

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

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

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

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

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

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

Université de Montréal

**Étude du transport ionique membranaire par la mesure de concentration dans le
microenvironnement externe de la membrane : mise au point de la technique du
« piège ionique »**

par

Maxime Blanchard

Département de physique
Faculté des arts et sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)
en physique
option biophysique et physiologie moléculaire

Novembre 2007

© Maxime Blanchard, 2007



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
**Étude du transport ionique membranaire par la mesure de concentration dans le
microenvironnement externe de la membrane : mise au point de la technique du
« piège ionique »**

présenté par :
Maxime Blanchard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Raynald Laprade..... président-rapporteur
Jean-Yves Lapointe.....directeur de recherche
Rikard Blunck.....membre du jury

Résumé

L'étude de l'activité des protéines de transport membranaire a traditionnellement recours à l'électrophysiologie et/ou à la de captation de substrats radioactifs. Nous proposons une nouvelle technique permettant l'étude des protéines de transport membranaire en condition pré-stationnaire ($t \sim 20$ ms) et/ou stationnaire ($t \geq 1$ s). Cette nouvelle approche se base sur l'utilisation d'électrodes sélectives à large diamètre (20-100 μm) déposées à la surface d'ovocytes de grenouille *Xenopus laevis* pouvant être en condition de voltage imposé. Des changements de concentration ionique, générés par l'activité de protéines de transport sont alors mesurés dans un espace créé entre l'électrode sélective et les invaginations de la membrane plasmique : « le piège ionique ». La combinaison de la faible impédance de l'électrode sélective et d'un petit volume de détection permet l'obtention d'une excellente sensibilité : un changement de concentration de 0.04%, par rapport au milieu ambiant, peut-être détecté avec confiance. Nous appliquons cette approche à l'étude du cotransporteur Na^+ /glucose (SGLT1) et montrons que l'électrode sélective est en mesure de détecter les changements de concentration ionique à l'équilibre ($t > 20$ s) et les changements de concentration dus à la réorientation du transporteur dans la membrane ($t < 150$ ms). Nous présentons une série d'expériences contrôle, une analyse du niveau de bruit et discutons de l'application possible de cette technique à l'étude du mécanisme de transport de plusieurs types de transporteurs membranaires. Cette nouvelle approche se distingue par sa résolution temporelle, sa sensibilité et par la possibilité de l'appliquer à l'étude de l'activité de transporteurs électroneutres.

Mots-clés : électrophysiologie, électrodes sélectives, électroneutre, électrogénique, cotransporteurs,

Abstract

The study of membrane transporters generally relies on electrophysiology and/or on radioactive uptake experiments. We propose a new experimental approach which makes possible the measurement of transport activities in both transient ($t \sim 20$ ms) and/or steady state ($t > 1$ s) conditions. To achieve this goal, a large diameter ion-selective electrode (20-100 μm) is pushed against the surface of a *Xenopus laevis* frog oocyte which may be in voltage-clamp condition. The changes in ionic concentration associated with the transport activity of transport proteins are then measured in a restricted space between the ion-selective electrode and the plasma membrane invaginations: “the ion-trap”. The combination of low impedance of the ion-selective electrode and this small volume yields an excellent sensitivity: a 0.04% change in ion concentration, with respect to the ionic background, can be reliably detected. We apply this approach to the study of the Na^+ /glucose cotransporter (SGLT1) and we show that it can detect the ionic concentration changes, associated with the reorientation of the transporter ($t < 150$ ms), and the ionic concentration changes associated with the steady-state activity of the protein ($t > 20$ s). We introduce a series of control experiments, an electrical noise level analysis and we discuss the potential application of the method to the study of other transporter mechanisms. This novel approach is characterized by its excellent time resolution, its sensitivity and the possibility of its application to the study of electroneutral transporter activities.

Keywords: electrophysiology, ion-selective electrodes, electroneutral, electrogenic, cotransporters,

Table des matières

Résumé.....	iv
Abstract.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	x
Remerciements.....	xiii
1. Introduction.....	1
1.1. Les cotransporteurs ioniques : présentation et problématiques.....	3
1.1.1. Le courant de fuite.....	8
1.1.2. La conductance non couplée.....	9
1.1.3. Les courants transitoires.....	11
1.2. Techniques expérimentales d'étude des protéines membranaires.....	20
1.2.1. La captation de substrat radioactif.....	20
1.2.2. L'électrophysiologie.....	20
1.2.3. Les changements de fluorescence.....	23
1.2.4. La volumétrie.....	23
1.2.5. Les électrodes sélectives.....	24
1.3. La diffusion.....	31
1.4. Le cotransporteur sodium glucose (SGLT1).....	33
2. Matériel et méthodes.....	39
2.1. Ovocytes de grenouille <i>Xenopus laevis</i>	39
2.2. Solutions.....	39
2.3. Électrophysiologie : appareillage et protocoles.....	40
2.4. Enregistrement du signal sélectif.....	41
2.4.1. Fabrication de l'électrode sélective de grand diamètre.....	41
2.4.2. Résines utilisées et solutions de référence.....	43
2.4.3. Système d'enregistrement.....	43
2.4.4. Procédure expérimentale.....	44
2.4.5. Filtration du signal.....	45
2.4.6. Correction des mesures pré-stationnaires.....	46
2.4.7. Analyse du bruit électrique.....	47
3. Measuring ion transport activities in <i>Xenopus</i> oocytes using the Ion-Trap <i>technique</i>	48

3.1.	Abstract	48
3.2.	Introduction	49
3.3.	Materials and methods.....	50
3.3.1.	Ion-selective electrode fabrication	50
3.3.2.	Oocyte preparation	50
3.3.3.	Solutions.....	51
3.3.4.	Recording circuitry	51
3.3.5.	Pulse protocols and data analysis.....	52
3.4.	Results	53
3.4.1.	Steady-state concentration measurements.....	53
3.4.2.	Fast $\Delta[\text{Na}^+]_{\text{T}}$ measurements	55
3.4.3.	Fast $\Delta\text{pH}_{\text{T}}$ measurement.....	57
3.4.4.	Control experiments	58
3.5.	Discussion	59
3.5.1.	Detection limits	59
3.5.2.	Steady-state measurements	59
3.5.3.	Initial rate measurements	60
3.5.4.	Advantages and limitations of the Ion-Trap technique.....	62
3.6.	Conclusion.....	64
3.7.	Bibliography	65
3.8.	Figure legends	67
4.	Discussion	76
4.1.	Analyse du niveau de bruit électrique.....	76
4.2.	Mesure de l'activité de transport électroneutre.....	77
4.3.	Mesures de changements de concentration pré-stationnaires – Application à l'étude du mécanisme de fonctionnement des cotransporteurs ioniques.....	78
4.4.	Performance de la technique du piège ionique	81
5.	Conclusion et perspectives.....	84
	Appendice 1	85

Liste des tableaux

Tableau I. Valeurs de coefficients de diffusion dans l'eau pour quelques éléments.....	31
Tableau II. Composition des solutions	40
Tableau III. Caractéristiques des résines sélectives	43

Liste des figures

Figure 1. Mécanisme de fonctionnement du transporteur AcrB	5
Figure 2. Illustration du mécanisme de fonctionnement de la lactose perméase	6
Figure 3. Le transporteur AmtB présentant une structure de type canal ionique.....	6
Figure 4. Mécanisme de fonctionnement du transporteur de glutamate EAAC1	7
Figure 5. Mécanismes de transport déduits à partir de structures cristallines.....	8
Figure 6. Le transporteur de sérotonine SERT (propriétés de canal ionique).....	11
Figure 7. Courants transitoires dans le cotransporteur neuronal rGAT1	12
Figure 8. Circuit équivalent du cotransporteur rGAT1	14
Figure 9. Modèle de transport à accès alterné proposé pour SGLT1	16
Figure 10. Deux modèles de courants transitoires	18
Figure 11. Modèle d'extraction à l'interface solution/membrane	26
Figure 12. Modèle de type Donnan.....	28
Figure 13. Expérience de spectropotentiométrie.....	30
Figure 14. Dépendance au sodium du transporteur SGLT1 de lapin (rSGLT1).....	34
Figure 15. Données fonctionnelles de hSGLT1	35
Figure 16. Dépendance de la constante de temps des courants transitoires (τ) à la concentration extracellulaire de sodium.....	37
Figure 17. Une électrode sélective prête à l'emploi	42
Figure 18. Correction pré-pulse	46
Figure 19 (1)	70
Figure 20 (2)	71
Figure 21 (3)	72
Figure 22 (4)	73
Figure 23 (5)	74
Figure 24 (6)	75

Liste des abréviations

3D	tridimensionnelle
5-HT	sérotonine
AcrB	exportateur de drogues chez E. Coli.
ADN	acide déoxyribonucléique
Ag ⁺	ion argent
Ag ⁰	forme neutre de l'ion d'argent
AmtB	transporteur de NH ₃ et de NH ₄ ⁺
αMG	α-methyl-glucose
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
Ba ²⁺	ion baryum
BGT-1	transporteur de bétaïne
Ca ²⁺	ion calcium
Cd ²⁺	ion cadmium
Cl ⁻	ion chlore
CO ₃ ²⁻	carbonate
Cs ⁻	ion césium
Cu ²⁺	ion cuivre
DCT1	Transporteur de cations divalents
EAAT	transporteur d'acides aminés excitants
E. Coli.	Escherichia Coli
E _{ion}	signal potentiométrique d'un ion
E _{ref}	lecture de l'électrode de référence
E _{selectif}	lecture de l'électrode sélective
GABA	γ-aminobutyric acid (acide γ-aminobutyrique)
GAT	transporteur de GABA
GAT1	transporteur de GABA
Glt _{ph}	transporteur de glutamate

H ⁺	ion proton
HEPES	tampon
HMIT	transporteur de myo-inositol
hSGL1	isoforme humain du transporteur sodium glucose SGLT1
I _m	courant transmembranaire
ISE	ion-selective electrode (électrode selective)
ISM	ion-selective membrane (membrane sélective aux ions)
IV	courant-voltage
K ⁺	ion potassium
K _m	constante de Michaelis
KAAT1	transporteur d'acides aminés
KCl	chlorure de potassium
LacP	lactose permease
LacY	gène codant pour LacP
Li ⁺	ion lithium
MES	tampon, acide 2-(N-morpholino)ethanesulfonique
Mg ²⁺	ion magnésium
myc	épithope de marquage
myc-hSGLT1	transporteur humain de sodium glucose marqué avec myc
Na ⁺	ion sodium
NaCl	chlorure de sodium
NCX	échangeur sodium calcium
NH ₃	amoniac
NH ₄ ⁺	ammonium
NIS	symporteur Na ⁺ /I ⁻
NMDG	N-methyl-D-glucamine
NO ₂ ⁻	dioxyde d'azote
NO ₃ ⁻	nitrate
Pb ²⁺	ion plomb
Pz	phlorizine
Q	charge transferee

Q_{\max}	charge transférée maximale
Q_{in}	charge transférée à une position intérieure
Q-V	courbe charge transférée en fonction du voltage
ρ	pende de l'électrode sélective
Rb^+	ion rubidium
rGAT1	isoforme du lapin du transporteur de GABA GAT
rSGLT1	isoforme du lapin du transporteur SGLT1
SGLT1	transporteur sodium glucose
SIMS	analyse de composition d'un solide par bombardement
ionique	
SMF	famille des transporteurs d'ions métalliques
Sr^{2+}	ion strontium
Ti^+	ion titanium
TRIS	tampon : trishydroxyméthylaminométhane
UO_2^{2+}	dioxyde d'uranium
V_{ion}	signal sélectif
V_m	voltage transmembranaire
V_{ref}	signal de l'électrode de référence locale

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma conjointe Isabelle et ma famille pour leur support sans bornes.

Puis, je tiens à remercier mon directeur de recherche, Jean-Yves Lapointe, sans qui ces deux années auraient pu être beaucoup plus éprouvantes, pour sa très grande disponibilité, son sens du raisonnement, son perfectionnisme et pour m'avoir amené à deux congrès. Je tiens à remercier Jean-Philippe, Dominique et les deux François pour les discussions stimulantes sur mon projet et sur le transport membranaire en général. Sincères remerciements à monsieur X.Z. Chen pour une suggestion importante ayant fait avancer le projet. Bernadette qui a répondu à toutes mes questions et pour la bonne humeur contagieuse qu'elle dégage. Merci à Michel pour le soutien technique lorsque le montage avait des ennuis. Julie pour le soin des grenouilles et pour m'avoir laissé utiliser son four à de multiples reprises. Mike pour la correction de mes posters en anglais. Aux professeurs des cours PSL pour leur excellent enseignement.

1. Introduction

Les ions, lorsqu'ils sont en solution, sont entourés d'une couche de molécules d'eau qui ont leur dipôle orienté de façon à stabiliser l'ion. Pour traverser la membrane biologique, fortement hydrophobe, les ions doivent donc se départir de ce *manteau* d'eau. Cette déshydratation est énergétiquement défavorable et c'est pourquoi la membrane biologique constitue une barrière très importante à la diffusion de toutes les espèces chargées ou polaires. Sans l'assistance des protéines de transport membranaire, l'échange de métabolites entre la cellule et son environnement serait fortement limité par une faible diffusion passive.

Les protéines de transport membranaire, amphiphiles, s'enchâssent dans la membrane et ouvrent la voie au passage transmembranaire de substrats chargés, polaires ou neutres. Le développement d'une approche expérimentale permettant l'étude du mécanisme de fonctionnement d'une classe de protéines de transport membranaire, les cotransporteurs ioniques, forme le principal sujet d'étude du présent travail. Un cotransporteur ionique est une protéine transmembranaire permettant le transport d'un substrat, contre son gradient de concentration, à l'aide du gradient électrochimique d'un ion. Jusqu'à l'apparition de structures cristallines de certains cotransporteurs ioniques (Murakami *et al.* 2002), le mécanisme moléculaire de transport était très peu connu et était surtout déduit d'études fonctionnelles produites dans diverses conditions ioniques et à l'aide de divers mutants. Citons, comme exemple célèbre d'une telle approche, le travail du groupe de H.R. Kaback ayant produit, sur quelques années, un modèle moléculaire complet du symporteur de lactose, la *lactose permease* (LacP), en procédant à la mutation, en cystéine, de tous les acides aminés de la protéine (Frillingos *et al.* 1998; Kaback *et al.* 2001). Cette approche par mutagenèse dirigée à large échelle est très puissante, mais requiert plusieurs années de travail expérimental et d'analyse. Les cotransporteurs ioniques étant complexes à cristalliser, ce type d'approche doit toujours être utilisé pour déterminer le mécanisme moléculaire de la majorité des cotransporteurs ioniques.

Les cotransporteurs ioniques électrogéniques produisent du courant et sont généralement sensibles au voltage transmembranaire. La majorité des cotransporteurs ioniques présente, en absence de leur substrat, des courants transitoires associés à des changements de conformation électrogéniques faisant partie du cycle de cotransport : liaison d'un ion devant traverser une fraction du champ électrique membranaire, translocation dépendante du voltage d'un segment protéinique chargé ou une combinaison de ces deux phénomènes (Peres *et al.* 2004). Ces courants transitoires sont mis à jour par une technique électrophysiologique permettant de modifier très rapidement le potentiel transmembranaire et d'enregistrer le courant résultant. Plusieurs modèles ont été proposés pour décrire ces courants. Ils reproduisent généralement très bien les résultats expérimentaux mais ne permettent pas de prouver avec certitude le mécanisme moléculaire de fonctionnement d'un cotransporteur. Dans ces circonstances, une approche expérimentale permettant de déterminer directement le rôle d'un ion pourrait aider à discriminer ces différents modèles. Plusieurs techniques expérimentales existent, mais aucune n'est en mesure de déterminer directement la dépendance ionique des étapes partielles du cycle de cotransport. À l'heure actuelle, pour y arriver, l'expérimentateur doit procéder à des substitutions d'ions ou à des mutations. Ces méthodes sont très efficaces, mais le danger d'affecter un processus biologique connexe est très grand.

Plusieurs cotransporteurs ioniques, dont beaucoup sont des transporteurs de neurotransmetteurs, présentent une conductance non couplée au transport du substrat. Ces courants seraient dus à la diffusion passive d'ions, à travers le cotransporteur, en absence du substrat. Ce mécanisme utiliserait certaines des réactions du mécanisme de cotransport ou suivraient un chemin de type « canal ionique » ou « pore » (DeFelice *et al.* 2007). À l'heure actuelle, il est très complexe de déterminer la dépendance ionique de ce transport non couplé. Une technique permettant la détection directe, sans altération des conditions ioniques, d'un flux non couplé viendrait faciliter la caractérisation de tels mécanismes.

Nous présentons ici le développement d'une approche expérimentale basée sur l'utilisation d'électrodes sélectives à large diamètre (20-100 μm), permettant l'étude directe du niveau d'implication d'une classe d'ion dans le mécanisme de transport des cotransporteurs ioniques exprimés dans les ovocytes de *Xenopus laevis*. Afin d'évaluer la performance de cette approche, le cotransporteur Na^+ /glucose (SGLT1), relativement bien connu du point de vue fonctionnel, est utilisé. Son activité ionique est étudiée à l'aide d'électrodes sélective au Na^+ et au H^+ dans diverses conditions expérimentales. Nous montrons que la technique du piège ionique est en mesure de détecter les changements de concentration associés à la réorientation du cotransporteur lors d'un pulse de voltage et qu'elle est en mesure d'être appliquée à l'étude des transporteurs électroneutres. Bien que l'application d'électrodes sélectives à l'étude de protéines de transport membranaire ne soit pas un fait nouveau (Nicholson *et al.* 1977; Levy *et al.* 1987; Oakley 1987; Danker *et al.* 1996; Kang *et al.* 2003), cette nouvelle approche se distingue par sa très bonne résolution temporelle permettant la détection de changements de concentration ionique causés par une étape intermédiaire dans le cycle de cotransport d'un cotransporteur ionique et par la possibilité de son application à l'étude du transport électroneutre de faible amplitude.

Débutons cette introduction par un bref survol des cotransporteurs ioniques et des mécanismes proposés pour décrire leur fonctionnement. Nous poursuivrons en décrivant les techniques expérimentales utilisées pour l'étude de ces mécanismes. Puis, nous discuterons plus en profondeur des particularités du cotransporteur Na^+ /glucose SGLT1 et nous aborderons quelques concepts sur la diffusion en solution.

1.1. Les cotransporteurs ioniques : présentation et problématiques

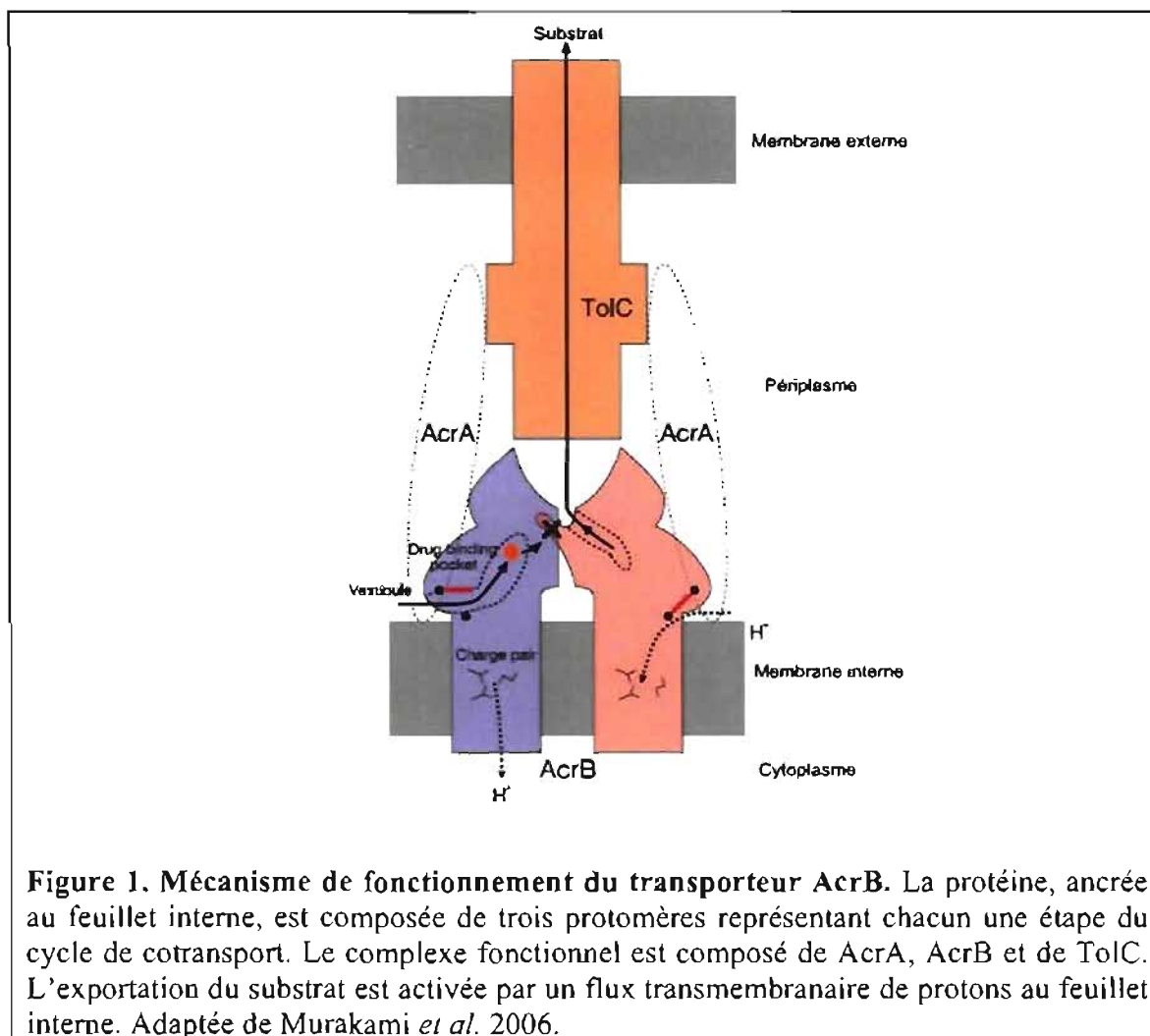
Les cotransporteurs ioniques forment une classe de protéines de transport membranaire utilisant le gradient électrochimique d'un ion pour transporter, contre leur gradient de concentration, différents substrats: acides aminés, osmolites, neurotransmetteurs, sucres, peptides, ions et nucléotides. Le modèle classique du mécanisme de cotransport, nommé « accès alterné », suggère la liaison de(s) l'ion(s) suivie d'un changement de conformation permettant la liaison du substrat. Le complexe

ion(s)/substrat subit alors un important changement de conformation permettant la translocation du substrat et de(s) l'ion(s) de l'autre côté de la membrane. L'inhibition moléculaire d'un cotransporteur ionique se produirait lors de la liaison d'un analogue du substrat ayant la particularité de ne pouvoir être transporté au travers de la membrane, ce qui rend la protéine non fonctionnelle.

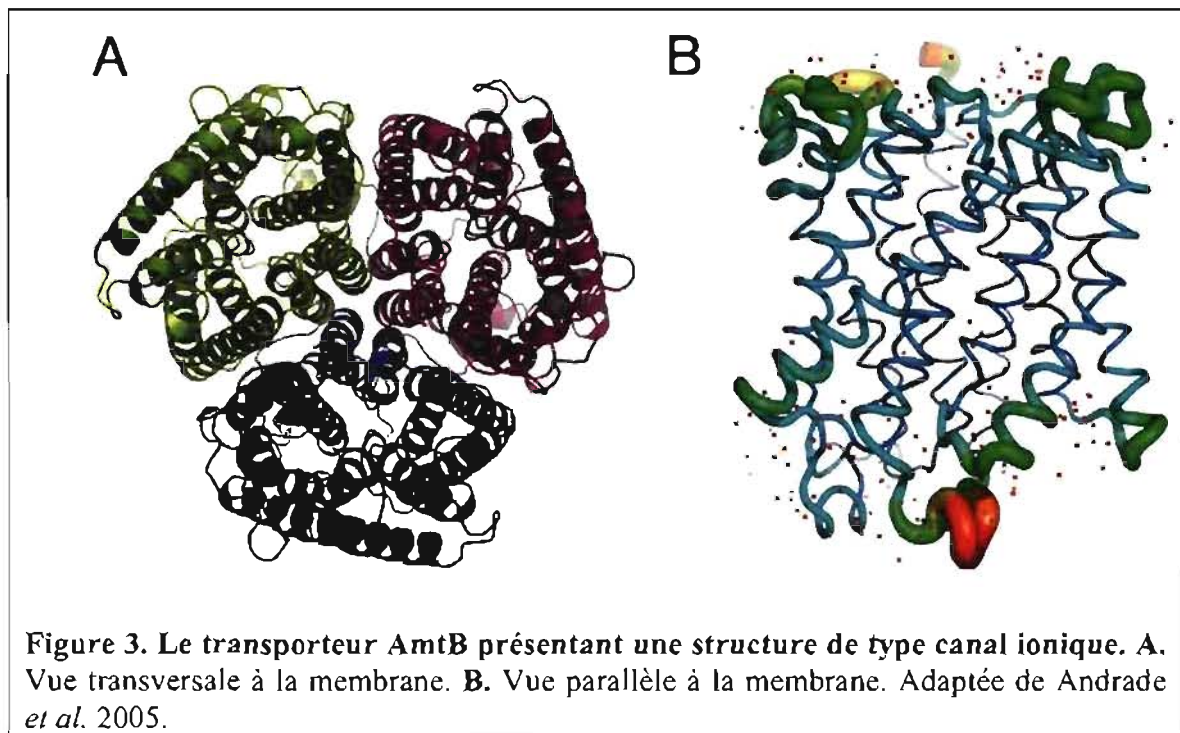
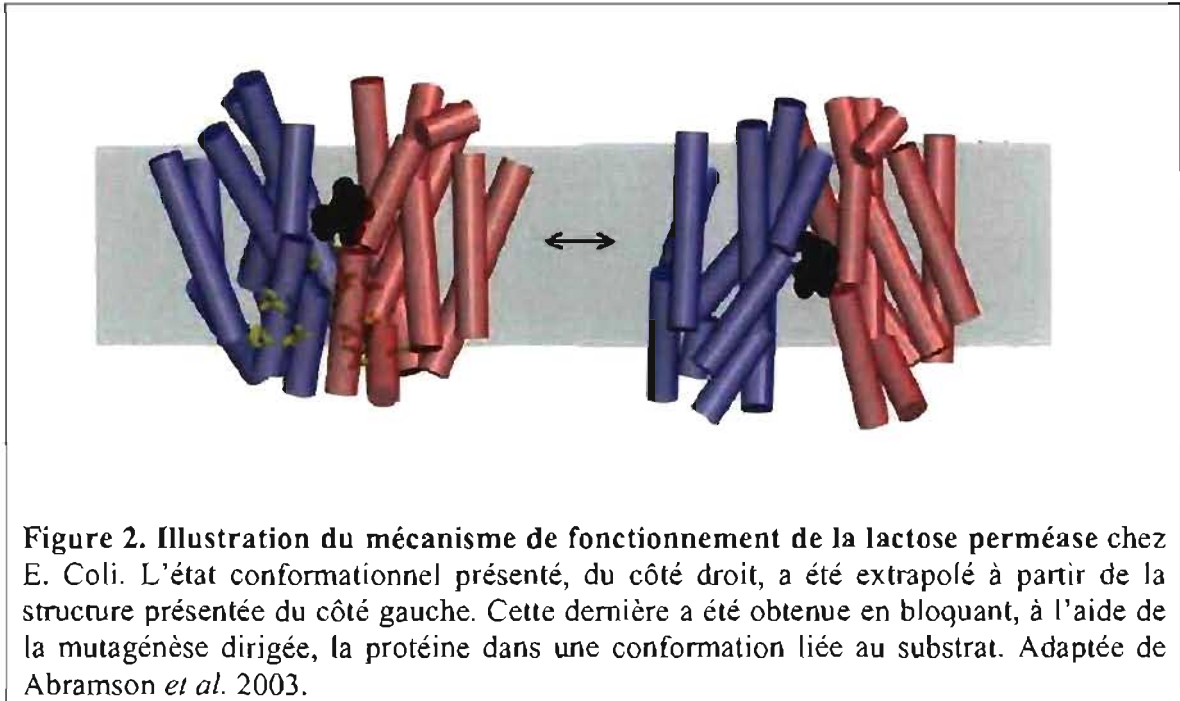
Plusieurs mécanismes, observés chez les cotransporteurs ioniques, sont toujours sujets à d'intenses débats au sujet de leur origine moléculaire : les courants de fuite, la conductance non couplée de type canal ionique, la faculté de transporter de l'eau et les courants transitoires. La complexité des transporteurs ioniques est illustrée par le nombre de mécanismes proposés et est amplifiée par la difficulté d'obtenir des structures cristallines à haute résolution, les cotransporteurs ioniques pouvant présenter plusieurs états conformationnels distincts.

