

Université de Montréal

Transport d'iode par le transporteur de sodium/acide monocarboxylique SMCT1

par

Maria Eugenia Juárez Ugarte

Département de Physiologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Science en physiologie
option Physiologie et biophysique moléculaires

[aout, 2010]

© Maria Eugenia Juárez Ugarte, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Transport d'iode par le transporteur de sodium/acide
monocarboxylique SMCT1**

Présenté par :

Maria Eugenia Juárez Ugarte

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Rémy Sauvé, président-rapporteur

Jean-Yves Lapointe, directeur de recherche

Jean-Louis Schwartz, membre du jury

Résumé

Le transporteur de Na⁺/acide monocarboxylique sensible à l'ibuprofène (SMCT1) est exprimé dans la membrane apicale de plusieurs épithélia. Son rôle physiologique dans la glande thyroïde reste cependant obscur mais on présume qu'il pourrait agir comme un transporteur apical d'iode nécessaire pour la synthèse des hormones thyroïdiennes. Récemment, on a montré que SMCT1 possède un courant de fuite anionique sensible à [Na⁺]_e qui permettrait de transporter l'iode de façon électrogénique. Cependant, un efflux d'iode sensible à l'ibuprofène, mais indépendant de la [Na⁺]_e a été aussi observé sur des cultures primaires des thyrocytes porcins, suggérant un autre mécanisme de transport d'iode par SMCT1. Ce travail vise à comprendre les caractéristiques de ce genre de transport en utilisant comme modèle d'expression les ovocytes de *Xenopus laevis*. Les résultats obtenus des essais de captation d'iode radioactif montrent que SMCT1 présente un transport d'iode sensible à l'ibuprofène de l'ordre de 30nmol/ovocyte/h. Si ce transport est non saturable en iode (0-100 mM), il nécessite du Na⁺ dans la solution externe. En effet, le remplacement du Na⁺ extracellulaire par le NMDG inhibe complètement le transport. En outre, on s'est intéressé à exclure la possibilité de différents artefacts. En ayant trouvé que la grande majorité de l'iode radioactif se trouve dans la partie soluble de l'ovocyte, on exclut une liaison non spécifique de l'iode à la membrane cellulaire. Cependant, une bonne proportion de l'iode transporté pourrait être liée à des protéines à l'intérieur de l'ovocyte. En effet, on observe une réduction du transport d'iode dans les ovocytes exprimant SMCT1 de 81,6 ± 2 % en présence de 2 % BSA dans la solution extracellulaire. Également, on écarte la possibilité que le transport d'iode soit le résultat de la surexpression de protéines de transport endogènes dont les canaux chlore. Le transport d'iode semble spécifique à l'expression de SMCT1 et de manière intéressante à l'expression d'un autre transporteur de monocarboxylates, MCT1. L'analyse de l'ensemble des essais, y compris le fait que l'amplitude du transport observé est 20 fois plus grande que celle du courant de fuite nous mène à proposer que SMCT1 puisse transporter l'iode de façon électroneutre. Cependant, le mécanisme par lequel ceci est accompli n'est pas évident à identifier. L'utilisation d'un autre modèle cellulaire serait sûrement utile pour répondre à cette question.

Mots-clés : SMCT1, transport apical d'iode, thyroïde

Abstract

Ibuprofen sensitive, Sodium Monocarboxylate Transporter (SMCT1) is expressed in the apical membrane of diverse epithelia. Its physiological role in the thyroid remains however unknown, but it has been proposed that SMCT1 could act as an apical iodide transporter required for the main function of the gland: the thyroid hormone synthesis.

We previously reported that SMCT1 exhibit a $[\text{Na}^+]_e$ sensible anionic leak current that could account for the electrogenic transport of iodide. However, an iodine efflux sensitive to ibuprofen but independent of $[\text{Na}^+]_e$, was also observed in primary cultures of porcine thyrocytes, suggesting another mechanism of iodine transport mediated by SMCT1. This work aims to understand the characteristics of this type of transport using *Xenopus laevis* oocytes as an SMCT1 expression system. By realising ^{125}I uptakes, we found that SMCT1 transports iodide in an ibuprofen sensitive manner (30nmol/oocyte/h). While nonsaturable uptake iodide kinetics were observed, SMCT1 iodide transport was Na^+ dependent as shown by the transport reduction when the $[\text{Na}^+]_e$ is replaced by NMDG. The possibility of artifacts, such as non specific binding and the overexpression of endogenous proteins, was analysed. By observing that the vast majority of the radioactive iodide is found in the soluble portion of the oocyte, we excluded non-specific binding of iodide to the cell membrane. However, it is believed that most of the iodide entering the cell is not free and must be bound to some intracellular proteins. Indeed, there is a significant reduction of SMCT1-mediated iodide transport when 2% BSA is present at the extracellular solution. Furthermore, the lack of iodide transport when overexpressing other proteins than SMCT1, precludes the possibility of an overexpression of endogenous transport proteins like chloride channels for example. In fact, the transport of iodide appears to be specific to the expression of SMCT1 and interestingly of another monocarboxylate transporter MCT1. The analysis of all trials, including the fact that the amplitude of the observed transport is 20 times larger than the leak current lead us to propose that SMCT1 can carry iodide in an electroneutral manner. However, the mechanism by which this is accomplished is not easy to identify and future experiments will be necessary to determine whether this transport is observed in other SMCT1 expression systems.

Keywords : SMCT1, iodide transport, thyroid.

Table des matières

RÉSUMÉ	I
ABSTRACT	II
TABLE DES MATIÈRES	III
LISTE DES TABLEAUX	V
LISTE DES FIGURES	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	IX
REMERCIEMENTS	XIII
I- INTRODUCTION	15
1- LE TRANSPORT MEMBRANAIRE	16
2-LA FAMILLE DES <i>SLC5</i>	19
3- LE TRANSPORTEUR DE Na ⁺ MONOCARBOXYLATES : <i>SMCT1</i>	21
3.1- <i>Les monocarboxylates</i>	22
3.2- <i>Caractérisation fonctionnelle de SMCT1</i>	24
3.3- <i>Fonctions physiologiques de SMCT1</i>	27
4- <i>SMCT1 ET LA THYROÏDE</i>	39
4.1- <i>Synthèse des hormones thyroïdiennes</i>	40
II- DONNÉES PRÉLIMINAIRES	55
OBSERVATIONS SUGGÉRANT UNE IMPLICATION DE <i>SMCT1</i> DANS LE TRANSPORT APICAL D'IODE PAR LA THYROÏDE.....	55
1.- LES COURANTS DE FUITE ANIONIQUES	55
2- LE TRANSPORT D'I ¹²⁵ SUR DES CULTURES PRIMAIRES DE THYROCYTES PORCINS.....	58
III- OBJECTIF GÉNÉRAL	60
IV- MATÉRIELS ET MÉTHODES	61
1- PRÉPARATION DES OVOCYTES	61
2- SYNTHÈSE DE mRNA ET INJECTION	62
3- ÉSSAIS D'EXPRESSION FONCTIONNELLE	62

4- GRAPHIQUES ET ANALYSE STATISTIQUE.....	63
5- PRÉCISIONS PAR RAPPORT AU STOCKAGE ET À LA MANIPULATION DE L' I ¹²⁵	63
V- RÉSULTATS.....	65
1) CARACTÉRISATION DU TRANSPORT D'IODE PAR SMCT1	65
1.1- Les ovocytes injectés avec SMCT1 montrent une captation d'iode radioactif.....	65
1.2- Le transport d'iode observé chez les ovocytes exprimant SMCT1 est sensible à l'ibuprofène.	67
1.3) Les ovocytes exprimant SMCT1 présentent un efflux d'iode radioactif sensible à l'ibuprofène.....	68
1.4) Détermination de l'affinité pour l'iode	69
1.5) Le transport d'iode par SMCT1 est sensible au Na ⁺	72
2) CONCLUSIONS PARTIELLES ET OBSERVATIONS SURPRENANTES	73
2.1) Le transport d'iode est électroneutre : les ovocytes injectés avec SMCT1 montrent une captation d'iode radioactif 20 fois plus grande que le courant de fuite.....	74
2.2) La grandeur du transport d'iode indique que l'iode transporté ne peut pas être libre dans le cytosol	75
3) VÉRIFICATION QUANT À LA POSSIBILITÉ DE PRÉSENCE DE DIFFÉRENTS ARTÉFACTS	78
3.1) Le taux de transport d'iode peut varier selon la grenouille donneuse.....	78
3.2) Le transport d'iode observé chez les ovocytes exprimant SMCT1 n'est pas dû à la surexpression des canaux de chlore endogènes.....	80
3.3) Le transport d'iode sensible à l'ibuprofène est aussi associé à l'expression du transporteur de H ⁺ /monocarboxylates, MCT1	81
VI-DISCUSSION.....	83
1) JUSTIFICATION	83
2) OBSERVATIONS	85
3) HYPOTHÈSE 1 : SMCT1 TRANSPORTE UNE AUTRE ESPÈCE QUE L'IODE ANIONIQUE (I ⁻) : L'IODE MOLÉCULAIRE (I ₂).....	88
4) HYPOTHÈSE 2 : SMCT1 TRANSPORTE DU NAI	90
5) ANALYSE DES ARTEFACTS.....	91
6) INTERPRÉTATION DU RÔLE PHYSIOLOGIQUE DU TRANSPORT D'IODE ÉLECTRONEUTRE PAR SMCT1	93
7) PERSPECTIVES	97
VII- CONCLUSION	101
VIII- RÉFÉRENCES.....	103

Liste des tableaux

Tableau 1. Comparaison des propriétés des pores, canaux et transporteurs.

Tableau 2. Constante d'affinité moyenne (K_m) du transporteur SMCT1 pour différents monocarboxylates.

Liste des figures

Figure 1. Arbre phylogénique des membres de la famille des transporteurs SLC5 chez l'humain.

Figure 2. Structure moléculaire des monocarboxylates tels que les acides gras à chaîne courte (propionate et butyrate) et le lactate ainsi que celle de l'ibuprofène (dérivé du propionate).

Figure 3. Illustration des voies métaboliques qui impliquent les monocarboxylates.

Figure 4. Illustration du transport épithélial.

Figure 5. Illustration de la réabsorption des monocarboxylates aux cellules du tubule proximal du rein par SMCT1 et SMCT2. En médaillon: représentation du néphron, l'unité fonctionnelle du rein.

Figure 6. Illustration du rôle possible de SMCT1 dans la réabsorption d'urate aux cellules du tubule proximal du rein.

Figure 7. Illustration de l'origine des SCFAs au colon ainsi que de ses rôles physiologiques.

Figure 8. Structure moléculaire des hormones thyroïdiennes, triiodothyronine (T3) et thyroxine (T4).

Figure 9. Illustration de la synthèse des hormones T3 et T4 dans les follicules thyroïdiens.

Figure 10. Modèles de la fonction à la thyroïde de CIC5 et son interaction avec la pendrine.

Figure 11. Spécificité du courant de fuite de SMCT1.

Figure 12. Effets du Na^+ extracellulaire sur le courant de leak inward sur des ovocytes exprimant SMCT1.

Figure 13. Effets du Na^+ extracellulaire sur le courant de leak outward sur des ovocytes exprimant SMCT1.

Figure 14. Mesures de l'efflux d' ^{125}I sur des monocouches polarisées de cultures primaires de thyrocytes porcins.

Figure 15. Illustration de la préparation et de l'injection des ovocytes.

Figure 16. Détermination de la portion linéaire de la captation d'iode en fonction du temps en présence de 10mM d'iode.

Figure 17. Captation d' ^{125}I sur des ovocytes contrôle ou exprimant SMCT1 en présence de 10mM d'iode.

Figure 18. Captation d' ^{125}I sur des ovocytes non injectés et exprimant SMCT1 en présence ou absence de 1mM d'ibuprofène.

Figure 19. Quantité d' ^{125}I restant à l'intérieur des ovocytes non injectés et exprimant SMCT1 après une période d'efflux d'une heure.

Figure 20. Captation d' ^{125}I avec des concentrations allant de 0 à 10mM d'iode sur des ovocytes non injectés ou exprimant SMCT1.

Figure 21. Captation d' ^{125}I à des concentrations allant de 0 à 100mM d'iode sur des ovocytes non injectés ou exprimant SMCT1.

Figure 22. Captation d' ^{125}I en présence ou absence du Na^+ extracellulaire sur des ovocytes non injectés ou exprimant SMCT1.

Figure 23. Comparaison de l'amplitude du transport d'iode électroneutre (captation) vs le courant d'iode (courant de fuite associé à SMCT1).

Figure 24. Séparation par centrifugation des parties soluble et protéique d'un ovocyte exprimant SMCT1 après la captation d' ^{125}I pendant 1 heure.

Figure 25. Captation d' ^{125}I en présence ou absence de 2% de BSA dans la solution de captation.

Figure 26. Captation d' ^{125}I en fonction de la concentration d'iode.

Figure 27. Relation dose-réponse entre l'amplitude des courants de K^+ et Cl^- et la concentration de mRNA d'Isk injecté aux ovocytes.

Figure 28. Captation d' ^{125}I sur des ovocytes non injectés et sur des ovocytes exprimant Isk.

Figure 29. Captation d' ^{125}I sur des ovocytes non injectés et sur des ovocytes injectés avec SMCT1, KCC3, NKCC, DAT, SGLT1 et MCT1 respectivement.

Figure 30. Oxydation d' I^- et production d' I^2 et I^3 .

Liste des abréviations

ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien
ANOVA	Analyse de variance
Arg	Arginine
ARNm	Acide ribonucléique messager
Asn	Asparagine
ATP	Adénosine triphosphate
Br⁻	Brome (ion)
BSA	Albumine bovine
Ca⁺⁺	Calcium (ion)
C/EBPδ	<i>CCAAT/enhancer binding protein delta</i>
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
4-CHC	Acide cyano-4-hydroxy-cinnamique
CHT	Choline transporter/ Transporteur de choline
Cl⁻	Chlore (ion)
CIC5	Chloride channel 5/ Canaux de chlore 5
ClO³⁻	Chlorate (ion)
CO₂	Dioxyde de carbone
DIT	Di-iodotyrosine
EGF	Epidermal growth factor /Facteur de croissance épidermique
FRG	Familial renal glycosuria/Glycosurie rénale familiale
FRTL-5	Functional rat thyroid cell strain/ lignée cellulaire fonctionnelle des thyrocytes de rat
GABA	γ-Aminobutyric acid/Acide γ-aminobutyrique
GAT1/GAT3	GABA transporter 1/3/Transporteur du neurotransmetteur GABA 1/3
GGM	Glucose-galactose malabsorption/Syndrome de la malabsorption de glucose-galactose
Gly	Glycine
GMPc	Cyclic guanosine monophosphate /Guanosine monophosphate cyclique
H⁺	Proton (ion hydrogène)
HCO₃⁻	Bicarbonate
HDAC	Désacétylase des histones
hDAT	Human Dopamine transporter /Transporteur humain de dopamine
hKCC3a	Human potassium chloride cotransporter 3a/ Transporteur de potassium et chlore 3a
ITD	Iodide transport defect / Défet du transport d'iode

IsK	Potassium voltage-gated channel
K⁺	Potassium (ion)
KO	Knockout
MCT	Monocarboxylate Transporter / Transporteur de monocarboxylates
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney cell line/Lignée cellulaire de rein de chien
Mg⁺	Magnesium (ion)
MIT	mono- diiodotyrosine
Na⁺	Sodium (ion)
NHERF	Protéines contenant un domaine PDZ
NH₃	Ammoniac
NIS	Sodium Iodide Transporter/ Transporteur de sodium iode
NMDG	N-methyl-D-glucamine
NO₃⁻	Nitrate (ion)
O₂	Oxygène
OAT	Organic anion transporter/ Transporteur des anions organiques
PDS	Pendred syndrome/ Syndrome de Pendred
PDZ	Motif de liaison (pour PSD-95/SAP90, DLG, ZO-1)
PDZK1	Protéines contenant un domaine PDZ
pH_i	pH intracellulaire
PKA	Protein kinase A/phosphokinase A
PKC	Protein kinase C/phosphokinase C
rbNKCC2A	Rabbit sodium Potassium 2 Chloride transporter/ Transporteur de sodium potassium 2 de lapin
rSERT	Rat serotonin transporter/ Transporteur de serotonin de rat
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain réaction/ Réaction en chaîne par polymerase
SCFA	Short chain fatty acid/ Acides gras à chaîne courte
SCN	Thiocyanate
SGLT1	Sodium glucose transporter 1/ Transporteur de glucose 1
SLC	Solute carrier/ Transporteur des solutes
SMCT1	Sodium monocarboxylate transporter 1/Transporteur des monocarboxylates 1
SMCT2	Sodium monocarboxylate transporter 2/ Transporteur des monocarboxylates 2
SMVT	Sodium multivitaminic transporter/ Transporteur multivitaminique
T3	Triiodothyronine
T4	Thyroxine
Thr	Threonine

TonEBP	Tonicity-responsive enhancer binding protein
TPO	Thyroperoxydase
TRH	Thyrotropin-Releasing Hormone/ Hormone thyroïdienne
TSH	Thyroid Stimulating Hormone/ Thyroïdostimuline
TSHR	Thyroid Stimulating Hormone Receptor/ Récepteur de l'hormone thyroïdienne
URAT-1	Urate transporter1/ Transporteur des urates 1
Val	Valine
WT	Wild type/ Native, sauvage

*A mis padres Mayela y Fernando por su apoyo y amor
incondicional.*

Remerciements

En préambule à ce mémoire, je souhaitais adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui auront contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de ces formidables années universitaires.

Je tiens à remercier mon cher directeur de recherche Jean-Yves Lapointe sans qui tout cela n'aurait jamais été possible. Je te remercie Jean-Yves, pour avoir cru en moi depuis notre première rencontre en me donnant l'inestimable opportunité de travailler dans ton laboratoire. Merci de te montrer toujours à l'écoute, pour ta disponibilité et ton infinie patience et ton encadrement.

Je tiens aussi à remercier à Rémy Sauvé et Jean-Louis Schwartz pour m'avoir fait l'honneur d'être président du jury et rapporteur de mon travail, mais surtout pour ces précieux conseils et observations en tant que comité de parrainage au long de la maîtrise.

Mes remerciements s'adressent également à mes collègues de laboratoire. Je vous remercie Jean Philippe et Louis pour son agréable compagnie et sa gentillesse tout au long de ma maîtrise. J'ai toujours trouvé un conseil ou une réponse en vous. En fait si la rédaction de ce mémoire a vu le jour est grâce à vous mes chers éditeurs.

Mike, je te remercie pour tous les enseignements et chères suggestions depuis mon premier jour au laboratoire. Berni, sans ton aide j'aurais toujours manqué de quoi pour mes expériences. Je vais sûrement manquer ta bonne humeur et qui sait, peut être même ta poste de radio préféré.

J'exprime aussi ma gratitude aux tous les membres du GÉPROM, je tiens à les remercier tout un chacun. Bien entendu, je n'ai pas de mots pour remercier le support moral de Julie, l'encadrement de Pierre, la gentillesse de Louise, et l'aide de Michel. Aucune de ces expériences radioactives n'aurait pu se faire sans l'appui de Sandra, et de tout le labo Bichet. Merci à vous tous de rendre agréable chaque jour de travail.

En plus de la richesse académique, cette maîtrise m'a permis de gagner de précieux amis. Patricia et Nathan je vous adresse mes plus sincères remerciements vous m'avez toujours soutenue et encouragé. Cette maîtrise n'aurait pas été la même sans vous.

Finalement, je tiens à remercier mes meilleurs amis à vie Abi et Ceci et mon cher copain Rodrigo. Les filles, curieusement, l'ironie du destin nous a permis de partager cette expérience montréalaise ensemble. Je vous remercie pour votre encouragement et compagnie. Rodrigo, je n'ai pas de mots pour te remercier ton soutien et ton amour, on est sans doute la meilleur équipe au monde.

Je n'oublie pas ma famille, mais surtout mes parents pour lesquelles je n'aurais jamais assez des opportunités pour leur remercier toute, mais vraiment toute ma gratitude et reconnaissance.

I- INTRODUCTION

Pour maintenir leur composition et leur volume, les cellules requièrent un équilibre entre le milieu extracellulaire et intracellulaire. En effet, la composition du milieu extracellulaire est très différente de la composition interne des cellules et celles-ci dépendent d'une quantité d'énergie appréciable pour produire ou accumuler des composés importants comme les acides nucléiques, les acides aminés et les sucres. Si la cellule n'avait pas un moyen de s'isoler, tout en maintenant la communication avec le monde extérieur, la vie ne serait pas possible.

En agissant comme une barrière sélective, la membrane lipidique maintient un état stationnaire entre le milieu intérieur et extérieur en régulant le transport des ions, des molécules et de l'eau. Cette perméabilité sélective de la membrane plasmique résulte notamment de sa structure.

Les composants majeurs de la membrane plasmique sont les phospholipides. Les phospholipides sont une classe de lipides qui sont formés par une tête polaire et une queue non polaire lipidique composée d'une longue chaîne hydrocarbonée. En étant hydrophyles à la tête et hydrophobes à la queue, leur interaction avec l'eau est amphipatique et donc est idéalement adaptée pour séparer deux compartiments aqueux.

Bien que l' O_2 ainsi que des molécules polaires non-chargées telles que le CO_2 et NH_3 puissent traverser librement la membrane lipidique, des molécules solubles dans l'eau telles que les protéines, les acides nucléiques et les sucres sont retenues à l'intérieur de la cellule due à leur incapacité de passer à travers le centre hydrophobe de la membrane. De la même manière, la membrane reste imperméable à la diffusion simple des ions tels que le Na^+ , le K^+ , le Cl^- et le Ca^{++} .

Comment fait la membrane pour favoriser le passage sélectif de ces molécules à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule? En fonctionnant comme portes d'entrée ou de sortie des différentes molécules, des protéines immergées dans la bicouche lipidique rendent possible le transport de ces molécules.

Étant donné leur importance biologique, les protéines qui sont chargées du transport membranaire chez l'humain forment une classe comprenant autour de 2000 gènes et donc 8 % du génome humain. Parmi eux, on trouve des gènes codant pour des canaux ioniques, des transporteurs couplés à l'ATP, des transporteurs passifs, des cotransporteurs et des antiporteurs. Cette liste comprend aussi des récepteurs ionotropiques, des aquaporines, des sous-unités des transporteurs et canaux, ainsi que des protéines auxiliaires ou régulatrices des transporteurs (Hediger et al., 2004).

1- Le transport membranaire

Grossièrement, les protéines chargées du transport sont classées en fonction de leur mécanisme d'action, et en conséquence, en fonction de la source énergétique qui permet le mouvement des molécules.

Le mécanisme le plus simple connu est la diffusion facilitée. Ce processus utilise comme seule source d'énergie le gradient électrochimique de la molécule à transporter. Les pores, les canaux ioniques, les transporteurs de substrats organiques et les uniporteurs font partie de cette catégorie (Hediger et al., 2004).

Toutefois, comme il est montré dans le tableau 1, les pores, les canaux et les transporteurs sont fondamentalement distincts cinétiquement. Tandis que les pores sont ouverts en permanence, les canaux subissent des transitions de conformation entre les états fermés et ouverts. D'autre part, les transporteurs présentent une voie de perméabilité qui n'est

pratiquement jamais ouverte simultanément à la fois dans la partie intracellulaire et extracellulaire. Donc, si on considère que l'événement fondamental pour un canal est l'ouverture, l'événement fondamental pour un transporteur est un cycle complet de changements conformationnels. Parce que les sites de liaison dans un transporteur sont limités, seulement un petit nombre fixe de particules est transporté lors d'un cycle de transport. Ainsi, le nombre de particules par seconde qui peut se déplacer à travers la membrane à travers un transporteur est plusieurs ordres de grandeur inférieur à celle atteinte à travers un canal (Hediger et al., 2004).

Diffusion facilitée : comparaison des propriétés des pores, des canaux et des transporteurs			
	PORES	CANAUX	TRANSPORTEURS
Exemple	Aquaporine 1 (AQP1)	Canaux de K ⁺ (Shaker)	Transporteur de Glucose (GLUT1)
Voie de perméation à travers la membrane	Toujours ouverte	Ouverte de façon intermittente	Jamais ouverte
Mode de fonctionnement	(Aucun) toujours ouverte	Ouverture	Changement de conformation
Particules transportées par événement	-----	*6 × 10 ⁴	1 - 5
Particules transportées par seconde	Jusqu'à 2 × 10 ⁹	10 ⁶ - 10 ⁸ (selon la probabilité d'ouverture)	200 - 50,000

Tableau 1. Comparaison des propriétés des pores, des canaux et des transporteurs. *Le nombre de particules transportées par un canal est calculé en supposant un canal de 100-pS, soumis à une force électromotrice de 100mV et une temps d'ouverture de 1ms (Adapté de (Boron and Boulpaep, 2003).

Pourtant, la diffusion facilitée n'est pas dans toutes les circonstances le meilleur pour la cellule. Fréquemment la concentration d'un métabolite est beaucoup plus faible dans le milieu extracellulaire que dans la cellule. Alors, pour être capable de concentrer cette molécule, la cellule a besoin d'un mécanisme plus complexe que celui d'un pore qui permet

la diffusion simple. Le transport actif répond à ces exigences en utilisant d'autres sources d'énergie pour transporter des molécules à l'encontre de leur gradient. L'hydrolyse d'ATP, ainsi que l'énergie redox appartiennent à la catégorie de sources d'énergie dites directes. Ces sources énergétiques sont utilisées par des pompes comme les transporteurs couplés à l'ATP qui sont des transporteurs actifs primaires.

L'exemple le plus clair est la fameuse pompe Na^+/K^+ ATPase qui maintient le gradient transmembranaire de Na^+ et de K^+ qui constitue la source du potentiel membranaire de la cellule. Ainsi, cette pompe crée des gradients ioniques qui non seulement sont importants pour le bon fonctionnement de la cellule, mais peuvent aussi être utilisés comme force motrice d'un autre type de transport actif, le transport actif secondaire.

Les transporteurs actifs secondaires peuvent transporter toute une variété de substrats à l'encontre ou en faveur de leur gradient, en utilisant, par exemple, le gradient favorable du Na^+ . Du fait que la force motrice de ce mécanisme résulte du pompage des ions hors de la cellule, et donc du transport actif primaire, ce mécanisme de transport est dit secondairement actif.

Les transporteurs se divisent en cotransporteurs et antiporteurs. Les cotransporteurs transportent leurs substrats dans la même direction, tandis que les antiporteurs le font des directions opposées.

Les transporteurs, les antiporteurs ainsi que les transporteurs passifs sont regroupés dans la superfamille SLC pour « SoLute Carrier » (Hediger et al., 2004). La famille SLC comprend 55 familles géniques de transporteurs classifiés selon leur identité de séquence. Ceci représente environ 300 membres. Les substrats transportés incluent notamment des cations et anions inorganiques (ex. H^+ , HCO_3^- , Cl^- , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , etc.), des métabolites énergétiques tels que les acides aminés, des oligopeptides, du glucose et d'autres sucres. Des carboxylates et d'autres anions organiques, des acides gras, des lipides ainsi que des

composés vitaux tels que des vitamines, des nucléosides et des neurotransmetteurs, entre autres, peuvent aussi être transportés (He et al., 2009).

En raison de son importance physiologique, le cotransporteur de Na^+ glucose a été le premier cotransporteur couplé au Na^+ qui a été identifié. Ce dernier appartient à la famille génique des cotransporteurs SLC5 (Wright et al., 2004).

2-La famille des *SLC5*

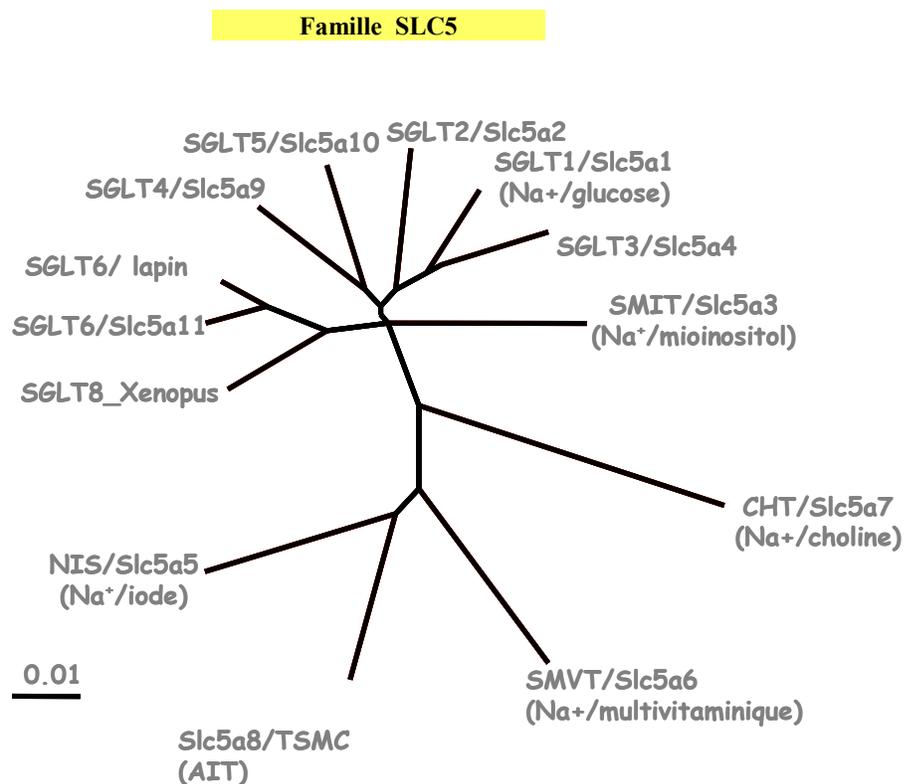


Figure 1 L'arbre phylogénique des membres humains* de la famille des transporteurs SLC5. (Adapté de Wright et Turk²⁴ 2004). * À exception de SGLT6 et SGLT8.

Connue aussi comme la famille des transporteurs Na^+ glucose, la famille *SLC5* comprend plus de 230 gènes dans les génomes bactériens et animaux. Pourtant, chez l'humain on a identifié seulement 11 gènes. Parmi ceux-ci on trouve des protéines qui transportent des

sucres (*SLC5A1*, 2, 9, 11) du myo-inositol (*SLCA3*, 11), des anions (*SLC5A5*, *SLC5A8*, *SLC5A12*), des vitamines (*SLC5A6*), de la choline (*SLC5A7*) ainsi qu'un senseur de glucose (*SLC5A4*). À ce jour, il y a encore un gène orphelin (*SLC5A10*) (Wright et al., 2007).

Comme tous les membres de la superfamille *SLC*, les gènes qui appartiennent à la famille *SLC5* ont été groupés par l'homologie de séquence qu'ils partagent entre eux. Comme la figure 1 le montre, le degré d'homologie des membres de la famille *SLC5* par rapport au transporteur de glucose SGLT1, varie de 21 à 70 %. Les plus homologues sont le senseur de glucose SGLT3 et les transporteurs de glucose SGLT2 et SGLT4 avec un degré d'homologie de 70, 59 et 56 % respectivement, suivi des transporteurs de myo-inositol SMIT1 (55 %) et SMIT2 (50 %). Finalement avec 20 % d'homologie de séquence on trouve le transporteur de choline CHT ainsi que les transporteurs anioniques, tel que le transporteur multi vitaminique SMVT, le transporteur d'iode NIS, et les membres récemment caractérisés SMCT1 et SMCT2 qui sont des transporteurs de Na⁺ monocarboxylates (Wright and Turk, 2004).

Plusieurs maladies héréditaires sont associées avec des mutations des membres de la famille *SLC5*. Des mutations chez SGLT2 occasionnent la glycosurie rénale familiale (FRG) tandis que des mutations chez SGLT1 sont la cause du syndrome de la malabsorption de glucose-galactose (GGM) (Turk et al., 1991). Parmi les transporteurs anioniques, il y a une association entre l'hypothyroïdisme et des mutations sur NIS(De, V et al., 2000) ainsi que l'incidence de plusieurs cancers avec des événements d'hyperméthylation qui rendent SMCT1 silencieux (Li et al., 2003).

Par rapport à la régulation de l'expression de cette famille de cotransporteurs, on sait que NIS est activé à la glande thyroïde lors de l'action de l'hormone stimulante de la thyroïde (TSH) via GMPc (De, V et al., 2000). De plus, l'hypertonie cellulaire stimule le transporteur de Na⁺ myo -inositol par le facteur de transcription (TonEBP) (Handler and Kwon, 2001). D'autre part, des études de régulation post-transcriptionnelle par

phosphorylation sur SGLT1 par Wright et collaborateurs (Wright et al., 1997), ont conclu que la PKA et la PKC participent à la régulation du transport de glucose en modulant le nombre de transporteurs à la membrane plasmique par mécanismes d'exo et d'endocytose.

La présente étude porte sur un des plus récents membres de la famille, un transporteur de Na^+ monocarboxylates, SMCT1, caractérisé par notre laboratoire en 2004 (Coady et al., 2004).

