couche_inj)=(((Vtot_couche+vol_inject+(4*pi/3)*(rayon_0^3)*1E12)
        *(3/(4*pi)))^(1E-12))^(1/3); %En m
    rayon_0=rayon(couche_inj);

```

```

vol_couche(n)=(Vtot_couche*fraction_accessible+vol_inject)*1E-12;   %En
m
n=n+1;

while n <= nombre_couche;
    rayon(n)=(((Vtot_couche+(4*pi/3)*(rayon_0^3)*1E12)*(3/(4*pi)))
    *(1E-12))^(1/3);   %En m
    rayon_0=rayon(n);
    vol_couche(n)=(Vtot_couche*1E-12)*fraction_accessible;   %En m
    n=n+1;
end

% L'épaisseur des couches:
dr_couche(1)=(rayon(2)-0)/2;   %m
m=2;
while m < nombre_couche;   %m
    dr_couche(m:(nombre_couche-1))=(rayon(m+1)-rayon(m-1))/2;   %m
    m=m+1;
end

% Courant sortant du glucose intracellulaire au départ:
prompt={'Veuillez entrer le courant sortant initial de l"ovocyte' };
def={'-0.065'};   %normalisé
dlgTitle='Concentration de glucose initiale normalisée';
lineNo=1;
reponse=inputdlg(prompt,dlgTitle,lineNo,def);

Ci=str2num(char(reponse(1)));

% Initialisation du nombre de cycles que le programme devra faire:
longueur=t_fin*50;

% ----- %
%***** Diffusion du glucose dans l'ovocyte virtuel          *****%

% Concentration, en courant normalisé, dans toutes les couches au temps 0:
C=zeros(1,nombre_couche);
C(1,:)=Ci;
C(1,couche_inj)=(Vtot_couche*fraction_accessible*Ci+conc_inject*vol_inject)
/(Vtot_couche*fraction_accessible+vol_inject);

% Deuxième dt, couche 1 (en mMol):
C(2,1)=(1./vol_couche(1)).*((C(1,1).*vol_couche(1))
+dt.*(-(C(1,1)-C(1,2)).*D.*4.*pi.*(rayon(1)).^2./dr_couche(1)));

% Deuxième dt, couches 2 à avant dernière couche (en mMol):

```

```

C(2,2:(nombre_couche-1))=C(1,2:(nombre_couche-1))
+D*dt*4*pi./vol_couche(2:(nombre_couche-1)).*((C(1,1:(nombre_couche-2))
-C(1,2:(nombre_couche-1)))./dr_couche(1:(nombre_couche-2))
.*(rayon(1:(nombre_couche-2))).^2-(C(1,2:(nombre_couche-1))
-C(1,3:(nombre_couche)))./dr_couche(2:(nombre_couche-1))
.*(rayon(2:(nombre_couche-1))).^2));

% Deuxième dt, dernière couche (en mMol):
C(2,nombre_couche)=C(1,nombre_couche)+dt*(4*D*pi
/dr_couche(nombre_couche-1))*((C(1,(nombre_couche-1))
-C(1,(nombre_couche))).*(rayon(nombre_couche-1)).^2)
./vol_couche(nombre_couche);

% Troisième dt, toutes les couches (en mMol):
C(3,1)=(1./vol_couche(1)).*((C(2,1).*vol_couche(1))
+dt.*(-(C(2,1)-C(2,2)).*D.*4.*pi.*(rayon(1)).^2./dr_couche(1)));

C(3,2:(nombre_couche-1))=C(2,2:(nombre_couche-1))
+D*dt*4*pi./vol_couche(2:(nombre_couche-1)).*((C(2,1:(nombre_couche-2))
-C(2,2:(nombre_couche-1)))./dr_couche(1:(nombre_couche-2))
.*(rayon(1:(nombre_couche-2))).^2-(C(2,2:(nombre_couche-1))
-C(2,3:(nombre_couche)))./dr_couche(2:(nombre_couche-1))
.*(rayon(2:(nombre_couche-1))).^2));