Malgré les difficultés associées à la cristallisation des cotransporteurs ioniques, quelque uns ont pu être cristallisés: l'exportateur de drogues (AcrB), la *lactose permease* (LacP), l'échangeur glycerol-3-P/P_i (GlpT), le transporteur de NH₄⁺ et de NH₃ (AmtB) et le transporteur bactérien de glutamate (Glt_{ph}) (Sobczak *et al.* 2005). Ces cinq structures présentent quatre mécanismes de fonctionnement différents (voir figure 6).

Le premier mécanisme, déduit de la structure du transporteur AcrB, un exportateur de drogues chez *E. coli.*, permet la livraison du substrat au pore situé dans le feuillet externe en le couplant au flux transmembranaire de protons au feuillet interne. La structure révèle un mécanisme de fonctionnement rotationnel dans lequel la protéine est formée de 3 protomères représentant chacun une étape du cycle de cotransport (figures 1 et 5a) (Murakami *et al.* 2002; Murakami *et al.* 2006).



La lactose permease (LacP, du gène LacY), couplant un gradient de protons au transport de lactose, et GlpT, un échangeur glycerol-3-P/P_i ont pu récemment être cristallographiés (voir Abramson *et al.* 2003 et Huang *et al.* 2003 respectivement). Ces structures suggèrent une large cavité hydrophile orientée vers le cytoplasme et une bouche périplasmique hermétique. Elles illustrent le mécanisme dit à « accès alterné » selon lequel la protéine subit un important changement de conformation permettant à la protéine de présenter, tour à tour, son site de liaison d'un côté à l'autre de la membrane (figures 2 et 5b) (Abramson *et al.* 2003).



Le troisième type de mécanisme, illustré par le transporteur de NH_4^+ et de NH_3 AmtB, s'apparente à celui d'un canal ionique (figures 3 et 5c). En effet, la structure

cristalline ne révèle pas de changements de conformation majeurs lors de la liaison du substrat. Le transport du substrat est activé par un proton ne traversant pas la membrane (Andrade *et al.* 2005; Sobczak *et al.* 2005).

Finalement, le transporteur bactérien de glutamate Glt_{Ph} (Yernool *et al.* 2004) présenterait un mécanisme de transport de type canal ionique possédant deux barrières ne pouvant être ouvertes en même temps (figures 4 et 5d). L'ouverture de ces barrières serait due au mouvement de boucles protéiques, à l'image des boucles assurant la sélectivité des canaux ioniques (Sobczak *et al.* 2005). Des études récentes montrent que la structure de ce canal peut servir de modèle à une meilleure compréhension des transporteurs de la famille des transporteurs de glutamate (Ryan *et al.* 2007). C'est ce qu'ont fait Mim *et al.* pour déduire le mécanisme de fonctionnement du transporteur de glutamate EAAC1 (voir figure 5)(Mim *et al.* 2007).

Maintenant que nous connaissons quelques mécanismes moléculaires de cotransport, intéressons nous aux phénomènes du courant de fuite, de la conductance non couplée au transport du substrat et des courants transitoires.

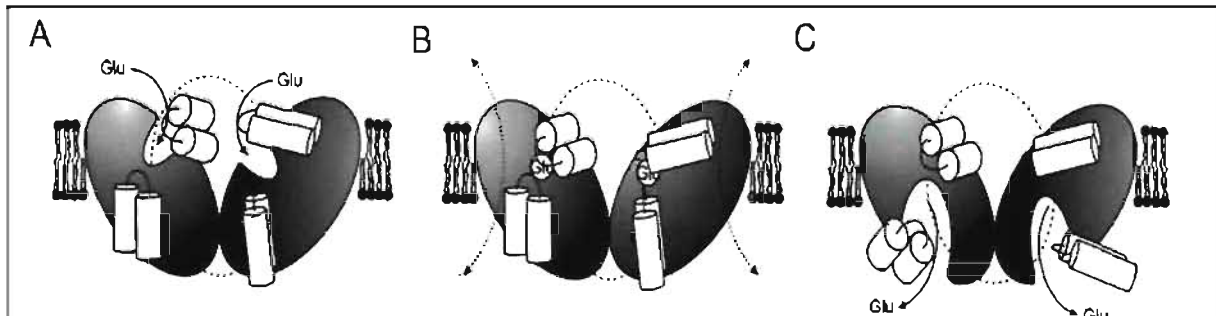
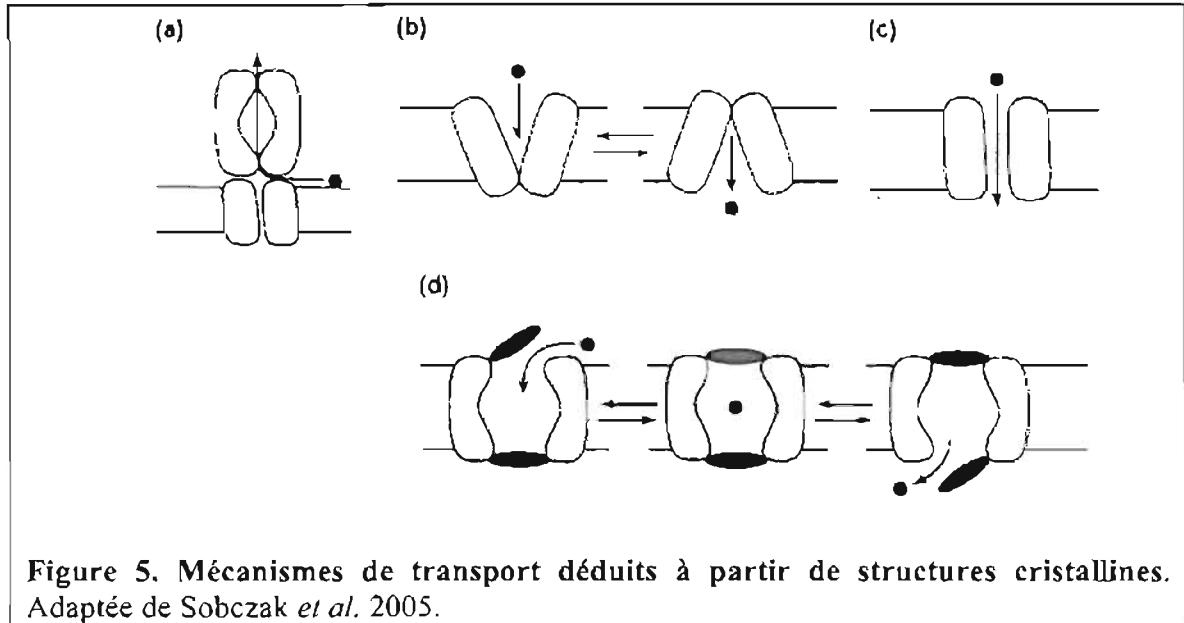


Figure 4. Mécanisme de fonctionnement du transporteur de glutamate EAAC1 déduit à partir de la structure de Glt_{Ph} . EAAC1 est un trimère. A. Le glutamate se lie à son site de liaison lorsque les boucles libèrent le chemin. B. Le flux d'un anion (flèches) est possible lorsque le substrat est lié à la protéine. C. Le glutamate est relâché de l'autre côté. Adaptée de Mim *et al.* 2007.



1.1.1. Le courant de fuite

Certains cotransporteurs possèdent la capacité de transporter des ions de façon non couplée au substrat (voir pour exemples: le cotransporteur Na^+ /glucose (SGLT1) (Parent *et al.* 1992a), le transporteur de Na^+ /Pi de type IIa (Forster *et al.* 2002), le symporteur thyroïdien de Na^+ /I⁻ (NIS) (Eskandari *et al.* 1997), le transporteur de sérotonine (SERT) (Mager *et al.* 1994), le transporteur d'acides aminés KAAT1 (Bossi *et al.* 1999) et le transporteur de bétaïne BGT-1 (Forlani *et al.* 2001)). Ce type de courant, généralement sensible à l'inhibiteur, est détecté par la présence d'un courant stationnaire, non négligeable, en l'absence du substrat, lorsque l'ion activateur est présent. C'est ce qu'on appelle le « courant de fuite ». Il est nécessaire de posséder un bon inhibiteur pour pouvoir différencier le courant de fuite du courant endogène de la cellule dans laquelle le transporteur est exprimé. Le courant de fuite est un mode de transport de type « uniport » qui doit être distingué d'un éventuel canal intrinsèque à la protéine. En général, l'amplitude du courant de fuite est proportionnelle au courant de cotransport ($I_{\text{fuite}}/I_{\text{cotransport}} \sim 10\%$ pour le transporteur de type IIa Na^+ /Pi)(Forster *et al.* 2002). Certains cotransporteurs, tel le symporteur de Na^+ /I⁻ (NIS), présentent un courant de fuite d'amplitude équivalente à celle du courant de cotransport. Dans ces conditions, il

est très complexe de déterminer la proportion du courant due au cotransport dans le courant total. En effet, des mesures expérimentales récentes tendent à montrer que le courant de fuite et le courant de cotransport sont mutuellement exclusifs et qu'à l'addition du substrat, une partie du courant de fuite est transformée en courant de cotransport (Forster *et al.* 2002). Ceci suggère que le courant de fuite est étroitement associé au mécanisme de cotransport et que l'ion (ou les ions) formant le courant de fuite, est le même que l'ion participant au cotransport. Néanmoins, comme nous allons en parler plus bas, ceci n'est pas toujours la cas : d'autres ions peuvent participer au courant de fuite.

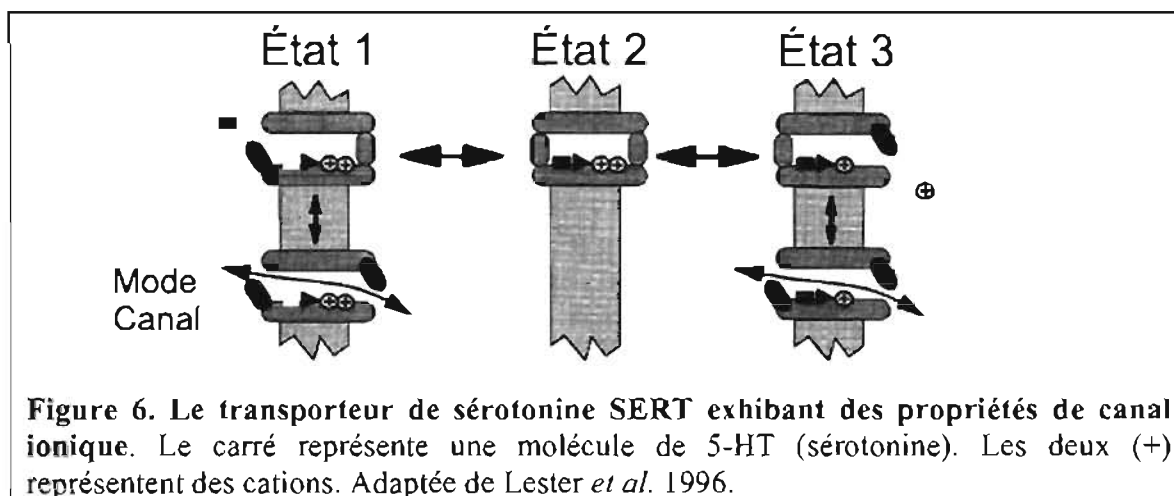
Il est parfois très difficile d'établir la nature de l'ion à l'origine du courant de fuite. En effet, par exemple, chez le transporteur de Na^+/P_i de type IIa et chez SGLT1, le courant de fuite, qu'on croit être dû au symport d'un ou deux ions Na^+ , ne s'inverse pas au potentiel d'inversion du Na^+ . La concentration intracellulaire de substrat, non nulle, viendrait moduler le potentiel d'inversion du courant de fuite. Le mécanisme d'action qui sous-tend ce phénomène demeure inconnu (Forster *et al.* 2002). De plus, un mutant de la protéine hSGLT1, présentant un fort courant de fuite, ne semble pas transporter que du Na^+ , le potentiel d'inversion ne changeant pas de façon attendu lorsque la concentration extracellulaire de Na^+ est altérée (communication personnelle, Jean-Philippe Longpré). Une technique permettant de détecter directement la nature de l'ion (ou des ions dans ce cas-ci) transporté pourrait donc simplifier la détermination de la nature du courant de fuite.

1.1.2. La conductance non couplée

Plusieurs laboratoires ont isolé des conductances non couplées, fonctionnellement différentes d'un courant de fuite, chez plusieurs familles de cotransporteurs. Plusieurs indices, laissant envisager cette possibilité, sont apparus depuis le début des années 1990. En effet, des mesures de changements de fluorescence couplées à des mesures d'électrophysiologie indiquaient des changements de conformations plus petits que prévu par le modèle dit à accès alterné, lequel suggère d'importants changements de conformations. De plus, certains transporteurs ont la possibilité de générer des courants

d'amplitude typiquement associée aux canaux ioniques. Ces transporteurs sont surtout retrouvés dans la synapse et peuvent générer, très rapidement, des courants d'un ordre de grandeur incompatible avec la vision traditionnelle des cotransporteurs (Bruns *et al.* 1993; DeFelice *et al.* 2007). Plusieurs laboratoires ont proposé que ce courant, très rapide et très important, serait dû à une conductance non couplée, de type canal ionique, étroitement associée au cotransporteur. Cette vision des choses est appuyée par la constatation de la présence, chez de nombreuses familles de cotransporteurs, d'un excès de charge par rapport à la stœchiométrie prévue. Kang *et al.*, pour expliquer cette stœchiométrie variable chez l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, proposent que la protéine ait plusieurs modes de conduction possibles (Kang *et al.* 2004). Bien qu'aucun événement de canaux unitaires n'ait été enregistré pour cette protéine, une analyse de bruit chez ce transporteur révèle la présence de canaux ioniques (Hilgemann 1996). Ces canaux ioniques ont été détectés, directement ou indirectement (en mutant un acide aminé par exemple), chez plusieurs familles de transporteurs : l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), le transporteur d'acides aminés excitants (EAAT), le transporteur $\text{Na}^+/\text{glucose}$ (SGLT1)(Quick *et al.* 2001), le transporteur de GABA (GAT1), le transporteur de sérotonine (SERT), le transporteur de cations divalents (DCT1) et la famille des transporteurs d'ions métalliques (SMF)(DeFelice *et al.* 2007). Leur présence tend à suggérer que les cotransporteurs présenteraient plusieurs modes de transport possible.

La figure 6 présente un modèle, proposé pour la protéine transporteuse de sérotonine (SERT), pouvant expliquer ces phénomènes. Ce modèle, basé sur la structure cristalline de Glt_{PH} , prend pour hypothèse la présence de deux barrières ne pouvant être ouvertes en même temps. La conductance non couplée serait causée par un défaut temporaire dans ce couplage strict d'ouverture des barrières ouvrant la voie à un canal ionique. Chez le cotransporteur SERT, tel qu'enregistré par des mesures de *patch-clamp*, il surviendrait une ouverture d'un tel canal à tous les 350-700 cycles de cotransport (Lester *et al.* 1996). Ce modèle serait suffisant pour expliquer le surplus de charge transférée par rapport au substrat et l'augmentation rapide du courant en présence d'une très grande quantité de substrat.



Nous croyons que l'étude de ce mécanisme pourrait être facilitée par une approche utilisant les électrodes sélectives : un flux ionique non couplé serait aisément mesurable et caractérisable.

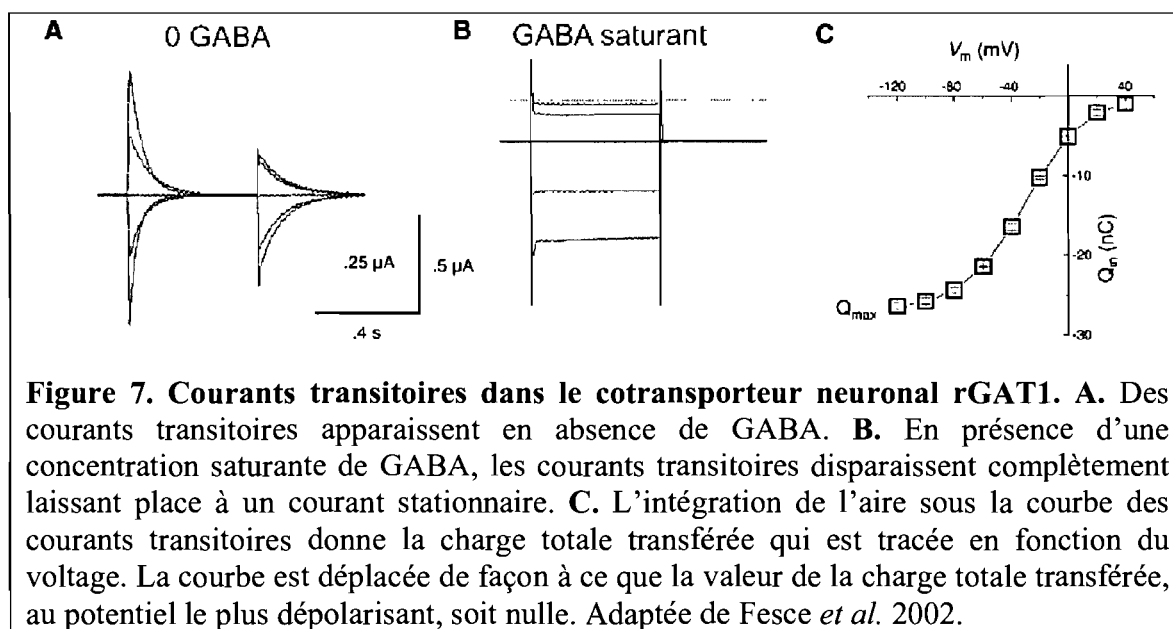
1.1.3. Les courants transitoires

Les cotransporteurs électrogéniques ont en commun la présence de courants transitoires apparaissant généralement en absence de substrat lors d'un saut de voltage ou de concentration de l'ion (Parent *et al.* 1992a; Mager *et al.* 1993; Mager *et al.* 1994; Wadiche *et al.* 1995; Bossi *et al.* 1999; Forlani *et al.* 2001; Fesce *et al.* 2002; Forster *et al.* 2002; Peres *et al.* 2004). Ces courants transitoires seraient dus à perturbation de la distribution des charges dans un cycle de cotransport : le mouvement d'un ion allant se lier à son site de liaison enfoui dans la protéine ou la réorientation d'un segment chargé de la protéine dans le champ électrique membranaire.

Les courants transitoires ont quelques propriétés caractéristiques : ils sont réversibles (i.e. la charge qui se déplace dans une direction lors de l'application d'un voltage donné revient dans l'autre direction lorsque le voltage de départ revient, voir figure 7 A), ils disparaissent généralement en présence d'une concentration saturante de substrat et d'inhibiteur (Parent *et al.* 1992a; Mager *et al.* 1993; Mager *et al.* 1994; Wadiche *et al.* 1995; Bossi *et al.* 1999; Fesce *et al.* 2002)(voir figure 7 B) et la charge transférée, obtenue en intégrant les courants transitoires, corrigés pour un éventuel courant de fuite,

à chaque voltages, atteint une valeur limite aux voltages extrêmes (Parent *et al.* 1992a; Mager *et al.* 1993; Wadiche *et al.* 1995; Bossi *et al.* 1999; Fesce *et al.* 2002; Peres *et al.* 2004). Prenant en compte toutes ces propriétés, il est alors utile et justifié de tracer l'amplitude de la charge totale déplacée en fonction du voltage (voir figure 7 C).

La figure 7 présente des enregistrements de courants du cotransporteur neuronal d'acide γ -aminobutyrique (GABA) GAT1. On y note la présence de courants transitoires en absence de substrats (figure 7 A) et l'apparition très rapide d'un courant stationnaire lorsque le substrat est présent en concentration saturante (figure 7 B).



La cinétique, l'amplitude et la dépendance en voltage des courants transitoires peuvent nous renseigner sur la vitesse de cotransport, les étapes limitantes, la densité de transporteurs, etc. En effet, en supposant une charge maximale Q_{\max} , les courants transitoires peuvent être utilisés pour dénombrer les transporteurs présents à la membrane et pour estimer la vitesse de cotransport (v , ou le « turnover rate ») à chaque voltage transmembranaire V_m :

$$v(V_m) = \frac{I_{tr}}{Nze_0} \quad (1)$$

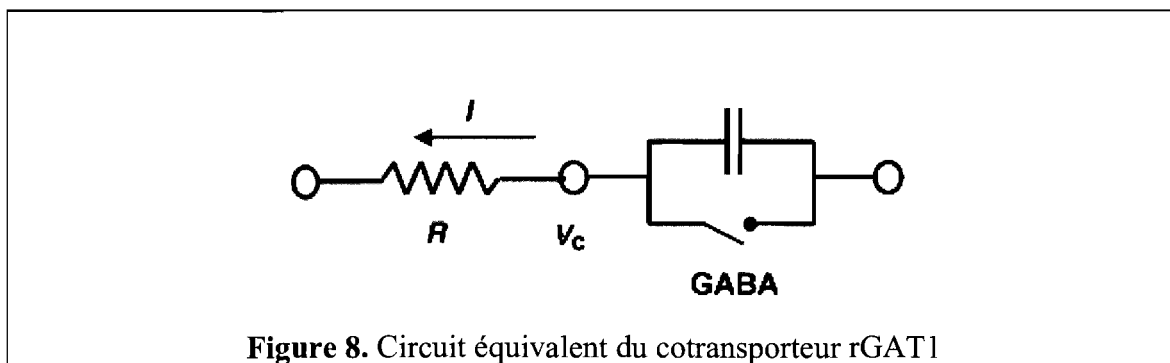
où I_{tr} est le courant de cotransport au voltage membranaire V_m , N le nombre de transporteur disponible à V_m et ze_0 est la charge associée à chaque transporteur (Loo *et al.* 1993; Mager *et al.* 1993; Wadiche *et al.* 1995; Mager *et al.* 1996; Forlani *et al.* 2001; Fesce *et al.* 2002). La charge totale déplacée ($Q_{max}=N_{max}ze_0$) nous renseigne aussi sur la densité de transporteurs exprimés à la membrane. En effet, en associant une charge à chaque transporteur e_0z , Q_{max} est alors un indicateur du nombre de transporteurs présents à la membrane (N_{max}). Ce type d'estimation, pour SGLT1 et le transporteur de Na^+/Pi de type IIa, donne généralement une densité de transporteur de 10^{10} à 10^{11} transporteurs par ovocyte (Forster *et al.* 2002).

Contrairement aux courants de barrière (*gating currents*) présents dans les canaux ioniques sensibles au voltage, les courants transitoires ont une valeur initiale qui est généralement du même ordre de grandeur que le courant stationnaires (Peres *et al.* 2004) et la charge assurant le transport ne peut être facilement distinguée de la charge qui génère les courants transitoires (Fesce *et al.* 2002). En effet, il est difficile de déterminer à partir de mesures électrophysiologiques si la charge déplacée est due à la réorientation, dans la membrane, d'un segment chargé d'une protéine ou si elle est due au mouvement des ions devant traverser une partie du champ électrique membranaire pour aller rejoindre leur site de liaison. De plus l'électrophysiologie ne peut nous renseigner directement sur la nature de l'ion se liant au cotransporteur.