3- Le transporteur de Na^+ monocarboxylates : SMCT1

Aujourd'hui on sait que les gènes *SLC5a8* et *SLC5a12* codent pour les transporteurs de Na^+ monocarboxylates SMCT1 et SMCT2. Cependant, en 2002, ils appartenait encore aux gènes orphelins de la famille *SLC5*. SMCT1 a été initialement cloné par Rodríguez et collaborateurs (Rodríguez et al., 2002) en essayant de trouver un transporteur d'iode similaire à NIS. En fait, ce laboratoire a même suggéré un possible rôle dans le transport d'iode pour le désormais connu SMCT1 (voir section I- Introduction, 4) SMCT1 et la thyroïde, page 39). Peu après, une étude suggérait que cette protéine était fortement exprimée dans le côlon et qu'elle pourrait même avoir un rôle comme gène suppresseur des tumeurs (Li et al., 2003). (Voir section 3.3.3 SMCT1 exprimé au côlon, page 35).

Cette étude réalisée par Li et coll. (Li et al., 2003) mettait en doute que le possible substrat pour ce transporteur soit l'iode comme Rodríguez l'avait proposé. Le fait que le transporteur ait été trouvé dans le côlon, qu'il semblait fonctionner d'une façon dépendante du Na^+ , et le fait que les transporteurs les plus près de SMCT1 dans la famille *SLC5* sont des transporteurs d'anions, nous ont suggéré de chercher un anion, abondant dans le côlon, qui pourrait agir comme le substrat privilégié de SMCT1 : les monocarboxylates.

3.1- Les monocarboxylates

Comme leur nom l'indique, les monocarboxylates sont des composés organiques dont la structure chimique possède un seul groupe carboxyle (figure 2). Ce sont des sources importantes d'énergie pour l'organisme et donc ont besoin de mécanismes efficaces pour leur absorption (Andoh et al., 2003).

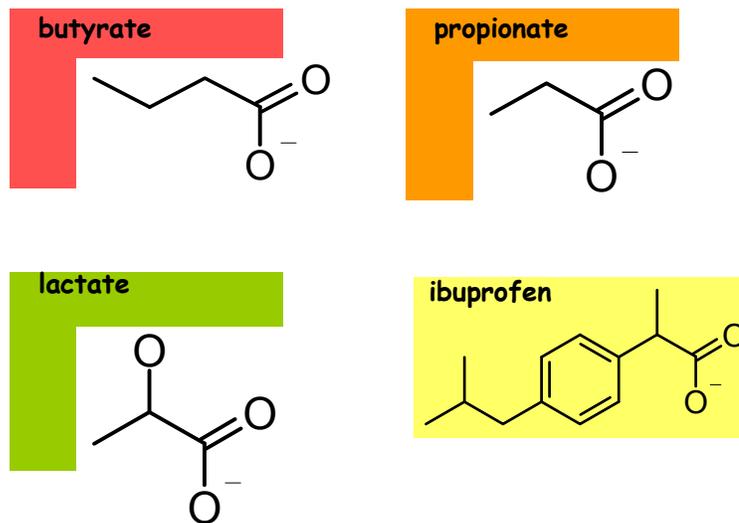


Figure 2 Structure moléculaire des monocarboxylates tels que les acides gras à chaîne courte (propionate et butyrate) et le lactate. La structure de l'ibuprofène, dérivé du propionate, est aussi montrée.

Comme il vient d'être mentionné, dans l'épithélium du côlon il y a une forte concentration de monocarboxylates, plus spécifiquement d'acides gras à chaîne courte, tels le butyrate, le propionate et l'acétate, connus aussi sous le nom de SCFA pour « short chain fatty acids ». Ces acides gras ont d'un à six atomes de carbone et sont produits lors de la fermentation bactérienne des polysaccharides, oligosaccharides, protéines et peptides. Du fait qu'ils représentent une des principales sources d'énergie pour les colonocytes (figure 7A), il n'est pas surprenant que leur absorption soit efficacement faite par l'intermédiaire de trois mécanismes différents : la diffusion passive, le transport dépendant du bicarbonate, et le transport dépendant du Na^+ (Andoh et al., 2003).

Cependant, les SCFA ne sont pas les seules molécules nommées monocarboxylates. Dans cette catégorie on trouve le lactate et des corps cétoniques, d'autres sources énergétiques qui jouent un rôle central dans le métabolisme de plusieurs tissus (figure 3). Le lactate est produit en conditions anaérobiques à partir du pyruvate. Quoique quelques cellules le requièrent dans des conditions d'hypoxie ou d'ischémie, le lactate est essentiel pour d'autres cellules comme les érythrocytes, les myocytes de fibres musculaires blanches et certaines cellules tumorales, qui l'utilisent comme leur seule source d'ATP (Boron and Boulpaep, 2003).

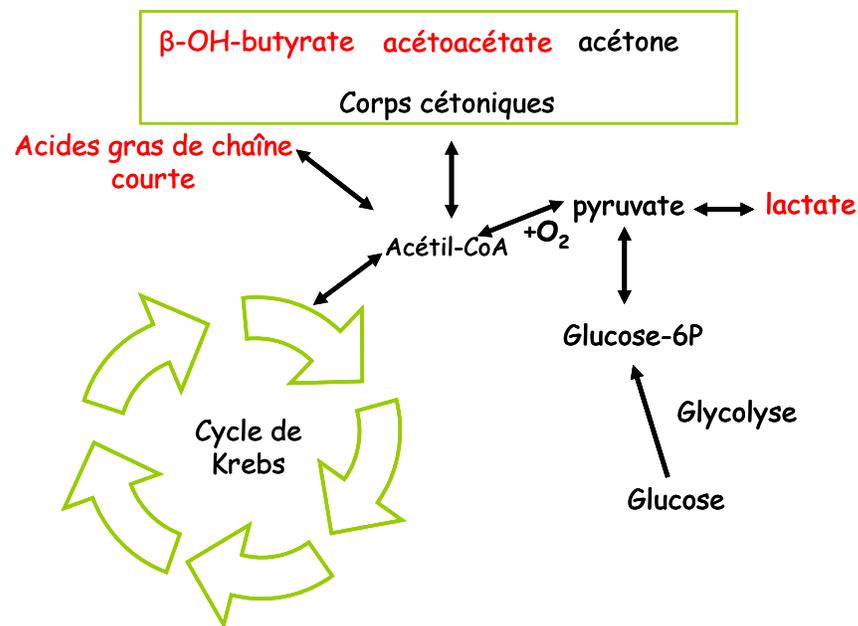


Figure 3. Illustration des voies métaboliques qui impliquent les monocarboxylates (en rouge).

D'autre part, d'autres sources d'énergie périphériques peuvent être produites lors de périodes prolongées de jeûne ou dans des conditions où le métabolisme du glucose n'est pas convenable, comme dans le cas du diabète. Évidemment, on évoque des corps cétoniques générés à partir de l'acétyl coenzyme A au foie, l'acétoacétate, le β -hydroxybutyrate et, dans une plus faible mesure, l'acétone (Boron and Boulpaep, 2003).

L'importance physiologique de tous ces monocarboxylates réside bien sûr en leur nature énergétique. Pourtant, le fait qu'ils doivent être réabsorbés dans plusieurs tissus incluant le côlon est un indice que SMCT1 peut y jouer un rôle important. À vrai dire, les indices les plus importants qui ont permis à notre laboratoire de démontrer que SMCT1 transportait des monocarboxylates ont été le fait que les monocarboxylates sont des molécules anioniques, et que des mécanismes d'absorption couplés au Na^+ avaient déjà été décrits pour les SCFA, mais aussi pour le lactate (voir section 3.3 Fonctions physiologiques de SMCT1 page 27). Comme on l'a déjà mentionné plus haut, au sein de la famille *SLC5*, SMCT1 partage la plus grande homologie avec les transporteurs anioniques NIS et SMVT (figure 1). De plus, tous les transporteurs de la famille sont couplés au Na^+ , quel que soit leur substrat.

Donc, tenant compte de cela, deux ans après son identification initiale, Coady et coll. (Coady et al., 2004) ont identifié correctement SMCT1 comme un transporteur de monocarboxylates. Cette démonstration a été publiée deux mois après un court article du laboratoire de Ganapathy (Miyachi et al., 2004) qui arrivait essentiellement aux mêmes conclusions. Par la suite, la caractérisation d'une deuxième version de SMCT (SMCT2) fut effectuée par d'autres équipes de recherche (Srinivas et al., 2005; Plata et al., 2007).

3.2- Caractérisation fonctionnelle de SMCT1

Coady et coll. (Coady et al., 2004) ont injecté l'ADNc de *SLC5A8* dans des ovocytes de grenouille, *Xenopus laevis*, dans le but d'exprimer SMCT1 à la membrane cellulaire. Ensuite, ils ont mesuré le transport en condition de voltage imposé en présence de plusieurs substrats potentiels. En raison de la forte homologie entre le gène orphelin *SLC5a8* et les transporteurs SMVT et NIS, Coady et coll. (Coady et al., 2004) ont testé des substrats anioniques tels que des mono, di et tricarboxylates, ainsi que l'I⁻ et le Br⁻.

Seulement en présence des monocarboxylates (100 μM), un courant entrant dépendant du Na^+ a été observé chez les ovocytes injectés. Ce courant variait en fonction du voltage, et

l'affinité pour les substrats et pour le Na^+ a été calculée (tableau 2) en mesurant la relation courant voltage en présence de différentes concentrations de Na^+ et du substrat (Coady et al., 2004). De plus, on a vérifié que les monocarboxylates étaient véritablement transportés en faisant des expériences de captation des monocarboxylates radioactifs sur des ovocytes de *Xenopus laevis* exprimant SMCT1. Cette étude était concordante avec la caractérisation faite par Miyauchi et coll. (Miyauchi et al., 2004).

<i>SUBSTRAT</i>	K_m
Propionate	$128 \pm 4 \mu\text{M}$
Butyrate	$72 \pm 8 \mu\text{M}$,
Lactate	$159 \pm 24 \mu\text{M}$

Tableau. 2 Constante d'affinité moyenne (K_m) du transporteur SMCT1 pour différents monocarboxylates.

Il a ainsi été démontré que ce transporteur est spécifique aux monocarboxylates, pour cette raison il a été nommé *Sodium Monocarboxylate Transporter 1* ou SMCT1 (Coady et al., 2004). La stœchiométrie du transporteur, $2 \text{Na}^+ : 1$ monocarboxylate, sera établie plus tard dans notre laboratoire (Coady et al., 2007).

3.2.1- Inhibiteurs

Dans le but de trouver des inhibiteurs spécifiques pour SMCT1, notre laboratoire a examiné plusieurs molécules potentielles. Parmi la liste, on trouve des inhibiteurs des autres transporteurs de la famille tels que la phlorizine et la phlorétine; des inhibiteurs du transport anionique, tels que le probénécide et le SITS, et des analogues des substrats, tels que le phenyllactate, et l'ibuprofène. L'acide cyano-4-hydroxy-cinnamique (4-CHC), l'inhibiteur de la famille de transporteurs de monocarboxylates couplé aux protons, MCT, a été aussi testé.

Seulement l'ibuprofène, ainsi que le probénécide, un anion organique, ont été capables d'inhiber le transport quand ceux-ci étaient utilisés à des concentrations autour de 100 μM et 500 μM respectivement. Ces deux inhibiteurs agissent de façon compétitive, avec des K_i de $20 \pm 3 \mu\text{M}$ pour l'ibuprofène et de $195 \pm 33 \mu\text{M}$ pour le probénécide (Coady et al., 2004).

L'ibuprofène est la substance active d'un des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), des médicaments antipyrétiques et analgésiques utilisés en cas de douleur aiguë ou chronique (Adams, 1992). Son mécanisme d'action résulte de l'inhibition de la cyclo-oxygénase, une enzyme impliquée dans la formation des prostaglandines et des thromboxanes. Ces dernières sont des médiateurs de l'inflammation et sont impliquées dans la fièvre et l'agrégation plaquettaire (Adams, 1992).

Il est intéressant de constater que l'inhibition qu'exerce l'ibuprofène sur SMCT1 n'a rien à voir avec son rôle anti-inflammatoire. Son effet résulte de sa structure, puisque il est un dérivé du propionate, un des monocarboxylates susmentionnés. Comme on peut l'observer dans la figure 2, les deux se ressemblent structuralement expliquant la raison de son interaction avec SMCT1.

3.2.2-Topologie

Selon plusieurs études, SMCT possède 610 acides aminés et comprendrait, comme NIS, 13 domaines transmembranaires. Deux sites potentiels de glycosylation ont été proposés (Asn 481 et 485) ainsi que des sites consensus de phosphorylation pour la kinase dépendante de l'AMPc (PKA) et pour la tyrosine kinase. Le gène qui code pour cette protéine se situe sur le locus q23 du chromosome 12 (Paroder et al., 2006).

3.3- Fonctions physiologiques de SMCT1

3.3.1 Le transport épithélial

Dans la section sur le transport membranaire, on a discuté de l'importance pour chaque cellule de maintenir un équilibre avec leur milieu extérieur. Pour comprendre le rôle de SMCT1, il faut maintenant aborder la question de la manière dont le corps humain maintient l'homéostasie de son milieu intérieur.

De la même façon que les cellules le font, la régulation hydrique dans le corps humain réside dans les mécanismes de transport membranaire. Pourtant, pour pouvoir effectuer des fonctions vitales, comme les processus de réabsorption et excrétion des solutés et métabolites présents dans le sang, l'organisme se sert du transport épithélial (Boron and Boulpaep, 2003).

L'épithélium est un des tissus principaux dans l'organisme, les autres étant le tissu musculaire, le tissu osseux, le tissu cartilagineux, le tissu adipeux, le tissu conjonctif et le tissu nerveux.

À la différence des autres tissus, un épithélium est composé par un ensemble de cellules étroitement juxtaposées qui sont souvent polarisées. Cela veut dire que les deux extrémités opposées sont différentes morphologiquement et biochimiquement. Quand un épithélium forme une structure repliée sur elle-même en forme de tubes ou en forme de sacs, la partie de la membrane qui fait face à la lumière est nommée apicale, tandis que la membrane qui fait face aux vaisseaux sanguins est nommée basolatérale (Boron and Boulpaep, 2003). Ainsi, l'épithélium agit comme une barrière perméable sélective puisque chaque région, soit apicale ou basolatérale, affiche divers mécanismes de transport qui permettent le mouvement de l'eau et de différents solutés d'un compartiment à l'autre (figure 4) (Boron and Boulpaep, 2003).

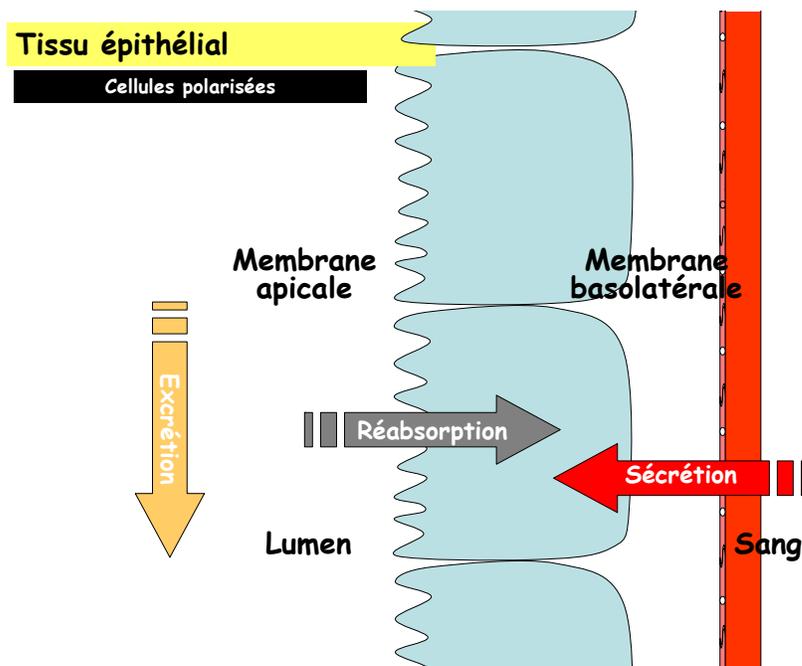


Figure 4. Illustration du transport épithélial. Les cellules polarisées (en bleu) sont morphologiquement différentes. Souvent la membrane apicale, celle qui fait face au lumen, peut présenter des bordures en brosse. La membrane basolatérale fait face au sang (en rouge). Les flèches représentent les différents mouvements transépithéliaux, la réabsorption, la sécrétion et l'excrétion.

Des organes comme les intestins et le rein ont un tissu épithélial spécialisé qui leur permet d'effectuer des mouvements transépithéliaux, soit d'absorption ou de sécrétion.

Si la fonction principale des intestins est l'absorption et la sécrétion des métabolites, celle du rein réside dans le maintien du volume et de la composition du liquide extracellulaire au niveau de l'équilibre électrolytique et acido-basique (Boron and Boulpaep, 2003). Pour arriver à accomplir cette tâche, le rein doit d'abord obtenir un ultrafiltrat du plasma avant de procéder à la réabsorption de l'ensemble des composants essentiels du plasma.

SMCT1 est exprimé dans plusieurs tissus épithéliaux à la membrane apicale. Il a été observé dans le côlon (Li et al., 2003; Takebe et al., 2005; Paroder et al., 2006; Iwanaga et al., 2006; Gopal et al., 2007a), le rein (Gopal et al., 2004; Iwanaga et al., 2006; Thangaraju et al., 2006a; Gopal et al., 2007a; Frank et al., 2008; Yanase et al., 2008), la thyroïde (Rodriguez et al., 2002; Lacroix et al., 2004; Porra et al., 2005; Hu et al., 2006; Xing,

2007), le tube digestif (Ueno et al., 2004; Anderle et al., 2005; Takebe et al., 2005; Iwanaga et al., 2006; Gopal et al., 2007a), le muscle squelettique (Srinivas et al., 2005), la rétine (Martin et al., 2007) et le cerveau (Martin et al., 2006).

En raison de sa localisation luminale dans l'épithélium rénal et du côlon, plusieurs études ont suggéré que SMCT1 pourrait servir pour l'absorption de ces métabolites énergétiques (Ganapathy et al., 2005; Gupta et al., 2006). Évidemment, un rôle physiologique en rien négligeable puisque les monocarboxylates jouent un rôle central dans le métabolisme cellulaire de nombreux tissus. En plus, leur réabsorption et excrétion sont indispensables pour éviter leur perte dans l'urine, ou une accumulation excessive qui peut occasionner des troubles tels que l'acidose métabolique.

Cependant, le fait qu'il soit aussi exprimé dans d'autres tissus, où la réabsorption de monocarboxylates ne semble pas être cruciale, suggère que d'autres rôles physiologiques soient aussi impliqués. Les exemples les plus clairs réfèrent à son rôle possible dans la thyroïde comme transporteur d'iode (Rodriguez et al., 2002) ainsi que l'implication du gène qui la codifie, le *SLC5A8*, comme gène suppresseur de tumeurs dans plusieurs cancers (Thangaraju et al., 2006b; Thangaraju et al., 2008).

3.3.2 SMCT1 dans le rein

A) Réabsorption des monocarboxylates

Le monocarboxylate dont la concentration est la plus élevée dans le sang est le lactate (1.2mM-10 mM) (Craig F.N, 1946). On sait depuis les années 50 que le tubule proximal du rein peut réabsorber plus de 95 % du lactate filtré au glomérule. Cependant, il a fallu attendre les années quatre-vingt avant que Boron et Siebens ne suggèrent un mécanisme de réabsorption. Leurs études électrophysiologiques ont permis de mettre en évidence le transporteur électrogénique à la membrane basolatérale, ainsi que les transporteurs électrogénique et électroneutre à la membrane apicale (Boron and Boulpaep, 1983a; Boron

and Boulpaep, 1983b; Siebens and Boron, 1987; Boron et al., 1988; Siebens and Boron, 1989a; Siebens and Boron, 1989c).

En utilisant des tubules proximaux de salamandre, ils ont observé l'effet de l'exposition du lactate du côté de la membrane apicale et basolatérale sur le pH intracellulaire (pH_i). Du côté apical, l'exposition de lactate a occasionné une alcalinisation intracellulaire dépendant du Na^+ sans changement dans le potentiel membranaire. En conséquence, ils ont proposé un cotransport électroneutre Na^+ /lactate comme mécanisme d'entrée de lactate luminal aux tubules proximaux (Siebens and Boron, 1987).

Même si plusieurs études ont confirmé les résultats de Boron et Siebens quant à l'existence d'un transporteur électroneutre de Na^+ lactate à la membrane apicale (Siebens and Boron, 1987; Barbarat and Podevin, 1988; Hildmann et al., 1980), d'autres études ont plutôt montré la présence d'un transporteur Na^+ /lactate électrogénique (Barac-Nieto et al., 1980; Kragh-Hansen et al., 1982; Mengual et al., 1990). Le conflit a conduit à l'hypothèse de deux systèmes de cotransport de lactate couplés au Na^+ , un électroneutre et un électrogénique, faisant en sorte que le mode électroneutre soit plus difficile à détecter à cause de la présence du transporteur électrogénique (Siebens and Boron, 1987).

D'autre part, l'exposition du lactate à la membrane basolatérale occasionnait une acidification intracellulaire indépendante du Na^+ , réversible par des inhibiteurs du transport anionique (CHC et SITS). Cette acidification était saturable par la concentration de lactate, suggérant ainsi que la protéine responsable du transport basolatéral de lactate dans les tubules proximaux était un transporteur H^+ /lactate électroneutre (Siebens and Boron, 1987). Des nos jours, on sait que les protéines responsables du transport de H^+ /lactate à la membrane basolatérale du tubule proximal appartient à la famille de cotransporteurs couplés aux protons (MCTs) (Juel and Halestrap, 1999; Halestrap and Meredith, 2004). La famille génique des MCTs (*SLC16*) comprend 14 membres parmi lesquels quatre, MCT1-MCT4, transportent des monocarboxylates et des acides gras à chaîne courte couplés aux

protons. En général, les MCTs s'expriment à la membrane basolatérale dans plusieurs tissus tels que le foie, les testicules, le cerveau, et le rein. Cependant, chaque isoforme a un modèle d'expression déterminé (Juel and Halestrap, 1999; Halestrap and Meredith, 2004).

L'identité des transporteurs apicaux n'a pas été élucidée avant le milieu de cette décennie, lorsque l'étude des protéines orphelines issues des gènes *SLC5a8* et *SLC5a12* (Coady et al., 2004; Thangaraju et al., 2006a; Plata et al., 2007; Gopal et al., 2007a; Frank et al., 2008) a suggéré que SMCT1 et SMCT2 sont les transporteurs apicaux de Na⁺- monocarboxylates électrogénique et électroneutre, respectivement, qui avaient été proposés par Boron et collaborateurs (Boron and Boulpaep, 1983a; Boron and Boulpaep, 1983b; Boron et al., 1988; Siebens and Boron, 1987; Siebens and Boron, 1989b; Siebens and Boron, 1989a). Les preuves les plus nettes de ce rôle étaient premièrement le fait que SMCT1 et SMCT2 transportaient des monocarboxylates de façon électrogénique (Coady et al., 2004) et électroneutre (Srinivas et al., 2005), respectivement. Deuxièmement, ils s'exprimaient de façon différentielle à la membrane apicale des cellules des tubules proximaux (Gopal et al., 2004). SMCT1, le plus affiné, se trouve seulement dans le segment S3 du tubule, tandis que SMCT2 s'exprime de façon ubiquitaire tout au long du tubule proximal (Gopal et al., 2007b; Plata et al., 2007). Ces deux observations peuvent expliquer de façon satisfaisante tout ce que l'on sait des mécanismes de captation apicale des monocarboxylates dans le rein.

Au rein, la concentration de lactate ultrafiltré au glomérule peut varier de 1 à 10 mM en fonction de l'activité physique. Les mécanismes de réabsorption dans le tubule proximal font chuter la concentration du lactate tout au long du néphron. Ainsi, le lactate serait plus élevé dans les premiers segments du tubule proximal (S1 et S2) et plus faible dans la dernière partie S3. Étant donné que SMCT2, le transporteur électroneutre, présente une affinité plus faible pour les substrats (Srinivas et al., 2005), il est logique de le retrouver au début du tubule proximal où la concentration du lactate est la plus élevée. De la même manière, on pourrait s'attendre que le transporteur de haute affinité, SMCT1 (Coady et al.,

2004), se trouve dans la région plus distale du tubule proximal où la concentration du lactate a déjà chuté. Donc, la localisation segmentée de ces deux transporteurs est précisément adaptée pour la réabsorption effective du lactate (figure 5).

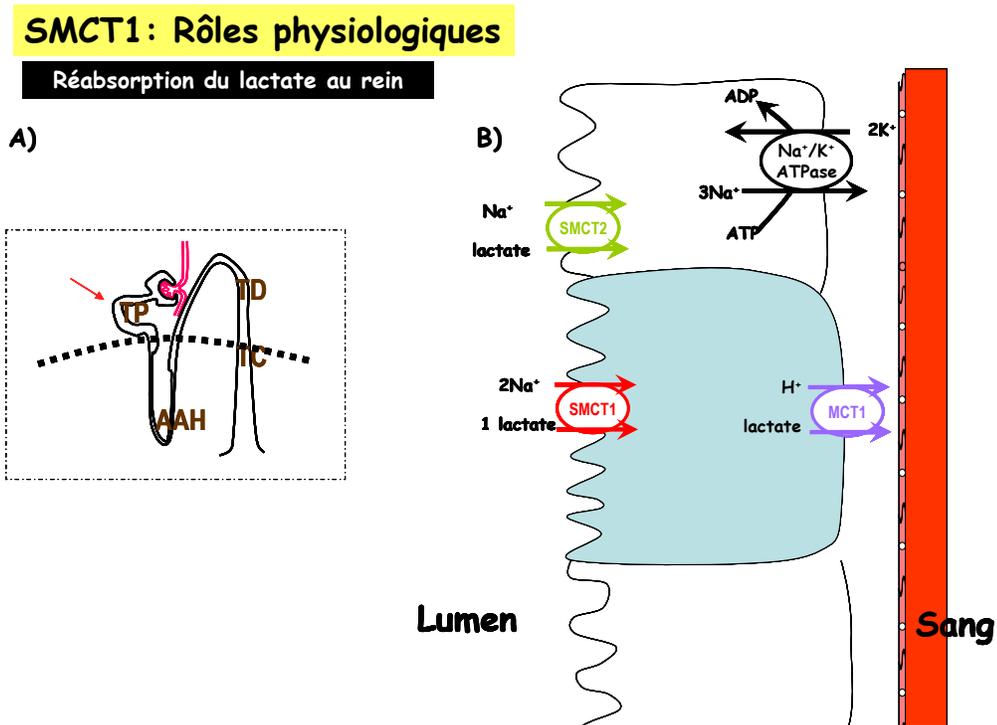


Figure 5. Illustration de la réabsorption des monocarboxylates aux cellules du tubule proximal du rein par SMCT1 et SMCT2. En médaillon: représentation du néphron, l'unité fonctionnelle du rein. La flèche rouge indique la localisation du tubule proximal. À droite, illustration des cellules proximales exprimant dans la première partie SMCT2. SMCT1 se trouve dans le dernier segment. Les transporteurs MCT se trouvent à la membrane basolatérale.

B) Génération d'un gradient anionique pour la réabsorption des urates

De nos jours, on sait qu'URAT-1 est un des transporteurs responsables de la réabsorption de l'urate et se situe sur la membrane apicale des cellules du tubule proximal rénal. Pour effectuer le transport d'urate, URAT-1, échange un anion intracellulaire tel que, par exemple, le lactate, ou le pyrazinoate contre l'urate. Donc, en fonctionnant comme un substrat pour l'échangeur des urates-anions, les anions sont capables de stimuler la

réabsorption d'urate (Guggino and Aronson, 1985; Roch-Ramel and Guisan, 1999; Mount et al., 2006).

En plus de leur rôle comme transporteurs de monocarboxylates, SMCT1 et SMCT2 pourraient aussi jouer un rôle secondaire dans la réabsorption de l'urate (Anzai et al., 2007). Dans le sang la majorité de l'acide urique, le produit de dégradation final du métabolisme des purines, circule sous forme d'urate. Comme l'urate ne peut pas être métabolisé dans les tissus humains, le maintien du taux sérique dépend de la balance entre production et excrétion.

Une mauvaise régulation de cette dernière peut occasionner une hyperuricémie qui est le premier facteur de risque pour développer la maladie de la goutte. Chez l'humain, l'excrétion des urates est assurée à 30 % par l'intestin et à 70 % par le rein (Mount et al., 2006).

SMCT1 et SMCT2 transportent des substrats anioniques tels que le lactate, pyrazinoate, nicotinate, β -hydroxybutirate et acétoacétate (Coady et al., 2004; Gopal et al., 2004; Miyauchi et al., 2004; Plata et al., 2007). Ceux-ci sont aussi des substrats d'URAT-1. Il a donc été proposé que les transporteurs Na^+ monocarboxylates pourraient avoir un rôle dans le transport des urates en générant un gradient anionique pour l'échangeur URAT-1 (figure 6) (Ichida et al., 2004). En accord avec cette hypothèse Mount et collaborateurs (Mount et al., 2006) ont observé récemment que la co-expression de SMCT1 et URAT-1 dans des ovocytes de *Xenopus laevis* résulte en une augmentation du transport des urates quand le pyrazinoate et le sodium sont présents. Cet effet n'est pas observé chez les ovocytes injectés seulement avec URAT-1 ou avec de l'eau.

Ainsi, deux fonctions ont été proposées pour les SMCTs du rein, la réabsorption des monocarboxylates tel que le lactate, et la génération d'un gradient anionique pour la

réabsorption des urates. En effet, deux études où l'expression de SMCT1 a été abolie ont mis en évidence son importance dans la physiologie rénale.

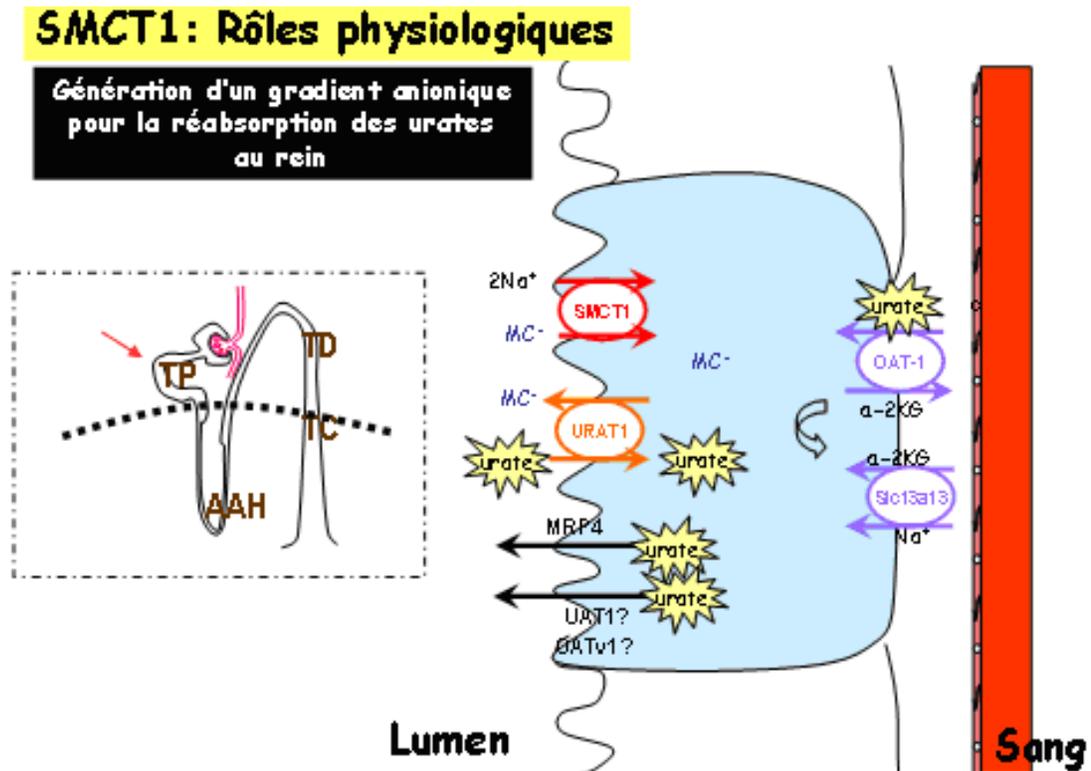


Figure 6. Illustration du rôle possible de SMCT1 dans la réabsorption d'urate aux cellules du tubule proximal du rein. En médaillon: représentation du néphron, l'unité fonctionnelle du rein. La flèche rouge indique la localisation du tubule proximal. L'entrée des anions tels les monocarboxylates (MC^-) par SMCT1 stimulerait la réabsorption des urates par le transporteur apical URAT1. La sécrétion des urates pourrait être due au transport par OAT-1 qui l'échange avec le α -cétoglutarate. Le gradient du α -cétoglutarate serait à la fois généré par Slc13a13. (Adapté d'Anzai et col. 2007).