C(3,nombre_couche)=C(2,nombre_couche)+dt*(4*D*pi
/dr_couche(nombre_couche-1))*((C(2,(nombre_couche-1))
-C(2,(nombre_couche))).*(rayon(nombre_couche-1)).^2)
./vol_couche(nombre_couche);

% On fait diffuser pour tout le temps restant par incrément dt (en mMol)
E(1:520,1:nombre_couche)=0; %Matrice de sauvegarde des [AMG] à tous
les dt
k=4; %compteur
i=1; %compteur

tic
while k < longueur
% moment 1:
C(2,1)=(1./vol_couche(1)).*((C(3,1).*vol_couche(1))
+dt.*(-(C(3,1)-C(3,2)).*D.*4.*pi.*(rayon(1)).^2./dr_couche(1)));

C(2,2:(nombre_couche-1))=C(3,2:(nombre_couche-1))
+D*dt*4*pi./vol_couche(2:(nombre_couche-1)).*((C(3,1:(nombre_couche-2))
-C(3,2:(nombre_couche-1)))./dr_couche(1:(nombre_couche-2))
.*(rayon(1:(nombre_couche-2))).^2-(C(3,2:(nombre_couche-1))
-C(3,3:(nombre_couche)))./dr_couche(2:(nombre_couche-1))

```

```

.*(rayon(2:(nombre_couche-1)).^2));

C(2,nombre_couche)=C(3,nombre_couche)+dt*(4*D*pi
/dr_couche(nombre_couche-1))*((C(3,(nombre_couche-1))
-C(3,(nombre_couche)))*(rayon(nombre_couche-1)).^2)
./vol_couche(nombre_couche);

% moment 2:
C(3,1)=(1./vol_couche(1)).*((C(2,1).*vol_couche(1))
+dt.*(-(C(2,1)-C(2,2)).*D.*4.*pi.*(rayon(1)).^2./dr_couche(1)));

C(3,2:(nombre_couche-1))=C(2,2:(nombre_couche-1))
+D*dt*4*pi./vol_couche(2:(nombre_couche-1)).*((C(2,1:(nombre_couche-2))
-C(2,2:(nombre_couche-1)))./dr_couche(1:(nombre_couche-2))
.*(rayon(1:(nombre_couche-2))).^2-(C(2,2:(nombre_couche-1))
-C(2,3:(nombre_couche)))./dr_couche(2:(nombre_couche-1))
.*(rayon(2:(nombre_couche-1)).^2));

C(3,nombre_couche)=C(2,nombre_couche)+dt*(4*D*pi
/dr_couche(nombre_couche-1))*((C(2,(nombre_couche-1))
-C(2,(nombre_couche)))*(rayon(nombre_couche-1)).^2)
./vol_couche(nombre_couche);

% Pour alléger la matrice de sauvegarde, seulement les
% valeurs se trouvant à tous les 50 dt seront sauvegardées:

    if rem(k,1500) == 0
        E(i,:)=C(2,:);
        i=i+1;
    end

    k=k+2;
end
toc

% Pour ajuster la hauteur de la courbe:
prompt={'Veuillez entrer le facteur de grossissement' };
def={'71.5'}; %normalisé
dlgTitle='Facteur';
lineNo=1;
reponse=inputdlg(prompt,dlgTitle,lineNo,def);

facteur=str2num(char(reponse(1)));
G=facteur*E-Ci*facteur+Ci;

% ----- %

```



```
%***** Mettre en graphique le modèle avec la vraie expérience *****%
%***** pour fins de comparaison *****%

% Matrice de temps au bon taux:
    temps1=temps.*1500;      %Pour passer des temps de 50Hz a 0.03Hz

% Graphique:
    hold on
    plot(Concentration(:,1),Concentration(:,2),'r-'
        ,temps1(1,11:40),G(1:30,nombre_couche),'b-');
    axis([0 t_fin Ci Ci+650]);
    hold off

    TITLE('Modélisation versus expérimentation')
    xlabel('temps (s)')
    ylabel('Courant sortant AMG (nA)')