Si on fait abstraction d'un éventuel courant de fuite et qu'on suppose que les courants transitoires reflètent le nombre de transporteurs prêts à lier le substrat, il existe donc une relation bien définie entre le transfert de charge due aux courants transitoires et le transport du substrat. Pour GAT1, selon Peres *et al.* (Peres *et al.* 2004) , la relation suivante existe entre la charge déplacée (intégrale des courants transitoires) et le courant stationnaire :

$$I_{tr} = Q_V r \quad (2)$$

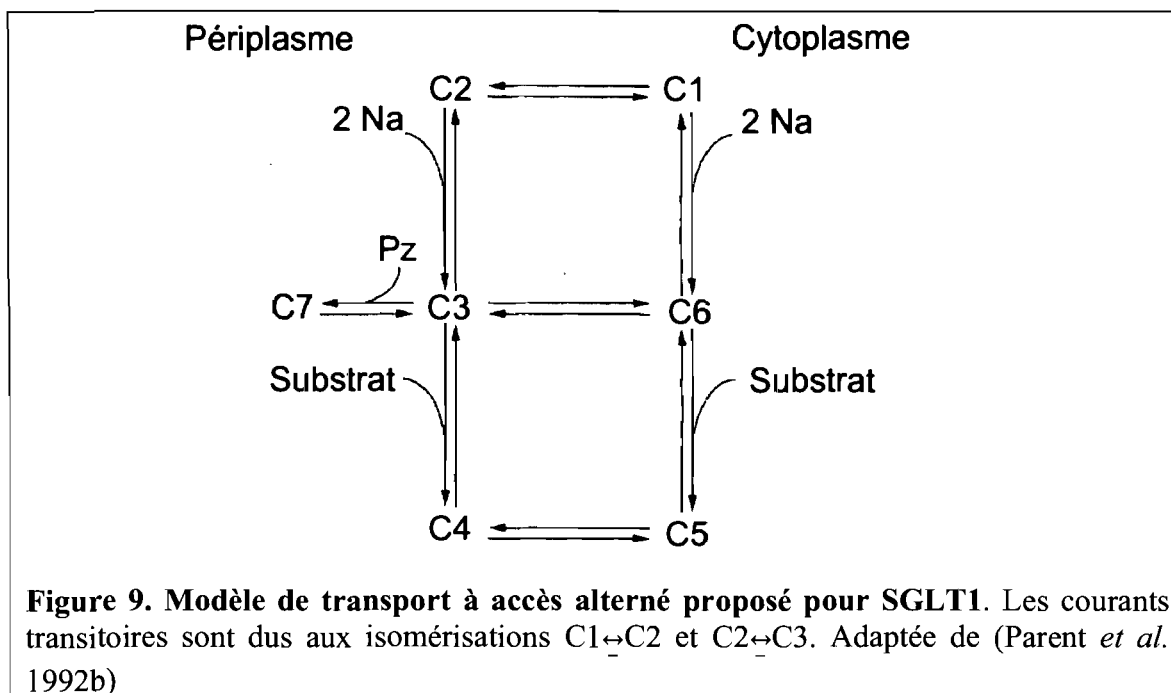
où I_{tr} est l'amplitude initiale du courant stationnaire de cotransport, Q_v la fraction de la charge déplaçable, au voltage V , et r le taux de transfert de charge (l'inverse de la constante de temps des courants transitoires) (Fesce *et al.* 2002; Peres *et al.* 2004). Ce mécanisme prédit, si on considère que l'étape limitante est voltage-dépendante, que le taux de transfert de charge est la vitesse de cotransport de la molécule (*turnover rate*) (Mager *et al.* 1993; Fesce *et al.* 2002; Peres *et al.* 2004). La figure 8 présente le circuit électrique équivalent qui représente ce mécanisme. Ce circuit est un cas particulier d'un mécanisme plus général de cotransport dans lequel un courant de fuite peut exister. Il est alors plus difficile de relier le transfert de charge et le courant de cotransport puisqu'une partie de la charge est utilisée pour produire un courant de fuite substantiel. Dans ce modèle, les courants transitoires seraient court-circuités par la présence du substrat, la charge passant d'une fonction capacitive à conductive. Cette hypothèse suppose que la charge transférée est entièrement due au mouvement des ions devant traverser une fraction du champ électrique membranaire pour aller se lier à leur site de liaison enfoui dans la protéine. Ainsi, les parties chargées de la protéine, si elles existent, ne subissent aucun mouvement significatif lorsque le voltage membranaire est modifié. Le cas échéant, il y aurait un courant transitoire associé à ce mouvement de charge intramembranaire. À la liaison du substrat, la charge liée à la protéine peut être transportée de l'autre côté de la membrane (Peres *et al.* 2004).



Le modèle utilisé pour décrire SGLT1, initialement proposé par Parent *et al.* (Parent *et al.* 1992b), suggère 6 états distincts et une liaison ordonnée des substrats. Dans ce modèle, la translocation du transporteur vide, portant une charge $z = -2$, contribue aux courants transitoires lors d'un saut de voltage. Lors d'un pulse hyperpolarisant, ces

transporteurs vides sont transportés vers le domaine périplasmique où ils peuvent lier 2 ions Na^+ et le substrat. Le complexe transporteurs- Na^+ -substrat est donc neutre lorsqu'il traverse la membrane à la suite de la liaison du substrat. Du côté cytoplasmique, les substrats sont relâchés et le complexe vide peut alors être à nouveau transporté du côté périplasmique. Contrairement à GAT1, SGLT1 présente un courant de fuite. La figure 9 présente le premier modèle proposé pour SGLT1 illustrant ces idées. Dans ce modèle, les étapes dépendantes du voltage sont la translocation du transporteur vide ($\text{C1} \leftrightarrow \text{C6}$) et la liaison extracellulaire de deux Na^+ . Une 7^e étape peut être ajoutée pour représenter la liaison, électroneutre, de l'inhibiteur (Pz) au transporteur chargé de deux ions Na^+ . Les courants transitoires sont donc dus aux étapes $\text{C1} \leftrightarrow \text{C2}$, et $\text{C2} \leftrightarrow \text{C3}$. Pour obtenir la contribution de chaque réaction au transfert de charge total, le modèle est simulé numériquement et le meilleur ensemble de paramètres est conservé (i.e. l'ensemble des paramètres qui reproduit bien les mesures expérimentales : courbe de constante de temps en fonction du voltage (τ - V_m), K_m , la vitesse de transport maximale (V_{max}), transfert de charge en fonction du voltage, etc). Dans cette série de paramètres se trouve α' , β et α'' , des facteurs numériques qui déterminent la fraction du voltage transmembranaire ressentie par les transporteurs vides et ions à chaque potentiels. Ce sont ces derniers qui nous renseignent sur la contribution de chaque type de réaction au transfert de charge total. Pour SGLT1, selon Loo *et al.* et Hazama *et al.* (Loo *et al.* 1993; Hazama *et al.* 1997), les simulations numériques reproduisant bien les données expérimentales, prédisent que 30% des courants transitoires seraient dus à la liaison extracellulaire des ions Na^+ . Ainsi, 70% des courants transitoires seraient dus à la translocation du transporteur vide entre le cytoplasme et le milieu périplasmique. Une prédiction du modèle, non évidente a priori, est que la réaction $\text{C6} \leftrightarrow \text{C1}$ serait complètement asymétrique du point de vue dépendance en voltage ; $\text{C1} \rightarrow \text{C6}$ serait dépendante du voltage. Il est important de noter que ces paramètres, très importants pour la compréhension du mécanisme de cotransport, sont obtenus par ajustement d'un modèle sur les résultats expérimentaux. Ce modèle se base sur quelques hypothèses pouvant se révéler fausses : valence du transporteur vide étant fixée à -2 afin d'avoir un transporteur chargé de Na^+ qui soit neutre, ordre de liaison intracellulaire identique à l'ordre

extracellulaire etc. Ce modèle a d'ailleurs subi plusieurs raffinements au cours des 15 dernières années (voir la section sur SGLT1).



Certains transporteurs, tel GAT1, voient leur courbe de transfert de charge bien décrite par un processus de Boltzmann mono-exponentiel (Bossi *et al.* 1999; Fesce *et al.* 2002). En physique, l'équation de Boltzmann est utilisée pour décrire la distribution d'une population de particules entre divers niveaux i d'énergie E_i . Un processus de Boltzmann mono-exponentiel survient lorsqu'une population de particules se distribue, à l'équilibre, sur deux niveaux d'énergie bien distincts. Dans le cas présent, si le mouvement de charge se produit entre deux états, séparés par une barrière d'énergie et si on pose que le transfert de charge au voltage le plus dépolarisant est donné par Q_{dep} , la théorie de Eyring-Boltzmann prévoit que la courbe Q - V puisse être ajustée à l'équation de Boltzmann suivante :

$$Q(V) = \frac{Q_{max}}{1 + e^{\frac{(V_{0.5} - V)e_0 z}{kT}}} + Q_0 \quad (3)$$

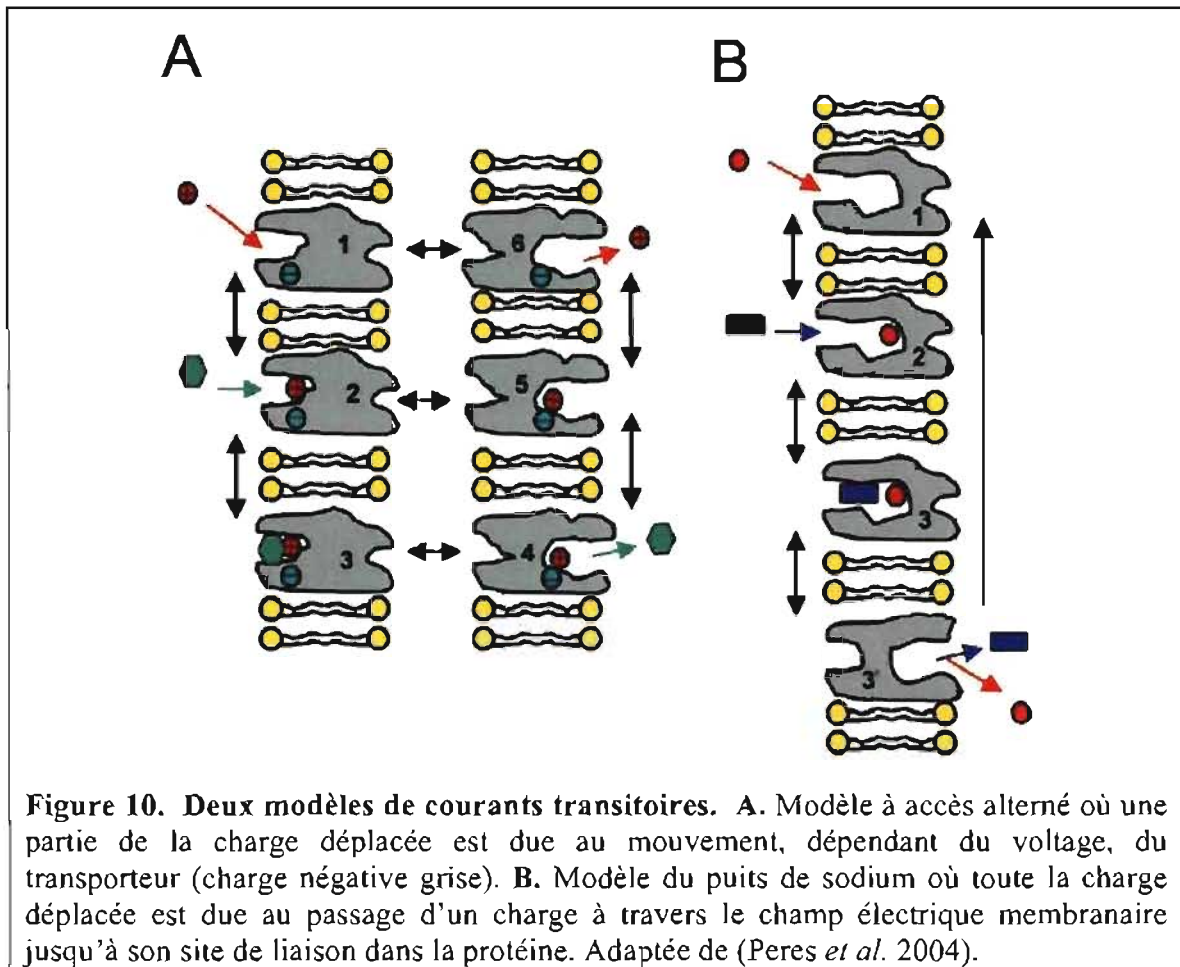
où $Q(V)$ est la charge déplacée d'un état à l'autre au voltage V , Q_{max} est la charge totale qui peut être déplacée entre les deux états, $V_{0.5}$ est le potentiel où la probabilité

d'occuper les deux états est égale, e_0 est la charge élémentaire, z est la valence du transporteur et Q_0 est le niveau de base de $Q(V)$ au voltage le plus dépolarisant ou hyperpolarisant selon le contexte (la charge peut être au feuillet interne ou externe selon le cas). Dans le cas de plusieurs transporteurs, tel SGLT1, la charge déplacée provient de plusieurs réactions en série (s'alimentant l'une de l'autre) et on ne s'attendrait pas à ce que la courbe $Q-V_m$ soit bien décrite par une simple fonction de Boltzmann. Néanmoins, l'ajustement est souvent assez bon et permet de tirer des paramètres comme $V_{0.5}$ et e_0z qui caractérisent la distribution.

Les modèles suivants ont été proposés pour décrire l'origine des courants transitoires dans les cotransporteurs :

- Le modèle à **puits de sodium** (Lester *et al.* 1996) explique les courants transitoires du transporteur neuronal GAT1 par le mouvement des ions traversant le champ électrique membranaire jusqu'à leur site de liaison sur la protéine (voir figure 10 B). Ce modèle est bien reproduit par la relation (2) selon laquelle la charge transférée passe d'un mode capacitif à un mode conducteur lorsque le substrat est ajouté.
- Le modèle à **accès alterné**, du type proposé pour SGLT1 (voir figures 9 et 10A) (Parent *et al.* 1992b), propose que les courants transitoires soient produits, en partie, par le mouvement d'une charge intrinsèque au cotransporteur. Cette hypothèse est supportée par la constatation que les cinétiques et l'amplitude des changements de fluorescence du cotransporteur SGLT1 marqué seraient les mêmes que celle des courbes de transfert de charge (Loo *et al.* 1998).

Su *et al.* (Su *et al.* 1996), proposent un modèle alternatif décrivant les courants transitoires du transporteur GAT1. Le modèle à **file indienne** (*single-file*) supporte l'idée d'une protéine possédant une cavité aqueuse rigide possédant des sites de liaisons fixes tel un canal ionique.



Quelques observations penchent vers un mécanisme à accès alterné :

- Chez le transporteur d'acides aminés KAATI, il existe un transport non couplé possédant une séquence de sélectivité incohérente avec l'idée d'un puits à sodium (Bossi *et al.* 1999).
- La structure de la *lactose permease* (voir figure 2) penche très fortement vers un mécanisme de cotransport à accès alterné.
- Certains transporteurs présentent une disparition incomplète des courants transitoires en présence d'une concentration saturante de substrat (Galli *et al.* 1995; Forster *et al.* 2000; Forlani *et al.* 2001) suggérant une charge intrinsèque à la protéine.

Une autre observation supporte plutôt l'idée de l'absence d'une charge intrinsèque au transporteur :

- L'absence de sodium chez le transporteur de glutamate EAAT2 amène à une disparition des courants transitoires en accord avec le modèle à puits de sodium où à un mécanisme à accès alterné où le courant transitoire se produirait par le mouvement d'une charge intrinsèque exposée à la suite de la liaison de l'ion sodium (Wadiche *et al.* 1995).

Ainsi, il semblerait qu'il n'y ait pas un modèle universel permettant de décrire l'origine des courants transitoires dans tous les cotransporteurs. Cette constatation est renforcée par la diversité des mécanismes obtenus avec les cinq structures cristallines connues (voir plus haut). La technique du piège ionique pourra être utile pour discriminer ces différents modèles en mesurant la quantité d'un ion qui disparaît lors d'un processus transitoire. Avant de voir les résultats de cette approche, regardons les techniques expérimentales permettant, à l'heure actuelle, d'étudier les étapes partielles et la capacité de transport des cotransporteurs ioniques.

1.2. Techniques expérimentales d'étude des protéines membranaires

Diverses techniques expérimentales permettent de mesurer l'activité des protéines de transport membranaire : la captation de molécules radiomarquées, l'électrophysiologie, la fluorescence, la volumétrie et la potentiométrie par électrodes sélectives.

1.2.1. La captation de substrat radioactif

La technique de captation de substrats radiomarqués permet de mesurer l'activité de tous les types de protéines de transport membranaire (électrogéniques ou électroneutres) en mesurant l'influx de substrat radiomarqué. La cellule ou la vésicule membranaire, exprimant un transporteur membranaire, est placée dans un milieu contenant un substrat radiomarqué pour une certaine période (période d'incubation). À la fin de la période d'incubation, le substrat radiomarqué est enlevé du milieu de perfusion et un inhibiteur est ajouté afin de contrer l'efflux de substrat. La cellule est alors dissoute dans un contenant qui est placé dans un compteur à scintillation. La radioactivité mesurée nous permet de déterminer la quantité de substrat qui a pénétré dans la cellule durant la période d'incubation.

Cette technique présente les avantages de pouvoir être utilisée pour étudier les transporteurs électroneutres et les transporteurs à faible activité. En effet, l'expérimentateur est libre de prolonger l'expérience de captation aussi longtemps qu'il le désire. Les principaux désavantages de cette approche sont : la mesure de la diffusion non spécifique du substrat radiomarqué et sa faible résolution temporelle (qui est, au mieux, de l'ordre de 1s).

1.2.2. L'électrophysiologie

L'électrophysiologie est un ensemble de techniques permettant l'étude des protéines de transport membranaire électrogéniques par l'enregistrement du courant associé à un mouvement transmembranaire net d'ions. Les techniques d'électrophysiologie permettent de varier le potentiel transmembranaire et d'enregistrer le courant résultant. Les courants enregistrés lors d'une expérience d'électrophysiologie varient généralement de 10^{-12} A (canal unitaire) à 10^{-6} A (population de canaux ioniques ou de

cotransporteurs). L'électrophysiologie permet l'étude du transport stationnaire et l'enregistrement de l'activité pré-stationnaire associée aux étapes partielles dans le cycle de transport d'un cotransporteur. Diverses modalités d'électrophysiologie existent. Les plus connues sont : l'imposition du voltage à deux électrodes, le patch-clamp, l'imposition de voltage à une bicouche lipidique et la technique du *cut-open oocyte*.

1.2.2.1. L'imposition du voltage à deux électrodes

La technique d'imposition du voltage à deux électrodes permet de contrôler le voltage intracellulaire, de le varier rapidement et d'enregistrer le courant transmembranaire résultant. Pour y arriver, une microélectrode est chargée d'enregistrer le potentiel transmembranaire et une autre d'injecter le courant nécessaire au maintien d'un potentiel désiré. Ce système est assisté d'un amplificateur à rétroaction négative rapide et permet donc le maintien d'un potentiel transmembranaire très stable et la possibilité d'y apporter de très rapides changements brusques. Sa très bonne résolution temporelle (environ 1 ms chez les ovocytes) permet l'étude des étapes partielles dans le cycle de cotransport via l'enregistrement de courants transitoires. Ce type de système permet de mesurer des courants de 10^{-9} A.

1.2.2.2. Le patch-clamp

Le patch-clamp est une technique permettant, dans sa forme la plus sensible, d'enregistrer l'activité d'une seule molécule-protéine avec une excellente résolution temporelle (< 1ms). Une pipette de faible diamètre est posée à la surface d'une cellule. Diverses variantes existent : *inside-out* (un bout de membrane est arraché de la cellule et exposé à la solution extérieure), *outside-out* (un bout de membrane est arraché et inversé), *whole-cell* (le courant d'une cellule entière est enregistré) et la variante du *cell-attached* où le courant à travers un patch toujours attaché à la cellule est enregistré. Dans tous les cas, l'expérimentateur essaie d'obtenir la plus grande isolation électrique possible entre la pipette et la cellule (*seal*). Cette technique permet l'enregistrement de courants de 10^{-12} A (canal unitaire) à 10^{-10} A (*whole cell*).

1.2.2.3. Imposition du voltage à une bicouche lipidique

Une bicouche lipidique est peinte sur une petite ouverture. Des électrodes placées de chaque côté de la membrane permettent de mesurer le courant traversant la membrane via cette ouverture. Cette méthode permet de contrôler la composition des solutions de part d'autre de la membrane mais ne permet pas d'obtenir une stabilité sur plusieurs heures. Cette technique permet l'enregistrement de l'activité d'un seul canal (10^{-12} A).

Une variation de cette technique consiste à peindre une bicouche lipidique directement sur une électrode. Cette approche se nomme : « bicouche supportée ». La membrane est stable durant plusieurs heures. Néanmoins, l'expérimentateur ne peut contrôler la solution du côté de l'électrode.

1.2.2.4. La technique du *cut-open oocyte*

Cette technique permet d'isoler une petite surface de membrane et d'y mesurer le courant transmembranaire, tout en contrôlant la solution de perfusion des deux côtés de la membrane. Elle présente les avantages suivants : faible niveau de bruit électrique, contrôle du milieu ionique de part et d'autre de la membrane, résolution temporelle excellente ($< 20-100 \mu\text{s}$) et stabilité sur plusieurs heures (Taglialatela *et al.* 1992). Cette technique permet l'enregistrement de courants de l'ordre du nano ampère (10^{-9} A).

Ces techniques d'électrophysiologie présentent le désavantage de ne mesurer que le mouvement de charges en ne donnant pas directement d'information sur le type d'ions déplacés. Pour connaître la nature de l'ion qui est à l'origine du courant observé, l'expérimentateur doit procéder à des substitutions ioniques, rendant possible l'altération d'un mécanisme biologique dans la préparation utilisée. La technique de captation de molécules radiomarquées vient palier à cette faiblesse en mesurant l'activité d'une seule classe de molécule (ou d'ion), mais ne possède pas une très bonne résolution temporelle et n'informe donc pas sur les étapes partielles du transport.

La combinaison d'une technique d'électrophysiologie à la technique de captation de substrats radiomarqués rend possible la détermination directe de la stœchiométrie du transporteur. Pour y arriver, la quantité totale de radioactivité prise par la cellule est comparée au transfert total de charge durant la même période d'incubation (voir Bourgeois *et al.* 2005 pour un exemple d'utilisation).

1.2.3. Les changements de fluorescence

Il est possible d'observer les changements conformationnels de protéines de transport membranaire en leur ajoutant un marqueur fluorescent. Ces derniers, lorsque couplés à une technique d'électrophysiologie, permettent l'étude de changements conformationnels associés à l'activité transitoire et stationnaire d'un cotransporteur (voir Gagnon *et al.* 2007b et Loo *et al.* 2006 pour exemples). Avec cette technique, il est possible de détecter un changement de fluorescence de l'ordre de 1 pourcent ($\Delta F/F = 1\%$).

La détection de changements de fluorescence possède l'avantage de présenter une excellente résolution temporelle. Néanmoins, cette méthode n'apporte qu'une information sur le changement d'environnement du fluorophore et ne nous permet pas, dans sa forme la plus simple, de déduire le mécanisme de couplage du transporteur. De plus, la protéine de transport doit généralement être mutée pour permettre l'addition de ce marqueur. Cette action est souvent sans conséquence pour les canaux ioniques mais peut s'avérer délicate pour un cotransporteur qui doit pouvoir compter sur des changements de conformation importants pour fonctionner.

1.2.4. La volumétrie

La volumétrie permet l'étude du changement de volume d'un ovocyte en réponse à la stimulation d'un mécanisme de transport donné. L'image d'une section d'un ovocyte est enregistrée à l'aide d'une caméra et le volume de l'ovocyte en est déduit (pour un exemple voir Charron *et al.* 2006). Ce type de montage permet, par exemple pour Charron *et al.* (Charron *et al.* 2006), de détecter des changements de volume de 10^{-10} L. Lorsque cette technique est couplée à des mesures électrophysiologiques, elle permet

d'estimer une certaine stœchiométrie de transport en donnant le nombre d'osmolites transportés par unité de charge.

1.2.5. Les électrodes sélectives

Une électrode sélective est un dispositif potentiométrique traduisant l'activité d'un ion (l'ion primaire) en un signal mesurable grâce à un voltmètre de haute impédance (Pungor 1998). Elles peuvent être intra ou extracellulaire dépendamment du mode expérimental choisi. Les électrodes sélectives intracellulaires doivent être de faible diamètre afin de pénétrer la cellule sans causer de fuite. Cette nécessité guidera l'expérimentateur dans le choix du type d'électrode utilisé (voir plus bas).

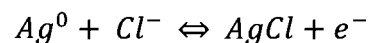
Les électrodes sélectives peuvent, selon le type d'électrode choisi, détecter les ions suivants : Na^+ , K^+ , H^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , Li^+ , NH_4^+ , Rb^+ , Cs^+ , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Cu^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Ti^+ , UO_2^{2+} , Cd^{2+} , NO_2^- , NO_3^- et CO_3^{2-} (Morf *et al.* 1986; Fry *et al.* 2002). La capacité d'une électrode sélective à discriminer une classe d'ion en présence d'autres ions est nommée « sélectivité ». Une électrode sélective génère une différence de potentiel en réponse à l'activité a_i d'un ion. Lors d'un équilibre thermodynamique à l'interface solution/membrane, la réponse d'une électrode « idéale » est décrite par l'équation de Nernst :

$$E = E_0 + \frac{RT}{zF} \ln(a_i) \quad (4)$$

où E_0 est le potentiel standard de l'électrode et dépend de la solution de référence de l'électrode, R la constante des gaz, T la température ambiante, z la valence de l'ion primaire, F la constante de Faraday et a_i l'activité de l'ion primaire. En présence d'un électrolyte fort et à faible concentration, l'activité d'un ion peut être substituée par la concentration de l'ion.

Les électrodes sélectives peuvent prendre les formes suivantes: les électrodes à « membrane de verre » (*glass electrodes*), les électrodes à « membrane cristalline » et les électrodes à « membrane organique ».