La première, réalisée par Thangaraju et coll. (Thangaraju et al., 2006a), porte sur la génération d'une souris double knockout (KO) pour le facteur de transcription *C/EBP δ* , un membre de la famille des *CCAAT/enhancer binding proteins*. L'absence de ce facteur de transcription a comme conséquence l'abolition de l'expression rénale des transporteurs SMCT1 et SMCT2 et constitue un outil très important pour comprendre son rôle dans ce tissu. Ces auteurs ont observé que contrairement à la souris de type sauvage, la souris KO

C/EBPδ^{-/-}, présente une augmentation dans l'excrétion de lactate, et une diminution de la concentration de lactate dans le sang. De plus, ils ont observé une augmentation dans l'excrétion des urates indépendante de l'expression du transporteur d'urates URAT-1 (Thangaraju et al., 2006a). En effet, ces deux observations confirmeraient le rôle des SMCTs dans la réabsorption de lactate, et aussi dans la génération d'un gradient anionique pour la réabsorption des urates.

La deuxième et très récente étude, réalisée par Franck et collaborateurs (Frank et al., 2008), analyse une souris knockout de SMCT1. À la différence de la première étude, celle-ci ne vise pas de facteurs de transcription, mais elle propose plutôt d'éliminer l'expression générale de SMCT1 en créant une troncation à l'exon 4 et 5 du gène. Dans le rein, l'absence de SMCT1 provoquerait une augmentation de lactate dans l'urine, confirmant son rôle dans l'absorption de ce monocarboxylate par le tubule proximal. Pourtant, à différence de la souris *C/EBPδ^{-/-}* (Thangaraju et al., 2006a), la souris *SLC5A8^{-/-}* ne présentait aucun changement dans les niveaux de lactate sanguins ni des irrégularités dans la réabsorption des urates (Frank et al., 2008). Bien que l'absence de SMCT2, homologue de SMCT1, sur la souris *C/EBPδ^{-/-}* pourrait expliquer les différences entre les deux études, d'autres changements physiologiques dans ce dernier ne sont pas exclus. Ainsi, les deux études ont montré le rôle de SMCT1 dans la réabsorption de lactate. Cependant, son rôle secondaire dans la réabsorption d'urate devrait être étudié plus en détail. L'impact de l'absence de SMCT1 dans d'autres tissus chez la souris KO *SLC5A8*, sera discuté plus tard.

3.3.3- SMCT1 exprimé au côlon

Comme dans le rein, la fonction de SMCT1 dans le côlon a été associée avec des processus de réabsorption des monocarboxylates, mais aussi, de façon intéressante, avec des fonctions anti-cancérogènes (Ganapathy et al., 2005). Comme on l'a mentionné plus haut, la corrélation entre la forte concentration des SCFA dans le côlon et l'expression de SMCT1 à la membrane apicale des colonocytes (Paroder et al., 2006; Iwanaga et al., 2006) nous a

fait penser dès le début que ce transporteur était impliqué dans la réabsorption des métabolites énergétiques. En effet, les SCFA sont des substrats de SMCT1 (Coady et al., 2004), et donc ce transporteur doit être un des mécanismes qui permettent leur utilisation par les colonocytes.

Pourtant, le rôle des SCFA s'étend au-delà de leur rôle comme sources d'énergie puisqu'ils participent aussi comme modulateurs à d'autres aspects cellulaires du côlon. Plusieurs études ont montré que les SCFA peuvent avoir un effet sur le pH_i, le volume cellulaire, la prolifération, la différenciation et l'expression génique (Andoh et al., 2003; Cook and Sellin, 1998; Wong et al., 2006) (figure 7B).

En effet, la quantité des SCFA, ainsi que les différences de concentration dans chaque région du côlon, ont été associées avec des pathologies telles que des troubles gastro-intestinaux et même le cancer (Cook and Sellin, 1998; Nkondjock et al., 2003; Whiteley et al., 1996; Young and Le Leu, 2004). Le butyrate, en particulier, a été le SCFA le plus étudié dû à son possible rôle comme agent thérapeutique pour le traitement du cancer (Grunstein, 1997). Ses effets anti cancérogènes tels que l'arrêt de la prolifération cellulaire et l'induction de l'apoptose sont le résultat de l'inhibition qu'il exerce sur les désacétylases des histones (HDAC) (Lupton, 2004; Sengupta et al., 2006).

SMCT1 transporte du butyrate (Coady et al., 2004). Étant donné qu'il y a de nombreuses études qui ont associé les niveaux de butyrate avec une baisse de l'incidence de cancer du côlon, il a été suggéré que le transport de butyrate exercé par SMCT1 pourrait lui conférer un rôle de suppresseur de tumeur (Gupta et al., 2006).

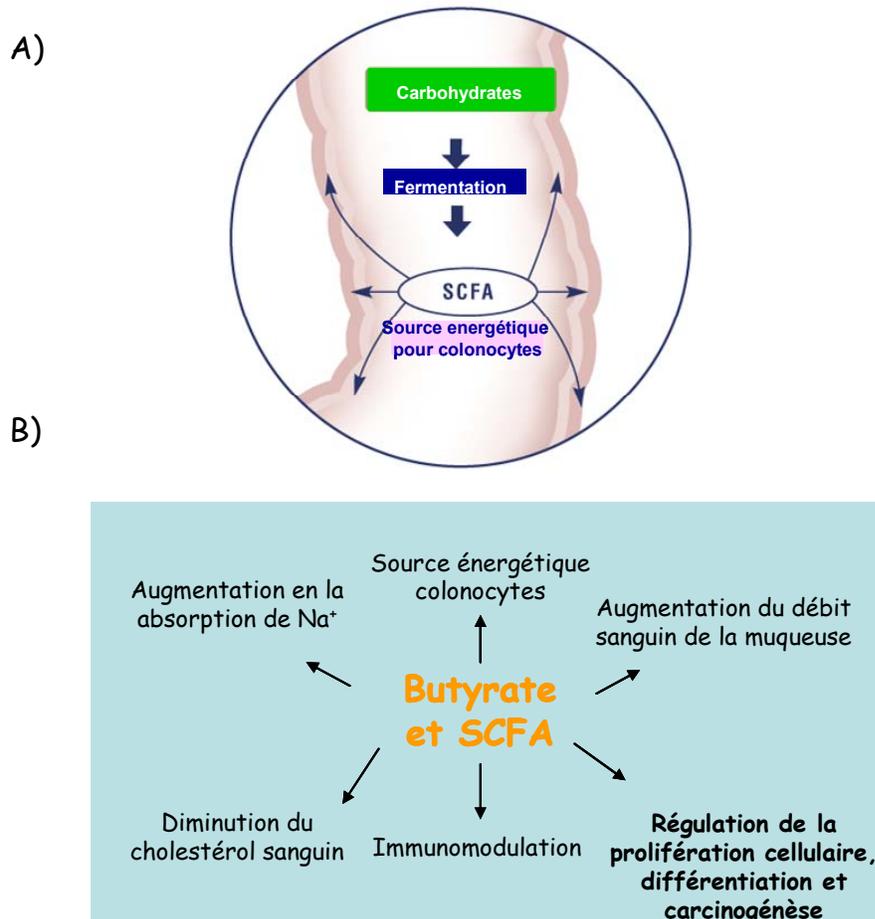


Figure 7. Illustration de l'origine des SCFA au côlon ainsi que de ses rôles physiologiques.

A) *SLC5A8* un possible gène suppresseur de tumeurs

L'hypothèse du transport de butyrate au côlon

En 2003, Li et coll. (Li et al., 2003) ont identifié le gène qui code pour SMCT1, *SLC5A8*, comme un des gènes rendus silencieux par hyperméthylation lors d'un cancer du côlon. On a alors fait l'hypothèse qu'il puisse agir comme un « tumor suppressor gene » (gène suppresseur des tumeurs) puisque la réintroduction de ce gène sur des lignées cellulaires du cancer du côlon empêche la croissance tumorale.

Comme il a déjà été mentionné, le mécanisme par lequel le gène *SLC5A8* aurait un effet protecteur envers le cancer du côlon pourrait être la réabsorption du butyrate, un inhibiteur des HDAC. À vrai dire, plusieurs études réalisées par le groupe de Ganapathy et coll. (Ganapathy et al., 2005; Gupta et al., 2006; Ganapathy et al., 2008; Thangaraju et al., 2008) se sont concentrées sur cette hypothèse en observant l'effet de la réintroduction de SMCT1 et du butyrate sur diverses lignées cellulaires provenant du cancer du côlon.

Ainsi, ils ont observé que la réintroduction de SMCT1, mais non du vecteur vide, en présence de butyrate, conduit à l'apoptose sur les cellules SW480, une lignée maligne où SMCT1 est complètement silencieux. En revanche, cet effet est absent sur la lignée cellulaire non maligne CCD841, qui exprime SMCT1 abondamment, suggérant ainsi que l'entrée de butyrate via SMCT1 est capable d'induire l'apoptose seulement dans les cellules cancéreuses (Thangaraju et al., 2008).

De plus, pour confirmer que l'entrée de butyrate dans les cellules via SMCT1 a un effet sur les HDAC, ils ont comparé le degré d'acétylation des histones sur les deux lignées cellulaires. Dans les cellules non malignes, ou non transfectées, le butyrate n'a pas d'effet sur l'activité des HDAC. Par contre, cet effet est bien présent chez les cellules malignes quand on réintroduit SMCT1 en présence de butyrate (Thangaraju et al., 2008).

En outre, l'induction de l'apoptose dans la lignée cellulaire maligne SW480 par SMCT/butyrate est associée avec l'augmentation des gènes pro-apoptotiques et la diminution des gènes anti-apoptotiques (Thangaraju et al., 2008).

Pourtant, si toutes ces observations semblent indiquer que SMCT1 a un effet anticancérigène grâce à son transport de butyrate, l'étude des préparations cellulaires provenant du côlon de la souris knockout (*SLC5A8*^{-/-}) n'est pas tout à fait concordante.

En effet, Frank et coll. (Frank et al., 2008) n'ont pas observé des différences de transport du butyrate ni du propionate entre la souris knockout et WT. De plus, la souris *SLC5a8*^{-/-} ne

présente aucune malformation morphologique mettant en doute son rôle comme gène suppresseur de tumeur.

SLC5A8 comme suppresseur des tumeurs dans d'autres tissus

Plusieurs études ont montré que le gène *SLC5A8* est aussi rendu silencieux dans plusieurs cancers tels que le cancer de la thyroïde (Xing, 2007; Porra et al., 2005; Lacroix et al., 2004), de l'estomac (Ueno et al., 2004), du cerveau (Hong et al., 2004), du sein (Thangaraju et al., 2006b), du pancréas (Park et al., 2008), du rein, de la prostate (Park et al., 2007) et de la peau (Bennett et al., 2008).

À la différence du côlon, aucun de ces tissus ne présente une concentration élevée de butyrate. Donc, selon Ganapathy et coll. (Thangaraju et al., 2006b) la raison pour laquelle SMCT1 aurait un effet anti cancérogène serait due au transport de pyruvate, un autre substrat du transporteur. Dans la lignée cellulaire de cancer de sein MCF7, où SMCT1 est rendu silencieux, il a été montré que la réintroduction de SMCT1 en présence de pyruvate induit l'apoptose.

Du fait que dans l'étude Frank et coll. (Frank et al., 2008), la souris knockout n'ait présenté aucune malformation ou prédisposition au cancer en aucun de ses tissus, le rôle du transporteur dans le cancer est encore douteux.

4- SMCT1 et la thyroïde

Comme on a déjà mentionné, la fonction initialement proposée pour SMCT1 était de servir de transporteur apical d'iode chez les thyrocytes. Pour mieux comprendre l'importance de ce rôle éventuel, nous allons d'abord brièvement présenter quelques notions de base sur la physiologie de la glande thyroïde.

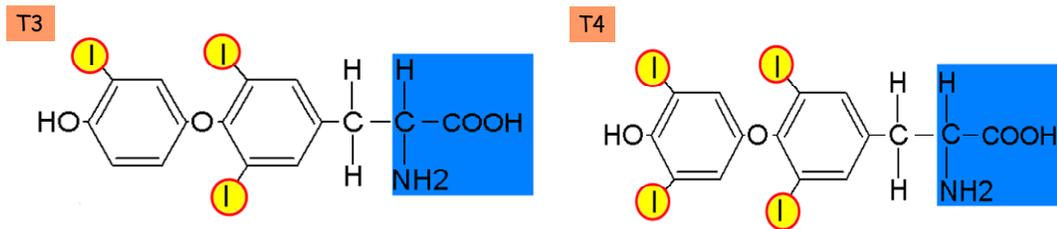


Figure 8. Structure moléculaire des hormones thyroïdiennes, triiodothyronine (T3) et la thyroxine (T4). Les deux sont formés à partir de la fusion d'une tyrosine avec le groupe benzyl d'une autre tyrosine. Un ou deux atomes d'iode (en cercles jaunes) se lient à chaque groupe benzyl.

La thyroïde est une glande endocrine située à la face antérieure du cou. Chez l'humain, elle joue un rôle clé dans le métabolisme, le développement, et la croissance grâce à l'action des hormones qu'elle produit, la triiodothyronine (T3) et la thyroxine (T4) (Boron and Boulpaep, 2003).

La figure 8 montre les structures de la T3 et la T4. Remarquons la présence des atomes d'iode qui sont liés aux anneaux de benzène. Ceci constitue un élément clé indispensable pour l'activité biologique de ces hormones et en conséquence pour leurs synthèses. Dans les endroits où il y a un manque endémique d'iode, un manque d'hormone T3 et T4 est associé à un taux élevé de crétinisme, une maladie caractérisée par un profond retard mental chez les enfants (Boron and Boulpaep, 2003). C'est la glande thyroïde qui est responsable d'accumuler l'iode dans un milieu où elle peut être correctement l'insérer dans la structure de la T3 et de la T4.

4.1- Synthèse des hormones thyroïdiennes

L'iodure existe dans la nature comme un oligo-élément. De nos jours, on l'incorpore dans le sel et dans les aliments afin de favoriser une absorption suffisante dans les intestins. Une fois dans le sang, son accumulation dans la thyroïde est faite par un système hautement spécialisé : les follicules thyroïdiens (figure 9). En effet, la thyroïde est composée de

plusieurs follicules qui sont des sacs remplis d'un milieu colloïdal et entourés par des cellules folliculaires (Boron and Boulpaep, 2003).

L'accumulation d'iode dans les cellules folliculaires se fait grâce à un transporteur secondairement actif couplé au Na^+ que l'on appelle NIS « *Na^+/I^- symporter* ». Ce dernier permet l'absorption de l'iode à travers la membrane basolatérale (Boron and Boulpaep, 2003) (figure 9.1). Une fois que l'iode est accumulé dans les cellules folliculaires, il est libéré vers la partie colloïdale par un mécanisme d'efflux qui n'est pas encore bien compris (figure 9.2). Les protéines qui ont été suggérées comme responsable de ce rôle seront discutées dans la section suivante.

Parallèlement à la sécrétion d'I⁻, les cellules folliculaires sécrètent la thyroglobuline (figure 9.3), une protéine qui forme le colloïde et représente la moitié du contenu protéique dans les follicules thyroïdiens. En effet, la thyroglobuline est la base structurale des hormones thyroïdiennes puisque, comme on peut l'observer dans le coin supérieur gauche de la figure 9, la thyroglobuline contient des résidus de tyrosine auxquels des atomes d'iode peuvent se lier (Boron and Boulpaep, 2003).

La glande thyroïde

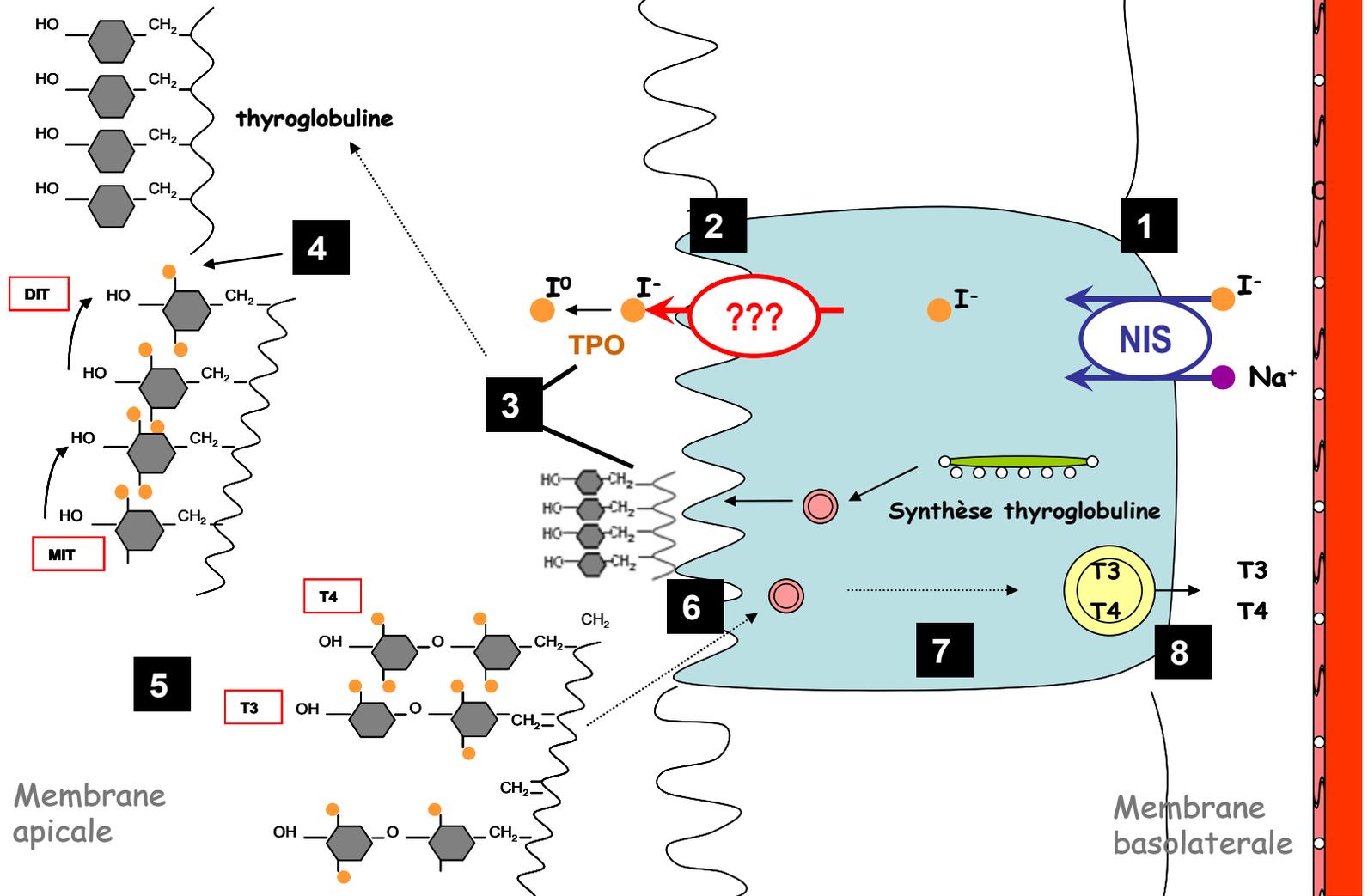
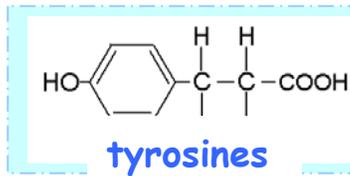


Figure 9. Illustration de la synthèse des hormones T3 et T4 dans les follicules thyroïdiens. 1) Le transporteur de Na⁺:I⁻ basolatéral, NIS, permet l'accumulation d'iode à l'intérieur des cellules folliculaires. 2) L'iode est transporté à travers la membrane apicale par une, ou plusieurs protéines membranaires (pendrine, CIC5, SMCT1). 3) Une fois que l'iode est dans la lumière de la thyroïde, il est oxydé par les TPO en présence de H₂O₂. En même temps, la thyroglobuline est relâchée vers le colloïde. 4) L'iode peut se lier aux tyrosines de la thyroglobuline formant des tyrosines mono ou di-iodées, MIT et DIT respectivement. 5) La conjugaison des MIT et DIT permet la formation de la structure de la T3 (DIT+MIT) et la T4 (DIT+DIT). Pourtant, elles sont encore attachées à la thyroglobuline. 6) La thyroglobuline est endocytée. 7) La vésicule contenant la thyroglobuline fusionne avec lysosomes et la thyroglobuline est clivée, détachant ainsi la structure de la T3 et la T4. 8) La T3 et la T4 sont relâchés à la circulation sanguine.

La liaison d'iode aux résidus de tyrosine spécifiques de la thyroglobuline est possible grâce à l'oxydation de I^{-1} effectuée, en présence de peroxyde d'hydrogène, par les peroxydases thyroïdiennes (TPO) qui sont des enzymes secrétées en même temps que la thyroglobuline dans l'espace colloïdal (figure 9.3). En d'autres termes, les TPO permettent la formation des mono- et di-iodotyrosines (MIT et DIT) (figure 9.4). Ensuite, un réarrangement interne, catalysé aussi par les TPO, permet aux iodo-tyrosines de se conjuguer, ce qui entraîne la formation de la structure T3 (DIT+MIT) et la T4 (DIT+DIT) (figure 9.5). Cependant, même si la structure des hormones thyroïdiennes est déjà prête, la T3 et la T4 sont encore attachées à la structure de la thyroglobuline (Boron and Boulpaep, 2003). Pour être activée, la thyroglobuline doit d'abord être endocytée par les cellules folliculaires (figure 9.6) et clivée lors de la fusion de la vésicule avec un lysosome (figure 9.7). Ainsi, les enzymes lysosomales clivent la thyroglobuline formant la T3 et la T4 qui peuvent être relâchées à la membrane basolatérale de la cellule vers le sang (figure 9.8) (Boron and Boulpaep, 2003).

Le chef d'orchestre de la synthèse et de la sécrétion des hormones thyroïdiennes est la thyrotropine, en anglais TSH (*Thyroid Stimulating Hormone*), une hormone qui est sécrétée par l'antéhypophyse. Celle-ci est régulée à la fois par une hormone relâchée par l'hypothalamus, la thyrotrope ou TRH, d'après son nom anglais *Thyrotropin-Releasing Hormone*. Comme plusieurs mécanismes endocriniens, les hormones thyroïdiennes exercent une boucle de contrôle négatif vis-à-vis des hormones qui contrôlent la synthèse et la sécrétion : la TSH et la TRH (Boron and Boulpaep, 2003). Il est clair que la synthèse des hormones thyroïdiennes représente un processus assez complexe. Le rapport avec le présent travail est que SMCT1 pourrait jouer un rôle dans le transport de l'iode à travers la membrane apicale des cellules folliculaires.

4.1.2- Le transporteur basolatéral d'iode : NIS

Comme on vient de le mentionner, l'accumulation d'iode dans le milieu colloïdal de la glande thyroïde se fait grâce à la présence de transporteurs à la membrane basolatérale et apicale des cellules folliculaires.

De nos jours, on comprend bien le mécanisme pour le transport basolatéral. En effet, le fait que les cellules folliculaires puissent concentrer l'I⁻ d'un facteur 20-40 à l'égard de sa concentration plasmatique est connu depuis 1915 (Marine D and Feiss HO,). Pourtant, l'identification moléculaire du transporteur basolatéral de Na⁺/I⁻ (NIS) a eu lieu seulement en 1996, grâce à son clonage par la technique d'expression fonctionnelle sur des ovocytes de *Xenopus* par le groupe de Nancy Carrasco (Dai et al., 1996). En raison de son importance physiologique, plusieurs études ont suivi l'identification de ce transporteur qui appartient à la famille *SLC5*. Des enregistrements électrophysiologiques avec la technique de voltage-imposé à deux microélectrodes ont permis d'établir que NIS est un transporteur d'iode électrogénique dépendant du Na⁺. Sa stoechiométrie, obtenue à partir de mesures simultanées de flux et de courant, correspond au transport de 2 cations Na⁺ pour un anion I⁻. En plus de l'iode, NIS peut transporter d'autres substrats anioniques tels que le ClO³⁻, le SCN⁻, le SeCN⁻, le NO³⁻, et le Br⁻. Son inhibiteur spécifique est le perchlorate (Dohan et al., 2007; Tran et al., 2008; Bizhanova and Kopp, 2009).

Le gène codant pour NIS est localisé sur le chromosome 19p12-13.2 et comprend 14 introns et 15 exons (Smanik et al., 1997). Par rapport à sa structure topologique, le modèle actuel suggère la présence de 13 segments transmembranaires. L'extrémité amino terminale fait face au milieu extracellulaire, tandis que l'extrémité carboxy terminale fait face au cytoplasme (Dohan et al., 2003). La protéine a un poids de 87 kDa et présente trois sites potentiels de glycosylation.

D'autre part, deux facteurs peuvent agir sur l'expression de NIS et donc affecter le transport d'iode à la thyroïde. Le premier est la TSH qui augmente l'expression de NIS et donc favorise le transport d'iode à travers les cellules folliculaires (Levy et al., 1997). Le deuxième facteur est la concentration d'I⁻. En effet, une augmentation de la concentration plasmatique d'I⁻ provoque l'effet contraire en diminuant l'expression de NIS et donc le transport (Eng et al., 2001).

Évidemment, l'importance de NIS est soulignée dans les maladies thyroïdiennes. Des mutations spontanées de NIS causent des défauts congénitaux dans le transport d'iode, ou ITD « iodide transport defect ». ITD est une condition autosomale récessive qui est associée à l'hypothyroïdisme et au goitre (De, V et al., 2000).

L'étude de NIS n'a pas seulement permis de comprendre son rôle physiopathologique à la thyroïde. Son inhibiteur, le perchlorate, est utilisé dans la thérapie pour l'hyperthyroïdisme, ainsi que dans la détection des défauts dans l'organification de l'iode (BASCHIERI et al., 1963). D'autre part, l'introduction du transporteur dans des tissus cancéreux a été utilisée comme une stratégie pour induire la destruction de ces tissus par accumulation d'¹³¹I. Cette approche de thérapie génique semble en effet très prometteuse.

Si l'on est bien convaincu de l'importance du transport d'iode basolatéral effectué par NIS, l'identité du transporteur apical reste controversée. De nos jours, trois candidats ont été considérés : la pendrine, le canal chlore CLC5, et SMCT1.

4.1.3) La controverse du transporteur apical : la pendrine, SMCT1 ou CLC5?

Évidences de l'existence d'un transporteur apical

Comme on vient de discuter, NIS est nécessaire pour l'accumulation d'iode à l'intérieur des cellules folliculaires. Pourtant, pour synthétiser des hormones thyroïdiennes l'iode doit se rendre dans la lumière folliculaire.

Pendant des années, il a été largement admis que l'iode pouvait traverser la membrane apicale grâce au gradient électrochimique qui existe entre le cytosol et la lumière folliculaire (Wolff, 2005). Néanmoins, en 1967, des études autoradiographiques par Andros et coll. (Andros and Wollman, 1967) ont montré que l'iode s'accumule dans le cytosol de la cellule folliculaire avant de rentrer au colloïde, suggérant donc un mécanisme pour son transport apical.

À cet égard, Nilsson et ses collègues ont étudié l'efflux d'iode en utilisant comme modèle des monocouches polarisées provenant de cultures primaires de thyrocytes porcins. En

chargeant initialement les cellules d'iode, grâce au transport basolatéral, ils ont observé un efflux d'iode à la membrane apicale insensible au perchlorate. Du fait que ce phénomène puisse être accéléré par la TSH (Nilsson et al., 1990) et ralenti par le facteur de croissance épidermique (EGF) (Nilsson et al., 1992), l'idée de l'existence d'un transporteur ou d'un canal apical spécifique est née aux débuts des années 90.

En 1992, Goldstein et coll. (Goldstein et al., 1992) ont réalisé une étude sur des vésicules membranaires thyroïdiennes où ils suggéraient l'existence de deux systèmes de transport d'iode apicaux. Le premier présente une haute perméabilité et affinité pour iode ($K_m \sim 70 \mu\text{M}$) par rapport au deuxième mécanisme qui était beaucoup moins affin ($K_m \sim 33 \text{ mM}$). Cependant, pour l'instant, l'identité des protéines responsables de ces deux modes de transport d'iode n'a pas encore été révélée de façon convaincante du point de vue moléculaire. Une première étude à ce sujet a suggéré que la protéine issue du gène *SLC26A4*, la pendrine, pourrait jouer le rôle de transporteur d'iode apical.

A) La pendrine et le syndrome de Pendred

Le syndrome de Pendred est une maladie autosomale récessive qui se caractérise par la surdité, le goitre, des défauts partiels dans l'organification d'iode et l'hypothyroïdisme. Cependant, la surdité est le signe clinique le plus important de la maladie (Kopp et al., 2008).

En effet, les déficiences thyroïdiennes telles que des défauts dans l'organification d'iode et le développement de goitre sont extrêmement variables (Kopp et al., 2008). Si Vaughan Pendred (Kopp et al., 2008) a décrit ce syndrome en 1896, ce n'est qu'en 1997 que Everett et coll. (Everett et al., 1997) identifièrent un gène lié à la maladie. En effet en utilisant une stratégie de clonage positionnel, ils ont démontré que des patients atteints du syndrome avaient des mutations sur le gène *SLC26A4*, un membre de la famille des transporteurs anioniques *SLC26A* dont la fonction était inconnue à l'époque. Tout ce qu'on savait alors concernant la fonction de la protéine était qu'elle avait une forte ressemblance avec les transporteurs de sulfate (Everett et al., 1997). Des études postérieures proposèrent de

multiples fonctions de cette protéine dans l'oreille interne (Everett et al., 2001), le rein (Royaux et al., 2001) et la thyroïde (Royaux et al., 2000).

Dans l'oreille interne, la pendrine agit comme un échangeur $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$. Ainsi, en gardant la composition ionique de l'endolymphe, la pendrine permet le bon fonctionnement des cellules sensorielles (Everett et al., 1999; Wangemann et al., 2009).

Dans le Syndrome de Pendred, où la pendrine est dysfonctionnelle, la dérégulation de la composition ionique favorise une augmentation progressive du volume de l'endolymphe. Ceci résulte en un élargissement du labyrinthe membraneux et des structures osseuses voisines qui conduisent à une dégénérescence des cellules sensorielles de l'oreille interne. Tout cela se traduit par une sévère perte auditive neurosensorielle (Everett et al., 2001).

Dans le rein, la pendrine s'exprime dans les cellules intercalaires du tubule collecteur. Puisqu'elle agit aussi comme un échangeur de chlore/bicarbonate, il a été proposé qu'elle soit aussi un régulateur important dans l'équilibre acido-basique. En effet, la pendrine pourrait contribuer à la régulation de la pression et du pH sanguin grâce à sa participation dans l'excrétion rénale de Cl^- . Pourtant, aucune étude n'a montré une association des troubles de la fonction rénale avec la dysfonctionnalité de cette protéine (Royaux et al., 2001).

Finalement, comme il a déjà été mentionné, la pendrine pourrait agir comme un transporteur d'iode apical dans la thyroïde.

Rôle de la pendrine dans la thyroïde

Comme on l'a discuté antérieurement, des patients atteints du syndrome de Pendred peuvent présenter des défauts dans l'organification d'iode et même de l'hypothyroïdisme (Kopp et al., 2008). Puisque tout ce qu'on savait par rapport à la pendrine se résumait à sa ressemblance avec les transporteurs de sulfate, il a été proposé qu'elle pouvait avoir un rôle dans la sulfatation de la thyroglobuline, le précurseur des hormones thyroïdiennes (Everett et al., 1997).

Scott et coll. (Scott et al., 1999) réaliseront la première étude à propos de ce rôle hypothétique. Pourtant, contrairement aux attentes, ils n'observent aucun transport de sulfate chez les ovocytes ou les cellules Sf9 exprimant la protéine. Par contre, le transport d'autres anions tels que le Cl^- et l' I^- est clairement mis en évidence. En effet, Scott et coll. ont observé que la pendrine peut agir comme un transporteur de chlore et d'iode, indépendant du Na^+ . Un an plus tard, deux groupes de recherche démontreront son expression à la membrane apicale des thyrocytes (Royaux et al., 2000; Bidart et al., 2000).

Ainsi, comme le syndrome de Pendred se caractérise par des défauts dans l'organification d'iode, il a été présumé que la pendrine était importante pour le transport d'iode dans la glande thyroïde. C'est ainsi que l'hypothèse qui propose que la pendrine soit le transporteur apical d'iode dans la glande thyroïde est née.

Par la suite, plusieurs groupes de recherche utiliseront des cellules de mammifère pour confirmer le rôle de la pendrine comme transporteur d'iode. En utilisant des cellules non polarisées CHO, transfectées seulement avec NIS, ou doublement transfectées (NIS + pendrine) Yoshida et coll. (Yoshida et al., 2002) ont observé un efflux d'iode plus important chez les cellules contenant la pendrine.

Plus tard, appuyant ces résultats, le même groupe publiera une étude électrophysiologique sur cellules COS-7 transfectées avec la pendrine. Dans cette étude, ils suggèrent que la pendrine pourrait agir comme un échangeur de chlore-iode. En effet, les cellules transfectées avec la pendrine présentent des courants entrants d'iode (sortie des anions) en présence d'iode et de chlore. Ces courants augmentent en fonction de la concentration de Cl^- (Yoshida et al., 2004).