% ----- %
% FIN DE LA MODÉLISATION
```

Appendice 2 : Programme de diffusion (Gramicidine)

Pour analyser ces résultats, une quatrième version du programme de diffusion a dû être réalisée.

Comme pour les trois autres programmes, des similitudes les relient. La gramicidine crée des courants qu'il faut intégrer pour déterminer le nombre d'osmolytes entrant dans la couche du bord. En fait, ce programme est le premier à avoir été écrit sur les quatre et la différence majeure est la description de la géométrie des couches concentriques de la troisième section. Pour commencer, nous séparions l'ovocyte en un nombre de couches prédéterminées (51 couches) et d'épaisseur égale (10 μm). Ensuite, nous calculions le volume de chacune de ces couches selon le volume de l'ovocyte. Ainsi, le volume devenait de plus en plus petit au fur et à mesure que la couche se trouvait près de la couche du centre, donc une petite quantité d'osmolytes pouvait faire énormément grimper la concentration de la couche, ce qui posait problème pour les injections d'osmolytes au centre de l'ovocyte. C'est ce point qui nous a obligés à utiliser des couches de volume constante, car le programme était plus stable lors de la distribution des osmolytes pendant la diffusion. Cette stabilité était possible grâce au volume des couches qui restait toujours le même, ainsi les osmolytes étaient toujours dilués dans le même volume.

```
% ----- %
% Modélisation de la diffusion de sodium dans          %
% un ovocyte (gramicidine)                             %
% ----- %
% ***** On met en mémoire le fichier contenant le courant en  $\mu\text{A}$ . *****%
```

```
ButtonName=questdlg('Avez-vous déjà un vecteur INTENSITE?', ...
    'Pour commencer...', ...
    'OUI','NON','NON');
```

```
switch ButtonName,
case 'NON',
```

```

prompt = {'Quel est le fichier donnant l'intensité en fonction du temps (µA)?'};
title = 'Quel est le fichier donnant l'intensité en fonction du temps?';
lines = 1; def = {'intensite.atf'}; answer = inputdlg(prompt, title,lines,def);

```

```

reponse=char(answer(1)); Int=load(sscanf(reponse,'%s'));
Intensite=-Int(:,1);    %Remet le courant positif
clear Int

```

```

case 'OUI',
end % switch

```

```

% On met en mémoire le fichier contenant la concentration
% du sodium au centre de l'ovocyte en fonction du temps.
ButtonName=questdlg('Avez-vous déjà un vecteur concentration?', ...
    'Pour commencer...', ...
    'OUI','NON','NON');

```

```

switch ButtonName,
case 'NON',

```

```

    prompt = {'Fichier donnant la concentration de sodium en fonction du temps
(mV)?'};
    title = 'Quel est le fichier donnant la concentration en fonction du temps?';
    lines = 1; def = {'Concentration.txt'}; answer = inputdlg(prompt, title,lines,def);

```

```

    reponse=char(answer(1)); Conc=load(sscanf(reponse,'%s'));
    Concentration=Conc(:,2);
    clear Conc;

```

```

case 'OUI',
end % switch

```

```

% On fait la conversion des unités de la concentration
% de sodium soit: mV a mMol.

```

```

% C'est l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz.

```

```

    prompt={'Perméabilité (P): P(K)/P(Na)', 'Constante (K)'};
    def={'0.00101', '-118.84978'};
    dlgTitle='Paramètres de calibration de la concentration de sodium';
    lineNo=1;
    reponse=inputdlg(prompt,dlgTitle,lineNo,def);

```

```

    P=str2num(char(reponse(1)));
    K=str2num(char(reponse(2)));

```

```

    Concentration=(10.^((Concentration-K)./58)-100*P)./(1-P);
    Concsz=size(Concentration,1);

```

```

% ----- %
%***** Fixer les paramètres de l'expérience.          *****%

% Paramètres de temps:
prompt={'Stimulation de la gramicidine','Fin de la stimulation','Fin de
l'expérience' };
def={'390','420','530'};          %Temps en seconde
dlgTitle='Paramètres de l'expérience';
lineNo=1;
reponse=inputdlg(prompt,dlgTitle,lineNo,def);

t_depart=str2num(char(reponse(1)));
t_arret=str2num(char(reponse(2)));
t_fin=str2num(char(reponse(3)))+10;