- L'électrode à membrane de verre est constituée d'un verre dont la composition chimique est propice à l'échange ionique avec l'ion d'intérêt. Cette technologie, très fiable à long terme, est principalement utilisée pour mesurer le pH et autres cations monovalents. Ce type de verre est principalement utilisé dans la fabrication d'électrodes-sélectives de gros diamètre, la technique permettant de construire des microélectrodes à verre sélectif étant très complexe. Ce type d'électrode est donc surtout utilisé pour mesurer des concentrations extracellulaires.
- Les électrodes à membrane cristalline sont composées d'un sel insoluble pouvant se dissocier, en présence d'un électron. Le cation du sel est neutralisé par l'électron et l'anion est libéré en solution. Un exemple, particulièrement commun en électrophysiologie, est l'électrode à Ag/AgCl où un fil d'argent est recouvert d'une couche de chlorure d'argent. Son principe de fonctionnement peut-être résumé par la réaction suivante:



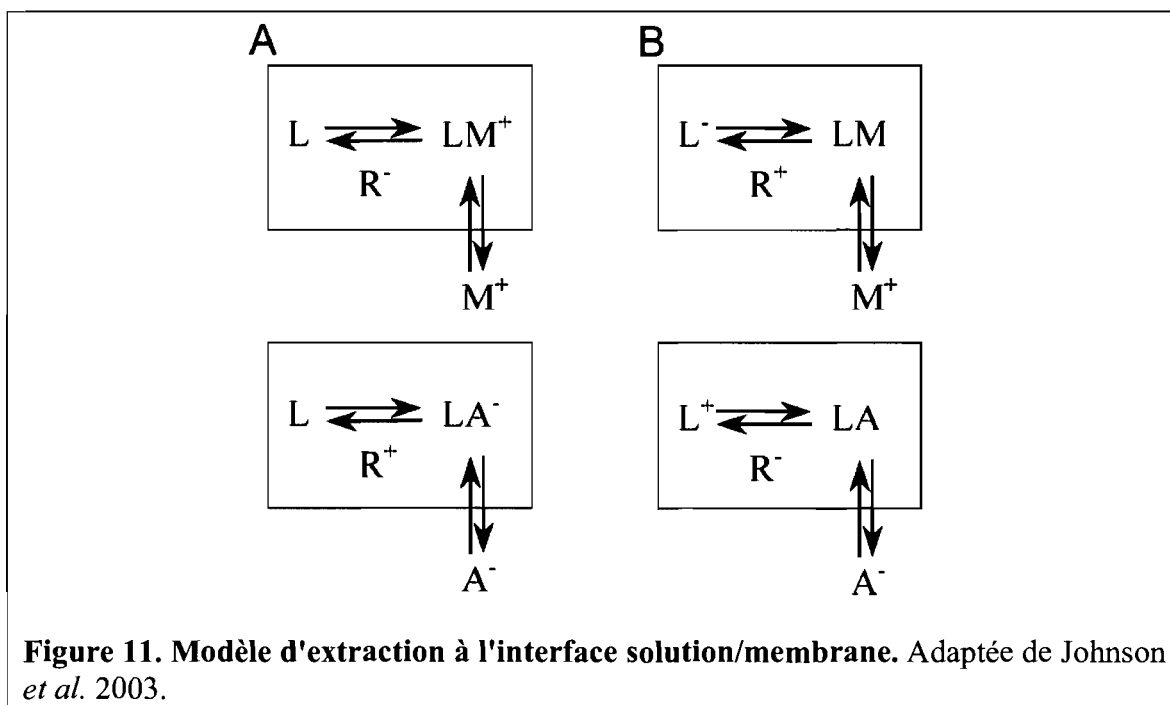
où Ag^0 est la forme neutre de l'atome d'argent. L'injection d'un courant dans une telle électrode amène à la libération d'ions chlore dans la solution. Ce type d'électrode sélective est utilisé pour mesurer et contrôler le potentiel électrique d'une solution.

- Les membranes organiques modernes, utilisées dans la fabrication des microélectrodes sélectives, sont composées d'une matrice membranaire polymérique (*polymeric membrane matrix*). Un ionophore et un sel lipophile y sont insérés de façon à obtenir une sélectivité optimale à un ion en particulier (Morf *et al.* 1986; Johnson *et al.* 2003). Ce type de membrane est très bien adapté aux microélectrodes en verre, rendues hydrophobes par silanisation, et est l'outil fondamental de ce travail.

La genèse du potentiel, dans les électrodes à membrane organique, aurait lieu en quatre étapes (Tóth *et al.* 1988):

1. **Diffusion** de l'ion primaire jusqu'à la membrane.
2. **Transfert**, au travers de l'interface solution/membrane, dans la membrane.
3. **Formation d'un complexe** ion/ionophore.
4. **Diffusion** du complexe ion/ionophore au travers de la membrane.

La figure 11 présente deux mécanismes d'extraction de l'ion primaire à l'interface solution/membrane. Pour un ionophore de type transporteur neutre (*neutral carrier*, L), une molécule chargée, incorporée dans la membrane, de signe contraire à l'ion primaire, vient stabiliser le complexe chargé (LM^+). Ces molécules sont généralement : un ammonium quaternaire (R^+) ou un ion tétraphénylborate (R^-). Elles sont essentielles à la sélectivité à l'ion primaire par rapport au contre-ion. Dans le cas où l'ionophore est chargé (L^\pm), l'électrode ne nécessite plus la présence des ces ions pour produire une réponse. Néanmoins, l'expérience montre que ces sites aident à atteindre une sélectivité optimale (Johnson *et al.* 2003).

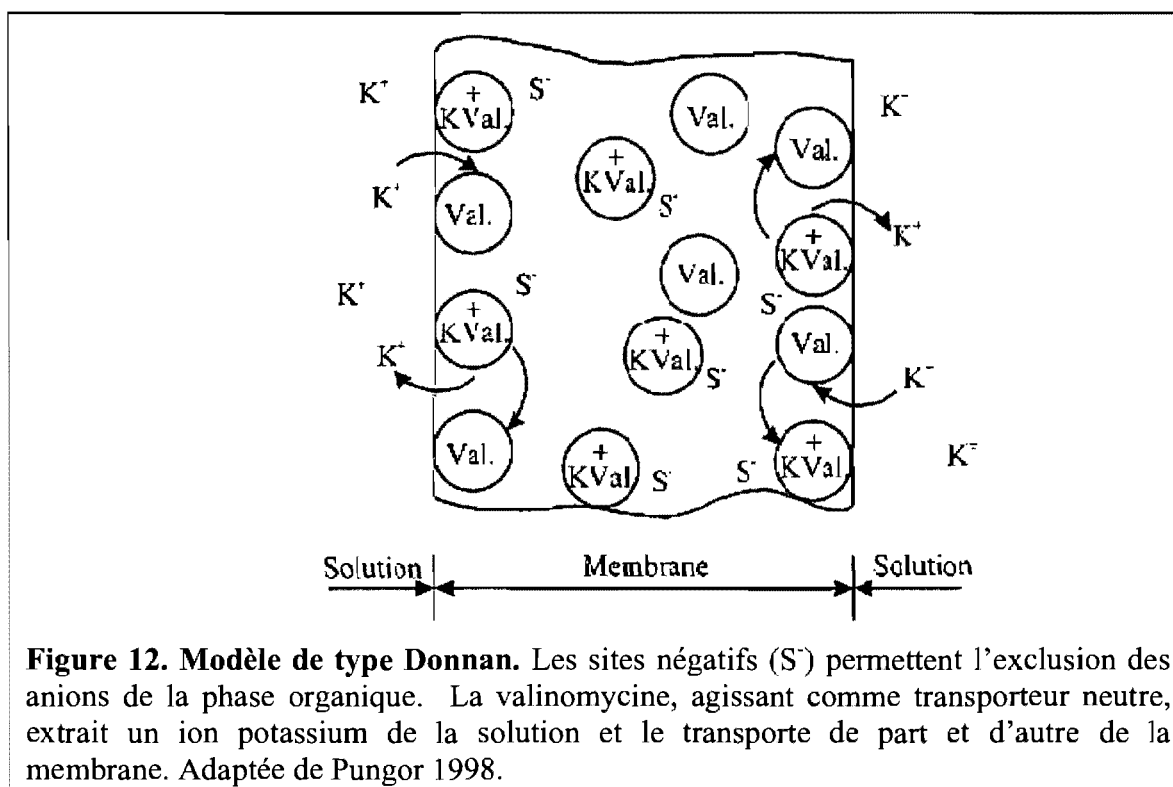


L'importance de la diffusion du complexe ion/ionophore dans la genèse du potentiel est toujours sujette à débat. Le modèle classique « de type Donnan » est confronté au modèle à « séparation de charge sans transport ». Cette distinction est importante puisqu'elle permet de déterminer la capacité de l'électrode sélective à produire une réponse très rapide.

1.2.5.1. L'interprétation de type Donnan

Donnan (1912) expliqua l'origine du potentiel d'une membrane semi-perméable à un ion par la diffusion transmembranaire de cet ion et la séparation de charge qui en résulte. Soit une membrane épaisse, électroneutre, perméable à un cation q^+ et ayant un gradient de concentration de part et d'autre de la membrane. Le cation diffuse selon son gradient de concentration laissant une charge négative nette en diffusant d'un compartiment à l'autre. Après un certain temps, cette charge négative exerce une force qui contrebalance exactement la diffusion de l'ion q^+ . Le système est alors à l'équilibre électrochimique. Dans ce type de système, le potentiel atteint est proportionnel au rapport du logarithme des concentrations de l'ion perméable de chaque côté de la membrane (équation de Nernst).

Le modèle de type « Donnan » propose qu'une membrane sélective aux cations soit composée de molécules assurant le transport transmembranaire de l'ion primaire. Le potentiel est généré lorsque la molécule transporteuse d'ions extrait le cation de la phase aqueuse et l'incorpore en phase organique laissant une charge nette négative en solution (le contre-ion). Le cation est alors transporté par la molécule transporteuse au travers de la membrane et relâché dans l'espace interne (Werner E. Morf 1986). La figure 12 illustre ce modèle en prenant l'exemple de la valinomycine, un ionophore à potassium.

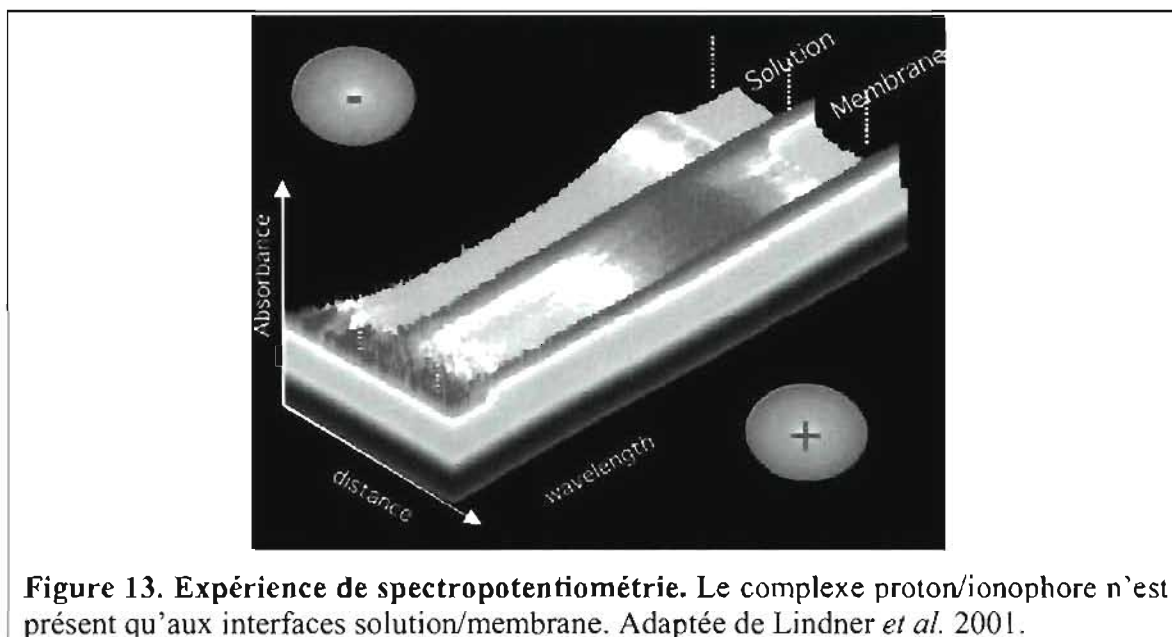


1.2.5.2. Le modèle à séparation de charge sans transport

Ce modèle soutient que le potentiel est produit par une séparation de charge à l'interface échantillon/membrane et que le transport au travers l'électrode n'est qu'un processus négligeable dans la genèse du potentiel. Plusieurs faits expérimentaux appuient cette vision des choses :

1. Des mesures potentiométriques, effectuées par changement de solution rapides, ont montré que le temps de réponse de l'électrode, inférieur ou égal à 20 ms, est incompatible avec une diffusion de l'ion primaire dans la membrane. Advenant un tel cas, la réponse de l'électrode serait de 2 à 3 ordres de grandeur plus lente que ce qui est mesuré expérimentalement. Une grande partie de ce 20 ms est d'ailleurs expliquée par la diffusion de l'ion de la solution à l'électrode au travers d'une couche non mélangée (Pungor 1995).
2. Des expériences de ATR-IR (*Attenuated Total Reflectance - Infra-Red*) menées sur des électrodes en verre et à base d'échangeur de potassium ont montré que le complexe échangeur lié à l'ion primaire ne pénètre pas profondément dans la

- membrane (< 10 nm) si son contre-ion n'est pas lipophile et que la membrane est en condition « zéro courant ». Dans le cas où le contre-ion est lipophile (SCN^- ici), l'ion potassium peut diffuser dans la membrane avec ce dernier (Tóth *et al.* 1988; Pungor 1998).
3. Des électrodes en verre mesurant la concentration d' Ag^+ en solution ont été couvertes d'une couche d'or. En extrayant la couche de surface et en l'analysant grâce à la technique SIMS (analyse de la composition d'un solide par bombardement ionique), il a été montré que l'or pénétrait à la même profondeur que l' Ag^+ (quelques nm) (Pungor 1995).
 4. Un chromoionophore sensible au pH (Bakker *et al.* 1993), permettant de mesurer la distribution spatiale de pH dans une membrane polymérique sélective aux protons, a permis de démontrer que le facteur déterminant la réponse d'une électrode sélective est le partitionnement de l'ion primaire à l'interface échantillon/membrane. Dans le domaine Nernstien de réponse, le profil de concentration est constant dans l'électrode. Un changement de composition intramembranaire est associé à une déviation de la réponse par rapport à la théorie (Bakker *et al.* 1995; Lindner *et al.* 2001). La figure 13 présente une telle mesure en présence d'un gradient de potentiel. Les zones sombres représentent des endroits où la concentration de protons complexés est grande.



Même si la question n'a pas eu de réponse définitive jusqu'à maintenant, le modèle à séparation de charge sans transport semble s'imposer, comme en témoigne les mesures expérimentales récentes. Ainsi, la réponse de l'électrode peut être décrite par un modèle d'équilibre dans un mince film ayant la même composition que la membrane. Ainsi, à la frontière entre l'échantillon et la membrane, l'ion primaire est absorbé par un complexe dans la membrane. Ceci crée une séparation de charge à l'origine du potentiel membranaire. La sélectivité de ce système serait basée sur l'amplitude de l'interaction entre la molécule liante et l'ion absorbé (Pungor 1995; Johnson *et al.* 2003).

1.3. La diffusion

Soit une solution dans laquelle existe un gradient de concentration d'une molécule i . Si la molécule est neutre et/ou s'il n'existe pas un gradient de potentiel électrique, la première loi de Fick prédit un flux de la molécule allant du point le plus concentré vers le point le moins concentré :

$$\phi_i(\vec{r}, t) = -D_i \nabla C_i(\vec{r}, t) \quad (5)$$

où ϕ_i est la densité de flux de l'espèce i à la position r et au temps t ($\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$), D_i est la constante de diffusion de l'espèce diffusible et C_i la concentration de l'espèce i à la position r et au temps t . La constante de diffusion D a été mesurée et est connue pour une majorité de composés. Cette loi prédit donc un flux entre deux volumes à concentration différente de l'espèce i .

Soit c , la concentration de l'espèce i en $x=0$ à $t=0$. Le temps nécessaire pour que la moitié de ces particules diffuse sur une distance x est donné par :

$$t_{0.5} = \frac{x_{1/2}^2}{D_i} \quad (6)$$

Le tableau I donne le coefficient de diffusion D_i pour différents atomes, dans l'eau.

Tableau I. Valeurs de coefficients de diffusion dans l'eau pour quelques éléments

Espèce	Coefficient de diffusion $\times 10^{-5} \text{ (cm}^2/\text{s)}$
Hydrogène	4.50
Hélium	6.28
Oxygène	2.10

Ainsi, si n_0 molécules d'hydrogène sont placées en $x=0$ au temps $t=0$, la relation (6) nous indique qu'il faudra environ 22 ms pour que $n_0/2$ protons aient diffusé sur 10 μm . Cette information est importante puisqu'elle nous permet d'estimer le temps que prendra une quantité d'ion à diffuser sur une certaine distance. Nous tentons de détecter un changement de concentration dans l'espace compris entre la membrane plasmique et l'électrode sélective. Il a été montré, grâce à la microscopie électronique, que la profondeur des invaginations de la membrane plasmique d'un ovocyte mature est d'environ 10 μm (Abriel *et al.* 1999). Ainsi, conformément à l'estimation précédente, nous devrions pouvoir détecter un changement de concentration, en environ 20 ms, à l'aide de la technique du piège ionique.

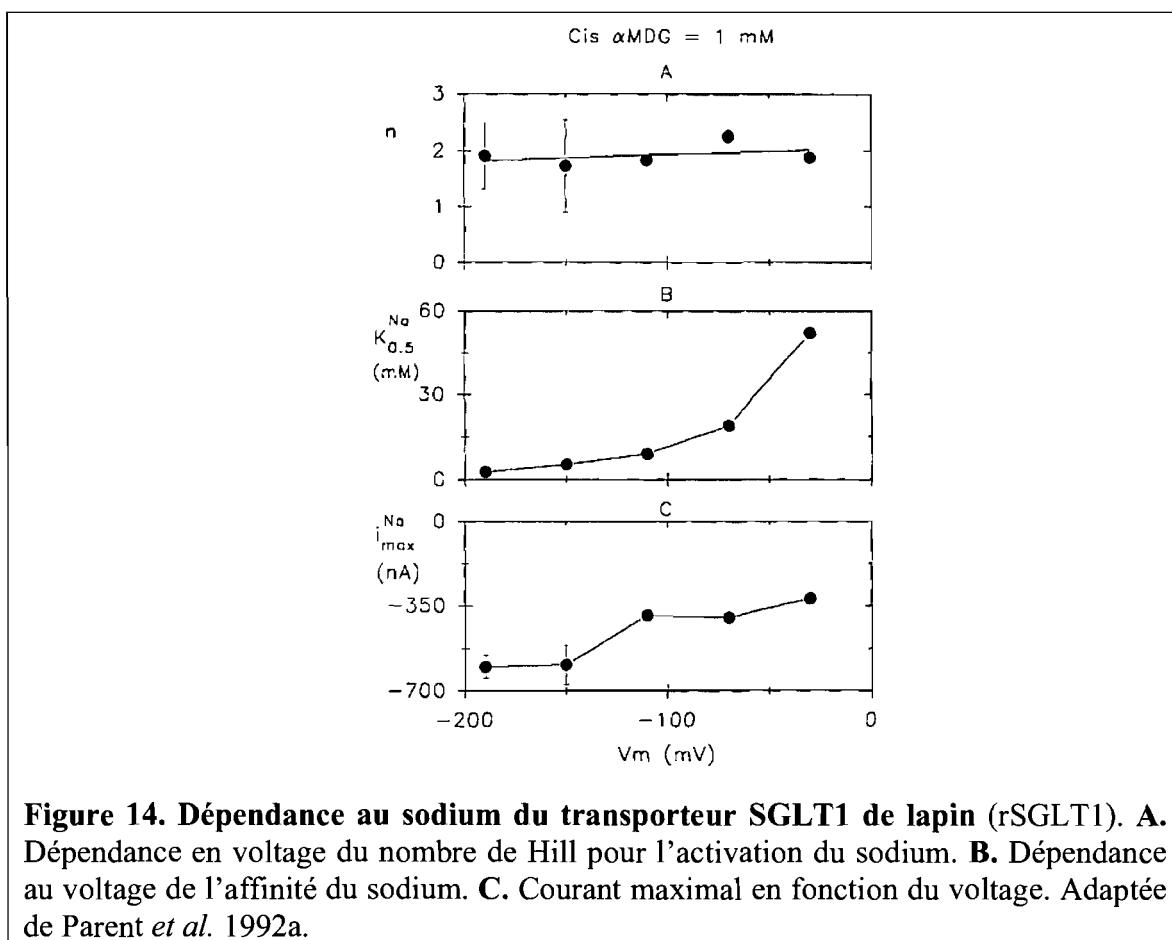
1.4. Le cotransporteur sodium glucose (SGLT1)

Le cotransporteur Na⁺/glucose (SGLT1), de la famille SLC5, cloné en 1987 (Hediger *et al.* 1987), principalement étudié par expression dans les ovocytes de *Xenopus laevis* (Umbach *et al.* 1990), cotransporte le glucose et divers analogues (voir plus bas) avec une stœchiométrie de 2 ions Na⁺ par molécule de glucose (Dayton *et al.* 1982; Chen *et al.* 1995). SGLT1 présente des courants transitoires exponentiels associés à la translocation du transporteur vide (portant une charge négative de valence $z = -2$) et à la liaison de deux ions Na⁺ devant traverser une partie du champ électrique membranaire pour aller rejoindre leur site de liaison enfoui dans la protéine (Parent *et al.* 1992b). Diverses mesures expérimentales suggèrent que la liaison de deux ions Na⁺ permet l'exposition du site de liaison du substrat, précédemment occlus. Le cotransport est totalement inhibé par des analogues du glucose tels la phlorizine (Umbach *et al.* 1990) et les thioglycosides (Kottra *et al.* 2007). L'ordre de liaison du substrat et des ions fut sujet à controverse entre la liaison de deux ions Na⁺ suivie du substrat (Parent *et al.* 1992b; Berteloot 2003) et la liaison d'un Na⁺, d'un substrat puis d'un dernier ion Na⁺ (Dayton *et al.* 1982; Chen *et al.* 1997)). Il est maintenant généralement accepté que les deux ions Na⁺ se lient avant le substrat.

Les mesures de sélectivité au substrat effectuée à l'aide de la technique de captation de substrat radioactif suggèrent la séquence de sélectivité suivante : D-glucose > α -methyl-D-glucoside > D-galactose > 3-O-methyl-D-glucopyranose >> L-glucose (Hediger *et al.* 1987). D'autres mesures, étudiant la force de liaison du substrat à l'aide de la microscopie à force atomique, révèlent plutôt la séquence de sélectivité suivante: 2-deoxy-D-glucose >= 6-deoxy-D-glucose > D-glucose > D-galactose >= α -methyl-D-glucoside (Puntheeranurak *et al.* 2007). Malgré la moins bonne affinité de SGLT1 au α -methyl-D-glucopyranoside, ce dernier est utilisé comme substrat, en lieu et place du D-glucose, puisqu'il ne peut être métabolisé par la cellule.

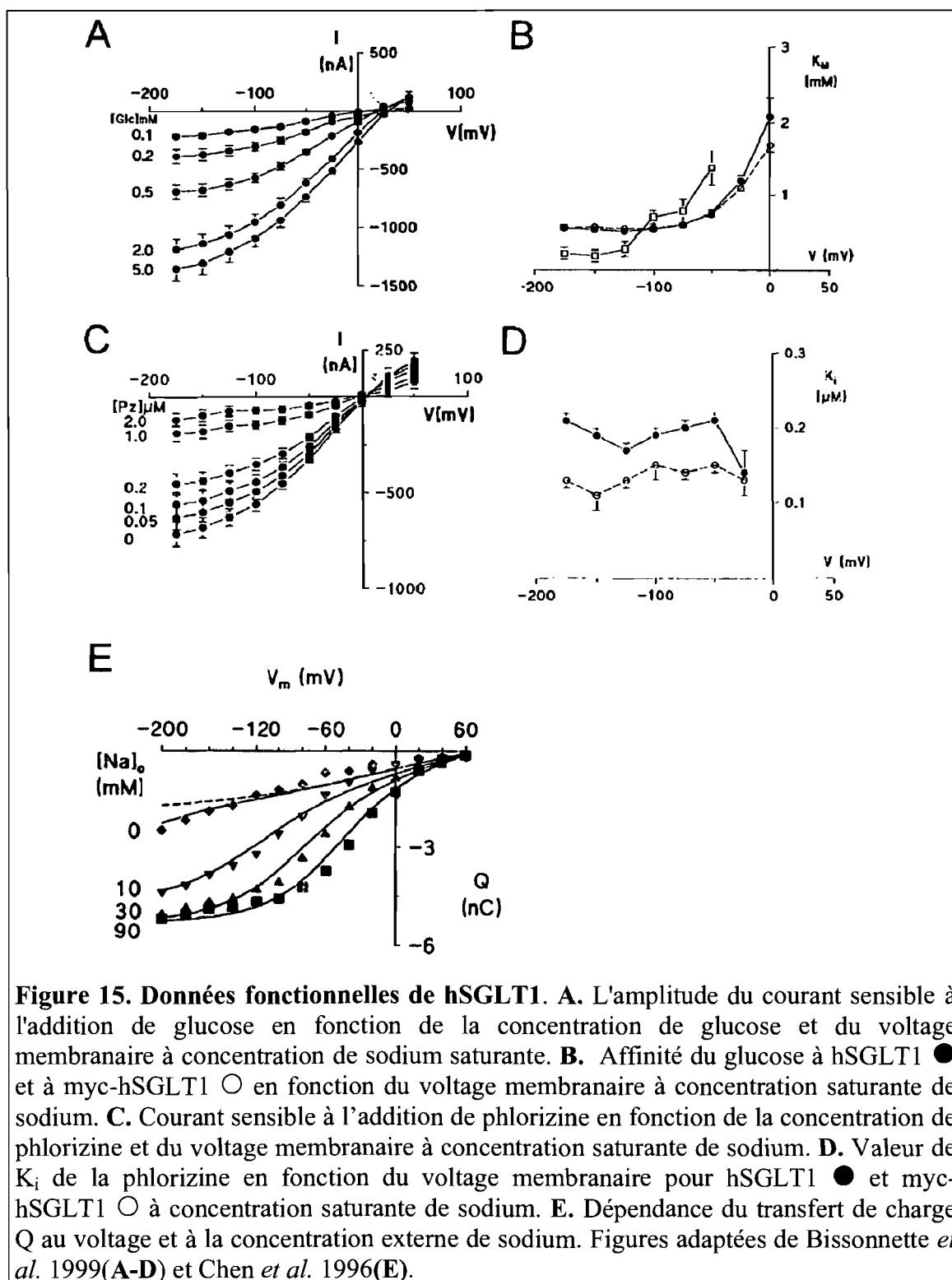
La figure 14 présente la dépendance au sodium du transporteur SGLT1 de lapin (rSGLT1) en présence de 1 mM α MG. Le nombre de Hill (n), obtenu par lissage de

l'équation de Michaelis-Menten à la courbe d'activation du courant de cotransport (I_{amg} en fonction de la concentration extracellulaire de Na^+), est de 2 et varie très peu en fonction du voltage. Ceci suggère que plusieurs ions sodiums sont nécessaires à l'activation du courant de cotransport. L'affinité de rSGLT1 au sodium $K_{0.5}^{\text{Na}}$ varie très fortement avec le voltage passant de 53 ± 2 mM à (-30 mV) à 2.7 ± 0.5 mM (à -190 mV). Cette observation expérimentale suggère que la liaison du sodium dépend du voltage. Néanmoins, un mécanisme de liaison électroneutre suivi ou précédée d'une réorientation voltage dépendante est aussi envisageable.