De plus, pour imiter plus précisément la situation de la pendrine dans la cellule folliculaire, des études sur des systèmes polarisés ont aussi été réalisées. En utilisant des membranes semi-perméables sur des dispositifs bicaméraux, Guillam et coll. (Gillam et al., 2004) ont étudié le transport d'iode chez des cellules MDCK non transfectées, transfectées avec NIS,

ou transfectées avec NIS et la pendrine. Comme prévu, lors de l'exposition d'iode radioactif à la membrane basolatérale, des cellules transfectées avec NIS ont présenté une accumulation d'iode intracellulaire à la différence des cellules non-transfectées. Quand des cellules transfectées avec NIS et la pendrine sont mises dans la même situation, celles-ci présentent une accumulation d'iode apicale, et une diminution de l'iode intracellulaire (Gillam et al., 2004) indiquant la présence d'un transport trans-épithélial.

De plus, ce même groupe a testé la captation d'iode sur des cellules cotransfectées avec NIS et un des deux mutants de la pendrine survenant naturellement : le L6776Q et le FS306>309X. À différence des cellules cotransfectées avec la pendrine WT, les deux mutants perdent la capacité de promouvoir l'efflux apical (Gillam et al., 2004).

Ainsi, tous ces résultats, ajoutés aux défauts dans l'organification d'iode chez des patients présentant le syndrome de Pendred, sont concordants avec l'idée que la pendrine pourrait jouer un rôle à la thyroïde en facilitant le transport vectoriel d'iode. Cependant, cette notion a été remise en question à plusieurs reprises.

Questions concernant le rôle de la pendrine en tant que transporteur d'iode apical

Plusieurs observations rendent l'hypothèse de la pendrine comme transporteur apical difficile à soutenir.

En 2001 Everett et coll. (Everett et al., 2001) ont généré une souris knockout pour le gène de la pendrine. Comme attendu, le signe le plus caractéristique de la maladie, la surdité, était présent chez les souris PDS^{-/-}. Pourtant, même si les résultats de cette étude démontrent l'importance de la pendrine sur le développement de l'oreille interne, aucune preuve de sa fonction à la thyroïde n'a été montrée. En effet, les souris PDS^{-/-} ne montrent aucune différence histologique avec les souris WT. En outre, aucun signe d'hypothyroïdisme n'a été observé pendant les 2 premières années de vie (Everett et al., 2001).

Comme on a mentionné plus haut, la surdité est le phénotype par excellence du Syndrome de Pendred. En effet, des mutations bi alléliques sur la pendrine peuvent ou non occasionner le phénotype thyroïdien (Bizhanova and Kopp, 2009). S'il a été affirmé que ces variations peuvent être dues aux différences dans la prise d'iode, ceci n'a pas été encore démontré. Si cela était vrai, le goitre ou l'hypothyroïdisme chez les patients avec PS devrait être plus fréquent dans des endroits où il y a un manque d'iode (Wolff, 2005).

Aussi il est curieux que la même protéine ait des fonctions différentes dans la thyroïde, le rein et l'oreille interne (Wolff, 2005). Si cette hypothèse était respectée, les patients avec PS devraient aussi avoir des dysfonctions rénales relatives à l'absorption des anions (Wolff, 2005), ce qui n'a pas été observé.

En outre, si la fonction de la pendrine dans la thyroïde est bel et bien le transport d'iode, elle ne doit pas être la seule protéine à réaliser cette fonction. En effet, pour expliquer la variabilité des anions reconnus par la pendrine, il a été proposé que celle-ci puisse faire partie d'un complexe multiprotéique dont la composition peut varier dépendamment du type cellulaire. Mais quelles seront les autres composantes? L'implication de deux autres protéines a été suggérée : SMCT1 et CLC5 (Rodriguez et al., 2002; van den Hove et al., 2006).

B) Le canal CLC-5

En 2006, Van den Hove et coll. (van den Hove et al., 2006) ont proposé que le canal de chlore dépendant du voltage CLC-5 puisse agir comme un des médiateurs impliqués dans le transport apical d'iode dans la glande thyroïde.

À vrai dire, ce canal était plutôt connu pour son rôle au tubule proximal du rein. En effet, des mutations affectant le gène du CLC-5 entraînent une protéinurie et une calciurie chez des patients qui ont la maladie de Dent's (lithiase rénale familiale liée au chromosome X) (Devuyst et al., 1999; Wang et al., 2000). De façon intéressante, il a été démontré que la

perte de CLC-5 entraîne une protéinurie qui est due à un défaut dans le processus d'endocytose des protéines de faible poids moléculaire au niveau du tubule proximal (Wang et al., 2000). Si ce processus est réalisé par des récepteurs « multiligands » tels que la mégaline et la cubiline, des anomalies dans la fonction du CLC-5 pourraient affecter l'acidification endosomale et donc le trafic vésiculaire de ces récepteurs (Christensen et al., 2003). En effet, on pense que le CLC-5 procure la conductance anionique nécessaire au bon fonctionnement de la pompe électrogénique H^+ -ATPase vacuolaire (Gunther et al., 1998).

Mais quelle est la relation entre ce canal de chlore et la thyroïde? Rappelons-nous qu'un pas critique dans la sécrétion des hormones thyroïdiennes est l'endocytose de la prohormone thyroglobuline iodée au niveau de la membrane apicale des cellules folliculaires (figure 9.6). Si l'identité du récepteur qui est impliqué dans cette endocytose semble controversée, la mégaline semble être un candidat réaliste (Marino et al., 2001).

Au contraire des attentes, le canal CLC-5 n'a aucun rôle dans l'endocytose de la thyroglobuline. Aussi, contrairement à ce qui est observé au tubule proximal, la perte de CLC-5 ne diminue pas l'endocytose de thyroglobuline médiée par la mégaline. Au contraire, le taux de transfert de la thyroglobuline iode vers les lysosomes est accéléré. En plus, aucune altération dans les niveaux de T4 circulants n'a été observée.

Cependant, de façon inattendue, l'inactivation de CLC-5 chez la souris knockout, conduit à un goitre euthyroïdien causé par des délais dans l'organification d'iode. En plus, ces souris présentent une diminution de l'expression de la pendrine, reflétant un phénotype très similaire au syndrome de Pendred (van den Hove et al., 2006).

Quel est donc le rôle de CLC-5 à la membrane apicale des thyrocytes? Trois suggestions ont été proposées à partir des observations antérieures.

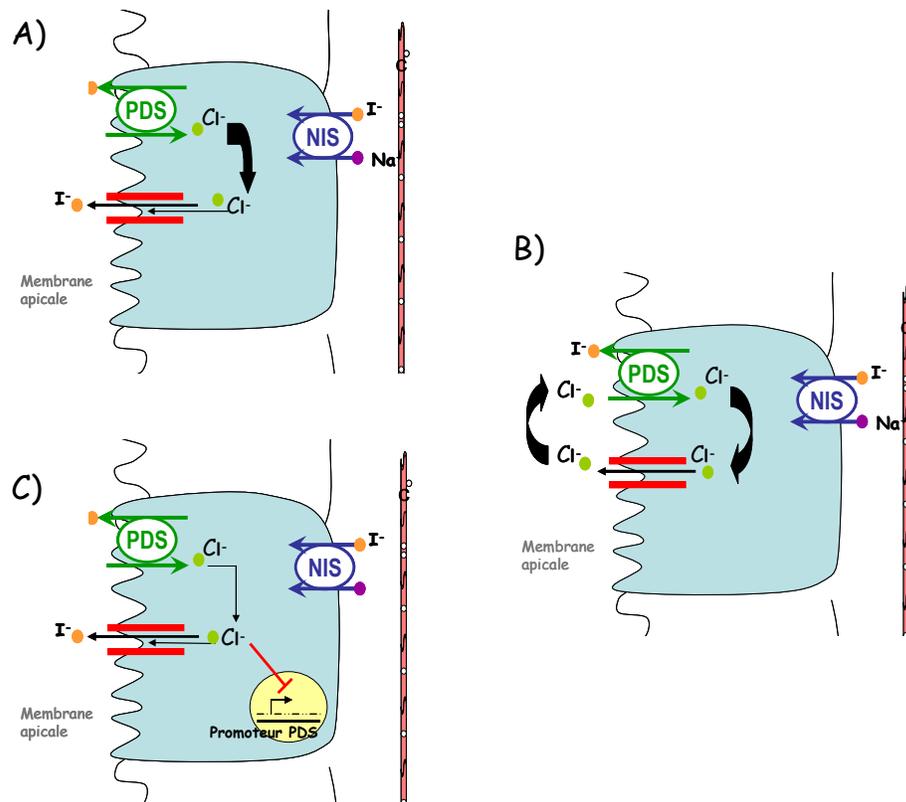


Figure 10. Modèles de la fonction à la thyroïde de CIC5 et son interaction avec la pendrine. A) CIC5 agit comme un transporteur d'iode à la thyroïde, même si il est plus affiné au Cl⁻. Son activité est indépendante de celle de PDS. B) CIC5 agit comme un canal Cl⁻ appuyant l'activité de PDS (échangeur Cl⁻/I⁻). C) CIC5 régule de façon indirecte l'expression de PDS.

Le premier modèle propose que CLC-5 fonctionne comme un canal apical d'iode indépendant de la pendrine. En effet, le profil de conductance du canal porcin orthologue pCLC-5, nitrate \gg Cl⁻ \approx Br⁻ $>$ I⁻ $>$ acétate $>$ gluconate, nous suggère que ceci est possible (Dowland et al., 2000). Bien que ce canal présente une affinité plus haute pour le chlore que pour l'iode, la concentration d'iode à l'intérieur des thyrocytes permettrait à ce canal de transporter ce dernier (van den Hove et al., 2006) (figure 10A).

Contrairement au premier modèle, le deuxième propose que le transport de chlore effectué par CLC-5 est couplé au transport d'iode réalisé par la pendrine. En effet, le transport de chlore par CLC-5 serait nécessaire pour soutenir l'échange de chlore/iode réalisé par la pendrine (van den Hove et al., 2006) (figure 10B).

Finalement, le troisième modèle suggère que le canal CLC-5 régule de façon indirecte l'expression de la pendrine (van den Hove et al., 2006) (figure 10C). L'hypothèse liée à ce modèle est basée sur les observations de la régulation de la pendrine chez les cellules rénales. En effet, des variations dans l'équilibre du chlore entraînent des changements dans son expression. Une augmentation de la concentration de chlore diminue l'expression de la pendrine, tandis que la déplétion de cet anion entraîne sa surexpression (Quentin et al., 2004). Puisque la concentration de chlore est plus faible au colloïde thyroïdien que dans l'urine, (97 mM vs 143 mM) (Hayden et al., 1970; Waugh, 1974) la régulation de l'expression de la pendrine pourrait être plus sensible aux changements de la concentration de chlore aux thyrocytes (van den Hove et al., 2006).

Ainsi, si ces trois modèles semblent intéressants, personne n'a réalisé d'études définitives à ce propos. Comment est-ce que l'iode est donc transporté? Est-ce que le transport est effectué par une simple protéine ou par un complexe multiprotéique? (Wolff, 2005). Dans ce contexte, SMCT1 constitue une troisième possibilité.

C) Données concernant le possible transport d'iode par SMCT1

Identification initiale de SMCT1 comme transporteur d'iode

Aujourd'hui, on sait que le gène *SLC5a8* code pour le transporteur de Na⁺ monocarboxylates SMCT1. Cependant, comme on l'a déjà mentionné, SMCT1 a été initialement cloné par Rodriguez et coll. (Rodriguez et al., 2002) dans une tentative pour identifier un transporteur d'iode apical qui serait structurellement similaire au NIS (*SLC5A5*) basolatéral.

En utilisant une stratégie par RT-PCR basée sur une homologie de séquence, on a trouvé, dans une librairie de rein, un gène présentant 46% d'homologie avec NIS : il s'agissait du *SLC5a8* (Rodriguez et al., 2002). Ainsi, pour identifier si à l'égal que NIS, SMCT1 pouvait transporter de l'iode, il a été transfecté de façon transitoire dans des cellules COS-7 et on a testé sa capacité de transport de l'¹²⁵I.

À la différence des cellules transfectées avec NIS, celles transfectées avec SMCT1, n'ont pas montré une capacité à accumuler l'iode. Pourtant, quand les deux protéines étaient cotransfectées, une diminution dans la quantité d'iode accumulée par NIS fut observée (Rodriguez et al., 2002). Ceci a été interprété comme signifiant que SMCT1 pouvait procurer une voie de sortie pour l'iode qui avait été cotransporté par NIS. Pour mieux caractériser la fonction de cette protéine, on a créé une lignée stable CHO-SMCT1. À la différence des cellules COS-7-SMCT1, les cellules CHO-SMCT1 ont démontré une perméabilité accrue à l'iode. Curieusement, ce transport était sensible au perchlorate, l'inhibiteur de NIS (Rodriguez et al., 2002).

Ainsi, à partir de ces deux observations il a été conclu que SMCT1 pouvait gérer le transport passif d'iode. Les différences dans le transport d'iode chez les deux types cellulaires, pourrait s'expliquer, selon Rodriguez, par le faible rendement de transfection chez les cellules COS-7. Puisqu'ils ont montré aussi que SMCT1 était fortement exprimé à la membrane apicale des thyrocytes, ils ont suggéré que, comme la pendrine, cette protéine pourrait agir comme un des systèmes de transport d'iode à la membrane apicale des cellules folliculaires thyroïdiennes. En effet, ils ont nommé hAIT (*human Apical Iodide Transporter*) le transporteur que nous connaissons maintenant sous le nom de SMCT1 (Rodriguez et al., 2002).

Mais comment est-ce que la même protéine a pu être identifiée comme un transporteur de monocarboxylates couplé au Na^+ ? En effet, peu après l'étude réalisée par Rodriguez et coll., Li et coll. ont montré de façon complètement indépendante que l'inactivation par méthylation de *SLC5A8* était un événement très précoce dans la transformation des cellules cancéreuses du côlon (Li et al., 2003). Le produit du gène *SLC5A8* qui était inactif dans les cellules du côlon mais aussi dans le cas des cancers de la thyroïde (Xing, 2007; Porra et al., 2005; Lacroix et al., 2004), de l'estomac (Ueno et al., 2004), du cerveau (Hong et al., 2004), du sein (Thangaraju et al., 2006b), du pancréas (Park et al., 2008), du rein, de la prostate (Park et al., 2007) et de la peau (Bennett et al., 2008) a été traité comme un suppresseur de tumeur. La fonction de transport du *SLC5A8* est restée inconnue jusqu'en 2004. En nous

basant sur l'arbre phylogénique de la famille des *SLC5*, nous avons la conviction que le substrat transporté par cette protéine membranaire était un anion organique. Après avoir testé quelques substrats divers, Michael Coady dans notre laboratoire a découvert que *SLC5A8* exprimé dans les ovocytes de *Xenopus laevis* transportait avidement le lactate et le propionate (Coady et al., 2004). Au même moment, une étude du laboratoire de Ganapathy publiait un court article qui concluait que *SLC5A8* était bel et bien un cotransporteur Na^+ -acide monocarboxylique de courte chaîne (Miyachi et al., 2004).

Analyse de la souris SMCT1^{-/-}

En 2008, Frank et coll. (Frank et al., 2008) apportaient une contribution significative dans la compréhension du rôle physiologique de SMCT1 en publiant leurs observations sur le phénotype de la souris knockout SMCT1^{-/-}. Avec des études histochimiques, ils ont démontré qu'il n'y a aucune différence en taille et en morphologie entre les souris WT et knockout sur des souris âgées jusqu'à deux ans. De plus, ils n'ont pas trouvé de différences dans la concentration périphérique de T4 et de la TSH. Pour analyser un possible défaut dans l'organification d'iode dans la thyroïde, ils ont mesuré l'incorporation d'iode radioactif dans les hormones thyroïdiennes. Encore là, ils n'ont détecté aucune différence. Cependant, pour faire une analyse plus profonde, ils ont même généré une souris déficiente en pendrine et SMCT1. De la même manière que les souris SMCT1 déficientes, les souris SMCT1-pendrine déficientes n'ont présenté aucune dysfonction thyroïdienne en suggérant qu'aucune de ces deux protéines n'est essentielle pour la fonction de la thyroïde (Frank et al., 2008).

Pourquoi donc est-ce nous sommes intéressés au transport d'iode effectué par SMCT1? S'il est clair que SMCT1 n'est pas le seul transporteur d'iode à la thyroïde, et que sa fonction n'est pas cruciale dans la physiologie thyroïdienne, il existe plusieurs observations qui nous suggèrent que cette protéine pourrait participer à ce processus complexe.

II- DONNÉES PRÉLIMINAIRES

Observations suggérant une implication de SMCT1 dans le transport apical d'iode par la thyroïde

1.- Les courants de fuite anioniques

Outre les observations par Rodriguez et coll. (Rodriguez et al., 2002), le seul travail qui ait révélé une relation entre les anions et SMCT1 est une caractérisation qui a été faite dans notre laboratoire concernant les courants de fuite de SMCT1. En effet, quand on a caractérisé SMCT1 comme un transporteur de Na^+ monocarboxylates, nous avons observé la présence d'un courant sensible à l'ibuprofène en absence d'acides monocarboxyliques. Ce courant diminuait d'amplitude aux voltages positifs lorsque le Cl^- était remplacé par le MES. Dans le cas de SMCT1, il a été noté que le MES est un anion de remplacement approprié pour le Cl^- tandis que l'acide aspartique est transporté par SMCT1 et que le cyclamate s'est avéré être un inhibiteur de ce cotransporteur. Ainsi, on a pu mettre en évidence la présence de courant anioniques, sensibles à l'ibuprofène en absence de monocarboxylates (Coady et al., 2010).

Bien que ce type de transport ait d'abord été considéré comme le produit d'un mécanisme de couplage imparfait, on se demande maintenant si ces courants n'auraient pas un rôle physiologique à jouer. En effet, de plus en plus on entend parler de transporteurs qui présentent des courants de fuite. Par exemple, GAT1 et GAT3, des transporteurs du neurotransmetteur GABA, présentent des courants de fuite de lithium (Grossman and Nelson, 2003). Une fuite de protons a été aussi observée chez le transporteur de sérotonine rSERT (Mager et al., 1994), ainsi que chez celui de la dopamine (Sonders et al., 1997). En plus, plusieurs membres de la superfamille *SLC* sont caractérisés par des courants de fuites significatifs. Des courants de fuite de Na^+ (ou, plus précisément aux cations) ont été observés chez le transporteur de Na^+ /glucose (Umbach et al., 1990), les transporteurs de

Na⁺/phosphates (Forster et al., 1998), le transporteur de Na⁺/myoinositol (Coady et al., 2002) et même le transporteur de Na⁺/iode (Eskandari et al., 1997).

Donc par rapport à SMCT, quelle est l'importance de l'existence de ces courants de fuite anioniques? À vrai dire, le rôle physiologique de ce phénomène est encore inconnu, même si Coady et coll. (Coady et al., 2010) ont récemment fait des observations intéressantes à ce sujet.

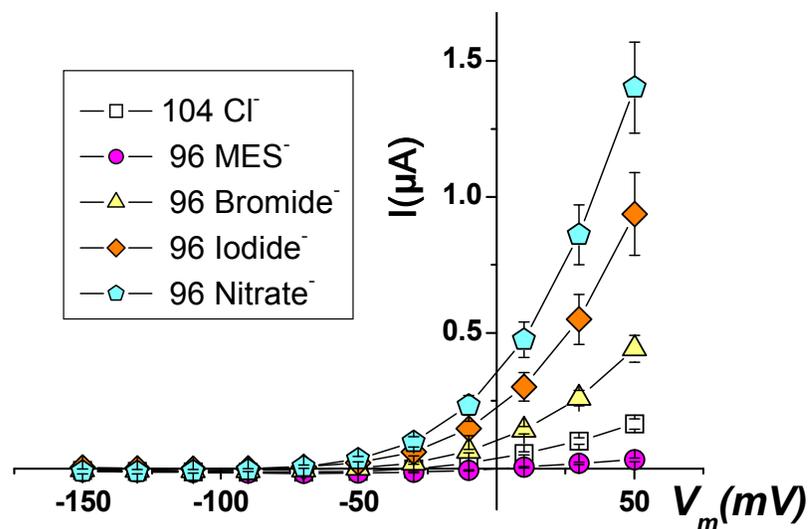


Figure 11. Spécificité du courant de fuite de SMCT1. Le courant de fuite a été étudié en remplaçant le Cl⁻ extracellulaire avec les anions inorganiques NO₃⁻, I⁻, Br⁻ ou MES⁻. On montre la mesure des courants sensibles à l'ibuprofène sur des ovocytes exprimant SMCT1 à différents potentiels membranaires.

Coady M. et al, 2010.

La sélectivité ionique du courant de fuite favorise nettement les plus gros anions monovalents (NO₃⁻ > I⁻ > Br⁻ > Cl⁻). Comme on peut observer à la figure 11, ces courants apparaissent pour les potentiels dépolarisants quand le nitrate, le brome et l'iode, remplacent le Cl⁻ dans la solution de perfusion. Ces courants *outward* représentent un influx d'anions (Coady et al., 2010). En fait, ces courants de fuite sont bidirectionnels.

Des ovocytes exprimant SMCT1 montrent des courants de fuite *inward* lorsque la concentration intracellulaire de grands anions est augmentée par l'injection d'une solution

concentrée de NMDG-NO₃ correspondant à une concentration intracellulaire finale de 18mM. Ces courants *inward* observés aux potentiels membranaires négatifs représentent un efflux d'anions (Coady et al., 2010). En plus il est intéressant de constater que ce courant d'efflux est inhibé par la présence de Na⁺ externe. En effet, la diminution de la concentration de Na⁺ extracellulaire augmente la grandeur des courants de leak (figure 12) (Coady et al., 2010). Ce phénomène est aussi observé sur le courant outward (figure 13).

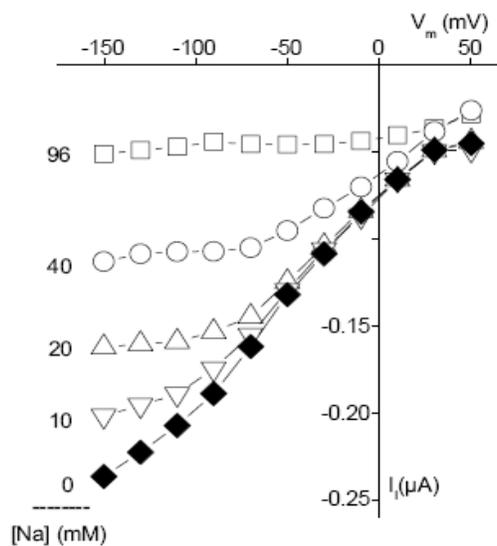


Figure 12. Effets du Na⁺ extracellulaire sur le courant de leak inward sur des ovocytes exprimant SMCT1. La concentration de Na⁺ initial de la solution de perfusion (96mM) a été diminuée en remplaçant de façon isotonique par NMDG⁺. Après l'injection de 23nl 200mM NMDGI, les courants ont été encore mesurés en utilisant les mêmes solutions de perfusion. Les données montrent la différence entre les courants mesurés avant et après l'injection de NMDGI.

Coady M. et al., 2010.

Pourquoi est-ce qu'on considère ces observations comme un signe d'un possible rôle de SMCT1 dans la glande thyroïde? Si ces observations ont été faites sur un système d'expression hétérologue, les courants de fuite observés pourraient représenter un mécanisme de transport d'iode *in vivo*. Cela serait possible, par exemple, dans le cas de tissus où la concentration extracellulaire de Na⁺ est faible et où le potentiel membranaire est légèrement dépolarisée. Ceci pourrait être le cas de la lumière du côlon et des follicules thyroïdiens.

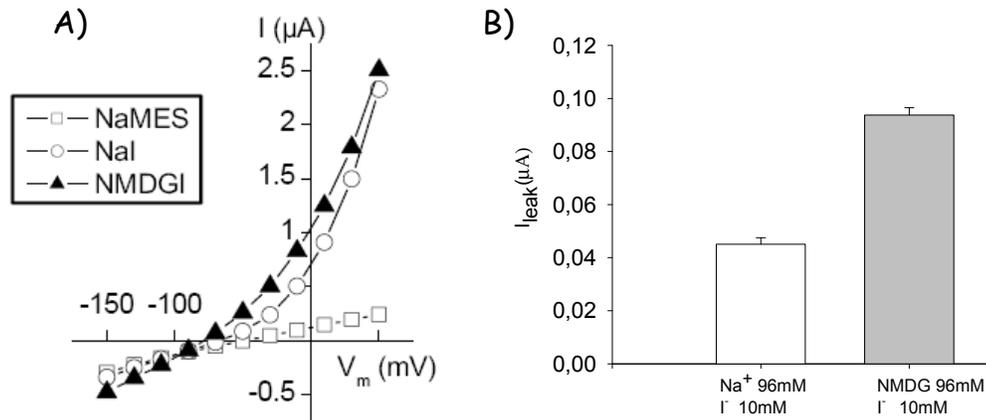


Figure 13. Effets du Na^+ extracellulaire sur le courant de leak outward sur des ovocytes exprimant SMCT1. Le remplacement de $[\text{Na}^+]_e$ par NMDG $^+$ augmente le courant de leak outward aux potentiels de membrane différents. A) Le Cl^- (96 mM) contenu à la solution de perfusion a été initialement remplacé par MES $^-$. Ceci a été à la fois remplacé par I^- . Ensuite le Na^+ a été remplacé par NMDG $^+$. La concentration d'iode dans la solution extracellulaire est de 100 mM. B) L'amplitude du courant de leak à -30 mV en présence ou absence de Na^+ . Comme il est reconnu que les courants sensibles à la présence de l'iode ne sont pas saturables, on a calculé les courants attendus pour une concentration de 10 mM d'iode dans la solution extracellulaire.

En effet, pour étudier ce phénomène de façon plus approfondie, un de nos collaborateurs, M. Nilsson, a vérifié ces prédictions dans le cas d'un modèle cellulaire plus physiologique, des cultures primaires de thyrocytes porcins.

2- Le transport d' I^{125} sur des cultures primaires de thyrocytes porcins

Comme on l'a mentionné plus haut, les chambres bicamérales sont un outil important pour analyser la polarité des systèmes de transport. En effet, en utilisant ce système, Nilsson et coll. (Nilsson, 2007) ont observé le transport d'iode radioactif du côté basolatéral vers le côté apical sur des cultures primaires de thyrocytes porcins.

Comme le montre la figure 14, un efflux d'iode sensible à l'ibuprofène, probablement attribuable au transport effectué par SMCT1, est observé dans ce système. Pourtant quand la concentration extracellulaire du Na^+ est augmentée, il n'y a pas de diminution du transport d'iode comme nous avons observé chez les ovocytes.

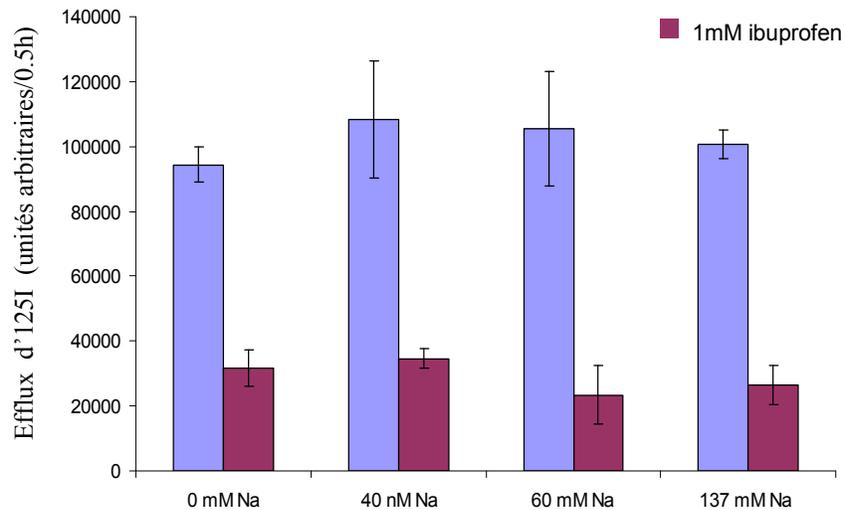


Figure 14. Mesures de l'efflux d'¹²⁵I sur des monocouches polarisées de cultures primaires de thyrocytes porcines. Les concentrations de [Na⁺] ont été diminuées en le remplaçant par NMDG. L'ibuprofène a été utilisé à une concentration de 1mM.

Nilsson M. et al. 2007.

Pourquoi y a-t-il cette différence? Le transport observé sur les cellules est plus significatif au niveau physiologique que celui dû aux courants de fuite dans un ovocyte exprimant SMCT1. Bien qu'on pourrait soutenir l'existence d'autres transporteurs d'iode tels que la pendrine ou CLC5 dans les cellules, le transport observé est sensible à l'ibuprofène. Donc, si ce transport est dû à SMCT1, pourquoi n'avait-il pas été observé avant dans les expériences d'électrophysiologie? Est-ce que le transport anionique observé dans les deux systèmes représente des mécanismes différents?

En cherchant les réponses à ces questions nous sommes venus à émettre l'hypothèse que SMCT1 pourrait avoir, en plus des courants de fuite anioniques, un mécanisme de transport électroneutre qui serait dominant, mais qui aurait échappé à nos mesures électrophysiologiques.

III- OBJECTIF GÉNÉRAL

Pour démontrer ou réfuter notre hypothèse, on a décidé d'analyser les caractéristiques du transport d'iode électroneutre sur des ovocytes exprimant SMCT1 en utilisant des mesures de transport d'iode radioactif. Ce modèle, contrairement à des cultures primaires des thyrocytes porcins, nous aide à observer de façon précise le transport effectué par SMCT1.

IV- MATÉRIELS ET MÉTHODES

Le présent travail comprend des techniques de biologie moléculaire ainsi que des essais d'expression fonctionnelle sur des ovocytes de *Xenopus laevis*. Toutes les expériences ont été effectuées en conformité avec les règlements du Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux de l'Université de Montréal.

1- Préparation des ovocytes

La grenouille a été anesthésiée avec de la tricaine (acide 3-aminobenzoïque ethyl ester) par voie cutanée à une concentration de 1,33% pendant 15 min.

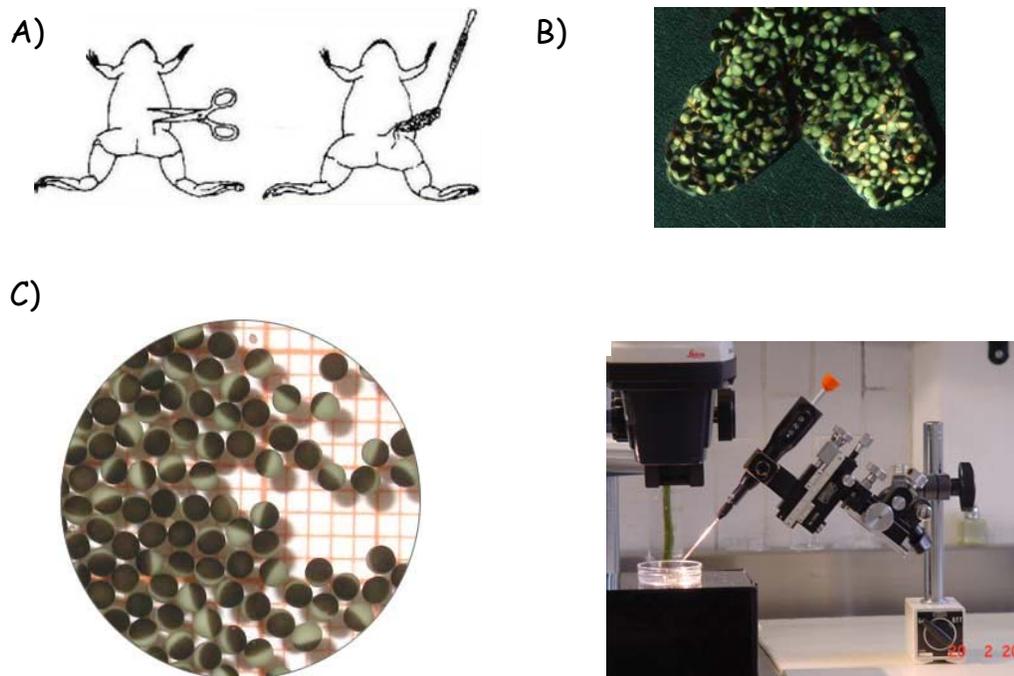


Figure 15. Illustration de la préparation et de l'injection des ovocytes. A) Chirurgie de la grenouille. B) Lobes contenant les ovocytes enlevés lors de la chirurgie. C) Ovocytes traités à la collagénase, defolliculés et triés. D) Microinjection.

Une fois la grenouille anesthésiée, les lobes contenant les ovocytes ont été enlevés par chirurgie (figure 15A, B). Par la suite, les ovocytes ont été dissociés les uns des autres et placés dans une solution saline sans calcium (200 mOsm) (102 mM NaCl, 3 mM KCl, 1

mM MgCl₂, 5 mM Hepes) où ils ont subi un traitement à la collagénase (1,75 mg/ml). Seulement les ovocytes matures, correspondant à l'étape V-VI selon la description de Dumont (Dumont, 1972), ont été sélectionnés (figure 15C). Les ovocytes sélectionnés sont ensuite maintenus à 18°C dans une solution de Barth [en mM: 90 NaCl, 3 KCl, 0,82 MgSO₄, 0,41 CaCl₂, 0,33 Ca(NO₃)₂, et 5 HEPES, pH 7,6] supplémentée avec 100 U/ml de pénicilline et 0,1 mg/ml de streptomycine.