% Paramètres de perméabilité membranaire:
dt=0.02;          %Delta t en secondes
w=18.2;          %Volume molaire spécifique de l'eau en cm3/mol
s=0.4;          %Surface d'un ovocyte en cm2

prompt={'Veuillez entrer la valeur de Lp en cm/s' };
def={'0'};      %En cm/s
dlgTitle='Perméabilité (Lp)';
lineNo=1;
reponse=inputdlg(prompt,dlgTitle,lineNo,def);

Lp=str2num(char(reponse(1)));

% Paramètres de coefficient de diffusion et fraction du volume accessible:
prompt={'Quel coefficient de diffusion (D, m^2/s)?','Quelle fraction accessible
(Va)?'};
def={'4.8E-10','0.64'};
dlgTitle='Paramètres contraignants du modèle';
lineNo=1;
reponse=inputdlg(prompt,dlgTitle,lineNo,def);

D=str2num(char(reponse(1)));
fraction_accessible=str2num(char(reponse(2)));

% Caractérisation des électrodes pour connaître le nombre d'osmolytes/charges:
osm_par_charge=1; % Nombre d'osmolytes pour un courant donné
fraction_locale=1; % Fraction des charges totales déversées par la cathode
osm=(fraction_locale)*(osm_par_charge); % Osmolytes/charges réelles

% ----- %

```

```

%***** Fabrication d'un ovocyte virtuel et initialisation      *****%
%***** de ses paramètres de forme, de concentration de sodium *****%
%***** et de ses couches.                                     *****%

% Création d'un vecteur temps pour reproduire le temps de l'expérience:
    temps=0:0.02:t_fin;    %Incrément de 0,02s

% Volume initial de l'ovocyte virtuel et dimension des couches:
    prompt={'Veuillez entrer le volume initial de l"ovocyte en pixel' };
    def={'51000'};    % En pixel
    dlgTitle='Volume initial';
    lineNo=1;
    reponse=inputdlg(prompt,dlgTitle,lineNo,def);

    vol_initial=str2num(char(reponse(1)));
    vol_initial=(7.98E-8)*((vol_initial)^(3/2)); % Convertit le volume de pixel à µL

% Dimension des couches:
    rayon=(vol_initial*(3./(4*pi)))^(1/3)./1000; % En mètres
    dr_couche=10/1000000;    % En mètres

% Concentration de sodium intracellulaire au départ:
    prompt={'Quelle est la concentration initiale du sodium intracellulaire' };
    def={'-73.866'};    %En mV
    dlgTitle='Concentration de sodium initiale (mV)';
    lineNo=1;
    reponse=inputdlg(prompt,dlgTitle,lineNo,def);

    Ci=str2num(char(reponse(1)));    % [Na] en mV
    Ci=(10.^((Ci-K)./58)-100*P)./(1-P);    % Convertit [Na] de mV a mMol

% On sépare l'ovocyte en sphère concentrique:
    couches=1:1:51; % L'ovocyte est séparé en 51 couches

% On calcul le volume initial de chacune des couches en m^3:
    Vinit(1:50)= (((rayon-(couches(1:50)-1)*dr_couche).^3-(rayon-couches(1:50)
    *dr_couche).^3)*4*pi/3)*fraction_accessible;
    Vinit(51)=((rayon-(couches(51)-
    1)*dr_couche).^3*(4*pi/3))*fraction_accessible;

% Initialisation de la matrice qui va contenir
% le volume de l'ovocyte à chaque moment:
    longueur=t_fin*50;
    Vtotal(1,:)=zeros(1,longueur);

% ----- %

```

```

%***** Diffusion du sodium dans l'ovocyte virtuel          *****%

% Concentration dans toutes les couches au temps 0:
C=zeros(1,51);      % En mMol
C(1,:)=Ci;         % En mMol