La figure 15 présente les données fonctionnelles de hSGLT1 (activation du glucose et dépendance au sodium du transfert de charge). En présence d'une concentration saturante de glucose, à -175 mV, l'affinité du glucose à myc-SGLT1 (K_m^{glucose}) est de 0.56 ± 0.04 mM, le courant stationnaire maximal est de 1.43 ± 0.03 μA et le K_i^{Pz} (la

concentration de phlorizine qui fait augmenter le ($K_m^{glucose}$ d'un facteur 2) est de $0.13 \pm 0.01 \mu\text{M}$.

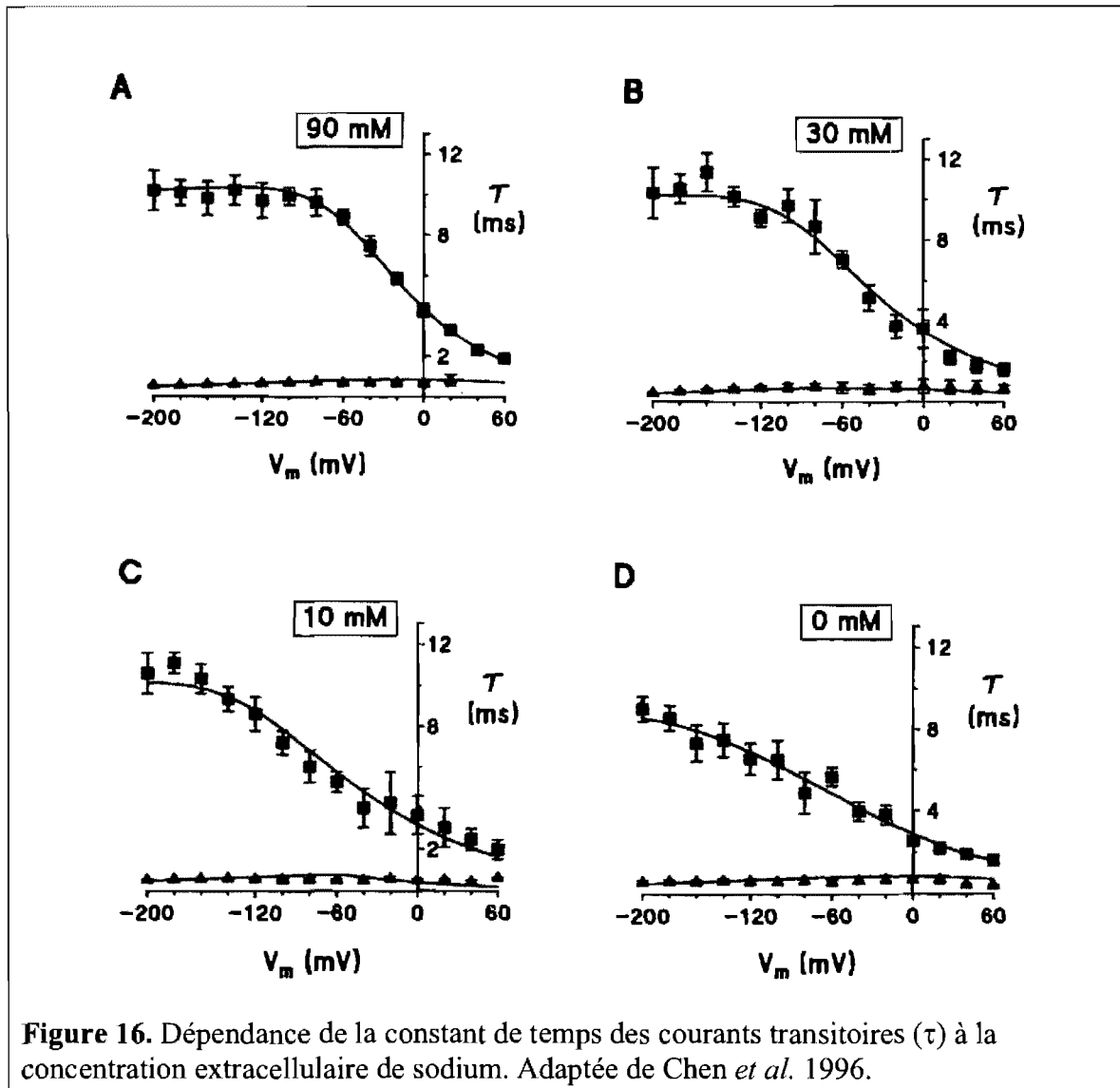


Les courants transitoires présentent une dépendance à la concentration extracellulaire de Na^+ ($[\text{Na}^+]_o$) (voir figure 15 E). En raison de la plage de voltage accessible relativement limitée, il est difficile de déterminer si l'amplitude totale de la charge déplacée (Q_{max}) diminue ou est seulement décalée vers les potentiels hyperpolarisants. La constante de temps des courants transitoires varie très peu en fonction de la concentration extracellulaire mais présente une dépendance au voltage avec un ralentissement marqué avec l'hyperpolarisation (voir figure 16).

Il a été montré que SGLT1, en absence de sodium, peut utiliser un gradient de H^+ pour activer le cotransport de glucose (Hirayama *et al.* 1994; Hirayama *et al.* 1997). Physiologiquement, cette fonction aurait un rôle important dans l'absorption de glucose par l'intestin où un microclimat acide existerait à la membrane luminale à bordure en brosse (Thwaites *et al.* 2007). Dans ces conditions, le $K_m^{\alpha\text{MG}}$ devient très fortement dépendant du voltage (voir figure 15). Ainsi, pour obtenir un transport maximal à -150 mV, il convient de fournir au moins 10 mM d' αMG . Malgré cela, il semble que l'affinité des protons à SGLT1 soit trois ordres de grandeur meilleure que l'affinité au sodium, $K_{0.5}^{\text{H}}$ et $K_{0.5}^{\text{Na}}$ étant respectivement de 3 μM et de ~ 20 mM (Hirayama *et al.* 1994).

La figure 9 (voir plus haut) illustre le mécanisme de fonctionnement du cotransporteur SGLT1, tel qu'initialement proposé par Parent *et al.* (1992). Il est possible, grâce à ce genre de modèle, lorsque le système est à l'équilibre, de reproduire les propriétés de SGLT1 (Q , τ , K_m de glucose et de sodium, etc). Pour ce faire, ce système est simulé numériquement en adjoignant une constante de vitesse k_{ij} à chaque branche reliant deux états et ajusté pour que toutes ces constantes reproduisent bien les paramètres mesurables expérimentalement (voir figures 14-16) (Parent *et al.* 1992b). Le meilleur ensemble de paramètres nous renseigne sur les étapes limitantes et permet d'expliquer certaines caractéristiques des courants transitoires (Gagnon *et al.* 2007a). Ce modèle a été, en 15 années, plusieurs fois modifié et raffiné. Certains groupes préconisent la présence de deux étapes intermédiaire entre C1 et C6 (Loo *et al.* 2005).

D'autres, n'ont besoin que d'une étape intermédiaire pour bien reproduire les propriétés de transport de SGLT1 (Gagnon *et al.* 2007b). Les résultats préconisant deux étapes intermédiaires doivent être analysés avec grande réserve puisqu'ils sont basés sur l'utilisation d'un mutant non fonctionnel. Avec l'amélioration des techniques expérimentales, d'autres étapes pourraient être détectées et venir modifier significativement le modèle actuellement utilisé.



De plus, les deux modèles en compétition, se basant sur des mutants de SGLT1 différents, arrivent à des conclusions différentes au sujet de la nature de l'étape limitante. Loo *et al.* (Loo *et al.* 2006) suggèrent que l'étape limitante est le relâchement intracellulaire, électroneutre, des deux ions sodium. Gagnon *et al.* (Gagnon *et al.* 2007a) proposent plutôt que l'étape limitante est la réorientation du transporteur vide dans la membrane. Cette disparité naît probablement du manque d'informations sur la dépendance intracellulaire au sodium et au substrat et sur l'utilisation de deux protéines mutantes différentes. À ce jour, une seule étude sur le mode de transport inverse a été menée (Eskandari *et al.* 2005). Cette dernière, menée en conditions de *patch-clamp* géant (un grand bout de membrane est arraché d'une cellule), ne reproduit peut-être pas le comportement de SGLT1 lorsqu'il est étudié sur une cellule intacte.

Le courant de fuite, qu'on croyait dû à un symport d'un ion Na^+ (Chen *et al.* 1997; Mackenzie *et al.* 1998), semble posséder une composante ionique différente dans certaines conditions expérimentales. En effet, un mutant de SGLT1, présentant un large courant de fuite, semble transporter du Na^+ et un ion non identifié. Cette caractéristique est présentement étudiée dans notre laboratoire.

Mais encore, l'hypothèse d'un transporteur vide de valence $z = -2$ est une simplification utile mais pas nécessairement vraie. Cette valeur, obtenue en lissant une courbe de Boltzmann sur la courbe de transfert de charge, peut ne pas représenter la réalité puisque la courbe de Boltzmann est elle aussi une approximation de la réalité : elle ne reproduit jamais complètement la courbe de transfert de charge chez SGLT1.

Ainsi, le transporteur Na^+ /glucose, très bien étudié, n'est pas encore tout à fait compris. Les résultats de simulations numériques doivent être analysés avec une très grande précaution. Nous croyons qu'une approche permettant la détection de mouvements ioniques, dans l'environnement externe de la membrane, pourrait nous aider à mieux comprendre le mécanisme de SGLT1 et des cotransporteurs ioniques en général.

2. Matériel et méthodes

2.1. Ovocytes de grenouille *Xenopus laevis*

Les grenouilles de *Xenopus laevis* (Nasco, Fort Atkinson, WI) sont anesthésiées puis quelques lobes ovariens sont retirés par incision abdominale et séparés manuellement. Les ovocytes sont alors triés, à la main, pour ne conserver que les sujets matures (stade V et VI) présentant un diamètre d'environ 1.2 mm et une sphéricité presque parfaite (Bissonnette *et al.* 1999). Ils sont alors placés dans une solution de collagénase pour une période variant de 30 à 60 minutes. Ce traitement est nécessaire afin d'éliminer toute traces de cellules folliculaires pouvant nuire aux mesures électrophysiologiques (Miledi *et al.* 1989). Un deuxième tri est requis afin de ne conserver que les ovocytes ayant survécu au traitement à la collagénase. Suivant un repos d'au moins vingt-quatre heures, un volume de 46 nL d'eau contenant 0.1 µg/µl d'ARN messenger codant pour myc-hSGLT1 (Bissonnette *et al.* 1999) est injecté à l'aide d'un système d'injection à précision nanométrique (*nanoject II*, Drummond Scientific Company, PA, U.S.A.). Lors de l'injection, un environnement Barth-antibiotique est utilisé afin d'éviter les complications provenant de contaminations bactériennes. Après injection, les ovocytes sont maintenus dans une solution de Barth à pH 7.6, contenant (en mM) 90 NaCl, 3 KCl, 0.82 MgSO₄, 0.41 CaCl₂, 0.33 Ca(NO₃)₂, 5 HEPES, 5% de sérum de cheval, 2.5 Na⁺-pyruvate, 100 U/ml pénicilline et 0.1 mg/ml de streptomycine. De 3 à 4 jours sont généralement nécessaires pour atteindre une expression maximale.

2.2. Solutions

Quatre solutions sont utilisées selon le contexte expérimental. La solution « saline » est utilisée pour perfuser les ovocytes à la pénétration des électrodes et comme solution de calibration. La solution dite « 10 Na » est une adaptation de la solution saline dans laquelle 80 mM de sodium a été remplacé par 80 mM de NMDG-Cl (N-methyl-D-glucamine-Chlore). Ces deux solutions, utilisées dans les expériences impliquant une électrode sélective au Na⁺, sont ajustées à pH 7.6 à l'aide de TRIS. Au besoin, 5 mM d'αMG est ajouté directement dans la solution saline ou 10 Na. Si une inhibition est désirée, 200 µM de phlorizine provenant d'une solution stock à base d'éthanol 90% sont

ajoutés à la solution contenant 5 mM d' α MG. Lors d'expériences avec électrodes sélectives aux H^+ , en conditions 0 Na^+ , 90 mM de Na^+ est remplacé par 90 mM de NMDG-Cl. Les solutions à pH 5.5 et 6.5 sont tamponnées à l'aide de 1.5 mM de MES (acide 2-(N-morpholino)ethanesulfonique) et ajustées au pH désiré à l'aide de TRIS. Les solutions à pH alcalin sont tamponnées à l'aide de 1.5 mM d'HEPES et amenées à pH 8.0 à l'aide de TRIS. Les solutions acides fortement tamponnées sont obtenues en remplaçant 1.5 mM de MES par 10 mM MES. La composition des solutions utilisées dans les diverses expérience est résumée dans le tableau I.

Tableau II. Composition des solutions

Composition (en mM)	NaCl	KCl	MgCl ₂	CaCl ₂	HEPES	MES	NMDG	pH
Salin	90	3	0.82	0.74	10	0	0	7.6
« 10 Na »	10	3	0.82	0.74	10	0	80	7.6
« 0 Na » Faiblement tamponnée	0	3	0.82	0.74	0	1.5	90	5.5, 6.5
« 0 Na » Fortement tamponnée	0	3	0.82	0.74	0	10	90	5.5, 6.5
« 0 Na » alcaline Faiblement tamponnée	0	3	0.82	0.74	1.5	0	90	8

2.3. *Électrophysiologie : appareillage et protocoles*

Des capillaires de borosilicate (diamètre externe 1 mm, diamètre interne 0.5 mm, FHC, Bowdoin, ME) sont étirés à l'aide d'une étireuse horizontale (Flaming Brown P-97, Sutter instruments corp., Novato, CA) puis remplis d'une solution de KCl 1M grâce à une seringue et un mince capillaire. Cette microélectrode est alors placée sur un support contenant une pastille d'Ag/AgCl. Au moment précédant la pénétration de l'ovocyte, la résistance de l'électrode est contrôlée et seules les électrodes présentant une résistance inférieure à $3M\Omega$ sont conservées.

Les données de courant (I_m) et de voltage (V_m) sont recueillies par un amplificateur à double électrode (OC-725C, WPI). À la sortie de l'amplificateur, I_m est automatiquement filtré par un filtre passe-bas à fréquence de coupure 1 kHz. V_m est enregistré directement dans l'ordinateur sans être filtré. Les résultats sont enregistrés et conservés sur un ordinateur personnel grâce au logiciel *clampex* de la suite *pClamp 8.2* (Axon instruments, Sunnyvale, CA).

Les pulses de voltages, d'une durée typique de 150 ms, sont générés au moyen du logiciel *clampex* et varient généralement de +40 à -140 mV à partir d'un potentiel de base défini à -50 mV. Les courbes courant-voltage (I-V) sont automatiquement générées à l'aide du logiciel *clampfit* faisant partie de la suite de logiciels *pClamp 8.2*. Les courants sensibles à l'ajout du substrat sont obtenus en soustrayant des valeurs obtenues en présence de substrat les valeurs obtenues dans la solution possédant une concentration saturante d'inhibiteur. Le courant sensible à l'inhibiteur est obtenu en soustrayant du courant obtenu dans la solution saline le courant enregistré en présence d'une concentration saturante de l'inhibiteur. Les courbes de transfert de charge en fonction du voltage (Q-V) sont obtenues par intégration des courants sensibles à l'inhibiteur, corrigés par soustraction du courant de fuite. Cette correction consiste à soustraire la valeur stationnaire du courant mesurée 150 ms après l'application d'un nouveau voltage membranaire.

2.4. Enregistrement du signal sélectif

2.4.1. Fabrication de l'électrode sélective de grand diamètre

Des capillaires de borosilicate sont d'abord étirés sur une étireuse horizontale, puis leur extrémité fine est cassée à un diamètre de 20 à 100 μm à l'aide de pincettes. Puis, un filament chauffant est approché, au microscope binoculaire, du bout cassé afin d'y niveler les irrégularités provenant de la cassure. Les électrodes sont individuellement trempées dans une solution de 1 :200 de 90% dichlorodiphenylsilane et d'acétone 99% et placées, bout vers le haut, sur un support en téflon. Le support en téflon est placé, durant 1h, dans un four réglé à 120°C. Les électrodes non utilisées sont entreposées dans

un dessiccateur sous vide ou dans un four réglé à 80°C. La figure 17 présente une électrode sélective prête à l'emploi.

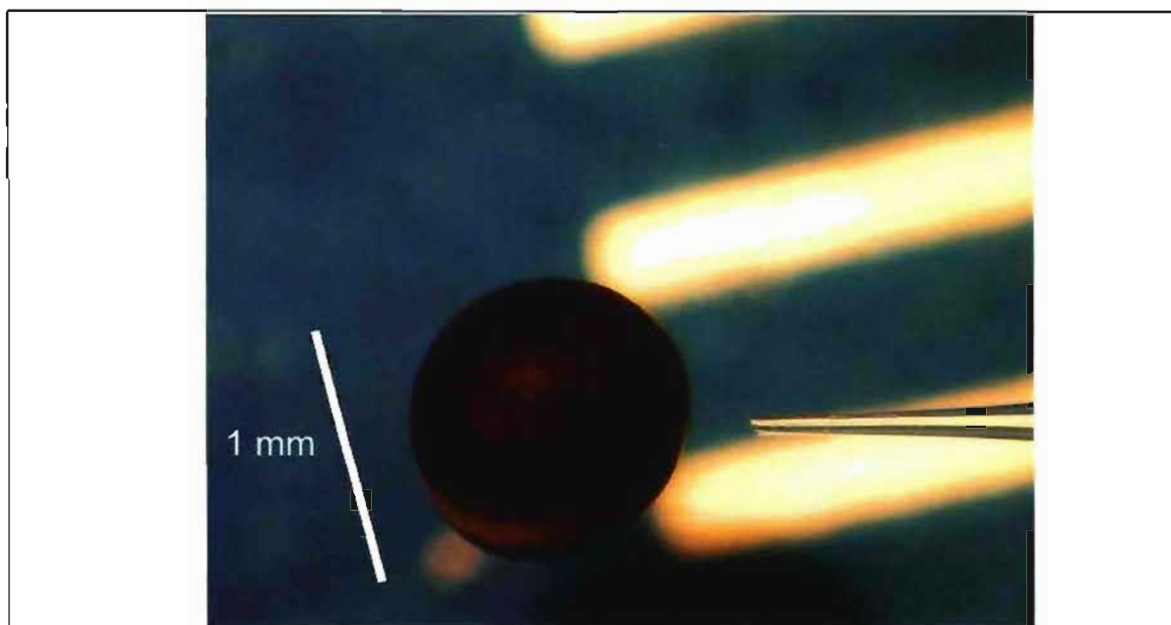


Figure 17. Une électrode sélective prête à l'emploi. L'électrode sélective est comparée à un ovocyte présentant un diamètre d'environ 1 mm (barres jaunes = 1 mm). (Photo personnelle)

Au moment de procéder à une expérience, une petite colonne de résine sélective (< 1 mm) est insérée dans le capillaire, par l'extrémité non cassée, à l'aide d'une fine aiguille et d'une seringue (Voir section suivante pour informations sur les résines utilisées). Une modeste pression est appliquée à la seringue afin d'éviter une expulsion massive de résine sélective. Une solution de référence est alors placée derrière la résine sélective, puis l'électrode est placée sur un porte-électrode duquel sort un fil d'Ag/AgCl. Ce porte-électrode possède une ouverture latérale permettant d'éviter une expulsion de la résine lors de l'insertion de la microélectrode sélective.

Lors de l'installation de l'électrode sur le montage, une feuille d'aluminium, mise à la terre, est enroulée autour du système électrode/porte-électrode. Cette isolation, combinée à une cage de Faraday, permet une diminution significative du niveau de bruit enregistré (voir Discussion).

2.4.2. Résines utilisées et solutions de référence

Le tableau III présente les résines utilisées, les solutions de référence et les ions interférents (s'il y a lieu). Les électrodes à Na^+ , à base du transporteur neutre ETH157, sont caractérisées par une interférence non négligeable à l'ion K^+ ($P_{\text{K}^+}/P_{\text{Na}^+} = +0.4$). La résine à H^+ (IE010), à base d'un échangeur ionique, ne possède aucune interférence ionique significative ($P_{\text{ion}}/P_{\text{H}^+} < 10^{-12}$). Les électrodes sélectives au Na^+ produisent une réponse de 58 mV/decade jusqu'à environ 3.2 mM Na^+ (Ammann *et al.* 1985). La résine IE010 produit une réponse presque idéale de 56 mV/decade sur une gamme de pH allant de 4 à 12 (Manuel de la compagnie). Une troisième résine, à base de ETH227, sélective au sodium, a précédemment été utilisée mais comportait la restriction majeure de perdre toute sa sélectivité en présence d'une trace de Ca^{2+} (R. A. Steiner 1979). Les ovocytes perfusés avec un milieu ne contenant pas de Ca^{2+} ne supportent pas suffisamment longtemps ce traitement et deviennent vite inutilisables.

Tableau III. Caractéristiques des résines sélectives

Résine	Ion	Solution de référence (mM)	Interférences majeures (P_i/P_{ref})
ETH157 (Fluka)	Na^+	NaCl (100)	K^+ : 0.4
		KH_2PO_4 (40)	
IE010 (WPI)	H^+	NaOH (23)	Aucunes
		NaCl (15)	
ETH227 (Fluka)	Na^+	NaCl (100)	Ca^{2+} -0.7

2.4.3. Système d'enregistrement

Un électromètre à deux canaux (Duo 773, WPI) est utilisé dans nos expériences. Afin de diminuer l'enregistrement de potentiels dû au courant injecté dans l'ovocyte qui passe par la résistance de la solution du bain, une fine microélectrode au KCl 1M (fabriquée avec la même méthode que les électrodes utilisées pour l'électrophysiologie) est placée près de l'électrode sélective, à la surface de l'ovocyte. Cette électrode est nommée « électrode de référence locale ».

L'électrode sélective et l'électrode de référence locale sont connectées, respectivement, au canal à haute et faible impédance. La valeur mesurée par l'électrode de référence locale est automatiquement soustraite à celle de l'électrode sélective, donnant le signal dû à l'activité de l'ion mesuré : $V_{\text{ion}} = V_{\text{sélective}} - V_{\text{ref}}$. V_{ion} est enregistré, non filtré, de façon variable selon le contexte expérimental :

- En conditions stationnaires (>20s), V_{ion} est enregistré sur un ordinateur personnel grâce au logiciel *Axoscope 8.2*. Au besoin, les changements de potentiel sont produits en variant directement le voltage de commande dans le logiciel.
- Les mesures en condition pré-stationnaire (<150 ms) sont enregistrées, non filtrées, en même temps que I_m et V_m dans *Clampex 8.2*.

2.4.4. Procédure expérimentale

2.4.4.1. Mesures stationnaires

Le signal sélectif est d'abord enregistré avec l'électrode sélective décollée de la surface de l'ovocyte, dans une solution à pH alcalin (7.6) ou à haut $[\text{Na}^+]$ (90 mM) pour les électrodes à pH et à Na^+ , respectivement. L'électrode sélective et son électrode de référence sont alors déposées à la surface de l'ovocyte et la solution de perfusion est changée pour la solution avec laquelle les mesures vont être menées (pH 5.5 et 10 Na respectivement). Lorsque V_{ion} est stabilisé (plusieurs secondes), le substrat est ajouté. Après stabilisation, le potentiel est varié, par incréments de 10 mV, de -50 à -90 mV. Puis, le potentiel de commande est de nouveau réglé à -50 mV et l'inhibiteur est ajouté à la perfusion. À la fin de chacune des mesures stationnaires l'électrode est décollée de l'ovocyte afin d'obtenir la véritable concentration de l'ion de la solution perfusée. Ainsi, l'expérimentateur connaît toujours la valeur précise de concentration dans deux solutions à concentration de l'ion primaire différentes, indépendamment de l'activité de transport de l'ovocyte (voir figure 19 C pour un exemple).