2- Synthèse de mRNA et injection

L'ARNm de SMCT1 humain a été synthétisé à partir du vecteur pT7TS-SMCT1. Ce dernier a été linéarisé avec l'endonuclease de restriction *SalI*. La transcription *in vitro* a été faite avec de la trousse T7 mMessage mMachine d'Ambion (Woodward, TX). La qualité de l'ARNm a été vérifiée avec l'aide d'un gel d'agarose, et sa concentration a été établie par spectrophotométrie.

L'ARNm de SMCT1 a été injecté (46 nl, 0,1 µg/µl) dans les ovocytes 1 ou 2 jours après leur extraction (figure 15 D). Ils ont été utilisés pour des essais d'expression fonctionnelle trois jours après l'injection.

3- Essais d'expression fonctionnelle

L'évaluation du transport d'iode, chez les ovocytes exprimant SMCT1, a été effectuée en mesurant la captation de l'isotope radioactif ¹²⁵I (Perkin Elmer) dans le cadre du protocole suivant.

Les ovocytes (n = 6 à 10 par groupe / par expérience) ont été incubés dans une solution de transport ND96, supplémentée avec NaI (0-10 mM), en présence ou non d'ibuprofène (1mM) sur une période de 30min-1h sous agitation (0-10 mM NaI, 86-96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1,8 mM CaCl₂, 5 mM HEPES). 1.0µ Ci / ml de ¹²⁵I a été utilisé comme marqueur. Des boîtes à culture de 24 puits ont été utilisées comme contenant. Chaque groupe expérimental ou contrôle a été mis dans un puits avec 1ml de la solution de transport. Pour assurer l'agitation, la boîte a été placée sur un agitateur de laboratoire pendant toute la période de captation.

À la fin de la période de captation, chaque groupe d'ovocytes a été lavé 5 fois avec 3.5 ml de solution ND96 froide ne contenant pas d'iode radioactif. Pour y parvenir, les ovocytes ont été enlevés de la boîte de captation avec l'aide d'une pipette de transfert, et ils ont été successivement plongés dans la solution de rinçage contenue dans 5 tubes en verre distincts. Postérieurement, chaque ovocyte a été placé séparément dans des tubes Eppendorf de 1ml où le détergent SDS 10% a été ajouté afin de les dissocier complètement.

Finalement ces tubes contenant l'ovocyte lysé ont été mis à l'intérieur des tubes de scintillation qui sont adaptés au compteur de rayonnement gamma (Beckman).

4- Graphiques et analyse statistique

Les résultats des expériences d'expression fonctionnelle sont représentés, en majorité, dans des graphiques en colonnes, dont chacune correspond à la moyenne \pm erreur standard (ES), obtenue pour chaque groupe d'ovocytes (axe X). La captation de l'iode est présentée en nmol/ovocyte/hr sur l'axe des Y. Les graphiques montrés représentent des expériences typiques. Sauf indication contraire, toutes les manipulations ont été refaites de 2 à 3 fois en utilisant des donneurs d'ovocytes différents.

Les tests statistiques utilisés ont été l'analyse de variance (one-way ANOVA) avec les tests de comparaisons multiples en utilisant la correction de Bonferroni et le t-test de Student. Les astérisques représentent la signification statistique ($P < 0.05$) telle qu'indiquée dans les légendes des figures.

5- Précisions par rapport au stockage et à la manipulation de l' I'¹²⁵

L'iode 125, commercialement disponible en solution diluée dans le NaOH, est un isotope qui émet un rayonnement gamma dont la demi-vie est de 59.6 jours. Puisqu'il est très volatil, sa manipulation nécessite des techniques spéciales pour réduire la possibilité que

l'expérimentateur ne soit exposé à trop de radiation. Ainsi, les expériences ont toujours été faites dans une hotte avec une vitesse minimale de 125 pieds linéaires par minute. En outre, l'utilisation des gants est clairement requise.

Par rapport à son stockage, il est recommandé de ne pas congeler la solution contenant l' ^{125}I et d'éviter les solutions acides. En effet, il est même suggéré de prélever le produit directement à partir du contenant reçu, en utilisant des seringues et des aiguilles hypodermiques. Pourtant, dans le cadre de la présente étude, la prise directe de l'iode à partir du contenant stock n'as pas été possible. En effet, dû à des restrictions sur notre permis d'utilisation des isotopes, la manipulation maximale autorisée a été de 100 μCi . Puisque la quantité minimale vendue par les compagnies est de 1mCi, un échantillonnage hors des nos installations a été nécessaire. En effet des échantillons de 100 μCi ont été préparés en les diluants dans 100 μl d'eau pour une concentration finale de 1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$. Tel que suggéré, ces échantillons ont été stockés dans des Eppendorfs bien scellés et entreposés sous la hôte de travail.

Malheureusement, au cours de l'utilisation des nos contenants stock, on a observé une évaporation évidente qui nous a obligé à changer nos conditions d'entreposage. En effet, les dilutions de 100 μCi dans 100 μl ont été remplacées par des dilutions 100 μCi dans 1000 μl dans le but de réduire l'importance relative de l'évaporation. Si ceci nous a aidé à contourner le problème de l'évaporation, on considère que lors de la suite de cette étude il serait préférable de ne pas faire d'échantillonnages du tout.

V- RÉSULTATS

1) Caractérisation du transport d'iode par SMCT1

1.1- Les ovocytes injectés avec SMCT1 montrent une captation d'iode radioactif

Dans le but de vérifier le transport d'iode total (électroneutre et électrogénique) par SMCT1, on a réalisé des essais de captation d'iode radioactif sur des ovocytes exprimant SMCT1 et sur des ovocytes contrôle non injectés.

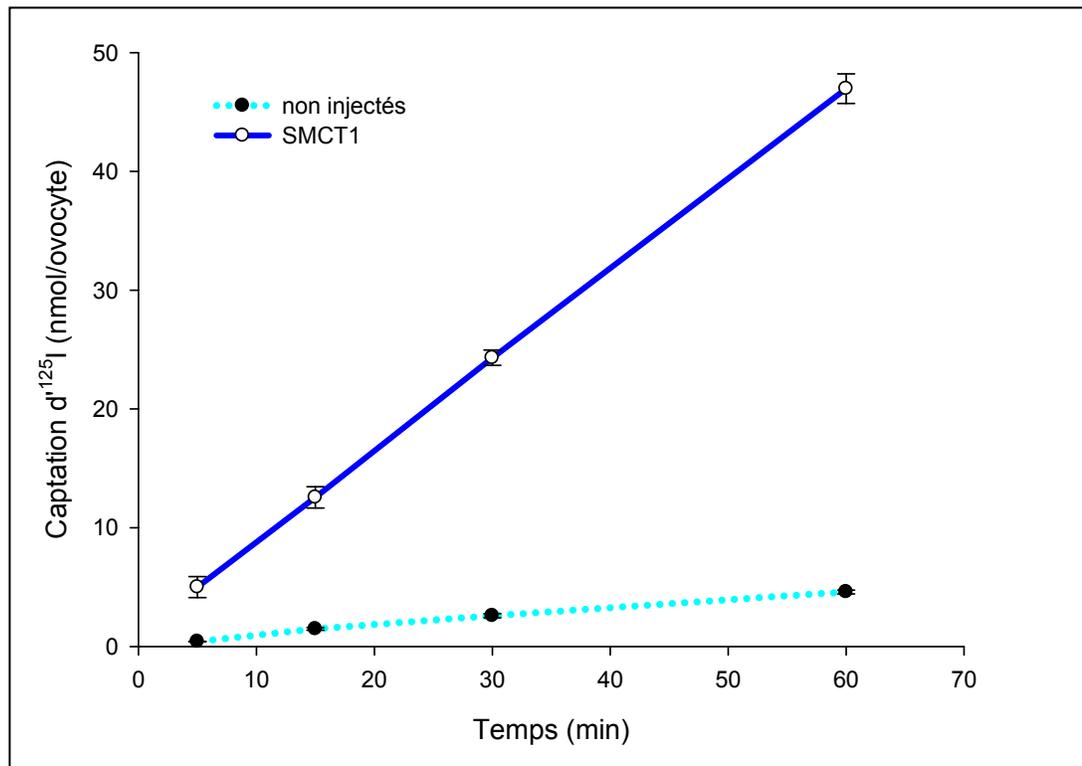


Figure 16. Détermination de la portion linéaire de la captation d'iode en fonction du temps en présence de 10mM iode. En bleu, ovocytes exprimant SMCT1, et en pointillé ovocytes témoin. Chaque point représente la moyenne de n=6 ovocytes. Expérience répétée à 3 reprises.

Le tout premier point à établir quand on veut mesurer la captation d'un substrat radioactif est la période de linéarité en fonction du temps. Nous avons donc fait des mesures de captation d'iode pour des périodes variant de 5 à 60 min. Comme on peut observer dans la figure 16 la linéarité du transport s'étend certainement au delà de la période de 1 h. Dans les expériences qui suivent, nous avons utilisé des temps de captation de 30 ou de 60 min et les données sont présentées de façon uniforme en nmol/ovocyte/heure.

Ainsi, comme on peut observer à la figure 17 dans le cas d'une expérience représentative, les ovocytes exprimant SMCT1 présentent une captation d'iode significativement plus grande que celle des ovocytes contrôle (en nmol/ovocyte/h : SMCT1=28,25 ± 1,34 VS. non injectés=5,56 ± 0,35).

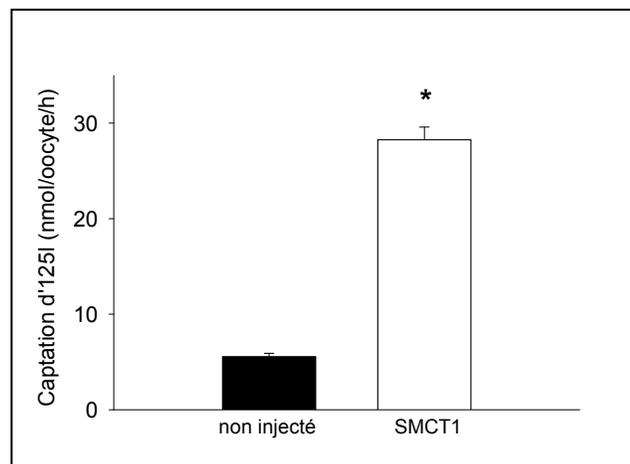


Figure 17. Captation d'¹²⁵I sur des ovocytes contrôle (barre noire) ou exprimant SMCT1 (barre blanche). La concentration d'iode dans la solution extracellulaire est de 10mM. Chaque barre représente la moyenne ± ES sur n=9. Signification statistique ($P < 0.05$). * SMCT1 vs non injectés. Expérience répétée à 4 reprises.

1.2- Le transport d'iode observé chez les ovocytes exprimant SMCT1 est sensible à l'ibuprofène.

Il est bien connu que l'ibuprofène peut interférer avec le transport des monocarboxylates effectué par SMCT1 (Coady et al., 2004; Miyauchi et al., 2004). En effet, son effet est dû à la ressemblance moléculaire qu'il partage avec les monocarboxylates, l'ibuprofène étant un dérivé de l'acide propionique.

Comme on peut observer dans la figure 18, l'ibuprofène (1mM) réduit de façon significative la captation d'iode présentée par les ovocytes exprimant SMCT1, nous confirmant la spécificité du transport. Dans le cas de cette expérience représentative, l'ibuprofène a réduit le transport d'iode effectué par des ovocytes exprimant SMCT1 de (en nmol/ovocyte/h) $17,3 \pm 1,5$ à $4,4 \pm 0,3$. En moyenne sur 4 expériences du type montré à la figure 18, l'ibuprofène a bloqué $75,6 \pm 2\%$ du transport d'iode dû à SMCT1.

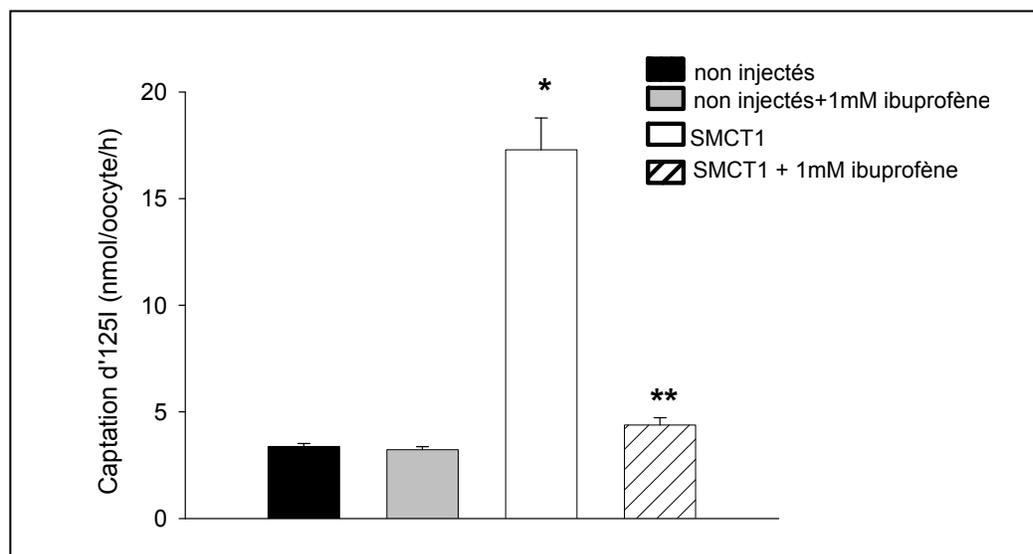


Figure 18. Captation d'¹²⁵I sur des ovocytes non injectés (barre noire), non injectés avec ibuprofène (barre grise), exprimant SMCT1 (barre blanche) et exprimant SMCT1 en présence de 1mM d'ibuprofène (barre hachurée). La concentration d'iode dans la solution extracellulaire est de 10 mM. Chaque barre représente la moyenne \pm ES sur 9 ovocytes. Signification statistique ($P < 0.05$). * SMCT1 vs non injectés, **SMCT1 vs SMCT1+1 mM ibuprofène. Expérience répété à 4 reprises.

1.3) Les ovocytes exprimant SMCT1 présentent un efflux d'iode radioactif sensible à l'ibuprofène

Dans la glande thyroïde, le transport d'iode à travers la membrane apicale se fait de la cellule vers la lumière. Pour vérifier si les ovocytes exprimant SMCT1 pourraient aussi permettre la sortie d'iode intracellulaire, on a réalisé des mesures d'efflux. Brièvement, les ovocytes ont suivi le processus de captation d'iode déjà décrit (pendant 1 heure), suivi d'une incubation dans une solution identique à la solution de captation mais sans iode. Cette incubation représente la période d'efflux. À la fin de celle-ci, l'ovocyte est mis dans un tube de scintillation et la quantité d'iode marquée restant dans l'ovocyte est mesurée. Pour vérifier que le mécanisme de transport d'iode est en effet dû à l'activité de SMCT1, des ovocytes exprimant SMCT1 ainsi que des ovocytes non injectés ont été exposés à l'ibuprofène pendant la période d'efflux.

Comme on peut observer à la figure 19, après la période d'efflux, les ovocytes exprimant SMCT1, présentent une quantité d'iode intracellulaire plus grande que celle contenue dans les ovocytes injectés à l'eau (en nmol/ovocyte : SMCT1=6,6 ± 1,3 vs non injectés=0,75±0,5. En effet, ceci est dû à l'accumulation initiale d'iode pendant la période de captation. De plus, la sortie d'iode chez les ovocytes SMCT1 est sensible à l'ibuprofène, puisque les ovocytes SMCT1 dont la solution d'efflux contenait cet inhibiteur pendant la période d'efflux ont conservé plus d'iode que les ovocytes dont le cotransporteur n'était pas inhibé (SMCT1= 6,6 ± 1,3 vs SMCT1 + 1 mM ibuprofène=22,7 ± 1,4).

Comme on l'a mentionné plus haut, le rôle physiologique de SMCT1 dans la glande thyroïde pourrait être l'efflux d'iode à travers la membrane apicale. Donc, d'un point de vue physiologique, les mesures d'efflux d'iode par SMCT1 semblent plus intéressantes que celles de captation. Pourtant, les mesures d'efflux ont un inconvénient. Puisqu'ils sont nécessairement plus longues que les mesures de captation, le risque d'évaporation de l'isotope est majeur (voir section IV- Matériels et méthodes, 5-Précisions par rapport au stockage et manipulation de l'¹²⁵I, page 63). En effet, la quantité d'iode libérée par les

ovocytes exprimant SMCT1 n'est pas quantitativement retrouvée dans la solution d'efflux à la fin de la manipulation (donnée non montrée) et ceci, même en prenant des mesures en fonction du temps d'efflux. Ainsi, car cela pourrait conduire à des imprécisions, l'analyse du transport d'iode par SMCT1 a été réalisée avec des mesures de captation.

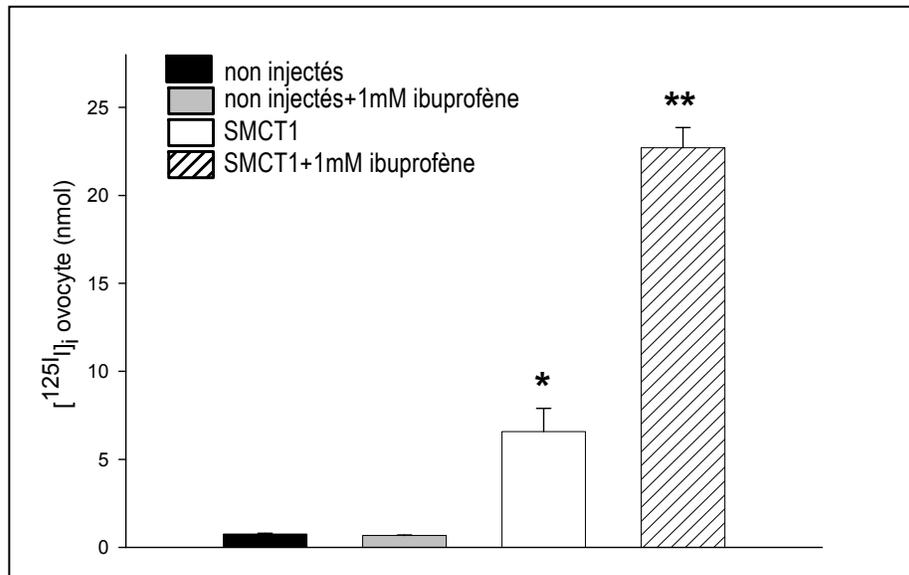


Figure 19. Quantité d'¹²⁵I restant à l'intérieur de l'ovocyte après une période d'efflux d'une heure. En noir les ovocytes non injectés, en blanc les ovocytes exprimant SCMT1. En présence de 1mM de ibuprofène, on montre en gris les ovocytes non injectés et en hachuré les ovocytes exprimant SMCT1. Chaque barre représente la moyenne ± ES sur n=10. Signification statistique ($P < 0.05$). *SMCT1 vs non injecté, **SMCT1 vs SMCT1+1mM ibuprofène. Expérience répétée à 2 reprises.

1.4) Détermination de l'affinité pour l'iode

Puisque le transport d'iode observé chez les ovocytes exprimant SMCT1 est significativement différent des ovocytes non injectés et sensible à l'ibuprofène, notre prochaine question à résoudre a été celle de l'affinité de SMCT1 pour l'iode. Pour y répondre, on a fait des essais de captation d'iode en utilisant différentes concentrations de cet anion allant de 0 à 10mM. En effet, ces concentrations couvrent la gamme du transport observé par NIS (Dai et al., 1996) et la pendrine (Yoshida et al., 2002) ainsi que d'autres protéines qui transportent l'iode (Nilsson et al., 1992; Golstein et al., 1995; Yoshida et al., 1997) mais qui n'ont pas encore été identifiées au niveau moléculaire.

De façon totalement inattendue, on a été incapable de saturer le transporteur. Comme on peut observer dans la figure 20, le transport d'iode est parfaitement linéaire de 0 jusqu'au 10 mM.

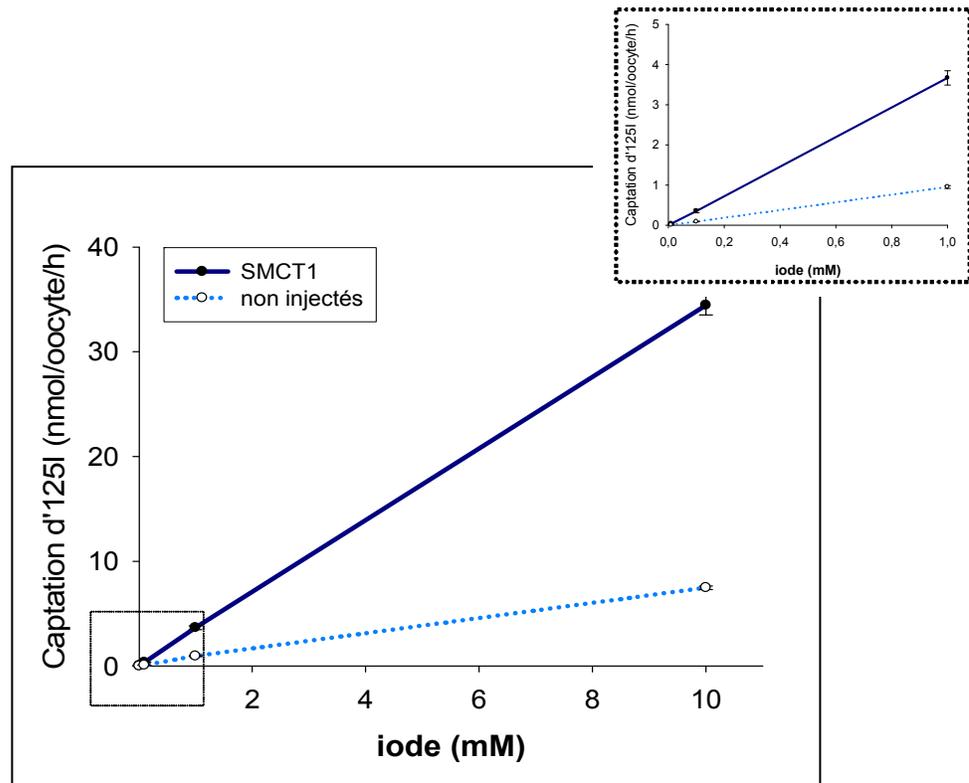


Figure 20. Captation d'¹²⁵I avec des concentrations allant de 0-10mM d'iode. Le transport effectué par les ovocytes non injectés est représenté par la ligne en pointillé, tandis que ce des ovocytes exprimant SMCT1 est représenté par la ligne bleu foncé. n=9-10. Expérience répétée à 3 reprises. En médaillon : le transport observé en présence de 0-1 mM d'iode.

Comme l'étude de Golstein et coll. (Golstein et al., 1992) suggère la présence dans la glande thyroïde de deux systèmes de transport d'iode non encore identifiés, dont un présente une affinité faible ($K_m \sim 33$ mM), on a décidé d'élargir notre domaine de concentrations. Ainsi, le transport d'iode sur des ovocytes exprimant SMCT1 a été testé en concentrations allant jusqu'au 100mM. Pourtant, la même linéarité a été observée (figure21).

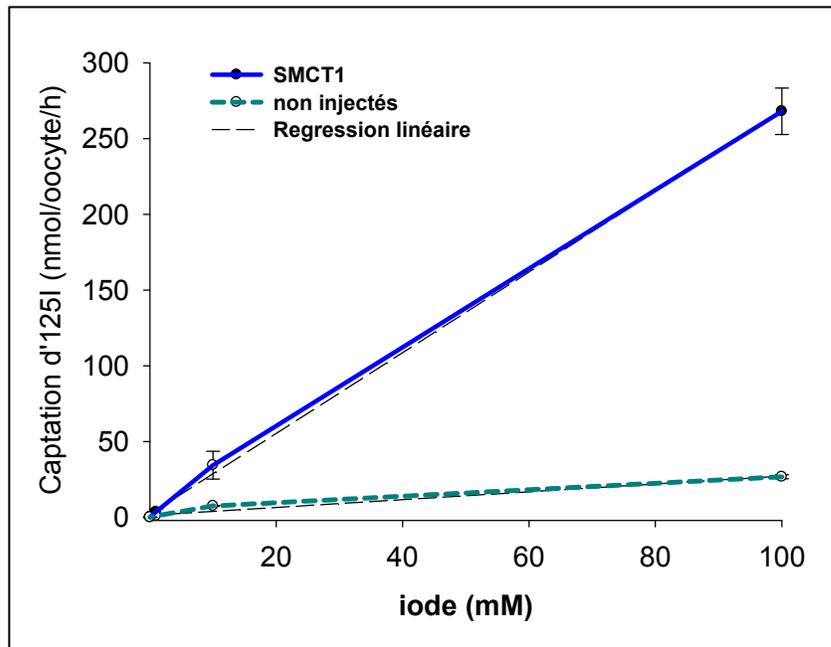


Figure 21. Captation d' ^{125}I avec des concentrations allant de 0-100mM d'iode. Le transport effectué par les ovocytes non injectés est représenté par la ligne bleu clair en pointillé, tandis que ce des ovocytes exprimant SMCT1 est représenté par la ligne bleu foncé. La ligne noir en pointillé montre la régression linéaire de chacun respectivement. $n=9-10$ ovocytes par point.

La non-saturabilité du système suggère un mécanisme de faible affinité de type canal. Cependant, la grandeur des flux observés correspondrait à des courants énormes si l' I^- traversait la membrane tout seul, de façon électrogénique. Par exemple, un flux de 40 nmol/h, tel que montré à la figure 19 pour une concentration d'iode de 10 mM, correspondrait à un courant de 1 μA . Un tel courant dû à la présence d'iode au potentiel de repos de l'ovocyte n'a jamais été observé lors des mesures électrophysiologiques faites sur des ovocytes exprimant SMCT1. Ainsi, on peut exclure la possibilité qu'il s'agisse d'un simple transport électrogénique d'iode, et suggérer plutôt un mécanisme de transport électroneutre. Il faudrait alors que l'iode extérieur soit échangé pour un anion interne ou cotransporté avec un cation externe.

Étant donné l'amplitude du transport d'iode à 10 mM (30nmol/ovocyte/h), on n'a pas priorisé des essais qui testent la possibilité d'un échange anionique. Par exemple, si la

concentration du Cl^- intracellulaire est de l'ordre de 30 mM, un volume intracellulaire accessible de 0.5 μl nous permet d'estimer que le contenu total en Cl^- de l'ovocyte est de 15nmol (Dascal, 1987). Au rythme de transport d'iode observé, il ne resterait plus de Cl^- dans la cellule après 30 min. La linéarité du flux d'iode pour plus d'une heure élimine complètement la possibilité d'un échange I^-/Cl^- .

On a donc investigué la possibilité d'un cotransport avec un cation. En fait, le Na^+ est nécessaire pour le transport des monocarboxylates par SMCT1 et agit comme inhibiteur du courant de fuite du même transporteur. On a donc fait l'hypothèse que le Na^+ pouvait très bien avoir un rôle à jouer dans le transport d'iode électroneutre.

1.5) Le transport d'iode par SMCT1 est sensible au Na^+

Ainsi, pour vérifier l'effet du Na^+ sur le transport électroneutre d'iode chez les ovocytes exprimant SMCT1, on a fait des essais de captation d'iode en présence ou absence de Na^+ .

Comme on peut observer dans la figure 22, le remplacement du Na^+ par le NMDG dans la solution extracellulaire annule le transport d'iode observé chez les ovocytes exprimant SMCT1 (en nmol/ovocyte/h : SMCT1 96mM Na^+ = 28,2 \pm 1,3 SMCT1 96 mM NMDG=3 \pm 0,2). Si sur d'autres conditions cet effet pourrait être interprété comme un transport d'iode couplé au gradient du Na^+ , le fait que le transport soit non-saturable rend cette possibilité plus difficile à défendre.

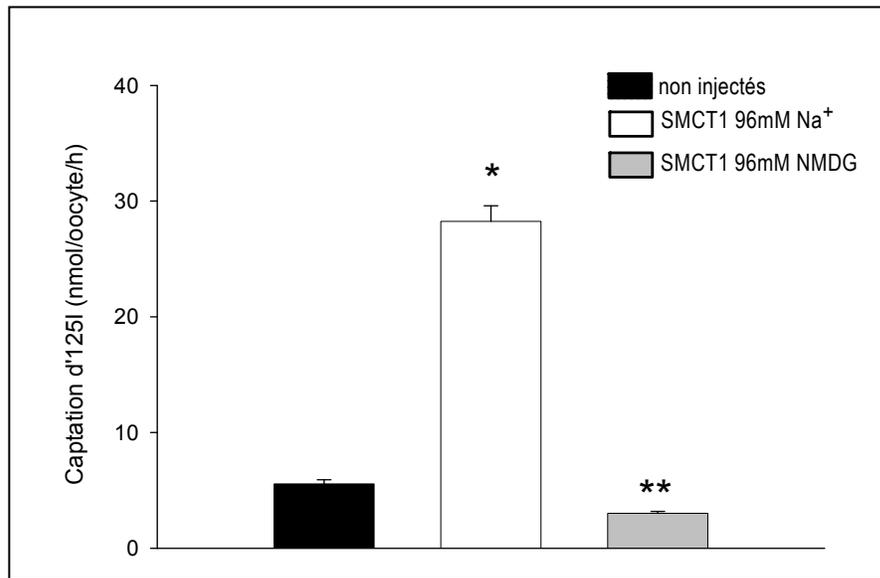


Figure 22. Captation d'¹²⁵I en présence ou absence du Na⁺ extracellulaire. On présente en noir, des ovocytes non injectés en présence de 96 mM Na⁺, en blanc des ovocytes exprimant SMCT1 aussi en présence de Na⁺ et en gris des ovocytes exprimant SMCT1 où le Na⁺ a été remplacé par NMDG. La concentration d'iode à la solution extracellulaire est de 10 mM. Chaque barre représente la moyenne ± ES sur n= 9 - 10 ovocytes. Signification statistique ($P < 0.05$). * SMCT1 vs non injectés, **SMCT1 96 mM Na⁺ vs SMCT1 96 mM NMDG. Expérience répétée 3 fois.

Donc, comment réconcilier une claire implication du Na⁺ qui suggère un mécanisme de cotransport avec l'absence de saturation selon la concentration d'iode qui suggère un mécanisme de type canal?

2) Conclusions partielles et observations surprenantes

Contrairement aux ovocytes injectés à l'eau, nous avons observé chez les ovocytes exprimant SMCT1 un transport d'iode sensible à l'ibuprofène, complètement dépendant du Na⁺, non saturable en iode et linéaire dans le temps pour de longues périodes. La différence entre l'amplitude du transport d'iode observée chez les ovocytes injectés à l'eau et les ovocytes exprimant SMCT1, ainsi que la sensibilité à l'ibuprofène nous suggèrent bel et bien que l'iode passe à travers ce transporteur. Cependant, le mécanisme par lequel l'iode est transporté n'est pas évident à identifier.

2.1) Le transport d'iode est électroneutre : les ovocytes injectés avec SMCT1 montrent une captation d'iode radioactif 20 fois plus grande que le courant de fuite

D'abord, même en observant un transport non-saturable en iode, on exclut la possibilité d'un transport électrogénique de type canal. La raison la plus évidente est que ce type de transport n'est pas visible lors des mesures électrophysiologiques.

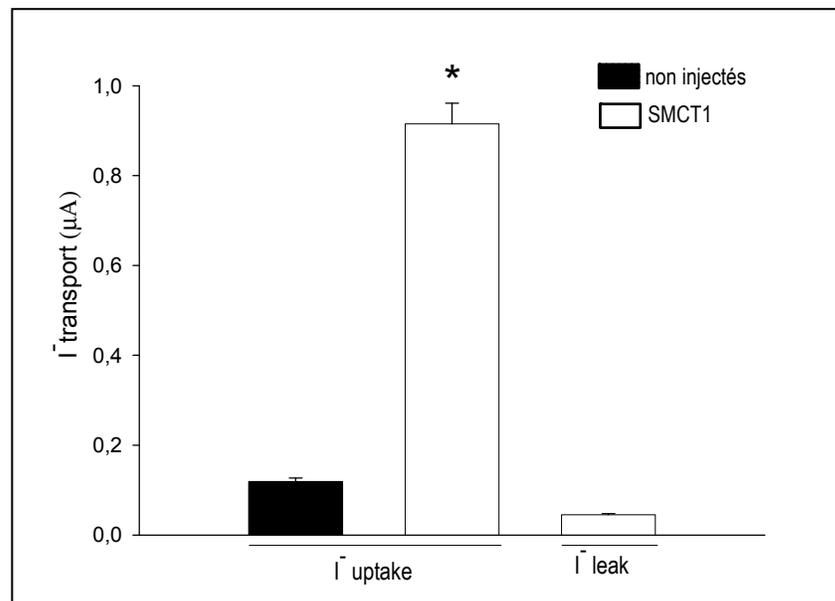


Fig.23. Comparaison de l'amplitude du transport d'iode électroneutre (captation) vs le courant d'iode (courant de fuite associé à SMCT1)(Coady et al., 2010). Les mesures de captation (nmol/ovocyte/h) ont été converties en μA . La grandeur du courant de fuite sortant correspond à la mesure prise à -30mV . En noir ovocytes non injectés, en blanc ovocytes exprimant SMCT1. La concentration d'iode dans la solution extracellulaire sur les deux mesures (captation et électrophysiologie) est de 10mM . Chaque barre représente la moyenne \pm ES sur $n=5$ (fuite) et $n=10$ ovocytes (captation). Signification statistique ($P < 0.05$). * uptake SMCT1 vs leakSMCT1. Les deux expériences ont été répétées au moins 3 fois.