% Deuxième dt, couche 1 (en mMol):
C(2,1)=(1./Vinit(1)).*((C(1,1).*Vinit(1))+dt.*(osm.*Intensite(2)).*
0.000001/96490-(C(1,1)-C(1,2)).*D.*4.*pi.*(rayon-dr_couche).^2./dr_couche));

% Deuxième dt, couches 2 à 50 (en mMol):
C(2,2:50)=C(1,2:50)+D*dt*4*pi./dr_couche./Vinit(2:50).*((C(1,1:49)-C(1,2:50))
.*(rayon-(couches(2:50)-1).*dr_couche).^2-(C(1,2:50)-C(1,3:51))
.*(rayon-couches(2:50).*dr_couche).^2);

% Deuxième dt, couche 51 (en mMol):
C(2,51)=C(1,51)+dt*(4*D*pi/dr_couche*((C(1,50)-C(1,51))
*(rayon-(couches(51)-1)*dr_couche).^2))./Vinit(51);

% Deuxième dt, gonflement :
gonflement(1)=0;    % En µl
gonflement(2)=Lp*s*w*dt*(C(2,1)-Ci)./1000;    % En µl

% Deuxième dt, volume total :
Vtot(1)=vol_initial;    % En µl
Vtot(2)=gonflement(2)+Vtot(1);    % En µl

% Deuxième dt, nouveau volume de la couche 1 :
Vc1(1)=Vinit(1);    % En m^3
Vc1(2)=Vc1(1)+gonflement(2)*10^(-9);    % En m^3

% Deuxième dt, nouveau dr :
dr_nouv(1)=0;    % En m
dr_nouv(2)=((Vtot(2)*10^(-9)*3/4/pi)^(1/3)-rayon)/2+dr_couche;    % En m

% Troisième dt, couche 1 à 51 (en mMol):
C(3,1)=(1./Vc1(2)).*((C(2,1).*Vc1(1))+dt.*(osm.*Intensite(3))
.*0.000001/96490-(C(2,1)-C(2,2)).*D.*4.*pi.*(rayon-dr_couche)
.^2./dr_nouv(2)));

C(3,2:50)=C(2,2:50)+D*dt*4*pi./dr_couche./Vinit(2:50)
.*(C(2,1:49)-C(2,2:50)).*(rayon-(couches(2:50)-1).*dr_couche)
.^2-(C(2,2:50)-C(2,3:51)).*(rayon-couches(2:50).*dr_couche).^2);

C(3,51)=C(2,51)+dt*(4*D*pi/dr_couche*((C(2,50)-C(2,51))
*(rayon-(couches(51)-1)*dr_couche).^2))./Vinit(51);

```

```

% Troisième dt, gonflement:
gonflement(3)=Lp*s*w*dt*(C(3,1)-Ci);      % En µl
Vtot(3)=gonflement(3)+Vtot(2);           % En µl
Vc1(3)=Vc1(2)+gonflement(3)*10^(-9);     % En m^3
dr_nouv(3)=((Vtot(3)*10^(-9)*3/4/pi)^(1/3)-rayon)/2+dr_couche; % En m
Vtotal(1:3)=Vtot(1:3);                    % En µl

% On fait diffuser pour tout le temps restant par incrément dt
E(1:5200,1:51)=0; %Matrice de sauvegarde des [Na] a tous les dt
k=4; %compteur
i=1; %compteur

tic
while k < longueur

% moment 1, en mMol:
C(2,1)=(1./Vc1(3)).*((C(3,1).*Vc1(2))+dt.*(osm.*Intensite(k)
.*0.000001/96490-(C(3,1)-C(3,2)).*D.*4.*pi.*(rayon-dr_couche)
.^2./dr_nouv(3)));

C(2,2:50)=C(3,2:50)+D*dt*4*pi./dr_couche./Vinit(2:50)
.*((C(3,1:49)-C(3,2:50)).*(rayon-(couches(2:50)-1).*dr_couche)
.^2-(C(3,2:50)-C(3,3:51)).*(rayon-couches(2:50).*dr_couche).^2);