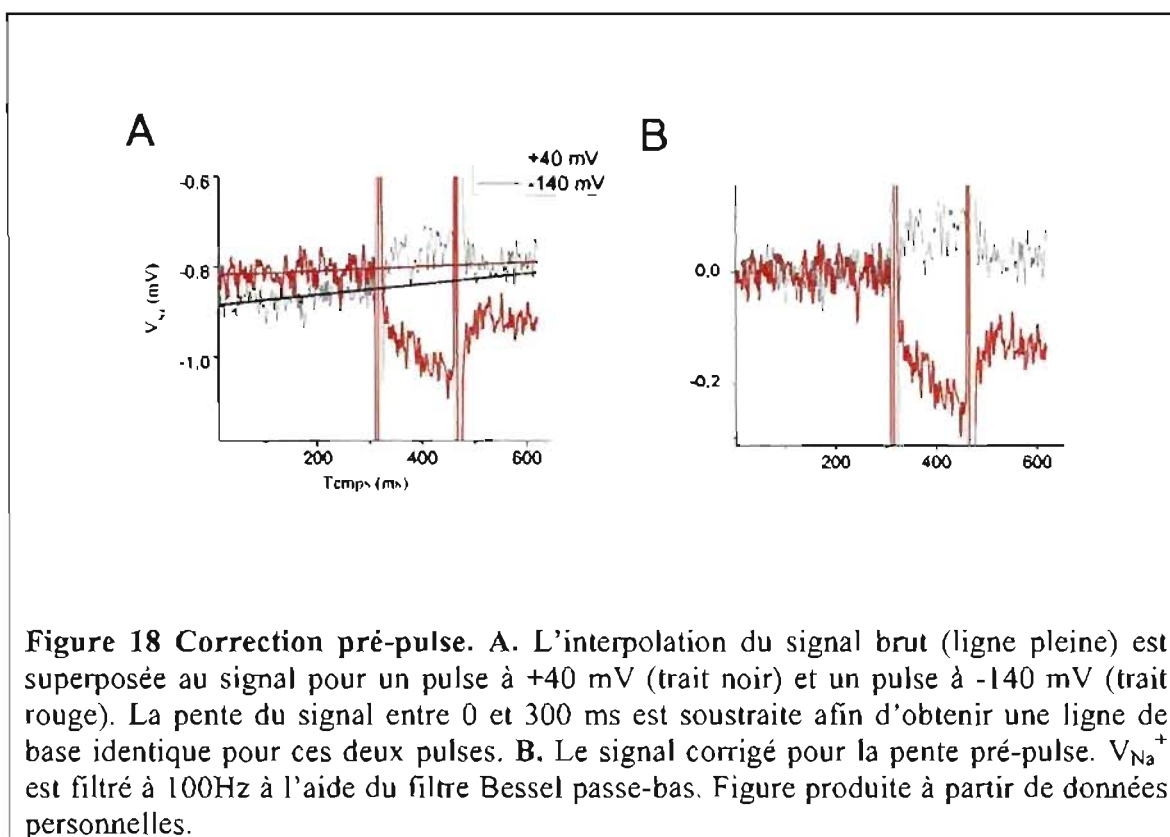
2.4.4.2. Mesures avec pulses

L'électrode sélective et son électrode de référence sont déposées sur un ovocyte en condition de voltage imposé à -50 mV. De 10 à 200 séries de pulses variant entre -140 et +40 mV sont alors effectuées et automatiquement moyennés avec le logiciel *Clampex*. Lors de changements de solution de perfusion, une période d'attente d'environ 2 minutes est respectée, permettant à la nouvelle solution de diffuser dans le piège ionique.

L'application des différentes séries de changements de potentiel membranaire est toujours précédée d'une période d'au moins 100 ms où le voltage de l'ovocyte est imposé à -50 mV. Cette période est primordiale pour l'analyse de l'effet du voltage sur la mesure de changement de concentration rapide (< 150 ms). En effet, il est possible que la concentration ionique mesurée par l'électrode sélective, à la fin d'un pulse, ne soit pas identique à la ligne de base du pulse précédent. De plus, l'électrode sélective peut présenter une dérive dans le temps. Il est primordial que tous les pulses aient la même ligne de base pour pouvoir les comparer entre eux. Les différents pulses sont donc normalisés en soustrayant la pente moyenne durant cette période dite « pré-pulse ». La figure 18 présente un exemple d'une telle correction.

2.4.5. Filtration du signal

Afin d'augmenter le rapport signal sur bruit des mesures pré-stationnaires (< 150 ms), un filtre passe-bas à fréquence de coupure de 0.1 kHz est appliqué aux enregistrements précédemment moyennés. Les mesures stationnaires sont réduites par une moyenne mobile (*moving average*) de façon à conserver 1 point par seconde sur les 100 points enregistrés.



2.4.6. Correction des mesures pré-stationnaires

Les mesures de changements de concentration pré-stationnaires sont corrigées pour une différence de voltage provenant du passage du courant au travers de la résistance « de seal » formée entre l'électrode sélective et la membrane plasmique. Pour établir la contribution de ce phénomène, nous supposons que tout le signal mesuré en présence d'une concentration saturante de l'inhibiteur (la phlorizine) est un artéfact électrique puisque SGLT1 ne présente aucune activité dans ces conditions. Cette hypothèse est en accord avec l'observation que ce changement de V_{ion} est proportionnel au courant total de l'ovocyte lorsqu'on change le potentiel membranaire (voir figure 22 A). Une résistance effective est obtenue en lissant une droite sur la courbe de V_{ion} en fonction de I_m en présence d'une concentration saturante de phlorizine. Cette résistance est alors utilisée pour soustraire un voltage proportionnel au courant total qui doit être généré en absence de phlorizine. Cette correction ohmique reste valide pour toutes les mesures effectuées avec le même ovocyte sans avoir bougé l'électrode sélective.

2.4.7. Analyse du bruit électrique

L'analyse du bruit électrique, présentée dans la section Discussion, a été effectuée avec le logiciel *Clampfit*. Pour y arriver, la fonction « spectre de puissance » a été appliquée au premier 200 ms d'un enregistrement représentant la moyenne de 20 séries de pulses. Le résultat, présentant les caractéristiques d'un bruit blanc, a été moyenné sur toutes les fréquences pour obtenir une puissance moyenne.

3. Measuring ion transport activities in *Xenopus* oocytes using the Ion-Trap technique

Soumis au American journal of physiology: Cell Physiology le 22 novembre 2007

3.1. Abstract

The Ion-Trap technique is an experimental approach allowing measurement of changes in ionic concentrations within a restricted space (the *Trap*) comprised of a large diameter ion-selective electrode apposed to a voltage-clamped *Xenopus laevis* oocyte. The technique is demonstrated with oocytes expressing the Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1), using Na⁺ and H⁺-selective electrodes. Bath substrate diffused into the *Trap* within 20 s, stimulating Na⁺/glucose influx which generated a measurable decrease in the *Trap* Na⁺ concentration ($[Na^+]_T$) by 0.080 ± 0.009 mM. Membrane hyperpolarization produced a further decrease in $[Na^+]_T$ which was proportional to the increased cotransport current. In a Na⁺-free, weakly buffered solution (pH 5.5), H⁺ drives glucose transport through SGLT1 and this was monitored with a H⁺-selective electrode. Time dependent changes in $[Na^+]_T$ or $[H^+]_T$ were also detected during a membrane potential pulse (150 ms) in the presence of substrate. In the absence of substrate, hyperpolarization triggered rapid reorientation of SGLT1 cation binding sites, accompanied by cation capture from the *Trap*. The resulting change in $[Na^+]_T$ or $[H^+]_T$ is proportional to the presteady-state charge movement. The Ion-Trap technique can thus be used to measure steady-state and presteady-state transport activities and provides new opportunities for studying electrogenic and electroneutral ion transport mechanisms.

Key words: Ion-selective electrode; cotransporter; SGLT1; electrogenic; electroneutral; transporters;

3.2. *Introduction*

For the past 20 years, measurement of specific membrane transport activities has been conveniently achieved by expressing individual transport proteins in *Xenopus laevis* oocytes. For electrogenic transport systems, electrophysiology is the method of choice as it provides sensitive detection of the transport current with excellent time resolution. The two-electrode voltage-clamp technique can be used to study steady-state currents over periods of seconds to hours as well as presteady-state charge movements occurring in the ms range (Parent *et al.* 1992a; Forster *et al.* 1998; Coady *et al.* 2002). For electroneutral or weakly expressed transporters, radiolabelled substrate are used for prolonged uptake experiments (minutes to hours). Alternatively, ion-selective microelectrodes (ISE) can be used to measure intracellular ionic activities but this approach is plagued by poor time resolution due to the large volume of an oocyte and to the intrinsically slow response time of these electrodes (Cougnon *et al.* 1996; Sciortino *et al.* 1999). Taking advantage of the large size of a *Xenopus laevis* oocyte (1.2 mm in diameter), we developed the Ion-Trap technique which uses a large ISE characterized by low impedance (<0.5 G Ω) and a typical response time of 20 ms. As the ISE is gently pushed against the surface of an oocyte, it isolates a small volume of extracellular solution (the *Trap*) in which transport-dependent changes in ionic concentrations can be detected. In this paper, we demonstrate that the Ion-Trap technique makes it possible to detect steady-state changes in ionic concentration arising from cotransport fluxes as well as fast ion binding/release events associated with the voltage-dependent reorientation of the cotransporter's ionic binding sites. The data demonstrate that this method can be used to study the transport of ions by both electroneutral and electrogenic transporters with good sensitivity and time resolution.

3.3. *Materials and methods*

3.3.1. Ion-selective electrode fabrication

Borosilicate capillaries (1 mm OD x 0.5 mm ID with fibres, FHC, Bowdoin ME) were pulled using an horizontal puller (Flaming Brown P-97, Sutter Instruments Corp., Novato, CA) and the tips were broken with forceps, while visualized under a microscope, to provide an approximate tip diameter of 20-100 μm ; the tips were then fire polished to create a smooth surface. The microelectrode was briefly dipped in a 1:200 mixture of 90% dichlorodiphenylsilane (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) and 99.9% acetone (Sigma) then positioned tip-up on a rack and baked at 120°C for an hour. Before use, the electrode was backfilled with a small volume (<1 mm of capillary length) of ion-selective resin using thin capillary tubing and a syringe. Na^+ -selective electrodes were made with a Na^+ neutral carrier cocktail (#71178, Fluka, Oakville, ON, Canada) which, according to the manufacturer, provides an ideal response of 58 mV/decade down to 3.2 mM (Ammann *et al.* 1985). This resin exhibits some interference with potassium ($P_{\text{Na}}/P_{\text{K}} = 2.5$) but presents the advantage of being insensitive to Ca^{2+} in the physiological concentration domain. H^+ -selective electrodes were made with IE010 ion-exchanger cocktail (World Precision Instruments, Sarasota, FL) and provide a response of 56 mV/decade from pH 4 to 12 without any significant ionic interferences (WPI data sheet). Na^+ -selective electrodes were backfilled with 100 mM NaCl and H^+ -selective electrodes with (in mM): 40 KH_2PO_4 , 23 NaOH and 15 NaCl (pH= 6.82). Unused silanized electrodes can be stored in a desiccator or in an oven set at 80°C for days without significantly affecting their properties.

3.3.2. Oocyte preparation

Oocytes were surgically removed from *Xenopus laevis* frogs, dissected and defolliculated as previously described (Gagnon *et al.* 2007a). Healthy oocytes were injected with 46 nl of water containing 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ mRNA coding for myc-hSGLT1 (this epitope-tagged version of human SGLT1 displays properties that are indistinguishable from the untagged form, as previously demonstrated (Bissonnette *et al.* 1999)). Oocytes were maintained in Barth's solution (in mM: 90 NaCl, 3 KCl, 0.82 MgSO_4 , 0.41 CaCl_2 ,

0.33 Ca(NO₃)₂, 5 HEPES, pH 7.6) supplemented with 5% horse serum, 2.5 mM Na⁺ pyruvate, 100 U/ml penicillin, 1 mg/ml kanamycin and 0.1 mg/ml streptomycin for at least 3 days following injection before electrophysiological experiments were performed.

3.3.3. Solutions

When needed, alpha-methyl-D-glucose (α MG, a non-metabolized glucose analogue) and/or 200 μ M phlorizin (Pz) were added to the Na⁺-buffer (in mM: 90 NaCl, 3 KCl, 0.82 MgCl₂, 0.74 CaCl₂, 10 HEPES and adjusted to pH 7.6 with Tris). Sodium replacement was performed with N-methyl-D-glucamine (NMDG). Sodium-free acidic solutions (pH 5.5) were buffered with 1.5 mM 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid hydrate (MES). In Na⁺-free, acidic solutions, the affinity for α MG is greatly reduced ($K_m^{\alpha MG} = 20$ mM at -50mV (Hirayama *et al.* 1994)) and 35 mM α MG was needed to obtain a large cotransport current. Under these conditions, 35 mM D-mannitol was present in the pH 5.5 solution in order to prevent osmotic shock when switching to the high α MG concentration solution; for both solutions, the NaCl (or NMDGCl) concentration was reduced to 65 mM (50 mM mannitol replacement). Unless otherwise mentioned, all chemicals were obtained from Sigma-Aldrich.

3.3.4. Recording circuitry

Voltage-clamp recordings and current filtering (1 kHz) were performed using the OC-725C two-electrode voltage-clamp headstage and amplifier (Warner Instrument Corp., Hamden, CT). Data recording was performed using a Digidata 1322A recording system and pClamp 8.2 software (Axon Instruments Inc, Union City, CA). The microelectrodes were filled with 1M KCl and presented resistances lower than 2 M Ω . Ion-selective measurements were performed with the Duo773 dual channel high impedance electrometer (World Precision Instruments). The signal from a supplementary 1M KCl microelectrode placed near the ISE was automatically subtracted from the ion-selective signal to eliminate the voltage drop associated with the bath series resistance. The ion-selective signal (V_{ion}) was amplified by the electrometer, digitized

and recorded unfiltered by pClamp. A grounded piece of aluminium foil was wrapped around the ISE holder to reduce electrical noise.

3.3.5. Pulse protocols and data analysis

A variety of voltage pulse protocols were used, with voltages ranging from -155 mV to +40 mV. In all cases, the holding potential was set at -50 mV. When needed, 10 to 200 identical pulses were averaged by pClamp in order to reduce electrical noise in V_{ion} . Extra filtering was achieved using the Clampfit lowpass Bessel filter ($f_c = 100$ Hz). Charge transfer curves were obtained as previously described (Gagnon *et al.* 2007a). Briefly, current in the presence of Pz was subtracted from currents measured in the Na^+ buffer lacking Pz. The resultant signal was corrected for steady-state currents by subtracting the mean of a 20 ms time window positioned at the end of the pulse. Integrating this signal yielded the total charge transferred at each potential. Fast V_{ion} changes were obtained by averaging 20 ms time windows at 75 or 125 ms after the initiation of the pulse. Slopes were obtained by fitting a straight line to the linear part of the V_{ion} vs time curve. For steady-state measurements of V_{ion} , a slow linear drift correction was applied to make sure that identical solutions yielded identical V_{ion} at the two different times. The amplitude of this drift was, on average, $-0.7 \pm 1.2 \mu V/s$ ($n=9$). Typical recordings are presented and similar experiments have been repeated 3 times or more in oocytes obtained from at least 2 different donors. All statistical results represent mean \pm SE.

3.4. Results

A *Xenopus laevis* oocyte expressing hSGLT1 was transferred to the bath of a classical two electrode voltage clamp set-up. Current and voltage electrodes were inserted in the oocyte and V_m was clamped at -50 mV. Using a third micromanipulator, the tip of the ISE was immersed in the bath solution and calibrated using extracellular Na^+ concentrations of 90 and 10 mM or using Na^+ -free solutions adjusted to pH 7.5 and 5.5, depending on the selectivity of ISE used. The ISE was then gently pushed against the oocyte viteline membrane and a fourth manipulator was used to position a reference KCl electrode within 50 μm of the ISE tip. At this point, two different types of measurement can be performed. To examine steady-state conditions, the *Trap* ionic concentration is measured over time courses of several min as a membrane transport mechanism is stimulated by addition of a cotransported substrate to the bath (this portion of the procedure can be applied to electroneutral transport systems) or by a change in the oocyte holding potential. The ionic concentration measured corresponds to the *Trap* ionic concentration needed to balance the ionic flux through the membrane patch bounded by the ISE with the ionic diffusion across the seal formed at the ISE/membrane junction. To examine initial rate conditions (for electrogenic membrane transport systems only), the transport system is abruptly stimulated by a voltage pulse and the initial change in the *Trap* ionic concentration is measured. In this case, the ionic gradient between the *Trap* and the bath solution remains almost constant and the change in the *Trap* ionic concentration reflects exclusively the change in the ionic transport rate in the membrane patch bounded by the ISE.

3.4.1. Steady-state concentration measurements

Fig. 1A presents a typical experiment where a Na^+ -selective electrode was applied against the surface of a voltage-clamped oocyte expressing hSGLT1. The external solution was switched from a normal saline solution, containing 90 mM Na^+ , to a solution where Na^+ had been reduced to 10 mM using NMDG as the replacement cation. As expected, the Na^+ -selective signal (V_{Na}) became more negative and, after 100 s, stabilized to a level that was 53 mV more negative than the value recorded in the

presence of 90 mM Na^+ . This is consistent with a near ideal response of 55.5 mV/decade. Adding 5 mM αMG to the bath solution was associated with a total oocyte current change of -205 nA. A drop in the trapped sodium concentration ($[\text{Na}^+]_{\text{T}}$) could be simultaneously observed from 10.11 to 10.03 mM (see Fig. 1A). In a series of 8 experiments performed on 5 different oocytes we found that, upon addition of αMG to the bath solution, an average current of -245 ± 18 nA was generated and the *Trap* V_{Na} decreased by an average of 203 ± 22 μV , corresponding to a $\Delta[\text{Na}^+]_{\text{T}}$ of -0.080 ± 0.009 mM. Please note that this type of experiment can be performed with an electroneutral transport mechanism. In the experiment shown, the drop in $[\text{Na}^+]_{\text{T}}$ was further increased by changing V_{m} in 10 mV steps from -50 mV to -90 mV. After the total oocyte current was corrected for the presence of minor currents, unrelated to SGLT1 (the current in the presence of Pz was measured at each V_{m} before the experiment), a linear correlation was observed between the change in $[\text{Na}^+]_{\text{T}}$ and the voltage-dependent change in the cotransport current (see Fig. 1B). In the absence of αMG , the Pz-sensitive current (the so-called leak current) measured at -50 mV is minimal and $[\text{Na}]_{\text{T}}$ reached the value predicted by the linear relationship between the phlorizin-sensitive current (I_{Pz}) and $[\text{Na}]_{\text{T}}$.

The same type of experiment can be performed using H^+ to activate SGLT1 and a H^+ -selective electrode to measure the *Trap* H^+ concentration (reported here as pH_{T}) (Hirayama *et al.* 1994; Hirayama *et al.* 1997). Fig. 1C depicts such an experiment performed in the absence of Na^+ and with a pH 5.5 external solution weakly buffered with 1.5 mM MES. In the absence of αMG , SGLT1 exhibits an inward leak current which is thought to originate from an uncoupled proton influx (Hirayama *et al.* 1994); thus, pH_{T} stabilized at 5.61 i.e. slightly more alkaline than the bath solution. When protons supply the driving force, the affinity for αMG is reduced and a high sugar concentration must be present to generate a significant cotransport current. When 35 mM αMG was added to the bath, an additional inward current of -188 nA was generated and pH_{T} alkalinized from 5.61 to 5.73. With αMG present, the voltage was then stepped, in -10 mV increments, to -80 mV. When 200 μM Pz was added to the bath, the leak current disappeared (leak current ≈ -50 nA at -50 mV) and the steady-state pH_{T} changed from 5.61 to 5.56 within 20 s. The steady-state pH_{T} value reached at each voltage is

plotted in Fig. 1D and was proportional to the α MG-stimulated cotransport current. The same experiment was performed 5 times with 2 different ISE on 5 different oocytes yielding the following average results: i) in the presence of pH 5.5 buffer, pH_T averaged 5.66 ± 0.04 , ii) addition of 200 μM Pz acidified pH_T to 5.59 ± 0.02 and demonstrated an average Pz-sensitive leak current of -86 ± 20 nA, iii) perfusion with 35 mM α MG generated an average inward current of -313 ± 44 nA and was associated with *Trap* alkalinisation to $\text{pH } 5.85 \pm 0.07$.

3.4.2. Fast $\Delta[\text{Na}^+]_T$ measurements

Fig. 2 shows the membrane current (I_m) and V_{Na} during 150 ms duration V_m pulses. A voltage-dependent slope clearly appears in the V_{Na} tracings when V_m is abruptly changed in the presence of 5 mM α MG. For negative V_m pulses, V_{Na} becomes progressively more negative with time, which is consistent with Na^+ leaving the *Trap* by entering the cell through the patch of membrane bounded by the ISE. When α MG is removed, the slope disappears and is replaced by a steady-state value of V_{Na} which varies by ~ 300 μV from the most negative (-140mV) to the most positive ($+25$ mV) V_m levels. Adding 200 μM Pz further reduces the steady-state change in V_{Na} by 50%. Fig. 3 shows the average instantaneous slope (ρ) of the V_{Na} vs t curve along with the current caused by the addition of 5 mM α MG ($I_{\alpha\text{MG}}$) for a series of 8 oocytes. The slopes were measured between $t=30$ and $t=150$ ms at each membrane potential studied. As shown in Fig. 3, the ρ vs V_m curve is perfectly parallel to the $I_{\alpha\text{MG}}$ vs V_m curve, which indicates that the Ion-Trap technique is capable of detecting the minute changes occurring in $[\text{Na}^+]_T$ which are due to activation of the cotransport mechanism within the 150 ms duration of the voltage pulse. In the absence of α MG, time-independent changes in V_{Na} are observed when the potential is stepped to different levels. A major portion of this signal is related to SGLT1 as it disappeared in the presence of Pz (see Fig. 2). In the presence of Pz, the remaining change in V_{Na} was found to be proportional to the total oocyte current (Fig. 4A). This suggests that the remaining sources of change in V_{Na} are due to a constant resistance multiplied by the current circulating at any moment between the oocyte and the bath current electrode. We hypothesized that this voltage drop could occur through the loose seal resistance created by the contact between the ISE and the

oocyte membrane. If an average ISE covers $1/2000^{\text{th}}$ of the total oocyte geometrical surface, the potentials presented in Fig 4A would thus be due to the measured I_m divided by 2000 and then multiplied by a resistance of $0.5 \text{ M}\Omega$. This appears reasonable for a “seal” resistance between a fire-polished pipette of more than $50 \mu\text{m}$ in diameter at the vitelline membrane of an oocyte. Recordings were corrected for this local voltage drop across the seal resistance created by the ISE. To do so, an effective resistance was measured by fitting a straight line through the V_{ion} vs whole oocyte current in the presence of the inhibitor for each set of recordings. Data were corrected by subtracting this effective resistance multiplied by the whole oocyte current during each condition. In the absence of αMG , these corrected V_{Na} were used to accurately estimate the sudden change in $[\text{Na}^+]_{\text{T}}$ that was associated with the non-cotransport activity of SGLT1 at different potentials. This value, measured in mV (ΔV_{Na}), is called “the *Step*” and is presented in Fig. 4B as a function of V_m for a series of 8 oocytes. This amount of Na^+ that rapidly moves in or out of the *Trap* upon changing V_m in the absence of αMG is reminiscent of the presteady-state charge movements (Q - V_m curve) that have been observed for a variety of cotransporters and pumps (Parent *et al.* 1992a; Holmgren *et al.* 1994; Forster *et al.* 1997; Lu *et al.* 1999). For the same series of 8 oocytes, the Q - V_m curve was measured by integrating phlorizin-sensitive currents ($I_{0\alpha\text{MG}} - I_{\text{Pz}}$) and the average data is presented in Fig. 4B. In the presence of 10 mM Na^+ , the Q - V_m curve doesn't reach a minimum within the experimental range of negative V_m . Nevertheless, it could be fitted with a Boltzmann curve:

$$Q = \frac{Q_{\text{hyp}} - Q_{\text{dep}}}{1 + \exp\left(\frac{V_m - V_{0.5}}{dV_m}\right)} + Q_{\text{dep}} \quad (1)$$

Under these conditions, if Q_{dep} is set to 5 nC , the best parameter values are: $V_{0.5} = -164 \pm 21 \text{ mV}$, $Q_{\text{hyp}} = -50 \pm 14 \text{ nC}$ and $dV_m = 48 \pm 3 \text{ mV}$. The Boltzmann fit of Q shown in Fig. 4B is superimposed onto the *Step* vs V_m curve and it can be seen that the two parameters vary across membrane potentials almost identically with each other. This is consistent with the hypothesis that a rapid change in V_m generates an electrogenic conformational change which can be observed as the Q vs V_m curve. This conformational change allows the Na^+ binding site to be exposed to one side or the other of the membrane and a fraction of the charge movement detected is thought to be

associated with the binding/debinding of Na^+ itself. Using the Ion-Trap Technique, this Na^+ movement between the *Trap* and the cotransporters can be directly detected.

3.4.3. Fast ΔpH_T measurement

The same analysis of rapid SGLT1-mediated changes in cation concentration can be performed when protons are used to drive the glucose cotransporter in the absence of sodium. Fig. 5 shows a typical experiment performed with a H^+ -selective electrode in Na^+ -free buffer at pH 5.5. There is clear evidence for a slope in the presence of 35 mM αMG between $t=60$ and $t=150$ ms. In the absence of glucose, there is a significant leak ($I_{0\alpha\text{MG}} - I_{\text{Pz}}$) which, at -140 mV, corresponds to $\sim 14\%$ of $I_{\alpha\text{MG}}$. In agreement with the presence of a relatively large leak, the V_{H} vs time curve in the absence of αMG is characterized by a *Step* and a certain slope during the time course of the pulse duration. The complete experimental series was performed on 3 oocytes and includes recordings obtained with 0, 2.5 and 35 mM αMG , and in the presence of 0.2 mM Pz. Once again, there was a strong similarity between the whole oocyte cotransport current ($I_{\alpha\text{MG}}$) and the slope of the V_{H} vs time curve for each of the two αMG concentrations (see Fig. 6A). In the absence of αMG the *Step*, measured between $t=130$ and $t=150$ ms, is proportional to the transferred charge, obtained by integrating the Pz-sensitive current over time. (see Fig. 6B). Because of the non-negligible leak current observed at pH 5.5 (see Fig. 5), the V_{H} vs time curve included both a *Step* and a slope which is associated with a significant steady-state proton flux. The presence of a slope during the voltage pulses makes it difficult to precisely estimate the amplitude that can be specifically attributed to the *Step*. Consequently, we chose to estimate the H^+ -*Step* by measuring the difference between the value of V_{H} recorded at the end of the voltage pulse (which includes the *Step* and the slope contribution) and the value recorded 100 ms after V_{m} was returned to -50 mV where the oocyte leak current and V_{H} slope are observed to be negligible. In the presence of Na, the same treatment proved effective in giving the same $\Delta[\text{Na}^+]_T$ as when it was calculated from the levels measured during the pulse.