En effet, si l'on compare l'amplitude du transport qu'on observe en captation ($\text{SMCT1}_{\text{captation}} = 0,8 \pm 0,04\ \mu\text{A}$) avec celle des courants de fuite anioniques, le seul type transport d'iode électrogénique attribuable à SMCT1, on voit que ce dernier est 20 fois plus

grand ($SMCT1_{fuite} = 0,045 \pm 0,002 \mu A$) (figure 23). Donc à partir de cela on suggère qu'au moins 95 % du transport d'iode doit se faire de façon électroneutre.

2.2) La grandeur du transport d'iode indique que l'iode transporté ne peut pas être libre dans le cytosol

Pourtant si le transport d'iode est électroneutre, le niveau de captation d'iode qui peut atteindre (30 nmol/ovocyte/h) indique que celui-ci ne pourrait être libre dans le cytosol. En effet, en présence de 10 mM iode dans le milieu extracellulaire, le transport atteint en 1 heure est de 30 nmol par ovocyte. Si l'on considère que le volume accessible d'un ovocyte est de 0.5 μl et cette quantité d'iode représenterait une concentration de 60 mM (équation 1).

$$[I]_{int\ ra} = \frac{30nM}{0.5\mu l} = 60mM \quad (\text{Équation 1})$$

Sans doute que cette concentration d'iode libre est irréaliste, à plus forte raison si le transport d'iode peut encore être multiplié par 10 en augmentant sa concentration extracellulaire à 100 mM.

Donc, si la concentration d'iode intracellulaire nous indique que cet anion ne peut pas être libre dans le cytosol, où est l'iode qui semble avoir été transporté? Premièrement, nous avons fait une simple expérience pour exclure la possibilité que l'iode ne soit pas transporté mais simplement lié à l'extérieur de l'ovocyte.

2.2.1) L'iode radioactif n'est pas lié à la membrane cellulaire

Après un essai de captation de 30 min, on a écrasé et centrifugé l'ovocyte en un volume d'eau déterminé pour en séparer la partie légère qui contient le cytosol, les protéines solubles et les petits fragments membranaires de la partie plus lourde qui contient essentiellement les grands fragments membranaires et les protéines qu'ils contiennent. Ensuite, les deux échantillons ont été comptés séparément à l'aide du compteur gamma.

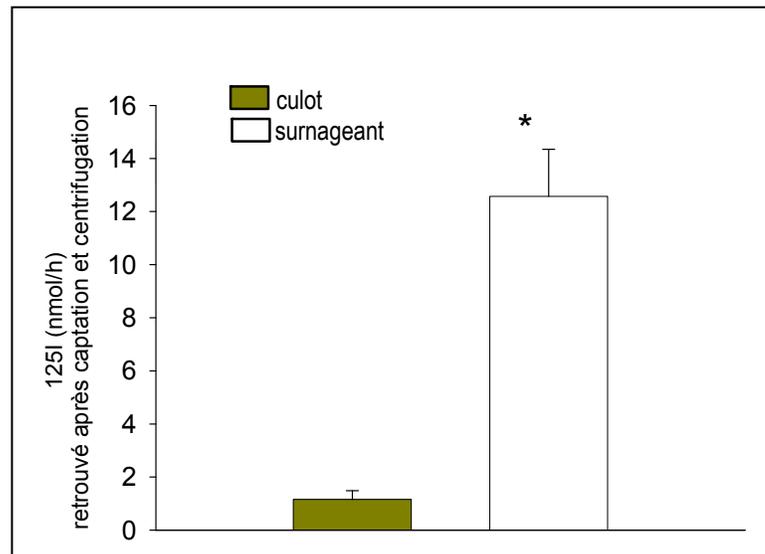


Figure 24. Séparation par centrifugation de la partie soluble et protéique d'un ovocyte exprimant SMCT1 après la captation d' ^{125}I pendant 1 heure. On montre en vert la radioactivité retrouvée dans le culot et en blanc la radioactivité associée au surnageant. Chaque barre représente la moyenne \pm ES sur $n=4$ ovocytes. Signification statistique ($P < 0.05$). *culot vs surnageant. Expérience faite 1 fois.

En effet, si le transport qu'on observe était dû à la liaison d'iode à l'extérieur de la membrane cellulaire, la majorité de l'iode radioactif devrait se trouver associée avec la fraction lourde. Pourtant, comme on observe dans la figure 24, l'iode radioactif a été trouvé en très grande majorité dans la partie soluble, éliminant ainsi la possibilité d'une liaison d'iode à la membrane cellulaire (en nmol/h; surnageant= $12,6 \pm 1,8$ vs culot= $1,1 \pm 0,3$).

2.2.2) L'albumine peut lier l'iode de façon non spécifique.

Alors, si l'iode est transporté à l'intérieur de l'ovocyte, il reste possible qu'il se lie aux protéines intracellulaires. À ce propos, on a utilisé l'albumine bovine (le BSA) dans le but de démontrer de façon indirecte la possibilité que ceci ait lieu. En effet, nous avons fait l'hypothèse que l'ajout de BSA dans la solution de captation réduirait le taux de transport d'iode dû à la liaison de celui-ci à l'albumine.

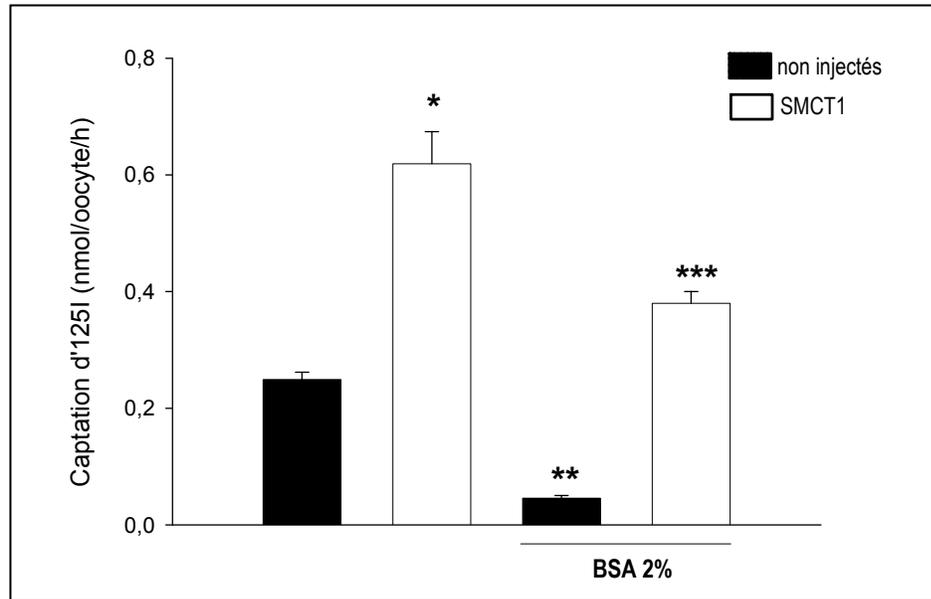


Figure 25. Captation d' ^{125}I en présence ou absence de 2% de BSA dans la solution de captation. On présente en noir, des ovocytes non injectés, en blanc des ovocytes exprimant SMCT1. La concentration d'iode dans la solution extracellulaire est de 1mM. Chaque barre représente la moyenne \pm ES sur $n=7-10$ ovocytes. Signification statistique ($P < 0.05$). * SMCT1 vs non injectés, ** non injectés vs non injectés+ BSA, *** SMCT1 vs SMCT1+BSA. Expérience faite 4 fois.

Comme on peut observer dans la figure 25, l'addition de 2 % de BSA a réduit significativement la captation d'iode par les ovocytes exprimant SMCT1 et aussi celle mesurée chez les ovocytes témoin (expérience faite en présence de 1 mM iode). Ce résultat suggère que l'iode est capable de se lier à des protéines et que c'est possiblement son sort dans le milieu intracellulaire. Cependant le pourcentage de réduction diffère entre les ovocytes non-injectés et ceux exprimant SMCT1. En effet, la captation d'iode en absence de BSA dans les ovocytes non injectés équivaut à $0,25 \pm 0,01$ nmol/ovocyte/h tandis que celle des non injectés + BSA est de $0,045 \pm 0,004$ nmol/ovocyte/h. De la même façon les ovocytes exprimant SMCT1 présentent une captation d'iode de $0,62 \pm 0,054$ nmol/ovocyte/h comparé à celle en présence de BSA de $0,38 \pm 0,02$ nmol/ovocyte/h. En moyenne pour les 4 répétitions de l'expérience montrée à la Fig. 25, la réduction en présence de BSA pour les ovocytes non injectés est de $81,6 \pm 1,9\%$ alors que pour les ovocytes exprimant SMCT1, la réduction du transport causée par la présence de BSA est de $38 \pm 3,3\%$. Cette différence est surprenante car le transport d'iode nous est apparu comme strictement proportionnel à la concentration de l'iode pour ces deux types d'ovocyte (voir

Fig 21). Si la présence de BSA fait chuter la concentration d'iode libre dans la solution de transport, il semble qu'elle ait un effet supplémentaire sur le mécanisme de transport endogène aux ovocytes.

Si le fait que l'iode, une fois transporté, se lie aux protéines intracellulaires ne nous surprend pas et pourrait même être, en fait, un avantage pour la précision de nos mesures, un autre aspect concernant la quantité d'iode retrouvé à l'intérieur de l'ovocyte à la fin de la période de captation nous a obligé à vérifier d'autres sources d'artéfacts possibles.

3) Vérification quant à la possibilité de présence de différents artéfacts

3.1) Le taux de transport d'iode peut varier selon la grenouille donneuse

Comme on peut observer dans la figure 26, pour de mêmes conditions de captation d'iode sur des ovocytes exprimant SMCT1, on a trouvé des chiffres allant de 34 nmol/ovocyte/h jusqu'aux six fois moins (5nmol/ovocyte/h).

Si dans tous les cas la captation d'iode sur les ovocytes exprimant SMCT1 est significativement plus élevée que celle des ovocytes témoin, il est très surprenant de voir de si grandes variations d'un groupe d'ovocytes à l'autre. Ce qui est encore plus surprenant, c'est que le transport par les ovocytes injectés à l'eau varie en parallèle avec le transport associé à l'expression de SMCT1. Cette situation pourrait se produire si SMCT1 agissait comme un stimulateur d'une protéine endogène que l'on retrouve en quantité variable selon le donneur d'ovocyte.

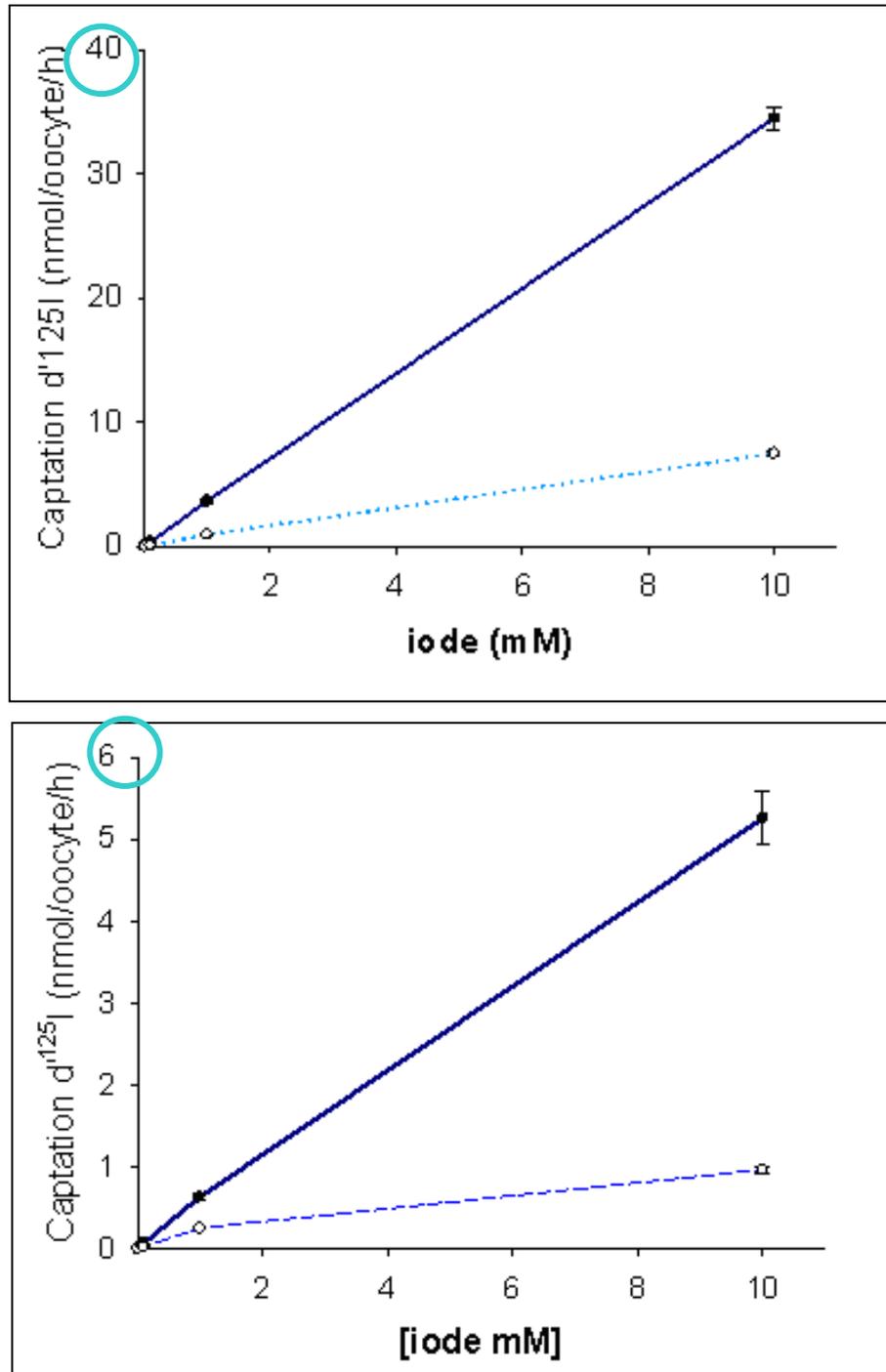


Figure 26. Captation d¹²⁵I en fonction de la concentration d'iode. Le transport effectué par les ovocytes non injectés est représenté par la ligne en pointillé, tandis que ce des ovocytes exprimant SMCT1 est représenté par la ligne bleu foncé. n=9-10 ovocytes par point. Les conditions de captation représentées par les deux graphes sont les mêmes, la seule variante est la grenouille donneuse.

3.2) Le transport d'iode observé chez les ovocytes exprimant SMCT1 n'est pas dû à la surexpression des canaux de chlore endogènes

Si on a constaté que l'expression des canaux chlore des ovocytes peut varier selon la grenouille donneuse, la question que nous nous demandions vraiment c'était si l'injection d'ARNm de SMCT1 pouvait entraîner la surexpression des canaux chlore endogènes.

Effectivement, il est connu que l'expression hétérologue des plusieurs protéines chez les ovocytes de *Xenopus* peut entraîner la surexpression de protéines endogènes telles que des canaux chlore (Attali et al., 1993; Kowdley et al., 1994; Tzounopoulos et al., 1995). Parmi ces protéines, on trouve le canal de K^+ , IsK.

En 1993 Attali et coll. (Attali et al., 1993) ont montré que l'injection de hautes concentrations de ARNm d'IsK sur des ovocytes induit en plus du courant de K^+ associé au canal, une autre courant de chlore activé par une hyperpolarisation (figure 27).

Puisque le profil biophysique, pharmacologique, et le profil de régulation du courant de chlore observé, diffère de celui des canaux K^+ , il a été suggéré que le canal de K^+ peut agir comme un activateur puissant des canaux Cl^- endogènes (Attali et al., 1993) lorsqu'on l'exprime en injectant plus de $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}^{-1}$ par ovocyte.

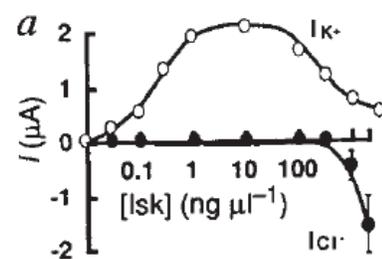


Figure 27. Relation dose-réponse entre l'amplitude des courants de K^+ et Cl^- et la concentration de mRNA d'IsK injecté aux ovocytes. Les courants ont été mesurés à -30mV et -130mV respectivement.

Attali B, et al., 1993.

Donc, pour vérifier de façon indirecte si la surexpression de SMCT1 pourrait induire l'expression des canaux chlore endogènes, on a décidé de tester la captation d'iode radioactif sur des ovocytes qui expriment IsK.

Comme on peut observer dans la figure 28, les ovocytes exprimant IsK (injection de 4.6 ng d'ARNm) présentent une captation d'iode égale aux ovocytes non injectés, nous suggérant, de façon indirecte, que le transport observé n'est pas du à la surexpression des canaux chlore endogènes (en nmol/ovocyte/h : non injectés= $0,37 \pm 0,02$ vs IsK= $0,36 \pm 0,01$).

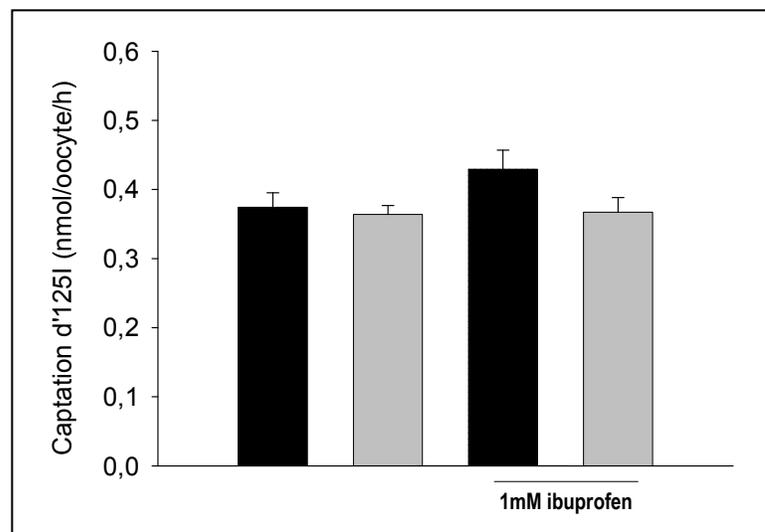


Figure 28. Captation d'¹²⁵I sur des ovocytes non injectés (barres noires) et sur des ovocytes exprimant Isk (barres grises) (46nl 0.1ng/nl). La concentration d'iode dans la solution extracellulaire est de 1mM. Chaque barre représente la moyenne ± ES sur n=10 ovocytes. Il n'y a pas une signification statistique ($P < 0.05$). Expérience faite 1 fois.

3.3) Le transport d'iode sensible à l'ibuprofène est aussi associé à l'expression du transporteur de H⁺/monocarboxylates, MCT1

Si l'expression de IsK ne se traduit pas en une captation d'iode due à l'expression des canaux chlore endogènes de l'ovocyte, on a décidé de vérifier si la captation d'iode pouvait être influencée par l'expression des divers transporteurs autres que SMCT1 et IsK. Nous faisons l'hypothèse implicite que la captation d'iode observée chez les ovocytes exprimant SMCT1 serait due à la stimulation de l'expression d'une protéine endogène. Si c'était le

cas, il devrait être possible de voir le même type de flux avec l'expression de d'autres cotransporteurs.

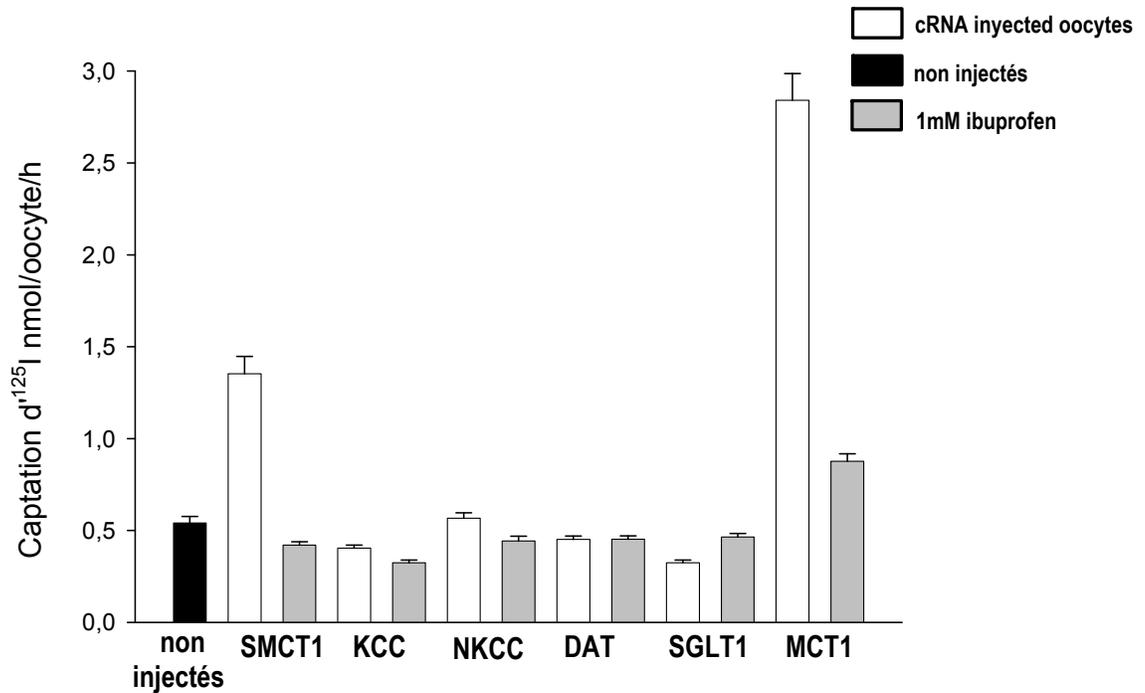


Figure 29. Captation d' ^{125}I sur des ovocytes non injectés (barres noirs) et sur des ovocytes injectés avec 46nl (0.1ng/nl) SMCT1, KCC3, NKCC, DAT, SGLT1 et MCT1 avec (barres grises) ou sans ibuprofène (barres blancs) respectivement. La concentration d'iode à la solution extracellulaire est de 1 mM. Chaque barre représente la moyenne \pm ES sur n=10. Signification statistique ($P < 0.05$). *SMCT1 vs témoin et MCT1 vs témoin. **SMCT1 vs MCT1. Cette expérience au complet a été faite juste une fois, pourtant, la captation d'iode par MCT1 a été observé au moins 3 fois.

Ainsi, on a exprimé de façon indépendante le transporteur de Na^+ glucose humain hSGLT1, un membre de la même famille que SMCT1; le transporteur de H^+ :monocarboxylates de rat, rMCT1, une protéine avec une fonction similaire à celle de SMCT1; le transporteur de $\text{Na}^+:\text{K}^+ :2\text{Cl}$ de lapin, rbNKCC2A, et le transporteur humain de $\text{K}^+ :2\text{Cl}^-$, hKCC3a, deux transporteurs de cations-chlore membres de la famille *SLC12*; ainsi que le transporteur de dopamine, hDAT de la famille *SLC6A3*. Pourtant, comme nous l'avons observé pour IsK, d'autres transporteurs tels que rbNKCC2A, hKCC3a, hDAT, hSGLT1, n'ont pas montré une captation d'iode comparable à ce que l'on peut voir chez les ovocytes exprimant SMCT1 (en nmol/ovocyte/h : NKCC=0,6 \pm 0,03 KCC=0,4 \pm 0,02 DAT= 0,45 \pm 0,02 SGLT1=0,5 \pm 0,02 vs SMCT1=1,35 \pm 0,1). La seule protéine qui le fait c'est rMCT1, un

transporteur de monocarboxylates couplé au H^+ . De façon intéressante, cette captation est sensible à l'ibuprofène (en nmol/ovocyte/h : SMCT1= $1,35 \pm 0,1$ vs MCT1= $2,8 \pm 0,1$) (figure 29).

VI-DISCUSSION

1) Justification

En 2004, notre laboratoire a identifié la protéine SMCT1 comme un cotransporteur de Na⁺ et d'acide monocarboxylique. Puisque SMCT1 est exprimé à la membrane apicale des épithélia spécialisés dans l'absorption d'ions et de solutés, tels que le tube digestif et le tubule rénal, on a rapidement présumé que son rôle physiologique était d'absorber ces métabolites énergétiques (Coady et al., 2004). En effet, selon le groupe de Ganapathy, la réabsorption de certains monocarboxylates comme le butyrate et le propionate, pourrait même expliquer le rôle de *SLC5A8* comme gène suppresseur des tumeurs dans le côlon et dans d'autres tissus (Ganapathy et al., 2008).

Pourtant, si aujourd'hui on comprend mieux l'implication physiologique du transport de monocarboxylates par SMCT1, il reste que ce transporteur s'exprime aussi chez d'autres tissus où la réabsorption des ces métabolites énergétiques n'est pas éminemment claire. Parmi ces tissus on trouve la thyroïde.

La fonction la plus importante de la thyroïde est la synthèse des hormones thyroïdiennes. Étant donné que le transport d'iode en est une étape clé, plusieurs groupes ont centré leurs efforts sur la compréhension du mécanisme qui permet à l'iode de jouer son rôle. Aujourd'hui, on sait que l'iode est transporté à la membrane basolatérale par le transporteur de sodium/iode NIS (Dai et al., 1996). Par contre, l'identité de la ou des protéines responsables du transport apical reste controversée.

La pendrine, le canal CIC5 et SMCT1 semblent avoir un rôle à jouer dans cette fonction (Scott et al., 1999; van den Hove et al., 2006; Rodriguez et al., 2002). Pourtant, le mécanisme nécessaire pour le transport d'iode à la membrane apicale semble assez complexe et paraît dépendre de plus d'une protéine. En effet, l'hypothèse de l'existence des mécanismes couplés, ou d'un complexe multiprotéique a déjà été proposé (Wolff, 2005).

L'objectif initial du présent travail était de mettre en évidence le rôle de SMCT1 dans le transport de d'iode impliqué dans ce processus. À vrai dire, l'idée du transport d'iode par ce transporteur a déjà été abordée. En effet, l'hypothèse du transport d'iode par SMCT1 a permis son clonage, même avant de connaître son rôle comme transporteur de Na^+ et de monocarboxylates (Rodriguez et al., 2002). Pourtant, si cette étude a permis de souligner l'homologie du transporteur avec NIS, ainsi que d'établir son expression à la membrane apicale des thyrocytes, les conclusions obtenues par rapport au transport d'iode semblent peu convaincantes.

En effet, comme on le mentionne dans « Identification initiale de SMCT1 comme transporteur d'iode (page 32) » le fait d'avoir observé une accumulation d'iode sur les cellules SMCT1-CHO et un efflux sur les SMCT1-NIS-COS-7 a permis à Rodriguez et coll de conclure que SMCT1 est un transporteur d'iode passif (Rodriguez et al., 2002).

Pourtant, il est important de souligner que l'accumulation d'iode est observée seulement pour un des deux modèles cellulaires, le SMCT1-CHO. Ainsi, si les différences dans l'accumulation d'iode pouvaient s'expliquer, comme argumente Rodriguez, par un faible taux de rendement de transfection, cela serait contradictoire avec l'attribution à SMCT1 de l'efflux d'iode observé chez les cellules SMCT1-NIS-COS7. En d'autres termes, si SMCT1 ne peut pas accumuler d'iode à cause de sa faible expression chez les cellules COS7, il ne devrait pas non plus pouvoir réaliser une fonction similaire telle que l'efflux.

En plus, si SMCT1 s'exprime mieux chez les cellules CHO, pourquoi celles-ci n'ont pas été utilisées pour montrer l'effet de la diminution de la concentration d'iode une fois qu'elles sont transfectés avec NIS? En outre, les auteurs de l'étude observent un transport sensible au perchlorate, un inhibiteur qui est connu pour son effet sur NIS, mais pas sur SMCT1.

Donc, il va sans dire qu'en étant à l'époque le seul travail à aborder le possible rôle de SMCT1 dans la thyroïde, cette idée est restée dans l'oubli depuis 2002. Évidemment, ceci n'a pas été dû seulement aux imprécisions dans l'étude de Rodríguez (Rodríguez et al., 2002). La caractérisation de SMCT1 comme transporteur de Na⁺ monocarboxylates (Coady et al., 2004), les travaux de Paroder (Paroder et al., 2006) montrant l'insensibilité du transporteur au régulateur clef de la thyroïde : la TSH, ainsi que l'analyse de la souris knockout soulignant un rôle non essentiel du transporteur dans la physiologie thyroïdienne (Frank et al., 2008), y ont aussi contribué. Pourtant, plusieurs observations nous suggèrent que SMCT1 pourrait avoir un rôle mineur dans le transport d'iode à la thyroïde.

2) Observations

L'intérêt pour l'étude du transport d'iode par SMCT1 remonte à la récente publication de l'analyse des courants de fuite anioniques. Cette étude, réalisée dans des ovocytes de *Xenopus* exprimant la protéine en question, montre que SMCT1 est capable de transporter des anions, tels que l'iode (Coady et al., 2010). Aussi, le fait que l'efflux d'iode chez des cultures primaires de thyrocytes porcines (Nilsson, 2007) se soit avérée sensible à l'ibuprofène constituait un autre indice nous indiquant que SMCT1 pourrait transporter l'iode.

Bien que les essais d'efflux d'¹²⁵I sur des thyrocytes porcins paraissent une bonne approche pour s'attaquer à la question du transport d'iode par SMCT1, il aurait été difficile d'identifier la contribution spécifique de SMCT1 dans un système qui exprime plusieurs protéines, parmi lesquelles on trouve la pendrine et CIC5. Conséquemment, cette étude a été faite sur des ovocytes de *Xenopus* exprimant SMCT1. Ainsi, on montre que contrairement à des ovocytes injectés à l'eau, des ovocytes exprimant SMCT1 présentent une captation d'iode sensible à l'ibuprofène, l'inhibiteur spécifique du transporteur.

Même si les essais de captation radioactive peuvent refléter autant le transport électroneutre qu'électrogénique, on pense que la grande majorité de ce transport est électroneutre, car il

existe une grande différence entre les courants de fuites dus à l'addition d'iode et l'amplitude des flux d'iodes radioactif. Ainsi, comme l'amplitude du transport observé lors des mesures de captation d' $^{125}\text{I}^-$ est 20 fois plus grande que celle des courants de fuite, on présume que 95% du transport d'iode est électroneutre et est passé inaperçu dans nos études électrophysiologiques. Parce que ce mécanisme doit forcément être électroneutre, l'iode doit passer en étant lié à un cation ou en échange pour un autre anion.

Étant donné la grandeur de l'influx d'iode observé, il est peu probable que l'iode soit échangé pour un anion intracellulaire donc nous avons négligé la possibilité d'un échange anionique. En effet, il est difficile d'identifier l'anion intracellulaire qui serait capable de s'échanger avec une aussi grande quantité d'iode.

Comme on le mentionné précédemment, l'amplitude du transport d'iode à 10 mM correspond à une accumulation d'iode à l'intérieur de l'ovocyte après une heure est de 60mM (équation 1). Donc, nous aurions besoin d'au moins la même quantité d'anion à échanger pour atteindre l'amplitude observé. Le chlore, le principal anion intracellulaire n'atteindrait que 45 mM étant donné son potentiel d'inversion qui est autour de -20 mV en présence de 90 mM de Cl externe. Pour cette raison et parce que le transport d'iode est sensible à la présence de Na extracellulaire, nous avons plutôt investigué la possibilité que l'iode soit cotransporté avec le Na^+ .

À ce propos, il est intéressant de constater que tous les membres de la famille génique *SLC5* sont des transporteurs couplés au Na^+ . Parmi eux, on trouve, le cotransporteur de Na^+I^- , NIS, qui a été largement caractérisé et dont la fonction clé est le transport d'iode dans la thyroïde. SMCT1 partage une grande homologie avec NIS en lui étant 70 % similaire et 46 % identique. Cette identité inclut 8 des 12 cystéines présentes dans NIS (130, 173, 270, 297, 308, 344, 396, et 480). De plus, la majorité des résidus critiques de NIS, dont la mutation est la cause des défauts congénitaux du transport d'iode, sont aussi conservés dans la séquence de SMCT1 (Val57, Arg122, Thr352, Gly393, et Gly536) (Levy et al., 1998; Dohan et al., 2002; De, V et al., 2004; Paroder et al., 2006). Il va sans dire que

le transport de monocarboxylates effectué par SMCT1 est aussi Na^+ dépendant (Coady et al., 2004).

Pourtant, le fait que le transport observé soit sensible au Na^+ est en contradiction avec l'insensibilité au Na^+ de l'efflux observé chez les thyrocytes porcines (Nilsson, 2007). À ce moment-ci, nous n'avons pas encore d'explication claire au sujet de cette nette différence mais nous pouvons proposer deux hypothèses.