C(2,51)=C(3,51)+dt*(4*D*pi/dr_couche*((C(3,50)-C(3,51))
*(rayon-(couches(51)-1)*dr_couche).^2))./Vinit(51);

gonflement(2)=Lp*s*w*dt*(C(2,1)-Ci); % En µl
Vtot(2)=gonflement(2)+Vtot(3); % En µl
Vc1(2)=Vc1(3)+gonflement(2)*10^(-9); % En m^3
dr_nouv(2)=((Vtot(2)*10^(-9)*3/4/pi)^(1/3)-rayon)/2+dr_couche; % m
Vtotal(k)=Vtot(2); % En µl

% moment 2, en mMol:
C(3,1)=(1./Vc1(2)).*((C(2,1).*Vc1(3))+dt.*(osm.*Intensite(k+1)
.*0.000001/96490-(C(2,1)-C(2,2)).*D.*4.*pi.*(rayon-dr_couche)
.^2./dr_nouv(2)));

C(3,2:50)=C(2,2:50)+D*dt*4*pi./dr_couche./Vinit(2:50)
.*((C(2,1:49)-C(2,2:50)).*(rayon-(couches(2:50)-1).*dr_couche)
.^2-(C(2,2:50)-C(2,3:51)).*(rayon-couches(2:50).*dr_couche).^2);

C(3,51)=C(2,51)+dt*(4*D*pi/dr_couche*((C(2,50)-C(2,51))
*(rayon-(couches(51)-1)*dr_couche).^2))./Vinit(51);

```

```

gonflement(3)=Lp*s*w*dt*(C(3,1)-Ci); % En µl
Vtot(3)=gonflement(3)+Vtot(2); % En µl
Vc1(3)=Vc1(2)+gonflement(3)*10^(-9); % En m^3
dr_nouv(3)=((Vtot(3)*10^(-9)*3/4/pi)^(1/3)-rayon)/2+dr_couche; % m
Vtotal(k+1)=Vtot(3); % En µl

% Pour alléger la matrice de sauvegarde, seulement les
% valeurs se trouvant à tous les 50 dt seront sauvegardées:
    if rem(k,50) == 0
        E(i,:)=C(2,:);
        i=i+1;
    end

    k=k+2;
end
toc

% ----- %
% ***** Mettre en graphique le modèle avec la vraie expérience *****%
% ***** pour fins de comparaison *****%

% Matrice de temps au bon taux:
temps1=temps.*5; %Pour passer des temps de 50Hz a 10Hz
temps10=temps.*50; %Pour passer des temps de 50Hz a 1Hz

% Graphique:
hold on
plot(temps1(1:n),Concentration(1:n),'r-',temps10(1,1:m),E(1:m,51),'b-');
axis([t_depart-15 t_fin Ci-0.2 Ci+4]);
hold off

TITLE('Modélisation versus expérimentation')
xlabel('temps (s)')
ylabel('Concentration de sodium (mMol)')