3.4.4. Control experiments

Several control experiments were performed to confirm that the measured changes in V_{ion} were a direct reflection of the cotransporter activity. First of all, the slopes measured during a voltage pulse are phlorizin-sensitive (see Fig. 2 and Fig. 5). Both the slope and the *Step* disappear when the electrode is pulled slightly away from the oocyte surface. Moreover, the Na^+ *Step* disappears when the bath $[\text{Na}^+]$ is increased to 90 mM Na^+ . This is expected since the electrode response is logarithmic and the ratio between the cotransporter signal amplitude and the ambient $[\text{Na}^+]$ concentration becomes negligible at high $[\text{Na}^+]$. In contrast, the ohmic contribution from the patch current multiplied by the seal resistance (see Fig. 4A) remains intact when $[\text{Na}^+]$ is increased. With a H^+ -selective electrode, the slope of V_{H} in the presence of αMG must represent a change in $[\text{H}^+]_{\text{T}}$ since the slope can be reduced by $36 \pm 4\%$ ($n=4$) by increasing the bath buffer concentration from 1.5 to 10 mM MES. Despite the fact that the H^+ -electrode is more sensitive, in absolute terms, at higher pH levels, no change in V_{H} can be detected at pH 8.0, presumably due to SGLT1 (rabbit) having a H^+ affinity of 3 μM (i.e. at pH=5.5) (Hirayama *et al.* 1994). Confirmatory experiments were also performed with the human H^+ /myo-inositol transporter where we observed a clear slope in V_{H} vs time measurements when in the presence of myo-inositol and an acidic buffer.

3.5. Discussion

3.5.1. Detection limits

Traditionally, ISEs have tip diameters much smaller than 1 μm and present impedances on the order of tens of $\text{G}\Omega$ (Fry *et al.* 2002). They are characterized by a high electrical noise level and slow rise time. To overcome these limitations, we used large ISEs. We quickly found that ISEs with tips larger than 100 μm do not hold resin tightly enough to perform long experiments while tips smaller than 20 μm were too resistive ($>500 \text{ M}\Omega$), which compromised the sensitivity and the time resolution of the technique. We thus settled on ISEs in the 20-100 μm range. We routinely achieve ISE impedances as small as 100 $\text{M}\Omega$, thus reducing their characteristic response time to ~ 20 ms (Fig. 2 and Fig. 5). If the signal is filtered with a low-pass Bessel filter with a 1 kHz cutoff frequency, a typical noise level of 0.1 mV can regularly be achieved. When used to detect ion concentration changes within a 150 ms voltage pulse, the cut-off frequency can be reduced to 100 Hz and the noise level can be lowered to approximately 0.04 mV. The noise level can be further reduced by a factor of 3 to 10 by averaging 10 to 100 identical voltage pulses. For non-electrogenic transporters, steady-state measurements must be used and the time response is limited by the time typically required for the extracellular solution to gain access to the *Trap* (~ 20 s). Under these circumstances, the Ion-Trap signal can be digitised at 100 Hz and local averaging can be performed to yield 1 point per s displaying a noise level of $\sim 10 \mu\text{V}$. The sensitivity of the signal is then limited by spontaneous fluctuations reaching 0.1 mV in amplitude over periods of minutes (see Fig 1A). For an ideally selective ISE, a sensitivity of 0.1 mV corresponds to a change in ionic concentration of 0.4%.

3.5.2. Steady-state measurements

The Ion-Trap technique was first used to examine steady-state conditions i.e. measuring the ionic concentration in the *Trap* when the flux across the membrane is exactly balanced by diffusion across the seal resistance between the ISE and the plasma membrane. In the absence of αMG , $[\text{Na}^+]_{\text{T}}$ is very close to the bath $[\text{Na}^+]$. Addition of glucose generates a shift in V_{Na} which can be resolved by this technique, as indicated by

the small SE associated with this measurement (-0.080 ± 0.009 mM). Note that, under steady-state conditions, the transporter need not be electrogenic and any transporter mediating a Na^+ flux of 7 nmol/h in an oocyte would generate the same signal. Employing an electrogenic transporter allowed us to change the ionic flux rapidly through application of different membrane potentials. When V_m is changed from -50 to -90 mV in 10 mV increments, Fig. 1A and Fig. 1B show that less than 20 s are required for a new equilibrium to be reached between the *Trap* and the bath and that the steady-state value reached after this short delay is proportional to the cotransport current.

Steady-state measurement can also be performed while measuring external pH (pH_T) in the absence of Na^+ . Upon changing the perfusion solution from a pH 7.5 buffer to a pH 5.5 buffer, pH_T became more acidic but stabilized before reaching pH 5.5. This steady-state difference is due to the presence of a significant leak current mediated by SGLT1 at acidic pH. This is confirmed by the fact that phlorizin perfusion inhibited the leak current and induced a further acidification of the *Trap* that progressively tended toward bath pH (see Fig. 1, C and D). This indicates that the leak current, in the absence of Na^+ , is indeed mediated by proton transport. This is a significant observation as the ionic nature of the leak current through SGLT1 remains poorly understood. Addition of αMG generated a large inward current and concomitant alkalinisation of the *Trap*. Fig. 1D shows that the pH_T , reached at steady state, is proportional to the αMG cotransport current. With H^+ fluxes in the presence of a weakly buffered extracellular solution (1.5 mM MES), the method detection limit would correspond to a change in cotransport current of 20 to 50 nA which corresponds to a proton flux of 0.7 to 1.8 nmol/hour per oocyte.

3.5.3. Initial rate measurements

The Ion-Trap technique can also detect voltage-dependent changes in the *Trap* ionic concentrations over the initial 20 to 150 ms of a voltage pulse. During this very short period, the ionic concentration in the *Trap* is far from attaining a new steady-state value as ~ 20 s would be required to achieve this. We are thus dealing with initial rate conditions where the change in the *Trap* ionic concentration reflects a change in the ionic transport across the membrane covered by the ISE with minimal changes in the

ionic flux across the seal between the *Trap* and the external solution. The changes in V_{ion} are rather small over such short time periods and a correction needs to be applied for the voltage drop across the seal resistance. This is best measured in the presence of Pz such that no SGLT1-dependent ion fluxes can occur across the patch of membrane covered by the ISE. Under these conditions, there remained a voltage-dependent change in V_{ion} which was proportional to the total oocyte current (Fig 4A). This ΔV is thought not to represent any change in the local cationic concentration since it is still present when the absolute sensitivity of the electrode is decreased by raising the ambient cationic concentration well above detectable limits (90 mM for Na^+ -electrode)(data not shown). In 8 experiments, the slope of the V_{Na} vs I_m (Fig. 4A) averages $100 \pm 30 \Omega$. This is an apparent seal resistance since it is calculated using the total current of the oocyte instead of the current fraction passing through the membrane patch covered by the ISE. Assuming that the ISE covers 1/2000th of the oocyte surface, this apparent resistance would correspond to an effective seal resistance of $230 \pm 70 \text{ k}\Omega$. When this ohmic ΔV is subtracted from the ion-sensitive signal, a significant voltage-dependent V_{ion} remains which represents a real change in the local cationic concentration. This V_{ion} is thought to represent the cations that bind to or are released from the cotransporter when a change in membrane potential produces a reorientation of the cation binding site. According to the current SGLT1 transport model, we expect an extracellular change in cation concentration that is proportional to the presteady-state charge displacement (as seen in a Q - V_m curve). Our results are in agreement with this idea since the Q - V_m curve nicely reproduces the characteristics of the *Step*- V_m curve with either Na^+ or H^+ -selective electrodes (see Fig. 4B and Fig. 6B).

In the presence of αMG , a slope in the V_{Na} vs time curve was observed. This slope can be used to estimate the equivalent height (h_T) of the *Trap* located between the oocyte plasma membrane invaginations and the ISE. The rate at which Na^+ disappears from the *Trap* during an hyperpolarizing voltage pulse can be estimated (a slope of $-1.72 \pm 0.30 \text{ mV/s}$ at a V_m of -140 mV yields a $d[\text{Na}^+]_T/dt$ of $665 \pm 120 \mu\text{M s}^{-1}$, see Fig. 3). As given in Eq. 2, this $d[\text{Na}^+]_T/dt$ is equal to the change in oocyte Na^+ flux (ΔJ_{Na} between -50 and -140 mV) divided by the oocyte geometrical surface (S) times h_T .

$$\frac{d[Na^+]_T}{dt} = \frac{\Delta J_{Na}}{S \times h_T} = \frac{\Delta I_{\alpha MG} / F}{S \times h_T} \quad (2)$$

where $\Delta I_{\alpha MG}$ is the change in the αMG -stimulated current (from -50 to -140 mV) and F is the Faraday constant. Interestingly, the area covered by the ISE cancels out from the calculation because a larger ISE would capture more of the whole oocyte Na^+ flux but would also dilute these ions in a commensurately larger volume. As shown in Fig. 3, the cotransport current varies from -150 nA at -50 mV to -1400 ± 100 nA at -140 mV. If we take 0.045 cm^2 as the geometrical surface area of a typical oocyte (radius $\sim 600 \text{ }\mu\text{m}$), h_T can be estimated at $4.9 \pm 0.5 \text{ }\mu\text{m}$. As electron micrographs of oocytes show the presence of membrane invaginations in the first $10 \text{ }\mu\text{m}$ (Abriel *et al.* 1999) of the oocyte surface, this estimation of the average Trap height appears quite reasonable.

3.5.4. Advantages and limitations of the Ion-Trap technique

The Ion-Trap technique is characterized by the combination of a large ISE and the presence of a constricted space where ion concentrations can increase or diminish. This combination allows for the detection of ion transport across membranes without having to rely on transmembrane current measurements or isotope flux measurements. The Ion-Trap technique has a much better time resolution than isotope flux measurement since changes in transport activities can be detected for an electrogenic transporters within 20 ms of the application of a voltage pulse. As compared to electrophysiology, the Ion-Trap technique has the advantage that, using steady-state measurements, it can be applied to electroneutral transport mechanisms and the nature of the transported ion doesn't have to be determined by ion substitutions since the method is based on the direct detection of a transported ion. Extracellular measurements have previously been done with both static and vibrating probe methods (for examples see (Newman 2001; Kang *et al.* 2003; Messerli *et al.* 2007)). With respect to vibrating probes, the Ion-Trap technique provides a much better time resolution. With respect to simple static extracellular ISE, the advantage of the Ion-Trap technique relies on the presence of a microscopic detection volume (the *Trap*) which provides a better sensitivity as changes

in ion transport will generate a larger change in ionic concentrations in this restricted space vs the open extracellular space.

One of the most serious disadvantages of the Ion-Trap technique is that the amplitude of the ion transport activity can only be determined relative to the transport measured in given basal condition. Since the ISE is pushed against the surface of an oocyte at resting potential, the ion flux through the membrane patch covered by the ISE is exactly balanced by the flux across the seal resistance between the ISE and the oocyte membrane. If a substrate is added or if the V_m is changed, the Ion-Trap technique will only yield an estimation of the change that has occurred in the membrane ion flux with respect to the starting conditions.

3.6. *Conclusion*

We have presented a method that allows accurate measurement of ionic transport activities without using isotopes or having to measure the transport current. The method is based on the measurement of ion capture and release in a reduced space between an ISE and the oocyte plasma membrane. The method presents good sensitivity and a time resolution that can reach 20 ms. Using the Na^+ /glucose cotransporter to test the Ion-Trap technique, we were able to demonstrate proportionality between the charge transferred and the surface rapid ΔV_{H} or ΔV_{Na} . Moreover, there was direct proportionality between the cotransport currents and the slopes in the ISE signal. On a slower time scale (on the order of 20s), the activity of the cotransporter can be detected without using its electrogenic properties, simply by adding the substrate. This demonstrates that the Ion-Trap technique can be applied to electroneutral ion transport as well. We predict that this method will be useful for testing transport mechanisms by looking at a different parameter than the traditional transport current or radioisotope uptake experiments.

3.7. *Bibliography*

1. Parent, L., S. Supplisson, D. D. Loo, and E. M. Wright. 1992a. Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter: I. Voltage-clamp studies. *The Journal of membrane biology* 125:49-62.
2. Coady, M. J., B. Wallendorff, D. G. Gagnon, and J. Y. Lapointe. 2002. Identification of a novel Na⁺/myo-inositol cotransporter. *The Journal of biological chemistry* 277:35219-35224.
3. Forster, I., N. Hernando, J. Biber, and H. Murer. 1998. The voltage dependence of a cloned mammalian renal type II Na⁺/Pi cotransporter (NaPi-2). *The Journal of general physiology* 112:1-18.
4. Sciortino, C. M., and M. F. Romero. 1999. Cation and voltage dependence of rat kidney electrogenic Na⁽⁺⁾-HCO⁽⁻⁾(3) cotransporter, rkNBC, expressed in oocytes. *Am J Physiol* 277:F611-623.
5. Cougnon, M., P. Bouyer, P. Hulin, T. Anagnostopoulos, and G. Planelles. 1996. Further investigation of ionic diffusive properties and of NH₄⁺ pathways in *Xenopus laevis* oocyte cell membrane. *Pflugers Arch* 431:658-667.
6. Ammann, D., and P. Anker. 1985. Neutral carrier sodium ion-selective microelectrode for extracellular studies. *Neuroscience letters* 57:267-271.
7. Gagnon, D. G., C. Frindel, and J. Y. Lapointe. 2007a. Effect of substrate on the pre-steady-state kinetics of the na⁺/glucose cotransporter. *Biophysical journal* 92:461-472.
8. Bissonnette, P., J. Noel, M. J. Coady, and J. Y. Lapointe. 1999. Functional expression of tagged human Na⁺-glucose cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes. *The Journal of physiology* 520 Pt 2:359-371.
9. Hirayama, B. A., D. D. Loo, and E. M. Wright. 1994. Protons drive sugar transport through the Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1). *The Journal of biological chemistry* 269:21407-21410.
10. Hirayama, B. A., D. D. Loo, and E. M. Wright. 1997. Cation effects on protein conformation and transport in the Na⁺/glucose cotransporter. *The Journal of biological chemistry* 272:2110-2115.

11. Lu, C. C., and D. W. Hilgemann. 1999. GAT1 (GABA:Na⁺:Cl⁻) cotransport function. Kinetic studies in giant *Xenopus* oocyte membrane patches. *The Journal of general physiology* 114:445-457.
12. Holmgren, M., and R. F. Rakowski. 1994. Pre-steady-state transient currents mediated by the Na/K pump in internally perfused *Xenopus* oocytes. *Biophysical journal* 66:912-922.
13. Forster, I. C., C. A. Wagner, A. E. Busch, F. Lang, J. Biber, N. Hernando, H. Murer, and A. Werner. 1997. Electrophysiological characterization of the flounder type II Na⁺/Pi cotransporter (NaPi-5) expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *The Journal of membrane biology* 160:9-25.
14. Fry, C., and S. Langley. 2002. Ion-selective electrodes for biological systems. CRC.
15. Abriel, H., and J.-D. Horisberger. 1999. Feedback inhibition of rat amiloride-sensitive epithelial sodium channels expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *The Journal of physiology* 516:31-43.
16. Newman, I. A. 2001. Ion transport in roots: measurement of fluxes using ion-selective microelectrodes to characterize transporter function. *Plant Cell Environ* 24:1-14.
17. Messerli, M. A., E. D. Corson, and P. J. Smith. 2007. Measuring Extracellular Ion Gradients from Single Channels with Ion-Selective Microelectrodes. *Biophysical journal*.
18. Kang, T. M., V. S. Markin, and D. W. Hilgemann. 2003. Ion fluxes in giant excised cardiac membrane patches detected and quantified with ion-selective microelectrodes. *The Journal of general physiology* 121:325-347.

3.8. *Figure legends*

Figure 1:

Steady-state trapped sodium and pH measurements ($[\text{Na}^+]_{\text{T}}$, pH_{T}). A. The solution was first switched from normal saline (90 mM Na^+) to a 10 mM Na^+ solution. Then, 5 mM αMG was added to the 10 mM Na^+ -buffer at -50 mV. After reaching a steady $[\text{Na}^+]_{\text{T}}$ measurement, V_{m} was stepped from -50 to -90 mV in 10 mV increments. V_{m} was then stepped back to -50 mV and αMG was removed. The electrode was calibrated by pulling the electrode from the oocyte surface in order to measure the true 10 mM value (not shown). B. Correlation between $[\text{Na}^+]_{\text{T}}$ and $I_{\alpha\text{MG}}$. The substrate was added at $V_{\text{m}} = -50$ mV (■, -50 mV) then the voltage was stepped, in 10 mV increments, to -90 mV. All points were fitted with a straight line. C. Steady-state surface pH (pH_{T}) measurement. The solution was switched from pH 7.6 to pH 5.5. When a steady pH_{T} was reached, 35 mM αMG was added to the bath. V_{m} was then stepped to -90 mV in 10 mV increments and returned to -50 mV. αMG was removed from the bathing solution and Pz was added. The ISE was then pulled away from the oocyte to measure the true pH 5.5 value (arrow). Data was reduced to yield 1 point per second. The three vertical interruptions in the current trace represents periods where series of voltage pulses were applied to the oocyte. D. Comparison of pH_{T} and $I_{\alpha\text{MG}}$. The substrate and inhibitor were added at -50 mV.

Figure 2:

Initial rate measurements of $[\text{Na}^+]_{\text{T}}$ during voltage pulses. The signals presented are averages of 10 series of the voltage pulses shown. Currents and V_{Na} were low-pass filtered at 1 and 0.1 kHz, respectively. Bath $[\text{Na}^+]$ is 10 mM and pH is 7.6. V_{Na} is shown uncorrected for series resistance artefacts. When 5 mM αMG was added to the bath, a slope appeared in the V_{Na} signal. Phlorizin abolished SLGT1-mediated presteady-state currents and reduced the amplitude of V_{Na} below the level seen in the Na^+ -buffer.

Figure 3:

Slope (ρ) and current ($I_{\alpha\text{MG}}$) comparison for multiple experiments using Na^+ -electrodes. The slope, during a voltage pulse, is obtained by fitting a straight line to the linear part of V_{Na} and is zero at -50 mV. The average slopes for 8 experiments are shown with interpolation (■). The αMG -dependent current was obtained by averaging a 20 ms time window at the end of the leak-corrected signal. The mean αMG -dependent currents for 8 experiments are shown with interpolation (●).

Figure 4:

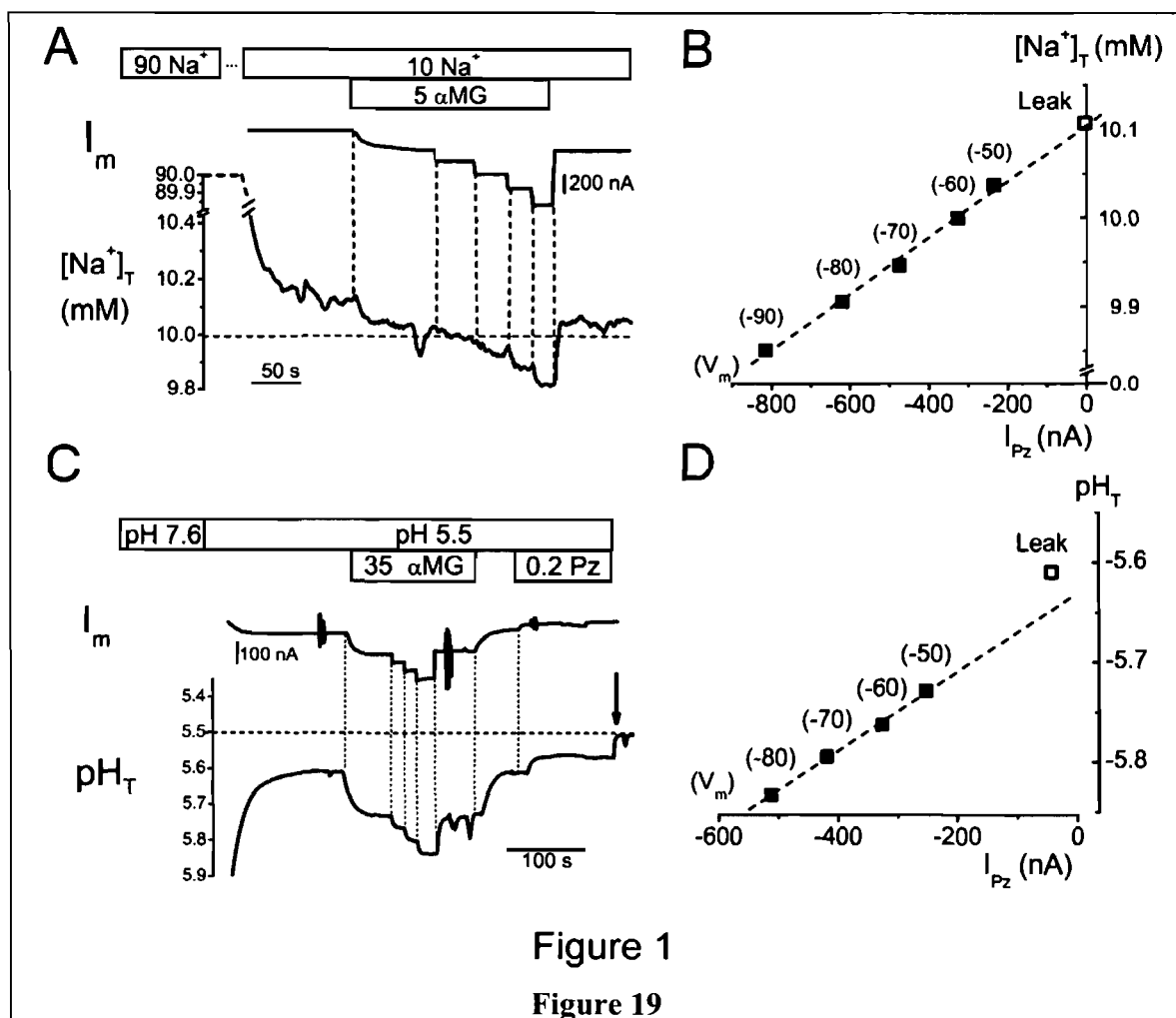
Series resistance correction and comparison of charge transfer (Q) and *Step* (V_{Na}) curves. A. The apparent resistance was obtained by fitting a straight line through the V_{Na} versus I_{Pz} data. These values were obtained at holding potentials ranging from -140 to 40 mV by averaging a 20 ms time window at the end of the pulse (dashed boxes). B. The charge transfer (Q) was obtained by integrating the phlorizin-sensitive presteady-state currents. Q is shown with its Boltzmann fit superimposed (solid line). After the correction of V_{Na} with the apparent resistance obtained as described in panel A, a 20 ms time window was averaged at the end of the pulse. The average *Step* derived from 8 experiments is shown on the right with the Boltzmann fit of Q normalized and superimposed (dashed line).

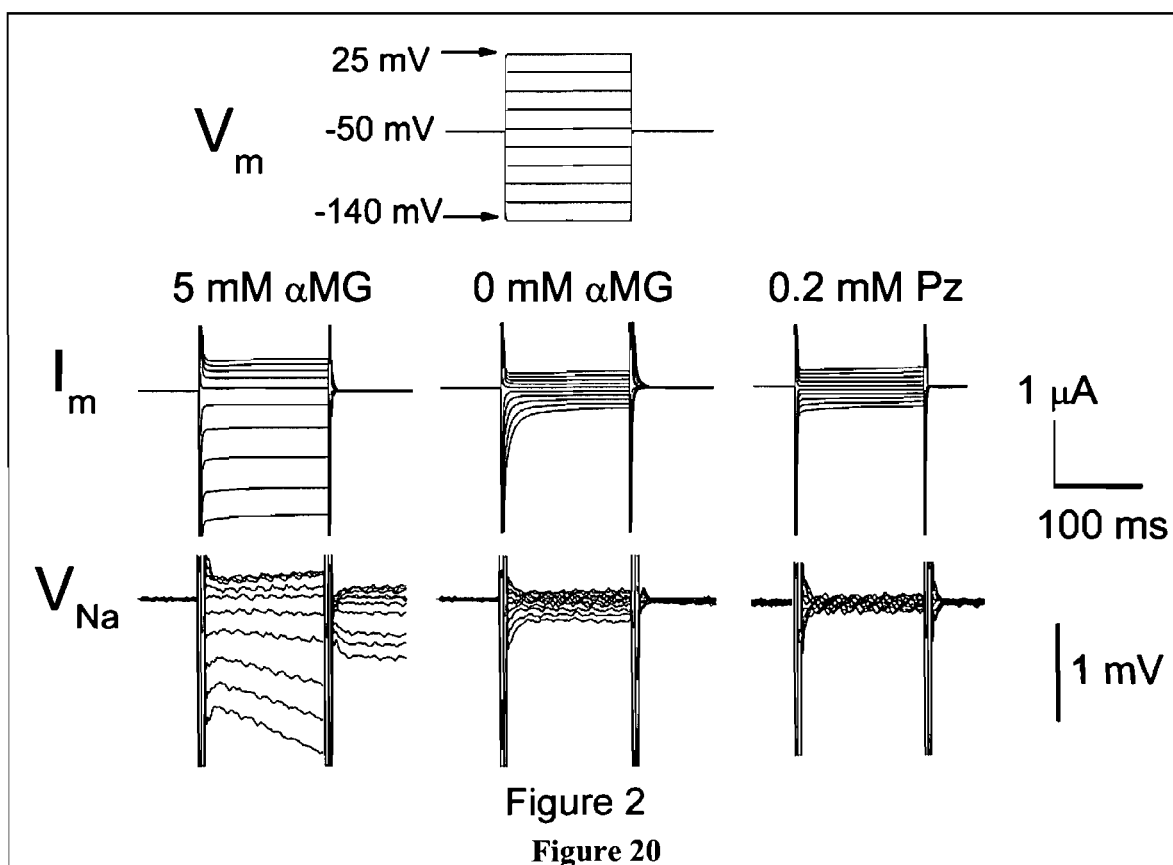
Figure 5:

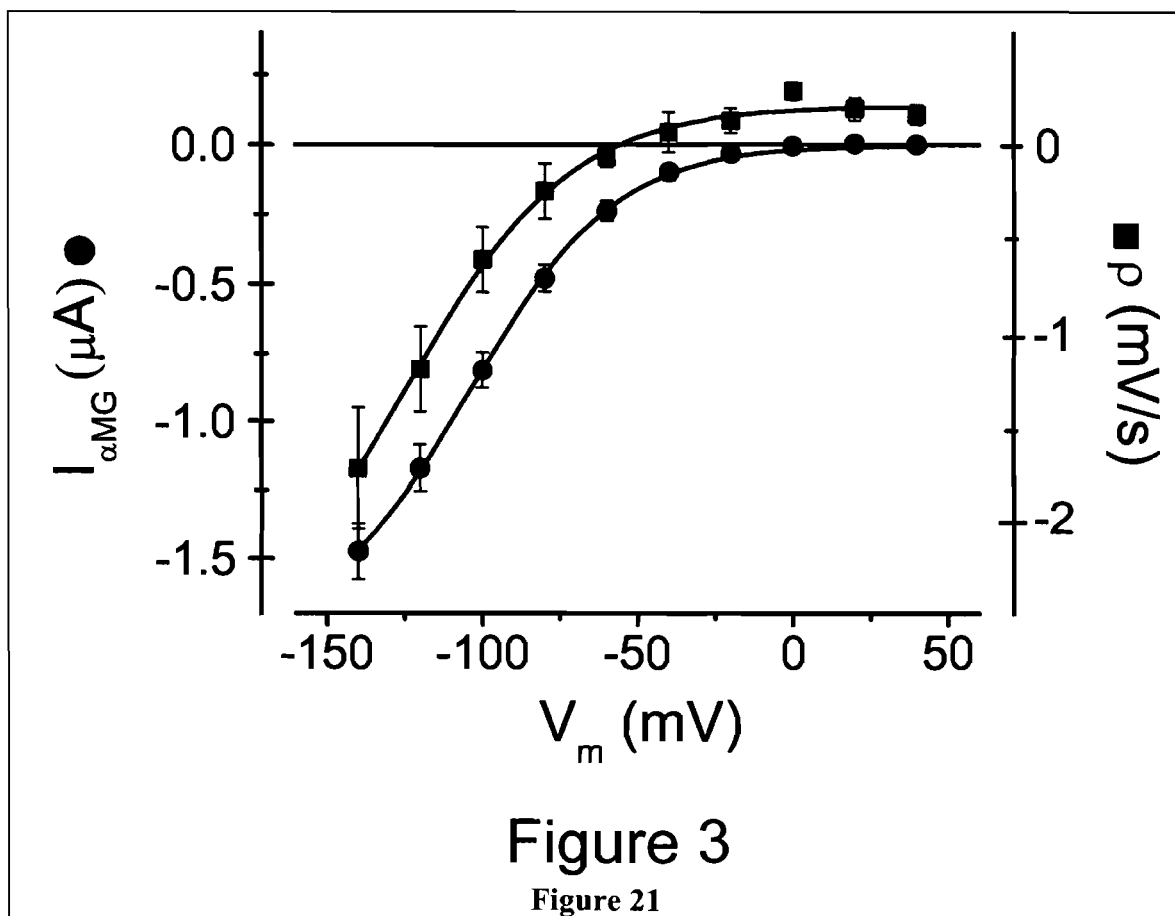
Simultaneous oocyte current I_{m} and pH_{T} measurements (V_{H}) in a pH 5.5 buffer. The signals shown were selected from a series of voltage pulses that were repeated 8 times for averaging purposes. Currents and V_{H} were low-pass filtered at 1 and 0.1 kHz, respectively. V_{H} is shown uncorrected for series resistance artefacts. In the pH 5.5 buffer, a significant presteady-state associated $\Delta\text{pH}_{\text{T}}$ (*Step*) appears with a non-negligible, leak-associated slope. The signal is completely Pz-sensitive.