La première hypothèse se base sur le fait que les thyrocytes constituent un système beaucoup plus complexe que les ovocytes et que l'analyse des caractéristiques du transport d'iode par ces cellules reste plus difficile à décortiquer. En effet, s'il est vrai que chez les thyrocytes l'efflux observé est sensible à l'ibuprofène, il reste possible qu'il ne s'agit pas d'un transport effectué par SMCT1, mais par un autre système qui est sensible au même inhibiteur. Dans le même sens, il est possible que l'efflux observé soit le résultat de l'expression de plusieurs autres transporteurs d'iode y compris SMCT1. Dans ces deux cas, l'expression d'autres possibles transporteurs d'iode pourrait masquer l'effet précis du Na^+ sur le transport effectué par SMCT1.

La deuxième hypothèse explore la possibilité que le Na^+ externe affecte différemment l'influx et l'efflux d'iode généré par SMCT1. Comme on le mentionne dans la section 1.3 des résultats (page 68), pour des raisons techniques l'ensemble des résultats obtenus dans les ovocytes réfère à la captation et non à l'efflux d'iode. Si on pourrait présumer que les caractéristiques du transport observées à la captation seront les mêmes pour l'efflux, il faut bien préciser que des essais d'efflux en absence de Na^+ extracellulaire n'ont pas encore été faits dans notre laboratoire. Cependant, puisque l'efflux d'iode radioactive observé chez les ovocytes a été fait en présence de Na^+ , on élimine la possibilité que le Na^+ agisse comme inhibiteur, comme c'est le cas pour l'efflux d'iode électrogénique observé chez les ovocytes. Ainsi, il est possible que l'enlèvement du Na^+ extracellulaire n'ait aucun effet sur l'efflux et soit donc différent de l'effet observé pour la captation chez les ovocytes. Si tel est le cas, la sensibilité au Na^+ du transport observé dans ce travail ne serait pas en

contradiction avec les données préliminaires de Nilsson (Nilsson, 2007). Plutôt, ceci serait simplement expliqué par des effets différents du Na^+ selon la directionnalité du transport.

En outre, il est surprenant de voir que SMCT1 transporte l'iode d'une façon particulière par rapport aux mécanismes de cotransport classiques. En effet, l'activité de cotransport n'est pas saturable en fonction de la concentration d'iode. Cette constante d'affinité extrêmement faible nous rappelle plutôt le comportement attendu d'un canal ionique. L'électroneutralité du mécanisme de transport nous suggère pourtant que le transport d'iode est couplé au transport d'un autre ion.

Donc, puisqu'on élimine la possibilité qu'il s'agisse d'un mécanisme de type canal pour l'I⁻ dû à l'électroneutralité du transport, on propose deux hypothèses qui essayent de concilier trois caractéristiques du transport observé : l'électroneutralité, la dépendance au Na^+ , et l'absence de saturabilité en fonction de la concentration d'iode.

3) Hypothèse 1 : SMCT1 transporte une autre espèce que l'iode anionique (I⁻) : l'iode moléculaire (I₂)

La première hypothèse suggère que le transport qu'on mesure est le résultat de l'accumulation d'une molécule qui contient l'iode radioactif, mais sans être de l'iode anionique I⁻. Cette molécule serait éventuellement en équilibre avec l'iode anionique dont la concentration est présumée dominante. En effet, à pH 7.4, l'oxydation de l'iode anionique peut donner lieu à d'autres espèces d'iode y compris l'iode moléculaire (I₂), le triiode (I₃⁻), l'acide hypoiodeux (HOI), l'ion hypoiodite (OI⁻) et l'anion HI₂O⁻ (Kessler et al., 2008). À vrai dire, ceci est le mécanisme utilisé par les thyroperoxidases pour lier l'iode à la structure de la thyroglobuline. En oxydant l'iode anionique, ils produisent l'iode moléculaire qui est reconnu comme un puissant agent ionisant.

Pourtant, l'oxydation d'iode peut se faire en absence des thyroperoxydases (TPO) en utilisant H_2O_2 (Huwiler et al., 1985). Cependant, puisque le taux de ce genre d'oxydation n'est que d'un millième du taux de la réaction inverse (la réduction d' I_2), la concentration d' I_2 par rapport à I^- est très faible. Encore plus si on tient compte du fait que le mécanisme est aussi utilisé pour la production d' I_3^- (figure 30).

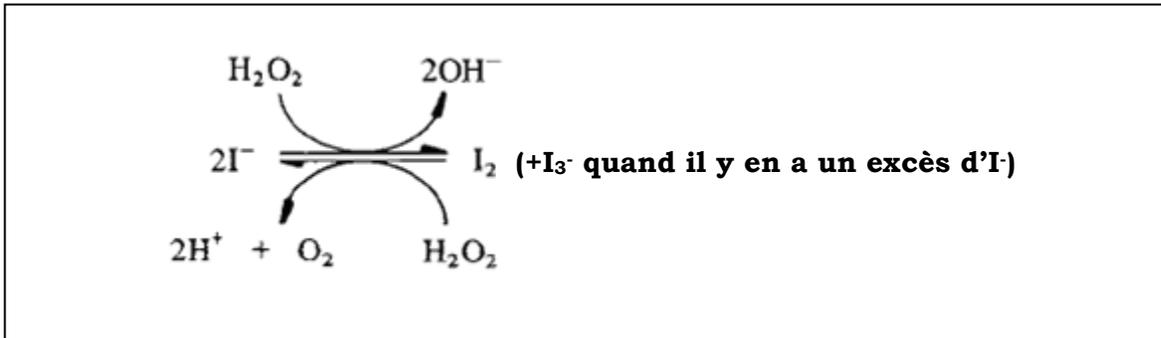


Figure. 30. Oxydation d' I^- , production d' I_2 et I_3^- .

Ainsi, en retournant à notre hypothèse de départ, il se peut que la molécule transportée par SMCT1 soit l'iode moléculaire. En effet, le manque de saturabilité serait expliqué par la faible concentration d' I_2 contenue dans une solution qui est constituée majoritairement d'iode anionique. Si l'hypothèse du transport d' I_2 peut expliquer l'électroneutralité et le manque de saturabilité (la concentration d' I_2 étant de plusieurs ordres de grandeur inférieure à la concentration d' I^-), il faudrait cependant comprendre pourquoi ce transport nécessite du Na^+ .

Contrairement au transport Na^+ /lactate, le possible transport d' I_2 ne pourrait pas être couplé au gradient sodique puisqu'il deviendrait électrogénique. Quel rôle aurait donc le Na^+ dans ce genre de transport? En effet, on suggère que dans ce cas-ci, que le Na^+ ne servirait qu'à activer le transporteur mais sans être transporté. Ainsi, la conformation de SMCT1 acquise lors de la liaison du Na^+ permettrait le passage électroneutre d'iode.

Pourtant, si notre hypothèse semble expliquer l'électroneutralité du transport ainsi que le manque de saturabilité, il y aurait deux aspects à confirmer. Le premier et le plus évident est l'affinité du transporteur pour le Na^+ . En effet, si le Na^+ se lie à SMCT1 nous devrions pouvoir calculer son K_m . Par contre s'il se comporte comme l'iode (transport non saturable en fonction de la concentration d'iode), cette hypothèse ne pourrait expliquer la dépendance au Na^+ du transporteur.

Le deuxième aspect à prendre en compte est la puissance de l'iode moléculaire pour se lier aux protéines. En effet, comme le HOI, l' I_2 est un des plus puissants iodants même aux concentrations aussi petites que $2 \mu\text{m}$ (Huwiler et al., 1985). Donc, s'il est vraiment transporté par SMCT1 *in situ*, il faudrait que l'iode ne soit pas sous une forme liée aux protéines avant d'être transporté. En d'autres termes, dû au pouvoir iodant de l' I_2 , il reste difficile à comprendre comment l'iode moléculaire ne réagirait qu'avec les protéines cytosoliques sans affecter les protéines membranaires. En effet, l'oxydation dans un compartiment spécifique, serait seulement envisageable si l'espèce anionique (I^-) serait l'espèce transporté et qu'il y avait une transformation en I_2 seulement au contact du milieu intracellulaire. L'exemple physiologique le plus clair c'est l'organification de la thyroglobuline au colloïde folliculaire. Lors de son transport à travers le thyrocyte, l' I^- est incapable d'oxyder les protéines membranaires ou cytosoliques. C'est seulement quand il est oxydé dans le colloïde, et donc converti dans un agent iodant, qu'il peut réagir avec les résidus tyrosines de la thyroglobuline.

Ainsi, on pourrait donc concevoir un transport d' I_2 dans des ovocytes exprimant SMCT1 et exposés à une solution extracellulaire qui ne contient pas de protéines mais ceci serait impossible pour SMCT1 exprimé à la membrane apicale de la glande thyroïde.

4) Hypothèse 2 : SMCT1 transporte du NaI

D'autre part, nous pouvons suggérer une deuxième hypothèse qui serait en mesure d'expliquer le transport observé. Puisqu'on parle d'un transport électroneutre qui implique

l'iode et le sodium, on propose qu'il s'agisse d'un transport de NaI (à ne pas confondre avec un cotransport de Na^+ et d' I^- tel que celui réalisé par NIS). En d'autres termes, le transport d'iode ne représenterait pas l'iode dissous en solution, mais plutôt une faible quantité qui serait sous la forme de NaI. Dans ce cas-ci, on prédit que le Na^+ activerait le transport d'iode dans la mesure où il favoriserait la formation de NaI en fonction de la constante d'équilibre de la réaction entre le Na et l'iode. Si tel est le cas, contrairement à notre première hypothèse, le transporteur ne serait pas saturable en Na^+ , plutôt, comme l'iode, on observerait une linéarité du transport par rapport aux concentrations extracellulaires. Toutefois, si on a vu de façon répétitive la sensibilité du transport de l'iode à la présence de Na^+ , on ignore toujours l'affinité du transporteur pour ce cation.

Pourtant, cette hypothèse est tout de même réfutable dû à l'impossibilité d'accumuler autant de Na^+ à l'intérieur de l'ovocyte. Si l'entrée de ce dernier pouvait être en équilibre avec sa sortie par un autre mécanisme, cela deviendrait mesurable en électrophysiologie.

5) Analyse des artefacts

Tout de même, il pourrait être argumenté que le transport qu'on observe n'est pas attribuable à SMCT1. À ce propos, notre travail prend aussi en compte cette possibilité. Premièrement, la possible liaison non spécifique de l'iode à la membrane cellulaire a été exclue. En effet, on montre que l'iode radioactif mesuré se trouve dans la partie légère qui contient le cytosol, les protéines solubles et les petits fragments membranaires, et non sur la partie plus lourde que l'on peut culotter avec une centrifugation d'une minute à 12000 rpm. L'iode semble donc avoir traversé la membrane et résiste aux multiples lavages que nous avons faits avant de compter la radioactivité associée à l'ovocyte.

Pourtant, vu que le transport a été réduit quand on utilise le BSA dans la solution extracellulaire, on présume qu'une fois que l'iode est entré, il peut se lier dans une certaine mesure aux protéines intracellulaires. En effet, comme on l'a mentionné plus tôt, ceci est possible dû à la formation d' I_2 lors de l'oxydation d'iode anionique. Cependant, il reste à

expliquer comment, dans nos mesures d'efflux, nous avons réussi à voir une diminution significative de l'iode de l'ovocyte après avoir exposé celui-ci à un milieu extracellulaire sans iode. En d'autres termes l'iode semble donc être capable de sortir ce qui pourrait s'expliquer par un certain équilibre entre l'iode lié et l'iode libre à l'intérieur de l'ovocyte.

À ce propos, on pense qu'une autre espèce d'iode pourrait expliquer ce phénomène: l' I_3^- . En effet, l' I_3^- est formé à partir de l' I_2 et de l' I^- , quand il y a un excès de ce dernier. Puisque l' I_3^- se dissocie spontanément, il y a été proposé que ce mécanisme puisse représenter un système d'entreposage d' I_2 dont la fonction physiologique serait de réduire le niveau des agents iodants, c'est-à-dire d' I_2 . En effet, *in vivo*, la production d' I_3^- peut affecter l'iodation des tyrosines en réduisant les niveaux d' I_2 nécessaires pour ce processus. Ceci pourrait même être un des causes de l'hypothyroïdisme causé par un excès d'iode mieux connu comme l'effet Wolff-Chaikoff (Huwiler et al., 1985).

En outre, on a observé une énorme variabilité dans le taux de transport mesuré d'une semaine à l'autre i.e. pour des groupes d'ovocytes différents. Si l'on n'est pas en mesure d'expliquer ce phénomène, on pense que le fait d'avoir eu de différents fournisseurs de grenouilles au cours de nos expériences a pu être une des raisons de cette variabilité. Pourtant, ceci n'expliquerait pas pourquoi ce genre de problème ne s'est pas manifesté dans d'autres types des expériences utilisant ces mêmes ovocytes dans des laboratoires voisins.

Une autre hypothèse pour expliquer ce phénomène prend en compte la possibilité que la différence dans le taux de transport observé soit due à une variation de la forme d'iode marquée qui a été utilisée au cours de nos expériences. En effet, il se peut que les variations observées dans le taux de transport ne soient pas vraiment dues à la grenouille donneuse, mais plutôt à des concentrations variables des espèces d'iode (I^- , I_2 , I_3^- ...) en fonction du temps et de notre façon de préparer et d'entreposer l'iode radioactive. Par exemple, au début de cet étude, la grandeur des contenants et la dilution de l' ^{125}I avaient créé des problèmes d'évaporation de nos solutions stock (voir section IV- Matériels et Méthodes, 5) Précisions par rapport au stockage et à la manipulation de l' ^{125}I , page 63).

D'autre part, comme il est bien connu que des canaux chlore endogènes, de loin les plus abondants de l'ovocyte, peuvent interférer lors de l'analyse du transport anionique d'une protéine donnée (Attali et al., 1993; Kowdley et al., 1994; Tzounopoulos et al., 1995), on a décidé d'analyser la possibilité que l'expression de SMCT1 puisse entraîner une augmentation de la présence de canaux Cl^- endogènes. En fait, comme dans le cas de la possible liaison à la membrane cellulaire, on a exclu l'idée de la surexpression des ces canaux en montrant que le transport d'iode semble être spécifique aux ovocytes exprimant des transporteurs des monocarboxylates SMCT1 et MCT1.

En effet, SMCT1 et MCT1 présentent un transport d'iode sensible à l'ibuprofène. S'il reste possible que seulement ces transporteurs soient capables de stimuler l'expression de canaux chlore endogènes, le fait que le transport observé par SMCT1 nécessite du Na^+ n'est pas cohérent avec cette hypothèse. Les canaux chlore qui prédominent sur les ovocytes de Xenope sont ceux activés ou inactivés par le Ca^+ (CaCC et CaIC respectivement), ceux activés par l'hypotonie (Cl^-_{vol}), ainsi que ceux induits par l'hyperpolarisation (Cl^-_{hyp}) (Weber, 1999). Donc, comme le sodium a été remplacé de façon isotonique par le NMDG, une réduction du transport serait improbable si elle était le résultat de l'activité de n'importe quel de ces canaux. En outre, si le transport d'iode qu'on observe chez les ovocytes exprimant SMCT1 et MCT1 est dû à l'expression des canaux chlore, l'apparente électroneutralité ne pourrait s'expliquer non plus.

6) Interprétation du rôle physiologique du transport d'iode électroneutre par SMCT1

Contrairement à l'étude de Rodriguez et coll. (Rodriguez et al., 2002) qui suggère que SMCT1 effectue un transport passif indépendant du Na^+ , nous proposons un transport électroneutre, dépendant du Na^+ dont le mécanisme est encore mal compris.

Si cela est correct, SMCT1 aurait deux mécanismes différents pour le transport d'iode : celui des courants de fuite, et le transport électroneutre. Si nous ignorons la raison pour laquelle il serait nécessaire d'avoir sur une même protéine des mécanismes différents de transport d'iode, on pense qu'il serait difficile que son activité soit synergique. En effet, il est possible que ces mécanismes soient mutuellement exclusifs à cause de la dépendance du sodium de l'un, et l'inhibition exercée par ce cation sur l'autre (la présence de Na^+ externe inhibe le courant de fuite de SMCT1).

Le rôle physiologique le plus évident pour n'importe quel de ces types de transport est le transport d'iode dans les tissus où SMCT1 est exprimé. Pourtant, les concentrations normales de Na^+ (140Mm) ainsi que le potentiel membranaire ($\sim -50\text{mV}$) inhiberaient le courant de fuite dans presque tous les épithélia.

Donc, comme Coady et coll. (Coady et al., 2010) l'ont discuté, le flux d'iode électrogénique pourrait avoir lieu seulement à la membrane apicale des thyrocytes et colonocytes. En effet, ces deux épithélia présentent des concentrations faibles de Na^+ ainsi qu'un potentiel membranaire un peu dépolarisé. Pourtant dans les deux cas, à cause de la sélectivité ionique du courant, un grand flux de chlore bidirectionnel coexisterait avec le faible flux d'iode.

D'autre part, en matière du transport d'iode électroneutre, il serait facile de dire qu'il constitue le mécanisme d'efflux d'iode à la membrane apicale des thyrocytes. En fait, si on base notre étude sur des mesures d'uptake, nous observons un transport d'iode sensible à l'ibuprofène lors des mesures d'efflux.

Pourtant, on a appris de l'étude de la pendrine qu'il faut plus que la démonstration du transport d'iode sur des systèmes hétérologues pour faire ce genre de conclusions. En effet, si plusieurs travaux appuient le rôle de la pendrine comme transporteur d'iode dans la thyroïde, son rôle demeure controversé. Entre autres, l'analyse de la souris pendrine knockout qui ne montre aucune dysfonction thyroïdienne est une observation très forte qui

met en doute l'implication de la pendrine comme transporteur principal d'iode à la membrane apicale des thyrocytes.

En effet, ceci pourrait aussi être le cas pour SMCT1. S'il n'existe pas encore autant d'études par rapport à son transport d'iode comme il y en existe pour la pendrine, l'analyse de la souris knockout de SMCT1 montre que son absence ne nuit pas non plus à la fonction de la thyroïde. Encore plus intéressant, l'inactivation combinée de la pendrine et de SMCT1 (souris SMCT1^{-/-} et pendrine^{-/-}) ne résulte en aucun défaut thyroïdien (Frank et al., 2008). Donc, comment concilier cette étude avec nos résultats?

Premièrement, le fait que l'inactivation des deux protéines, la pendrine et SMCT1, ne reflète pas les mêmes conclusions que l'étude de sa fonction, peut être dû à la présence d'un mécanisme de compensation induit lorsque l'on empêche la pendrine et SMCT1 de jouer leurs rôles. En d'autres termes il est aussi possible que la délétion d'une protéine entraîne la surexpression d'autres protéines capables d'assurer au moins une partie de la fonction.

Pourtant, dans le cas de l'étude de l'inactivation de la pendrine, la surexpression d'autres protéines n'as pas été étudiée parce qu'aucun autre transporteur n'avait été suggéré pour la même fonction. Dans le même ordre d'idées, quand Frank et coll. (Frank et al., 2008) ont analysé la souris SMCT1 knockout, seulement la pendrine était connue, l'implication possible du canal CIC5 n'avait pas encore été suggérée.

En outre, on pense que le fait que le transporteur n'ait pas un rôle essentiel à la thyroïde n'exclut pas l'idée qu'il puisse contribuer à ce rôle. En d'autres termes, on croit que le transport d'iode à la membrane apicale des thyrocytes est loin d'être simple. En effet, il faudrait déjà comprendre le mécanisme du transport électroneutre observé, mais aussi envisager qu'il puisse dépendre d'un complexe protéique pas encore complètement connu.

À ce sujet, l'idée qu'une seule protéine soit responsable de l'efflux d'iode à la thyroïde a commencé à disparaître. En effet, l'analyse de l'inactivation du canal ClC5 suggère fortement qu'il agisse comme modulateur de la fonction ou de l'expression de la pendrine (Frank et al., 2008).

Si on ignore ce genre d'interaction de la part de SMCT1, Anzai et coll. (Anzai et al., 2006) ont fait une observation intéressante par rapport à sa capacité de former des complexes protéiques impliquant les célèbres motifs de liaison PDZ (pour PSD-95/SAP90, DLG, ZO-1).

En effet, les motifs de liaison PDZ (entre 80-90aa) sont des motifs de la structure protéique qui permettent la liaison des protéines contenant un domaine PDZ telles que celles appartenant aux familles NHERF et PDZK1. Bien que sa fonction ait été initialement liée avec l'échafaudage moléculaire des complexes multiprotéiques de signalisation, aujourd'hui sa fonction a été reconnue comme importante pour le ciblage, l'activation et l'interaction multiprotéique des transporteurs (Fanning and Anderson, 1999).

SMCT1 présente sur son extrémité C-terminale ce genre de motif, et il a été démontré que la protéine contenant un domaine PDZ, la PDZK1, peut se lier à celui-ci (Anzai et al., 2006). En effet, au même titre que SMCT1, plusieurs transporteurs appartenant à la famille *SLC*, tels que PEPT1, PEPT2, OAT4, OCTN1, OCTN2, OATP-A, OATP-B, présentent des motifs de liaison PDZK1 à l'extrémité carboxy-terminale. En plus, il est intéressant de constater que, comme SMCT1, la majorité de ces protéines s'expriment à la membrane apicale des épithélia tels que le rein ou l'intestin grêle. Cette localisation est partagée aussi pour les protéines PDZ soulignant l'impact de ces motifs dans le ciblage protéique ainsi que la formation des complexes protéiques (Kato et al., 2006).

En effet, la formation des complexes protéiques semble être un mécanisme de base pour le couplage fonctionnel des transporteurs. Par exemple, la fonction de NHE3 peut être modifiée à cause de l'activation du récepteur adrénergique B2. Il a été démontré que

l'interaction entre ces deux protéines est possible grâce à la formation d'un complexe protéique de ces motifs de liaison PDZ avec NHERF. Pourtant, NHERF n'est pas seulement nécessaire pour le lien physique, mais aussi pour que la régulation de NHE3 ait lieu (Short et al., 1998; Hall et al., 1998).

Par rapport à SMCT1, il a été suggéré que la liaison de son motif PDZ avec PDZK1 pourrait être impliquée dans le transport des urates au tubule proximal. En effet, comme on le mentionne dans la section «3.3.2 SMCT1 dans le rein», une des fonctions physiologiques de SMCT1 consiste en la génération d'un gradient anionique nécessaire pour le transport des urates effectué par URAT1. En effet, ceci serait accompli grâce à la capacité des deux transporteurs de se lier à PDZK1 formant un complexe multimoléculaire ou «urate transportosome» formé par au moins 5 protéines, les transporteurs des urates URAT1 et NaPiI, ainsi que SMCT1 et deux PDZK1 (Endou and Anzai, 2008).

Ainsi, si la capacité de SMCT1 d'interagir avec d'autres protéines via PDZK1 a été seulement envisagée dans le rein, on pense qu'il serait intéressant d'investiguer si le motif PDZ de SMCT1 a aussi une implication dans la formation d'un complexe protéique à la thyroïde.

De façon intéressante, la pendrine présente sur son extrémité carboxy-terminale un domaine STAS (*sulfate transporter and antisigma factor antagonist domain*). Si la fonction exacte de ce domaine n'est pas encore bien comprise, il a été suggéré qu'il pourrait aussi servir à des interactions protéiques à cause de sa capacité d'interagir avec le domaine régulateur de CFTR (Ko et al., 2002; Ko et al., 2004). En effet, il a été proposé que les transporteurs de sa famille, *Slc26*, ainsi que CFTR soient recrutés pour le complexe en se liant à des échafaudages contenant des domaines PDZ (Shcheynikov et al., 2006).

7) Perspectives

Ainsi, les perspectives de recherche sur ce sujet sont vastes. Non seulement le transport à la membrane apicale des thyrocytes est un processus complexe, mais aussi SMCT1 est une protéine récemment étudiée.

Notre étude a permis de mettre en évidence un possible transport électroneutre d'iode par SMCT1 en nous servant d'un moyen largement utilisé pour l'étude des protéines membranaires : des ovocytes de *Xenope*. Pourtant, s'il est clair que les ovocytes présentent beaucoup d'avantages dans l'analyse des systèmes de transport, ceci peut se compliquer à cause de plusieurs inconvénients. Parmi ceux-ci, on peut mentionner des variations saisonnières, des variations entre les différents donneurs, ainsi que la contamination du signal par un transport endogène.

À vrai dire, ces facteurs ont fait partie des problématiques de cette étude. Si on a démontré de différentes façons que le transport d'iode observé est dû à l'expression de SMCT1, il serait opportun de tester un autre modèle cellulaire exprimant SMCT1 afin de constater si le même type de transport d'iode y aurait aussi cours.

En effet, il est connu que des transporteurs et des canaux peuvent faire preuve d'une fonction altérée lorsqu'ils sont exprimés dans différents modèles cellulaires (Lesage et al., 1993; Yoshida et al., 2002). Un exemple pertinent pour notre étude est celui de la pendrine. Contrairement aux études faites sur des ovocytes de *Xenope* et sur des cellules d'insecte Sf9 où le transport d'iode résultant de l'expression de la pendrine est dépendent du Cl⁻ (Scott et al., 1999), ce n'est pas le cas lorsqu'on exprime la pendrine chez les cellules P-4J et FRTL-5 (Yoshida et al., 2002). De plus, l'affinité observée chez des ovocytes (~30uM) n'est pas du tout en accord avec celle proposée pour les cellules (1mM).

Par rapport à SMCT1, on ignore si les caractéristiques du transport d'iode observé chez des ovocytes pourraient être modifiées en utilisant un autre modèle cellulaire. Cependant, nous croyons indispensable de vérifier nos données à l'aide de cellules de mammifère.

Récemment, la lignée MDCK-SMCT1 (transfectant stable) nous a été offerte par la professeur Nancy Carrasco. Puisqu'à la différence des cellules en culture thyroïdiennes telles que les FRTL-5 (*functional rat thyroid cells*), ces cellules n'expriment pas des protéines thyroïdiennes telles que la pendrine, CIC5 et NIS, on pense qu'elles seront très utiles pour étudier la fonction de SMCT1 de façon indépendante.

À ce propos, il s'agirait premièrement de confirmer l'expression de SMCT1 en testant les cellules pour le transport des monocarboxylates, ou en réalisant des essais d'immunobuvardage comme des westerns blots. Puisque le transporteur MCT1 s'exprime de façon endogène, il faudrait l'inhiber en travaillant aux pH basiques ou en utilisant son inhibiteur spécifique CHC, à condition qu'il n'interfère pas avec la fonction de SMCT1.

Une fois que les caractéristiques de la lignée seront établies, le transport d'iode par SMCT1 pourrait être testé avec des essais de captation d'iode radioactif sur des cultures en plats de Pétri. Les caractéristiques immédiates à vérifier seront la dépendance du transport au Na^+ , ainsi que la saturabilité en iode et en Na^+ . Aussi il serait intéressant de vérifier la possibilité que le Na^+ externe affecte différemment l'influx et l'efflux d'iode.

Si un transport d'iode est observé, il serait intéressant de faire des essais sur des systèmes bicaméraux sur des cellules MDCK-SMCT1 cotransfectées avec NIS.

Pourtant, bien que ces deux modèles puissent donner une idée du transport de l'iode par SMCT1, dans le futur, d'autres études plus complexes seront nécessaires pour analyser d'autres aspects intéressants tels que l'interaction, la régulation et le mécanisme de toutes les protéines impliquées dans le processus. À ce moment, des cellules FRTL-5 ainsi que des cultures primaires de thyrocytes deviendront plus utiles. De plus, pour vérifier la

possible formation d'un complexe via les segments PDZ, il serait nécessaire de faire des essais de double hybride en levure.

En plus, il serait opportun d'analyser de façon plus approfondie les souris knockouts. En effet, l'analyse de la fonction de la thyroïde comme mesure de l'implication d'une protéine est un point utile et intéressant mais elle pourrait être complétée par une étude de l'expression des autres composants possibles du système.

Aussi pour saisir toute la portée de la fonction physiologique de SMCT1 à la thyroïde, il serait important d'analyser son implication dans le cancer de cette glande. En effet, on a observé une régulation sélective à la baisse (40 fois) de l'expression de SMCT1 sur des carcinomes papillaires thyroïdiens de forme classique (PTC-cf). Comme dans d'autres tissus, cette diminution de l'expression est due à l'hyperméthylation du promoteur du transporteur (Porra et al., 2005; Hu et al., 2006).

Alors que la pertinence de SMCT1 comme un suppresseur de tumeurs dans d'autres tissus tels que le côlon est immédiatement apparente en raison de la présence de concentrations élevées de butyrate dans la lumière du côlon, les mécanismes possibles par lesquels ce transporteur pourrait fonctionner comme un suppresseur de tumeurs dans la thyroïde ne sont pas immédiatement évidents. Pourtant, le fait que les expressions d'autres gènes spécifiques, y compris NIS (Venkataraman et al., 1999; Neumann et al., 2004), la pendrine (Xing et al., 2003a) et le récepteur de l'hormone stimulante de la thyroïde (TSHR) (Xing et al., 2003b), soient fortement diminuées dans le cancer de cette glande souligne la possible implication de SMCT1 dans la physiopathologie de ce système. Le transport d'iode observé par MCT1 constituera, évidemment, un autre sujet de recherche.

VII- CONCLUSION

Ce travail visait à analyser le possible transport d'iode électroneutre par SMCT1, un co-transporteur de Na^+ /monocarboxylates dont l'identification est relativement récente et dont la fonction à la thyroïde est jusqu'à présent très peu étudiée.

Les essais de captation d'iode radioactif réalisés sur des ovocytes de *Xenopus laevis* exprimant SMCT1, nous permettent de proposer que cette protéine présente un transport d'iode sensible à l'ibuprofène, non saturable en iode, mais sensible au Na^+ . Étant donné qu'un transport d'iode d'une telle amplitude n'a jamais été enregistré en électrophysiologie, on propose qu'il est électroneutre. Pourtant, le mécanisme qui couvre les caractéristiques du transport observé : l'électroneutralité, non-saturabilité et dépendance du Na^+ , n'est pas évident à identifier.

Ainsi, on propose deux hypothèses. La première suggère que la liaison du Na^+ permet à SMCT1 d'acquérir une conformation adéquate pour le transport d'iode moléculaire. D'autre part, la deuxième propose que SMCT1 transporte de l'iode sous la forme du NaI . L'analyse de l'affinité du transporteur pour le Na^+ serait nécessaire pour distinguer ces deux possibilités.

Finalement, on exclut que des artefacts, tels que la liaison à la membrane cellulaire, ou la surexpression des canaux chlore endogènes, soient les responsables du transport observé. En effet, le transport d'iode semble spécifique de SMCT1 et au transporteur des H^+ /monocarboxylates MCT1.

Si ce travail a permis de comprendre un peu plus sur le transport d'iode par SMCT1, il a également conduit à d'autres questions qui seraient intéressantes à résoudre. Il s'agirait premièrement de confirmer le transport ici observé sur un autre modèle cellulaire pour

ensuite comprendre le mécanisme que permettrait à SMCT1 de transporter l'iode de façon électroneutre, dépendant du Na^+ et non saturable. D'ailleurs, la possible interaction avec d'autres transporteurs, ainsi que la signifiante physiologique, et la contribution au fonctionnement de la thyroïde restent des sujets très vastes à analyser.

VIII- RÉFÉRENCES

Adams,S.S. (1992). The propionic acids: a personal perspective. *J. Clin. Pharmacol.* 32, 317-323.

Anderle,P., Sengstag,T., Mutch,D.M., Rumbo,M., Praz,V., Mansourian,R., Delorenzi,M., Williamson,G., and Roberts,M.A. (2005). Changes in the transcriptional profile of transporters in the intestine along the anterior-posterior and crypt-villus axes. *BMC. Genomics* 6, 69.

Andoh,A., Tsujikawa,T., and Fujiyama,Y. (2003). Role of dietary fiber and short-chain fatty acids in the colon. *Current Pharmaceutical Design* 9, 347-358.

Andros,G. and Wollman,S.H. (1967). Autoradiographic localization of radioiodide in the thyroid gland of the mouse. *Am. J. Physiol* 213, 198-208.

Anzai,N., Kanai,Y., and Endou,H. (2007). New insights into renal transport of urate. *Curr. Opin. Rheumatol.* 19, 151-157.

Anzai, N., Miyazaki, H., He, X., Kanai, Y., Miyauchi, S, and Ganapathy, V. Identification of the multivalent PDZ domain protein PDZK1 as a binding partner of sodium-monocarboxylate cotransporter 1 (SMCT1). *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 753A. 2006. Ref Type: Abstract

Attali,B., Guillemare,E., Lesage,F., Honore,E., Romey,G., Lazdunski,M., and Barhanin,J. (1993). The protein IsK is a dual activator of K⁺ and Cl⁻ channels. *Nature* 365, 850-852.

Barac-Nieto,M., Murer,H., and Kinne,R. (1980). Lactate-sodium cotransport in rat renal brush border membranes. *Am. J. Physiol* 239, F496-F506.