% ----- %
% FIN DE LA MODÉLISATION

```


Bibliographie

- Agre, P., Sasaki, S. & Chrispeels, M. J. (1993). Aquaporins: a family of water channel proteins. *Am J Physiol* **265**, F461.
- Andreoli, T. E., Hoffman, J. F. & D.D., F. (1980). *Membrane Physiology*. Plenum Publishing Corporation, 468 p.
- Andreoli, T. E. & Schafer, J. A. (1978). Volume absorption in the pars recta. III. Luminal hypotonicity as a driving force for isotonic volume absorption. *Am J Physiol* **234**, F349-355.
- Antropov, L. (1979). *Électrochimie Théorique*. Éditions Mir, 645 p.
- Bissonnette, P., Noel, J., Coady, M. J. & Lapointe, J. Y. (1999). Functional expression of tagged human Na⁺-glucose cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J Physiol* **520 Pt 2**, 359-371.
- Coady, M. J., Chang, M. H., Charron, F. M., Plata, C., Wallendorff, B., Sah, J. F., Markowitz, S. D., Romero, M. F. & Lapointe, J. Y. (2004). The human tumour suppressor gene SLC5A8 expresses a Na⁺-monocarboxylate cotransporter. *J Physiol* **557**, 719-731.
- Crank, J. (1975). *The mathematics of diffusion*. Oxford University Press, 414 p.
- Dascal, N. (1987). The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit Rev Biochem* **22**, 317-387.
- Duquette, P. P., Bissonnette, P. & Lapointe, J. Y. (2001). Local osmotic gradients drive the water flux associated with Na⁽⁺⁾/glucose cotransport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3796-3801.
- Fick, A. (1855). *Phil. Mag.* **10**, 30.
- Finkelstein, A. (1987). *Water movement through lipid bilayers, pores, and plasma membranes*. New York: Wiley-Interscience, 228 p.
- Fischbarg, J., Kuang, K. Y., Hirsch, J., Lecuona, S., Rogozinski, L., Silverstein, S. C. & Loike, J. (1989). Evidence that the glucose transporter serves as a water channel in J774 macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 8397-8401.
- Gagnon, D. G., Holt, A., Bourgeois, F., Wallendorff, B., Coady, M. J. & Lapointe, J. Y. (2005). Membrane topology of loop 13-14 of the Na⁺/glucose

- cotransporter (SGLT1): a SCAM and fluorescent labelling study. *Biochim Biophys Acta* **1712**, 173-184.
- Gagnon, M. P., Bissonnette, P., Deslandes, L. M., Wallendorff, B. & Lapointe, J. Y. (2004). Glucose accumulation can account for the initial water flux triggered by Na⁺/glucose cotransport. *Biophys J* **86**, 125-133.
- Kao, H. P., Abney, J. R. & Verkman, A. S. (1993). Determinants of the translational mobility of a small solute in cell cytoplasm. *J Cell Biol* **120**, 175-184.
- Lapointe, J. Y., Gagnon, M. P., Gagnon, D. G. & Bissonnette, P. (2002). Controversy regarding the secondary active water transport hypothesis. *Biochem Cell Biol* **80**, 525-533.
- Larsen, E. H., Nedergaard, S. & Ussing, H. H. (2000). Role of lateral intercellular space and sodium recirculation for isotonic transport in leaky epithelia. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **141**, 153-212.
- Law, R. J. & Sansom, M. S. (2004). Homology modelling and molecular dynamics simulations: comparative studies of human aquaporin-1. *Eur Biophys J* **33**, 477-489.
- Leung, D. W., Loo, D. D., Hirayama, B. A., Zeuthen, T. & Wright, E. M. (2000). Urea transport by cotransporters. *J Physiol* **528 Pt 2**, 251-257.
- Loo, D. D., Hirayama, B. A., Meinild, A. K., Chandy, G., Zeuthen, T. & Wright, E. M. (1999). Passive water and ion transport by cotransporters. *J Physiol* **518 (Pt 1)**, 195-202.
- Loo, D. D., Wright, E. M. & Zeuthen, T. (2002). Water pumps. *J Physiol* **542**, 53-60.
- Loo, D. D., Zeuthen, T., Chandy, G. & Wright, E. M. (1996). Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13367-13370.
- MacAulay, N., Gether, U., Klaeke, D. A. & Zeuthen, T. (2002). Passive water and urea permeability of a human Na⁽⁺⁾-glutamate cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* **542**, 817-828.
- MacAulay, N., Hamann, S. & Zeuthen, T. (2004). Water transport in the brain: role of cotransporters. *Neuroscience* **129**, 1031-1044.