- Barbarat,B. and Podevin,R.A. (1988). Stoichiometry of the renal sodium-L-lactate cotransporter. *J. Biol. Chem.* *263*, 12190-12193.
- Baschieri,L., Benedetti,G., Deluca,F., And Negri,M. (1963). Evaluation and limitations of the perchlorate test in the study of thyroid function. *J. Clin. Endocrinol. Metab* *23*, 786-791.
- Bennett,K.L., Karpenko,M., Lin,M.T., Claus,R., Arab,K., Dyckhoff,G., Plinkert,P., Herpel,E., Smiraglia,D., and Plass,C. (2008). Frequently methylated tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* *68*, 4494-4499.
- Bidart, J. M., Mian,C., Lazar,V., Russo,D., Filetti,S., Caillou,B., and Schlumberger,M. (2000). Expression of pendrin and the Pendred syndrome (PDS) gene in human thyroid tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab* *85*, 2028-2033.
- Bizhanova, A. and Kopp,P. (2009). Minireview: The sodium-iodide symporter NIS and pendrin in iodide homeostasis of the thyroid. *Endocrinology* *150*, 1084-1090.
- Boron and Boulpaep (2003). *Medical Physiology*. (Saunders).
- Boron,W.F. and Boulpaep,E.L. (1983a). Intracellular pH regulation in the renal proximal tubule of the salamander. Basolateral. *J. Gen. Physiol* *81*, 53-94.
- Boron,W.F. and Boulpaep,E.L. (1983b). Intracellular pH regulation in the renal proximal tubule of the salamander. Na-H exchange. *J. Gen. Physiol* *81*, 29-52.
- Boron,W.F., Siebens,A.W., and Nakhoul,N.L. (1988). Role of monocarboxylate transport in the regulation of intracellular pH of renal proximal tubule cells. *Ciba Found. Symp.* *139*, 91-105.
- Christensen,E.I., Devuyst,O., Dom,G., Nielsen,R., Van der,S.P., Verroust,P., Leruth,M., Guggino,W.B., and Courtoy,P.J. (2003). Loss of chloride channel ClC-5 impairs endocytosis by defective trafficking of megalin and cubilin in kidney proximal tubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 8472-8477.

Coady,M.J., Chang,M.H., Charron,F.M., Plata,C., Wallendorff,B., Sah,J.F., Markowitz,S.D., Romero,M.F., and Lapointe,J.Y. (2004). The human tumour suppressor gene SLC5A8 expresses a Na⁺-monocarboxylate cotransporter. *J. Physiol* 557, 719-731.

Coady,M.J., Wallendorff,B., Bourgeois,F., Charron,F., and Lapointe,J.Y. (2007). Establishing a definitive stoichiometry for the Na⁺/monocarboxylate cotransporter SMCT1. *Biophys. J.* 93, 2325-2331.

Coady,M.J., Wallendorff,B., Bourgeois,F., and Lapointe,J.Y. (2010). Anionic leak currents through the Na⁺/monocarboxylate cotransporter SMCT1. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 298, C124-C131.

Coady,M.J., Wallendorff,B., Gagnon,D.G., and Lapointe,J.Y. (2002). Identification of a novel Na⁺/myo-inositol cotransporter. *J. Biol. Chem.* 277, 35219-35224.

Cook,S.I. and Sellin,J.H. (1998). Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 12, 499-507.

Craig F.N (1946). Renal tubular reabsorption, metabolic utilization and isomeric fractionation of lactic acid in the dog. *American Journal of Physiology* 146-159.

Dai,G., Levy,O., and Carrasco,N. (1996). Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 379, 458-460.

Dascal,N. (1987). The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit Rev. Biochem.* 22, 317-387.

De,l., V, Dohan,O., Levy,O., and Carrasco,N. (2000). Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology. *Physiol Rev.* 80, 1083-1105.

De,l., V, Ginter,C.S., and Carrasco,N. (2004). The Q267E mutation in the sodium/iodide symporter (NIS) causes congenital iodide transport defect (ITD) by decreasing the NIS turnover number. *J. Cell Sci.* 117, 677-687.

- Devuyst,O., Christie,P.T., Courtoy,P.J., Beauwens,R., and Thakker,R.V. (1999). Intra-renal and subcellular distribution of the human chloride channel, CLC-5, reveals a pathophysiological basis for Dent's disease. *Hum. Mol. Genet.* 8, 247-257.
- Dohan,O., De,l., V, Paroder,V., Riedel,C., Artani,M., Reed,M., Ginter,C.S., and Carrasco,N. (2003). The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr. Rev.* 24, 48-77.
- Dohan,O., Gavrielides,M.V., Ginter,C., Amzel,L.M., and Carrasco,N. (2002). Na⁺/I⁻ symporter activity requires a small and uncharged amino acid residue at position 395. *Mol. Endocrinol.* 16, 1893-1902.
- Dohan,O., Portulano,C., Basquin,C., Reyna-Neyra,A., Amzel,L.M., and Carrasco,N. (2007). The Na⁺/I⁻ symporter (NIS) mediates electroneutral active transport of the environmental pollutant perchlorate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 20250-20255.
- Dowland,L.K., Luyckx,V.A., Enck,A.H., Leclercq,B., and Yu,A.S. (2000). Molecular cloning and characterization of an intracellular chloride channel in the proximal tubule cell line, LLC-PK1. *J. Biol. Chem.* 275, 37765-37773.
- Dumont,J.N. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* 136, 153-179.
- Endou,H. and Anzai,N. (2008). Urate transport across the apical membrane of renal proximal tubules. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 27, 578-584.
- Eng,P.H., Cardona,G.R., Previti,M.C., Chin,W.W., and Braverman,L.E. (2001). Regulation of the sodium iodide symporter by iodide in FRTL-5 cells. *Eur. J. Endocrinol.* 144, 139-144.
- Eskandari,S., Loo,D.D., Dai,G., Levy,O., Wright,E.M., and Carrasco,N. (1997). Thyroid Na⁺/I⁻ symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity. *J. Biol. Chem.* 272, 27230-27238.

- Everett,L.A., Belyantseva,I.A., Noben-Trauth,K., Cantos,R., Chen,A., Thakkar,S.I., Hoogstraten-Miller,S.L., Kachar,B., Wu,D.K., and Green,E.D. (2001). Targeted disruption of mouse Pds provides insight about the inner-ear defects encountered in Pendred syndrome. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 153-161.
- Everett,L.A., Glaser,B., Beck,J.C., Idol,J.R., Buchs,A., Heyman,M., Adawi,F., Hazani,E., Nassir,E., Baxevanis,A.D., Sheffield,V.C., and Green,E.D. (1997). Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat. Genet.* *17*, 411-422.
- Everett,L.A., Morsli,H., Wu,D.K., and Green,E.D. (1999). Expression pattern of the mouse ortholog of the Pendred's syndrome gene (Pds) suggests a key role for pendrin in the inner ear. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 9727-9732.
- Fanning,A.S. and Anderson,J.M. (1999). PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane. *J. Clin. Invest* *103*, 767-772.
- Forster,I., Hernando,N., Biber,J., and Murer,H. (1998). The voltage dependence of a cloned mammalian renal type II Na⁺/Pi cotransporter (NaPi-2). *J. Gen. Physiol* *112*, 1-18.
- Frank,H., Groger,N., Diener,M., Becker,C., Braun,T., and Boettger,T. (2008). Lactaturia and loss of sodium-dependent lactate uptake in the colon of SLC5A8-deficient mice. *J. Biol. Chem.* *283*, 24729-24737.
- Ganapathy,V., Gopal,E., Miyauchi,S., and Prasad,P.D. (2005). Biological functions of SLC5A8, a candidate tumour suppressor. *Biochem. Soc. Trans.* *33*, 237-240.
- Ganapathy,V., Thangaraju,M., Gopal,E., Martin,P.M., Itagaki,S., Miyauchi,S., and Prasad,P.D. (2008). Sodium-coupled monocarboxylate transporters in normal tissues and in cancer. *AAPS. J.* *10*, 193-199.
- Gillam,M.P., Sidhaye,A.R., Lee,E.J., Rutishauser,J., Stephan,C.W., and Kopp,P. (2004). Functional characterization of pendrin in a polarized cell system. Evidence for pendrin-mediated apical iodide efflux. *J. Biol. Chem.* *279*, 13004-13010.

Golstein,P., Abramow,M., Dumont,J.E., and Beauwens,R. (1992). The iodide channel of the thyroid: a plasma membrane vesicle study. *Am. J. Physiol* 263, C590-C597.

Golstein,P.E., Sener,A., and Beauwens,R. (1995). The iodide channel of the thyroid. II. Selective iodide conductance inserted into liposomes. *Am. J. Physiol* 268, C111-C118.

Gopal,E., Fei,Y.J., Sugawara,M., Miyauchi,S., Zhuang,L., Martin,P., Smith,S.B., Prasad,P.D., and Ganapathy,V. (2004). Expression of slc5a8 in kidney and its role in Na(+)-coupled transport of lactate. *J. Biol. Chem.* 279, 44522-44532.

Gopal,E., Miyauchi,S., Martin,P.M., Ananth,S., Roon,P., Smith,S.B., and Ganapathy,V. (2007a). Transport of nicotinate and structurally related compounds by human SMCT1 (SLC5A8) and its relevance to drug transport in the mammalian intestinal tract. *Pharm. Res.* 24, 575-584.

Gopal,E., Umopathy,N.S., Martin,P.M., Ananth,S., Gnana-Prakasam,J.P., Becker,H., Wagner,C.A., Ganapathy,V., and Prasad,P.D. (2007b). Cloning and functional characterization of human SMCT2 (SLC5A12) and expression pattern of the transporter in kidney. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 2690-2697.

Grossman,T.R. and Nelson,N. (2003). Effect of sodium lithium and proton concentrations on the electrophysiological properties of the four mouse GABA transporters expressed in *Xenopus* oocytes. *Neurochem. Int.* 43, 431-443.

Grunstein,M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389, 349-352.

Guggino,S.E. and Aronson,P.S. (1985). Paradoxical effects of pyrazinoate and nicotinate on urate transport in dog renal microvillus membranes. *J. Clin. Invest* 76, 543-547.

Gunther,W., Luchow,A., Cluzeaud,F., Vandewalle,A., and Jentsch,T.J. (1998). ClC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 8075-8080.

- Gupta,N., Martin,P.M., Prasad,P.D., and Ganapathy,V. (2006). SLC5A8 (SMCT1)-mediated transport of butyrate forms the basis for the tumor suppressive function of the transporter. *Life Sciences* 78, 2419-2425.
- Halestrap,A.P. and Meredith,D. (2004). The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch.* 447, 619-628.
- Hall,R.A., Premont,R.T., Chow,C.W., Blitzer,J.T., Pitcher,J.A., Claing,A., Stoffel,R.H., Barak,L.S., Shenolikar,S., Weinman,E.J., Grinstein,S., and Lefkowitz,R.J. (1998). The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor to control Na⁺/H⁺ exchange. *Nature* 392, 626-630.
- Handler,J.S. and Kwon,H.M. (2001). Transcriptional regulation by changes in tonicity. *Kidney Int.* 60, 408-411.
- Hayden,L.J., Shagrin,J.M., and Young,J.A. (1970). Micropuncture investigation of the anion content of colloid from single rat thyroid follicles. A micromethod for the simultaneous determination of iodide and chloride in nanomole quantities. *Pflugers Arch.* 321, 173-186.
- He,L., Vasiliou,K., and Nebert,D.W. (2009). Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. *Hum. Genomics* 3, 195-206.
- Hediger,M.A., Romero,M.F., Peng,J.B., Rolfs,A., Takanaga,H., and Bruford,E.A. (2004). The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction. *Pflugers Arch.* 447, 465-468.
- Hildmann,B., Storelli,C., Haase,W., Barac-Nieto,M., and Murer,H. (1980). Sodium ion/L-lactate co-transport in rabbit small-intestinal brush-border-membrane vesicles. *Biochem. J.* 186, 169-176.

Hong,C., Maunakea,A., Jun,P., Bollen,A.W., Weiss,W.A., and Costello,J.F. (2004). Epigenetic mechanisms suppress the expression of SLC5A8, a tumor growth suppressor in human and mouse gliomas. *Neuro-Oncology* 6, 337.

Hu,S., Liu,D., Tufano,R.P., Carson,K.A., Rosenbaum,E., Cohen,Y., Holt,E.H., Kiseljak-Vassiliades,K., Rhoden,K.J., Tolaney,S., Condouris,S., Tallini,G., Westra,W.H., Umbricht,C.B., Zeiger,M.A., Califano,J.A., Vasko,V., and Xing,M. (2006). Association of aberrant methylation of tumor suppressor genes with tumor aggressiveness and BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *Int. J. Cancer* 119, 2322-2329.

Huwiler,M., Burgi,U., and Kohler,H. (1985). Mechanism of enzymatic and non-enzymatic tyrosine iodination. Inhibition by excess hydrogen peroxide and/or iodide. *Eur. J. Biochem.* 147, 469-476.

Ichida,K., Hosoyamada,M., Hisatome,I., Enomoto,A., Hikita,M., Endou,H., and Hosoya,T. (2004). Clinical and molecular analysis of patients with renal hypouricemia in Japan-influence of URAT1 gene on urinary urate excretion. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15, 164-173.

Iwanaga,T., Takebe,K., Kato,I., Karaki,S., and Kuwahara,A. (2006). Cellular expression of monocarboxylate transporters (MCT) in the digestive tract of the mouse, rat, and humans, with special reference to slc5a8. *Biomed. Res.* 27, 243-254.

Juel,C. and Halestrap,A.P. (1999). Lactate transport in skeletal muscle - role and regulation of the monocarboxylate transporter. *J. Physiol* 517 (Pt 3), 633-642.

Kato,Y., Watanabe,C., and Tsuji,A. (2006). Regulation of drug transporters by PDZ adaptor proteins and nuclear receptors. *Eur. J. Pharm. Sci.* 27, 487-500.

Kessler,J., Obinger,C., and Eales,G. (2008). Factors influencing the study of peroxidase-generated iodine species and implications for thyroglobulin synthesis. *Thyroid* 18, 769-774.

- Ko,S.B., Shcheynikov,N., Choi,J.Y., Luo,X., Ishibashi,K., Thomas,P.J., Kim,J.Y., Kim,K.H., Lee,M.G., Naruse,S., and Muallem,S. (2002). A molecular mechanism for aberrant CFTR-dependent HCO₃⁻ transport in cystic fibrosis. *EMBO J.* *21*, 5662-5672.
- Ko,S.B., Zeng,W., Dorwart,M.R., Luo,X., Kim,K.H., Millen,L., Goto,H., Naruse,S., Soyombo,A., Thomas,P.J., and Muallem,S. (2004). Gating of CFTR by the STAS domain of SLC26 transporters. *Nat. Cell Biol.* *6*, 343-350.
- Kopp,P., Pesce,L., and Solis-S JC (2008). Pendred syndrome and iodide transport in the thyroid. *Trends Endocrinol. Metab* *19*, 260-268.
- Kowdley,G.C., Ackerman,S.J., John,J.E., III, Jones,L.R., and Moorman,J.R. (1994). Hyperpolarization-activated chloride currents in *Xenopus* oocytes. *J. Gen. Physiol* *103*, 217-230.
- Kragh-Hansen,U., Jorgensen,K.E., and Sheikh,M.I. (1982). The use of potential-sensitive cyanine dye for studying ion-dependent electrogenic renal transport of organic solutes. Spectrophotometric measurements. *Biochem. J.* *208*, 359-368.
- Lacroix,L., Pourcher,T., Magnon,C., Bellon,N., Talbot,M., Intaraphairot,T., Caillou,B., Schlumberger,M., and Bidart,J.M. (2004). Expression of the apical iodide transporter in human thyroid tissues: a comparison study with other iodide transporters. *J. Clin. Endocrinol. Metab* *89*, 1423-1428.
- Lesage,F., Attali,B., Lakey,J., Honore,E., Romey,G., Faurobert,E., Lazdunski,M., and Barhanin,J. (1993). Are *Xenopus* oocytes unique in displaying functional IsK channel heterologous expression? *Receptors. Channels* *1*, 143-152.
- Levy,O., Dai,G., Riedel,C., Ginter,C.S., Paul,E.M., Lebowitz,A.N., and Carrasco,N. (1997). Characterization of the thyroid Na⁺/I⁻ symporter with an anti-COOH terminus antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 5568-5573.

Levy,O., Ginter,C.S., De,l, V, Levy,D., and Carrasco,N. (1998). Identification of a structural requirement for thyroid Na⁺/I⁻ symporter (NIS) function from analysis of a mutation that causes human congenital hypothyroidism. *FEBS Lett.* *429*, 36-40.

Li,H., Myeroff,L., Smiraglia,D., Romero,M.F., Pretlow,T.P., Kasturi,L., Lutterbaugh,J., Rerko,R.M., Casey,G., Issa,J.P., Willis,J., Willson,J.K.V., Plass,C., and Markowitz,S.D. (2003). SLC5A8, a sodium transporter, is a tumor suppressor gene silenced by methylation in human colon aberrant crypt foci and cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 8412-8417.

Lupton,J.R. (2004). Microbial degradation products influence colon cancer risk: the butyrate controversy. *J. Nutr.* *134*, 479-482.

Mager,S., Min,C., Henry,D.J., Chavkin,C., Hoffman,B.J., Davidson,N., and Lester,H.A. (1994). Conducting states of a mammalian serotonin transporter. *Neuron* *12*, 845-859.

Marine D and Feiss HO. The absorption of potassium iodide by perfused thyroid glands and some of the factors modifying it. *J.Pharmacol Exp Ther* *7*, 557-576.

Marino,M., Pinchera,A., McCluskey,R.T., and Chiovato,L. (2001). Megalin in thyroid physiology and pathology. *Thyroid* *11*, 47-56.

Martin,P.M., Dun,Y., Mysona,B., Ananth,S., Roon,P., Smith,S.B., and Ganapathy,V. (2007). Expression of the sodium-coupled monocarboxylate transporters SMCT1 (SLC5A8) and SMCT2 (SLC5A12) in retina. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* *48*, 3356-3363.

Martin,P.M., Gopal,E., Ananth,S., Zhuang,L., Itagaki,S., Prasad,B.M., Smith,S.B., Prasad,P.D., and Ganapathy,V. (2006). Identity of SMCT1 (SLC5A8) as a neuron-specific Na⁺-coupled transporter for active uptake of L-lactate and ketone bodies in the brain. *J. Neurochem.* *98*, 279-288.

Mengual,R., Schlageter,M.H., and Sudaka,P. (1990). Kinetic asymmetry of renal Na⁺-L-lactate cotransport. Characteristic parameters and evidence for a ping pong mechanism of the trans-stimulating exchange by pyruvate. *J. Biol. Chem.* 265, 292-299.

Miyauchi,S., Gopal,E., Fei,Y.J., and Ganapathy,V. (2004). Functional identification of SLC5A8, a tumor suppressor down-regulated in colon cancer, as a Na⁽⁺⁾-coupled transporter for short-chain fatty acids. *J. Biol. Chem.* 279, 13293-13296.

Mount,D.B., Kwon,C.Y., and Zandi-Nejad,K. (2006). Renal urate transport. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 32, 313-31, vi.

Neumann,S., Schuchardt,K., Reske,A., Reske,A., Emmrich,P., and Paschke,R. (2004). Lack of correlation for sodium iodide symporter mRNA and protein expression and analysis of sodium iodide symporter promoter methylation in benign cold thyroid nodules. *Thyroid* 14, 99-111.

Nilsson, M. Iodide efflux in primary culture porcine thyrocytes. Effets of extracellular Na⁺. 2007. Ref Type: Unpublished Work

Nilsson,M., Bjorkman,U., Ekholm,R., and Ericson,L.E. (1990). Iodide transport in primary cultured thyroid follicle cells: evidence of a TSH-regulated channel mediating iodide efflux selectively across the apical domain of the plasma membrane. *Eur. J. Cell Biol.* 52, 270-281.

Nilsson,M., Bjorkman,U., Ekholm,R., and Ericson,L.E. (1992). Polarized efflux of iodide in porcine thyrocytes occurs via a cAMP-regulated iodide channel in the apical plasma membrane. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 126, 67-74.

Nkondjock,A., Shatenstein,B., Maisonneuve,P., and Ghadirian,P. (2003). Specific fatty acids and human colorectal cancer: an overview. *Cancer Detection and Prevention* 27, 55-66.

- Park,J.Y., Helm,J.F., Zheng,W., Ly,Q.P., Hodul,P.J., Centeno,B.A., and Malafa,M.P. (2008). Silencing of the candidate tumor suppressor gene solute carrier family 5 member 8 (SLC5A8) in human pancreatic cancer. *Pancreas* 36, e32-e39.
- Park,J.Y., Zheng,W., Kim,D., Cheng,J.Q., Kumar,N., Ahmad,N., and Pow-Sang,J. (2007). Candidate tumor suppressor gene SLC5A8 is frequently down-regulated by promoter hypermethylation in prostate tumor. *Cancer Detect. Prev.* 31, 359-365.
- Paroder,V., Spencer,S.R., Paroder,M., Arango,D., Schwartz,S., Mariadason,J.M., Augenlicht,L.H., Eskandari,S., and Carrasco,N. (2006). Na⁺/monocarboxylate transport (SMCT) protein expression correlates with survival in colon cancer: Molecular characterization of SMCT. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 7270-7275.
- Plata,C., Sussman,C.R., Sindic,A., Liang,J.O., Mount,D.B., Josephs,Z.M., Chang,M.H., and Romero,M.F. (2007). Zebrafish Slc5a12 encodes an electroneutral sodium monocarboxylate transporter (SMCTn): A comparison to the electrogenic SMCT (SMCTe/Slc5a8). *J. Biol. Chem.*
- Porra,V., Ferraro-Peyret,C., Durand,C., Selmi-Ruby,S., Giroud,H., Berger-Dutrieux,N., Decaussin,M., Peix,J.L., Bournaud,C., Orgiazzi,J., Borson-Chazot,F., Dante,R., and Rousset,B. (2005). Silencing of the tumor suppressor gene SLC5A8 is associated with BRAF mutations in classical papillary thyroid carcinomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90, 3028-3035.
- Quentin,F., Chambrey,R., Trinh-Trang-Tan,M.M., Fysekidis,M., Cambillau,M., Paillard,M., Aronson,P.S., and Eladari,D. (2004). The Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger pendrin in the rat kidney is regulated in response to chronic alterations in chloride balance. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 287, F1179-F1188.
- Roch-Ramel,F. and Guisan,B. (1999). Renal Transport of Urate in Humans. *News Physiol Sci.* 14, 80-84.

Rodriguez,A.M., Perron,B., Lacroix,L., Caillou,B., Leblanc,G., Schlumberger,M., Bidart,J.M., and Pourcher,T. (2002). Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at the apical membrane of thyrocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 87, 3500-3503.

Royaux,I.E., Suzuki,K., Mori,A., Katoh,R., Everett,L.A., Kohn,L.D., and Green,E.D. (2000). Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. *Endocrinology* 141, 839-845.

Royaux,I.E., Wall,S.M., Karniski,L.P., Everett,L.A., Suzuki,K., Knepper,M.A., and Green,E.D. (2001). Pendrin, encoded by the Pendred syndrome gene, resides in the apical region of renal intercalated cells and mediates bicarbonate secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 4221-4226.

Scott,D.A., Wang,R., Kreman,T.M., Sheffield,V.C., and Karniski,L.P. (1999). The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nat. Genet.* 21, 440-443.

Sengupta,S., Muir,J.G., and Gibson,P.R. (2006). Does butyrate protect from colorectal cancer? *J. Gastroenterol. Hepatol.* 21, 209-218.

Shcheynikov,N., Ko,S.B., Zeng,W., Choi,J.Y., Dorwart,M.R., Thomas,P.J., and Muallem,S. (2006). Regulatory interaction between CFTR and the SLC26 transporters. *Novartis. Found. Symp.* 273, 177-186.

Short,D.B., Trotter,K.W., Reczek,D., Kreda,S.M., Bretscher,A., Boucher,R.C., Stutts,M.J., and Milgram,S.L. (1998). An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 273, 19797-19801.

Siebens,A.W. and Boron,W.F. (1987). Effect of electroneutral luminal and basolateral lactate transport on intracellular pH in salamander proximal tubules. *J. Gen. Physiol* 90, 799-831.

Siebens,A.W. and Boron,W.F. (1989a). Depolarization-induced alkalization in proximal tubules. I. Characteristics and dependence on Na⁺. *Am. J. Physiol* 256, F342-F353.

Siebens,A.W. and Boron,W.F. (1989b). Depolarization-induced alkalization in proximal tubules. II. Effects of lactate and SITS. *Am. J. Physiol* 256, F354-F365.

Siebens,A.W. and Boron,W.F. (1989c). Depolarization-induced alkalization in proximal tubules. II. Effects of lactate and SITS. *Am. J. Physiol* 256, F354-F365.

Smanik,P.A., Ryu,K.Y., Theil,K.S., Mazzaferri,E.L., and Jhiang,S.M. (1997). Expression, exon-intron organization, and chromosome mapping of the human sodium iodide symporter. *Endocrinology* 138, 3555-3558.

Sonders,M.S., Zhu,S.J., Zahniser,N.R., Kavanaugh,M.P., and Amara,S.G. (1997). Multiple ionic conductances of the human dopamine transporter: the actions of dopamine and psychostimulants. *J. Neurosci.* 17, 960-974.

Srinivas,S.R., Gopal,E., Zhuang,L., Itagaki,S., Martin,P.M., Fei,Y.J., Ganapathy,V., and Prasad,P.D. (2005). Cloning and functional identification of slc5a12 as a sodium-coupled low-affinity transporter for monocarboxylates (SMCT2). *Biochem. J.* 392, 655-664.

Takebe,K., Nio,J., Morimatsu,M., Karaki,S.I., Kuwahara,A., Kato,I., and Iwanaga,T. (2005). Histochemical demonstration of a Na⁺-coupled transporter for short-chain fatty acids (Slc5a8) in the intestine and kidney of the mouse. *Biomedical Research-Tokyo* 26, 213-221.

Thangaraju,M., Ananth,S., Martin,P.M., Roon,P., Smith,S.B., Sterneck,E., Prasad,P.D., and Ganapathy,V. (2006a). *c/ebpdelta* Null mouse as a model for the double knock-out of slc5a8 and slc5a12 in kidney. *J. Biol. Chem.* 281, 26769-26773.

Thangaraju,M., Cresci,G., Itagaki,S., Mellinger,J., Browning,D.D., Berger,F.G., Prasad,P.D., and Ganapathy,V. (2008). Sodium-coupled transport of the short chain fatty

acid butyrate by SLC5A8 and its relevance to colon cancer. *J. Gastrointest. Surg.* *12*, 1773-1781.

Thangaraju,M., Gopal,E., Martin,P.M., Ananth,S., Smith,S.B., Prasad,P.D., Sterneck,E., and Ganapathy,V. (2006b). SLC5A8 triggers tumor cell apoptosis through pyruvate-dependent inhibition of histone deacetylases. *Cancer Res.* *66*, 11560-11564.

Tran,N., Valentin-Blasini,L., Blount,B.C., McCuiston,C.G., Fenton,M.S., Gin,E., Salem,A., and Hershman,J.M. (2008). Thyroid-stimulating hormone increases active transport of perchlorate into thyroid cells. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* *294*, E802-E806.

Turk,E., Zabel E, Mundlos S, Dyer J, and Wright,E.M. (1991). Glucose/galactose malabsorption caused by a defect in the Na⁺/glucose cotransporter. *Nature* 354-356.

Tzounopoulos,T., Maylie,J., and Adelman,J.P. (1995). Induction of endogenous channels by high levels of heterologous membrane proteins in *Xenopus* oocytes. *Biophys. J.* *69*, 904-908.

Ueno,M., Toyota,M., Akino,K., Suzuki,H., Kusano,M., Satoh,A., Mita,H., Sasaki,Y., Nojima,M., Yanagihara,K., Hinoda,Y., Tokino,T., and Imai,K. (2004). Aberrant methylation and histone deacetylation associated with silencing of SLC5A8 in gastric cancer. *Tumour. Biol.* *25*, 134-140.

Umbach,J.A., Coady,M.J., and Wright,E.M. (1990). Intestinal Na⁺/glucose cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes is electrogenic. *Biophys. J.* *57*, 1217-1224.

van den Hove,M.F., Croizet-Berger,K., Jouret,F., Guggino,S.E., Guggino,W.B., Devuyst,O., and Courtoy,P.J. (2006). The loss of the chloride channel, ClC-5, delays apical iodide efflux and induces a euthyroid goiter in the mouse thyroid gland. *Endocrinology* *147*, 1287-1296.

- Venkataraman,G.M., Yatin,M., Marcinek,R., and Ain,K.B. (1999). Restoration of iodide uptake in dedifferentiated thyroid carcinoma: relationship to human Na⁺/I-symporter gene methylation status. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 84, 2449-2457.
- Wang,S.S., Devuyst,O., Courtoy,P.J., Wang,X.T., Wang,H., Wang,Y., Thakker,R.V., Guggino,S., and Guggino,W.B. (2000). Mice lacking renal chloride channel, CLC-5, are a model for Dent's disease, a nephrolithiasis disorder associated with defective receptor-mediated endocytosis. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2937-2945.
- Wangemann,P., Kim,H.M., Billings,S., Nakaya,K., Li,X., Singh,R., Sharlin,D.S., Forrest,D., Marcus,D.C., and Fong,P. (2009). Developmental delays consistent with cochlear hypothyroidism contribute to failure to develop hearing in mice lacking Slc26a4/pendrin expression. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 297, F1435-F1447.
- Waugh,W.H. (1974). Effect of chloride on p-aminohippurate analyses by the Bratton-Marshall method. *J. Appl. Physiol* 37, 752-755.
- Weber,W.M. (1999). Endogenous ion channels in oocytes of xenopus laevis: recent developments. *J. Membr. Biol.* 170, 1-12.
- Whiteley,L.O., Purdon,M.P., Ridder,G.M., and Bertram,T.A. (1996). The interactions of diet and colonic microflora in regulating colonic mucosal growth. *Toxicologic Pathology* 24, 305-314.
- Wolff,J. (2005). What is the role of pendrin? *Thyroid* 15, 346-348.
- Wong,J.M.W., de Souza,R., Kendall,C.W.C., Emam,A., and Jenkins,D.J.A. (2006). Colonic health: Fermentation and short chain fatty acids. *Journal of Clinical Gastroenterology* 40, 235-243.
- Wright,E.M., Hirayama,B.A., and Loo,D.F. (2007). Active sugar transport in health and disease. *J. Intern. Med.* 261, 32-43.

- Wright,E.M., Hirsch,J.R., Loo,D.D., and Zampighi,G.A. (1997). Regulation of Na⁺/glucose cotransporters. *J. Exp. Biol.* *200*, 287-293.
- Wright,E.M., Loo,D.D., Hirayama,B.A., and Turk,E. (2004). Surprising versatility of Na⁺-glucose cotransporters: SLC5. *Physiology (Bethesda)* *19*, 370-376.
- Wright,E.M. and Turk,E. (2004). The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflugers Arch.* *447*, 510-518.
- Xing,M. (2007). Gene methylation in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology* *148*, 948-953.
- Xing,M., Tokumaru,Y., Wu,G., Westra,W.B., Ladenson,P.W., and Sidransky,D. (2003a). Hypermethylation of the Pendred syndrome gene SLC26A4 is an early event in thyroid tumorigenesis. *Cancer Res.* *63*, 2312-2315.
- Xing,M., Usadel,H., Cohen,Y., Tokumaru,Y., Guo,Z., Westra,W.B., Tong,B.C., Tallini,G., Udelsman,R., Califano,J.A., Ladenson,P.W., and Sidransky,D. (2003b). Methylation of the thyroid-stimulating hormone receptor gene in epithelial thyroid tumors: a marker of malignancy and a cause of gene silencing. *Cancer Res.* *63*, 2316-2321.
- Yanase,H., Takebe,K., Nio-Kobayashi,J., Takahashi-Iwanaga,H., and Iwanaga,T. (2008). Cellular expression of a sodium-dependent monocarboxylate transporter (Slc5a8) and the MCT family in the mouse kidney. *Histochem. Cell Biol.* *130*, 957-966.
- Yoshida,A., Hisatome,I., Taniguchi,S., Sasaki,N., Yamamoto,Y., Miake,J., Fukui,H., Shimizu,H., Okamura,T., Okura,T., Igawa,O., Shigemasa,C., Green,E.D., Kohn,L.D., and Suzuki,K. (2004). Mechanism of iodide/chloride exchange by pendrin. *Endocrinology* *145*, 4301-4308.
- Yoshida,A., Sasaki,N., Mori,A., Taniguchi,S., Mitani,Y., Ueta,Y., Hattori,K., Sato,R., Hisatome,I., Mori,T., Shigemasa,C., and Kosugi,S. (1997). Different electrophysiological character of I⁻, ClO₄⁻, and SCN⁻ in the transport by Na⁺/I⁻ symporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *231*, 731-734.

Yoshida,A., Taniguchi,S., Hisatome,I., Royaux,I.E., Green,E.D., Kohn,L.D., and Suzuki,K. (2002). Pendrin is an iodide-specific apical porter responsible for iodide efflux from thyroid cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 87, 3356-3361.

Young,G.P. and Le Leu,R.K. (2004). Resistant starch and colorectal neoplasia. *Journal of Aoac International* 87, 775-786.