- Macey, R. I. & Farmer, R. E. (1970). Inhibition of water and solute permeability in human red cells. *Biochim Biophys Acta* **211**, 104-106.

- Meinild, A., Klaerke, D. A., Loo, D. D., Wright, E. M. & Zeuthen, T. (1998). The human Na⁺-glucose cotransporter is a molecular water pump. *J Physiol* **508** (Pt 1), 15-21.
- Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J. B., Engel, A. & Fujiyoshi, Y. (2000). Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* **407**, 599-605.
- Paganelli, C. V. & Solomon, A. K. (1957). The rate of exchange of tritiated water across the human red cell membrane. *J Gen Physiol* **41**, 259-277.
- Pauser, S., Zschunke, A., Kuen, A. & Keller, K. (1995). Estimation of water content and water mobility in the nucleus and cytoplasm of *Xenopus laevis* oocytes by NMR microscopy. *Magn Reson Imaging* **13**, 269-276.
- Peti-Peterdi, J., Bebok, Z., Lapointe, J. Y. & Bell, P. D. (2002a). Novel regulation of cell [Na(+)] in macula densa cells: apical Na(+) recycling by H-K-ATPase. *Am J Physiol Renal Physiol* **282**, F324-329.
- Peti-Peterdi, J., Warnock, D. G. & Bell, P. D. (2002b). Angiotensin II directly stimulates ENaC activity in the cortical collecting duct via AT(1) receptors. *J Am Soc Nephrol* **13**, 1131-1135.
- Preston, G. M. & Agre, P. (1991). Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 11110-11114.
- Preston, G. M., Carroll, T. P., Guggino, W. B. & Agre, P. (1992). Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* **256**, 385-387.
- Ren, G., Reddy, V. S., Cheng, A., Melnyk, P. & Mitra, A. K. (2001). Visualization of a water-selective pore by electron crystallography in vitreous ice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1398-1403.
- Sackin, H. & Boulpaep, E. L. (1975). Models for coupling of salt and water transport; Proximal tubular reabsorption in *Necturus* kidney. *J Gen Physiol* **66**, 671-733.
- Sehy, J. V., Ackerman, J. J. & Neil, J. J. (2002). Apparent diffusion of water, ions, and small molecules in the *Xenopus* oocyte is consistent with Brownian displacement. *Magn Reson Med* **48**, 42-51.

- Sehy, J. V., Zhao, L., Xu, J., Rayala, H. J., Ackerman, J. J. & Neil, J. J. (2004). Effects of physiologic challenge on the ADC of intracellular water in the *Xenopus* oocyte. *Magn Reson Med* **52**, 239-247.
- Turk, E. & Wright, E. M. (1997). Membrane topology motifs in the SGLT cotransporter family. *J Membr Biol* **159**, 1-20.
- Valentine, M. T., Perlman, Z. E., Mitchison, T. J. & Weitz, D. A. (2005). Mechanical properties of *Xenopus* egg cytoplasmic extracts. *Biophys J* **88**, 680-689.
- van't Hoff, J. (1877). Die rolle des osmotischen druckes in der analogie zwishen löauungen und gasen. *Zeitschrift fur Physikalische Chemie* **1**, 481-493.
- Vieira, F. L., Sha'afi, R. I. & Solomon, A. K. (1970). The state of water in human and dog red cell membranes. *J Gen Physiol* **55**, 451-466.
- Wright, E. M. & Turk, E. (2004). The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch* **447**, 813-815.
- Zeuthen, T. (1991a). Secondary active transport of water across ventricular cell membrane of choroid plexus epithelium of *Necturus maculosus*. *J Physiol* **444**, 153-173.
- Zeuthen, T. (1991b). Water permeability of ventricular cell membrane in choroid plexus epithelium from *Necturus maculosus*. *J Physiol* **444**, 133-151.
- Zeuthen, T. & Klaerke, D. A. (1999). Transport of water and glycerol in aquaporin 3 is gated by H(+). *J Biol Chem* **274**, 21631-21636.
- Zeuthen, T., Meinild, A. K., Klaerke, D. A., Loo, D. D., Wright, E. M., Belhage, B. & Litman, T. (1997). Water transport by the Na⁺/glucose cotransporter under isotonic conditions. *Biol Cell* **89**, 307-312.
- Zeuthen, T., Zeuthen, E. & Klaerke, D. A. (2002). Mobility of ions, sugar, and water in the cytoplasm of *Xenopus* oocytes expressing Na⁽⁺⁾-coupled sugar transporters (SGLT1). *J Physiol* **542**, 71-87.
- Zhu, F., Tajkhorshid, E. & Schulten, K. (2004). Theory and simulation of water permeation in aquaporin-1. *Biophys J* **86**, 50-57.