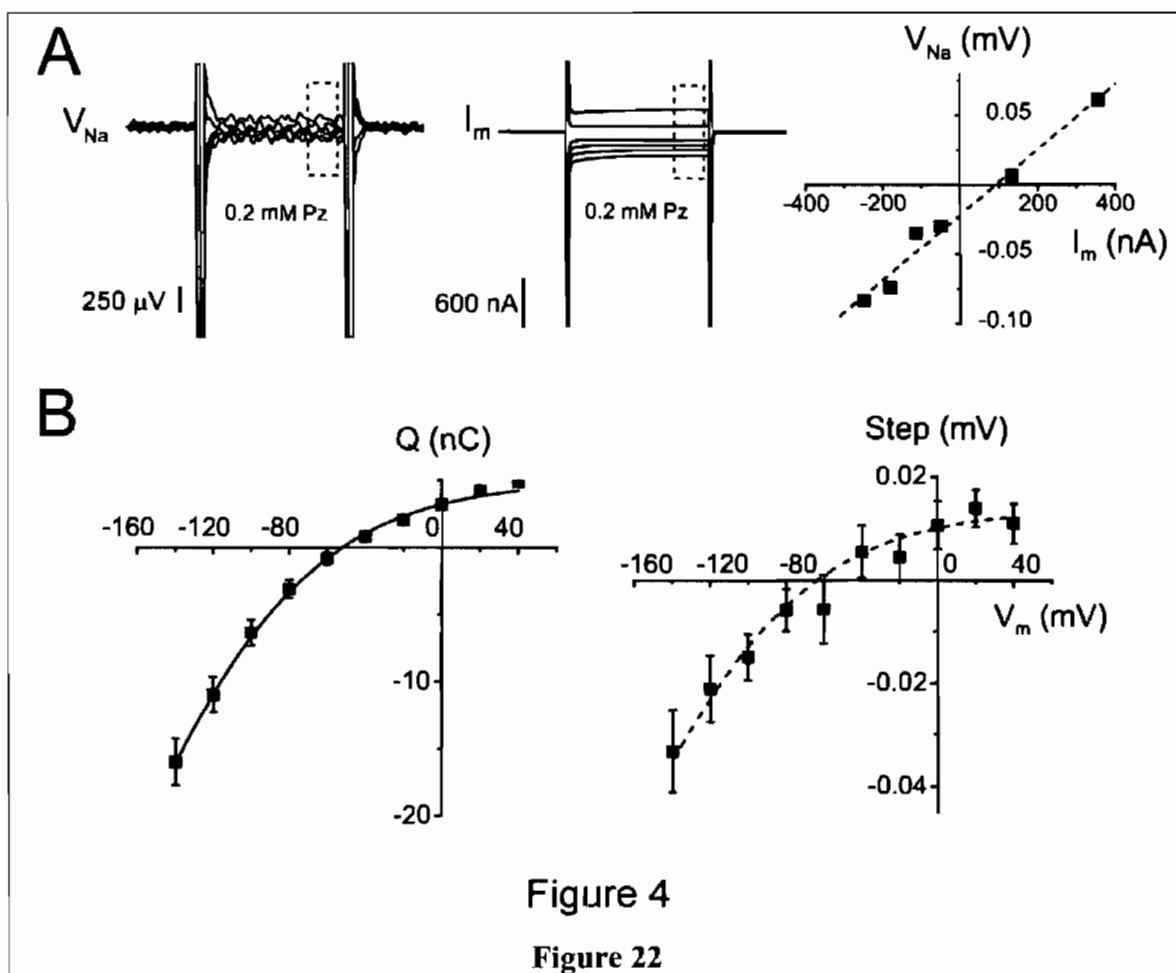
Figure 6:

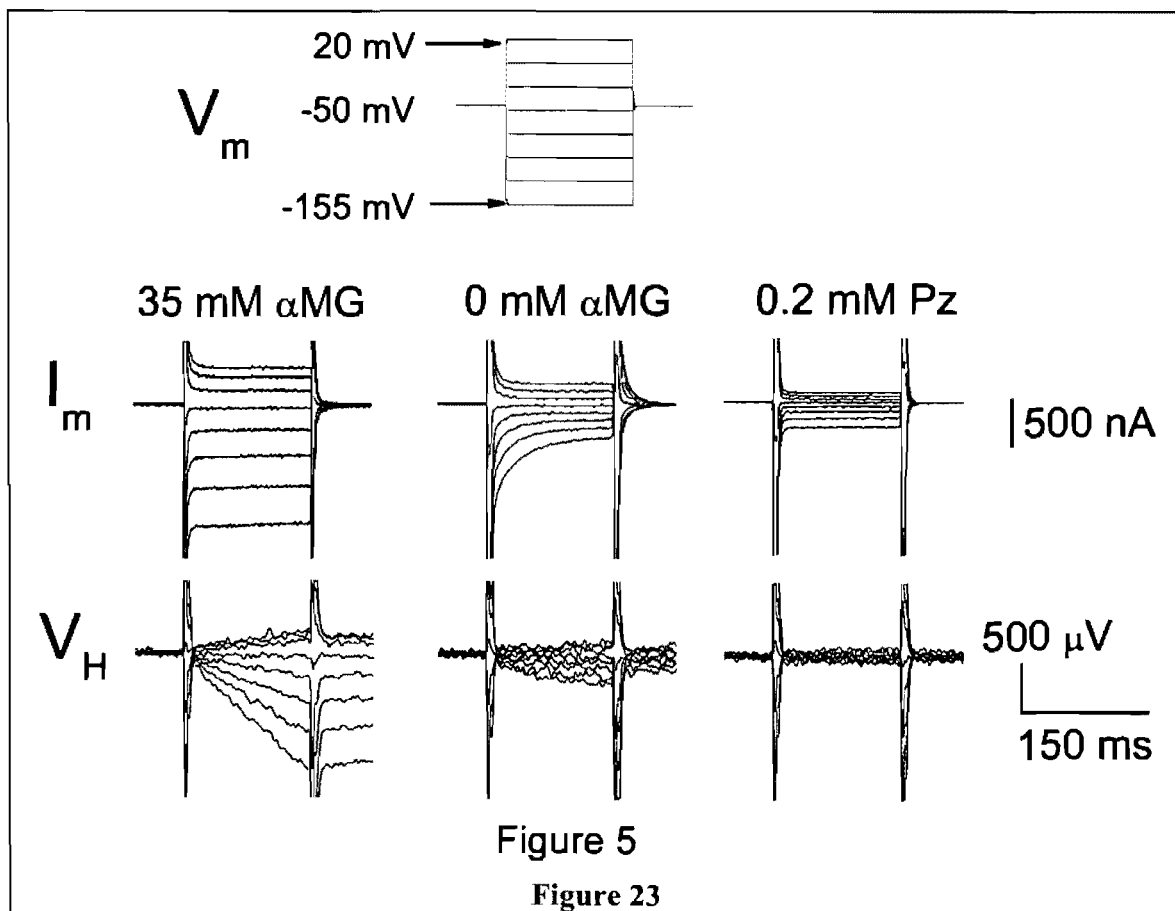
Comparison of electrophysiological steady state and pre-steady state current measurements with the observations provided by the Ion-Trap technique. A. Average α MG-sensitive current ($I_{\alpha\text{MG}}$) with the slope (ρ) measured in the V_H vs. t recording in the presence of 2.5 (●) and 35 (■) mM α MG ($n=3$). The interpolation of $I_{\alpha\text{MG}}$ at each concentration (full line) was normalized and superimposed on the V_H slope curve (dashed line). B. Average charge transfer (Q) obtained from the integration of the pre-steady state transient currents ($n=13$) with its Boltzmann fit superimposed (solid line) and average corrected *Step* in the V_H vs. t recording ($n=18$) with the normalized Boltzmann fit of Q superimposed (dashed line).

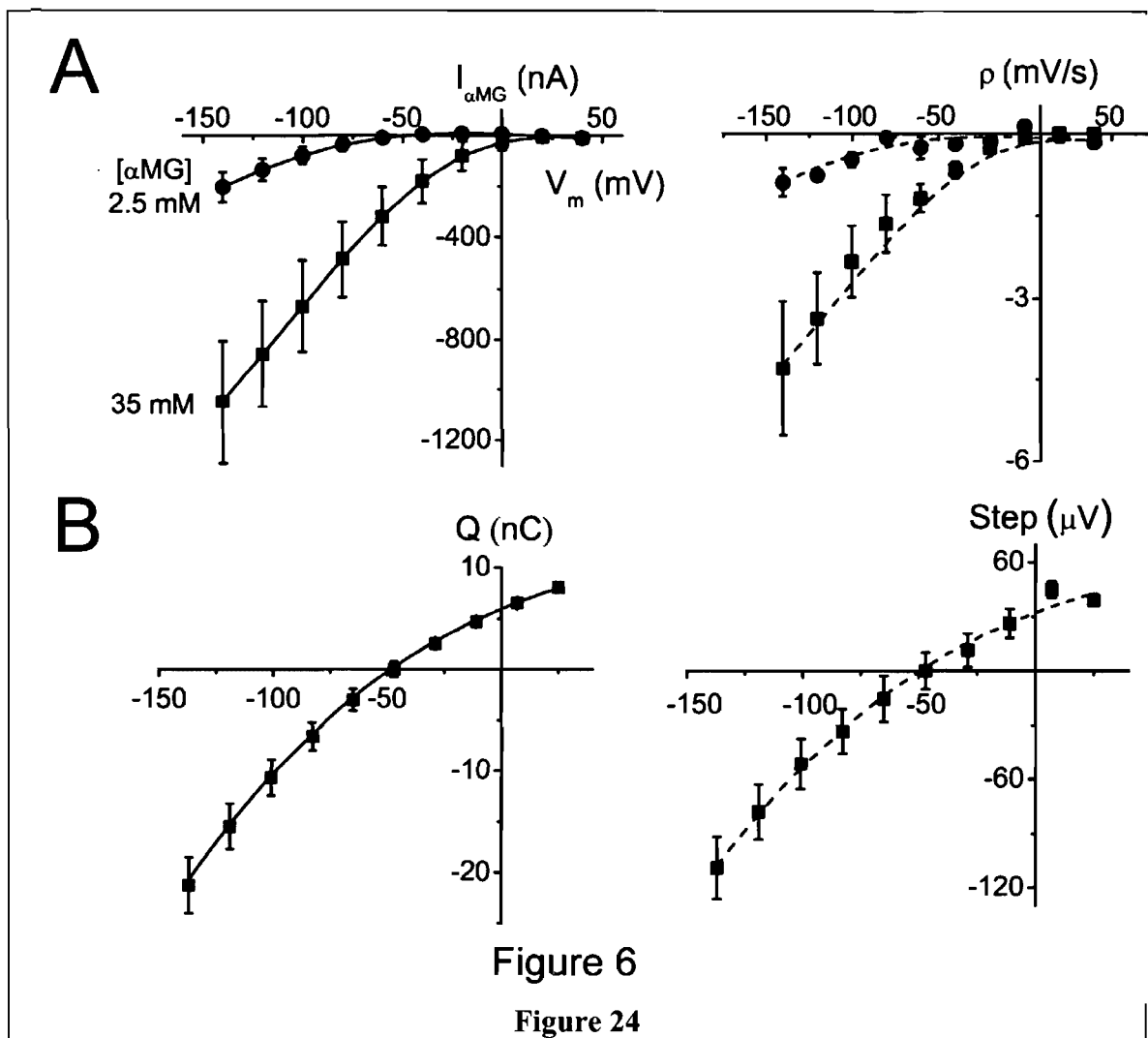












4. Discussion

Nous avons montré, à l'aide de diverses mesures expérimentales menées avec des électrodes sensibles aux protons et aux ions sodium, que la technique du piège ionique possède la capacité de détecter l'activité de protéines de transport membranaire électrogéniques ou électroneutres et qu'elle est en mesure de détecter les changements de concentration ionique associés à des mouvements pré-stationnaire du transporteur vide. De plus, en effectuant une série d'expériences contrôle et en estimant la hauteur moyenne du piège ionique, nous nous sommes convaincus que les petits changements de potentiels enregistrés correspondaient bel et bien à de réels changements de concentration locale provoqués par des mécanismes de transport ionique membranaire. Discutons d'abord du niveau de bruit électrique puis de deux grands champs d'application : l'étude du transport électroneutre et du mécanisme de fonctionnement des cotransporteurs ioniques. Finalement, attardons nous aux forces et aux faiblesses de cette nouvelle approche.

4.1. Analyse du niveau de bruit électrique

Le spectre de puissance d'un enregistrement effectué à un V_m de -50 mV, représentant la moyenne de 20 mesures produites à l'aide d'une électrode sélective au Na^+ , démontre la présence d'un bruit blanc (Appendice 1). L'amplitude moyenne de ce bruit blanc est de $5.89 \times 10^{-12} \text{ V}^2/\text{Hz}$. L'équation de Nyquist nous indique le lien entre l'amplitude du spectre de puissance du signal présentant un bruit blanc et la température dans une résistance :

$$S = 4kTR \quad (7)$$

où S est l'amplitude du spectre de puissance (en V^2/Hz), k est la constante de Boltzmann (J/K), T la température (K) et R la résistance (Ω). En utilisant cette relation, et en prenant $S = 5.89 \times 10^{-12} \text{ V}^2/\text{Hz}$ et $T=300 \text{ K}$, nous obtenons une résistance de $356 \text{ M}\Omega$. Cette valeur est cohérente avec la valeur de résistance de nos électrodes sélectives ($< 500 \text{ M}\Omega$). Notre approche expérimentale, aidée par l'enregistrement de multiples pulses

identiques, est donc en mesure d'éliminer tout bruit électrique extérieur au système d'enregistrement et de ne conserver que le bruit de Johnson associé à l'agitation thermique dans la résistance de l'électrode sélective.

Comme nous cherchons à étudier des phénomènes se produisant sur quelques dizaines de ms, il est justifié de filtrer nos enregistrements pré-stationnaires avec un filtre Bessel passe-bas à 100Hz. Ce filtre, et l'action de moyenner nos données, permettent d'atteindre, un niveau de détection de 10 μV . De plus, les mesures stationnaires sont réduites à l'aide d'une moyenne mobile (*moving average*) afin d'obtenir 1 point par seconde. Encore une fois, la vitesse du phénomène observé ($> 20\text{s}$) nous permet d'effectuer cette réduction sans crainte d'une perte d'information.

4.2. Mesure de l'activité de transport électroneutre

Bien que nous ayons caractérisé la technique du piège ionique à l'aide d'un mécanisme de transport électrogénique, la technique du piège ionique peut très bien être appliquée au cas d'un transport électroneutre. En effet, les changements de concentrations locales, associés à l'addition de substrat en présence d'un V_m constant, ne nécessitent pas la mesure du courant membranaire (voir figure 20 A et C). Cette observation de l'activité de transport est possible parce que le substrat peut diffuser assez librement entre le piège ionique et le bain. Au cours de la période de 20 s qui est nécessaire pour équilibrer la concentration du substrat entre le piège et le bain, les changements de concentrations ioniques associés à l'activation du flux ionique transmembranaire sont facilement perceptibles. Cette diffusion, entre le bain et l'électrode, est possible grâce à la faible étanchéité du joint entre l'électrode sélective et la membrane plasmique. Il s'établit alors un état stationnaire où le flux ionique transmembranaire dans le piège ionique, est compensé par un flux équivalent venant du bain à travers le joint entre l'électrode et la membrane. Nous avons mesuré le changement de concentration, lorsque l'équilibre entre le flux transmembranaire et le flux entre l'électrode et le bain est atteint, et avons montré qu'il était proportionnel au courant transmembranaire dépendant de l'addition du substrat (Voir figures 20 B et D). Ceci nous indique que le courant transmembranaire, dépendant de l'addition du substrat,

est dû au transport de Na^+ et de H^+ respectivement. De plus, en absence de substrat, la concentration de surface peut varier en proportion au courant de fuite si celui-ci est dû à l'ion mesuré. Ceci suggère que le courant de fuite est entièrement médié par un transport de H^+ en conditions 0 Na (pH 5.5) (voir figures 20 C et D). Dans le cas du courant de fuite en présence de Na^+ , celui-ci est si faible qu'il nous est impossible de voir si le changement de concentration de Na^+ est proportionnel à ce petit courant (voir figure 20 A et B). De plus, contrairement à l'électrode sensible au pH, l'électrode sensible au Na^+ présente un artéfact lorsque la Pz est ajouté à la solution du bain. En effet, même en absence d'ovocyte, l'addition de Pz produit un changement d'environ 1 mV dans V_{Na} . Ceci nous empêche de détecter directement l'effet de l'inhibition du courant de fuite sur la concentration locale de Na^+ . Par contre, dans le cas de l'électrode au pH, il est clair que l'inhibition du courant de fuite entraîne une acidification locale qui indique que le courant de fuite est dû à un transport de protons en absence de glucose. Ce type d'approche est très utile car il nous renseigne rapidement et sans ambiguïté sur la nature d'un transport transmembranaire. Il nous montre aussi que les transporteurs électroneutres peuvent être étudiés en additionnant un substrat mais aussi en additionnant un inhibiteur spécifique.

4.3. Mesures de changements de concentration pré-stationnaires – Application à l'étude du mécanisme de fonctionnement des cotransporteurs ioniques.

La technique du piège ionique est en mesure de nous renseigner sur les étapes partielles dans le cycle de cotransport d'un cotransporteur électrogénique : rôle des ions, ordre de liaison, vitesse de transport, etc. De plus, elle nous permet d'observer des mécanismes de transport cachés tel qu'une conductance non couplée au transport du substrat ou un courant de fuite à plusieurs ions.

Nous avons démontré que l'électrode sélective à large diamètre détecte un changement de concentration proportionnel au transfert de charge (voir figures 23 C et 25 D) lors de pulses de voltage de 150 ms. Le mécanisme de cotransport de SGLT1 propose que deux Na^+ se lient à la protéine et induisent un changement de conformation permettant la liaison du substrat. Ainsi, en absence de substrat, il est possible de stimuler

alternativement la liaison et le relâchement de ces deux Na^+ en procédant à des pulses de voltages hyperpolarisants et dépolarisants respectivement. La quantité de Na^+ qui disparaît, lors d'un pulse de voltage, est nommée *bolus* (ou *step* en anglais). Nos données, montrent que le bolus sodique, à 10 mM Na^+ , est complètement proportionnel au transfert de charge. Cette proportionnalité nous indique que la disparition de Na^+ se produit dans la proportion du nombre de transporteurs vides disponibles à la face extracellulaire. La technique du piège ionique ne nous renseigne pas, directement, sur le nombre d'ions Na^+ se liant à chaque transporteur. Néanmoins, la dépendance en voltage de la courbe de transfert de charge est parfaitement reproduite par la courbe de bolus en fonction du voltage. Ceci suggère que seuls des ions Na^+ se lient à la protéine. La liaison d'une autre classe d'ion induirait nécessairement une différence dans la dépendance en voltage de la courbe de transfert de charge, que la courbe de bolus sodique en fonction du voltage ne pourrait reproduire. La même proportionnalité est observée en absence de Na^+ , à pH acide, nous indiquant qu'en absence de Na^+ , seuls des H^+ se lient au transporteur.

Nous pouvons envisager un mécanisme plus complexe dans lequel, par exemple, un H^+ doit se lier à la protéine avant un ion Na^+ . Dans ce cas, le bolus sodique ne serait détectable qu'à pH très acide. Cette détection, dépendante du pH, d'un bolus sodique nous renseignerait donc directement sur la nature des ions activant le transport et leur ordre de liaison. Cette approche, très intéressante, est utilisée, à l'heure actuelle, pour caractériser un mutant du transporteur SGLT1. Ce dernier exhibe un très large courant de fuite composé en partie de H^+ . Il y aurait, chez ce transporteur mutant, la nécessité d'un pH acide pour obtenir un bolus sodique.

Plus généralement, il est possible de déterminer, rapidement, le rôle joué par un ion dans un mécanisme de cotransport. En effet, le rôle d'un ion activateur non transporté est, avec la technique du piège ionique, directement observé par une disparition d'un bolus ionique. Un ion transporté est identifiable par une diminution, dans le temps, de cet ion. Un mécanisme non couplé au transport du substrat serait alors détectable par un flux possédant une dépendance en voltage différente de celle du cotransport. L'étude des

transporteurs de glutamate, par exemple, serait facilitée par l'utilisation d'une résine au chlore. Dans un tel cas, la technique du piège ionique serait en mesure de détecter un flux pré-stationnaire linéaire avec le voltage. De plus, la technique du piège ionique serait très utile pour déterminer la nature du courant de fuite du cotransporteur SGLT1. En effet, tel que mentionné précédemment, le courant de fuite de SGLT1 a été longtemps considéré comme étant dû à un flux d'ions Na^+ . Néanmoins, des données récentes, de notre laboratoire, indiquent que le potentiel d'inversion du courant de fuite d'un mutant de SGLT1 ne suit pas une loi Nernstienne lorsque la quantité de Na^+ extracellulaire est variée (on s'attendrait à un changement du potentiel d'inversion de 58 mV lors d'une diminution du Na^+ extérieur d'un facteur 10). Ceci indique qu'un autre ion participe probablement à ce courant de fuite. La nature de cet ion est, en ce moment, inconnue, mais la technique du piège ionique sera en mesure de la déterminer.

La technique du piège ionique permet la mesure de la vitesse de cotransport de la protéine (« turnover rate »). Soit une situation où, lors d'un pulse de voltage, tous les transporteurs, faisant face au milieu intracellulaire, sont transloqués vers le milieu périplasmique et captent 2 ions sodium. La mesure de disparition de Na^+ à l'aide de la technique du piège ionique est alors une indication directe du nombre de transporteurs présents à la membrane, sous la surface couverte par l'électrode sélective. Si N est le nombre de transporteurs présents à la membrane encerclée par l'électrode et que V_p est le volume du piège ionique, le changement de concentration observé (le bolus) sera donné par $\frac{2N}{V_p}$. Supposons maintenant que, avec le même ovocyte et le même piège ionique, nous ajoutons une concentration saturante de substrat produisant un courant de cotransport maximal, la pente instantanée de V_{Na} en fonction du temps lors de l'application d'un V_m très hyperpolarisant serait donnée par $\frac{NT_0}{V_p}$ où T_0 est la vitesse du cotransporteur (« turnover rate ») au potentiel imposé. Théoriquement, le rapport entre la pente et bolus nous donnerait directement T_0 . Cette approche n'est cependant valable que si l'expérimentateur est en mesure d'obtenir un transfert de charge maximal ($Q = Q_{\text{max}}$). Cette mesure serait en mesure d'améliorer notre compréhension actuelle du mécanisme d'action de SGLT1. En effet, Loo *et al.* (Loo *et al.* 2005) ont proposé qu'il

existait une étape dépendante du voltage possédant une constante de temps de plus de 100 ms. Cette valeur, très longue, est surprenante et pourrait n'être qu'un artefact d'analyse. En 2006, dans une étude provenant du même laboratoire, on propose que la libération du Na^+ , du côté cytosolique, se produirait avec une constante de vitesse de 5 s^{-1} (Loo *et al.* 2006). La technique du piège ionique, en mesurant directement la vitesse de cotransport, serait en mesure de placer une limite maximale sur les constantes de temps des courants transitoires. Dans le cas présent, on ne peut simplement faire le rapport entre la pente et le bolus puisqu'en présence de 10 mM Na^+ , on ne peut atteindre un V_m assez négatif pour envoyer tous les sites de liaison du Na^+ vers le milieu périplasmique. Il nous faudrait donc trouver une façon d'estimer la fraction des sites qui font face à l'extérieur ce qui entraînerait une certaine incertitude sur la mesure de T_0 .

4.4. Performance de la technique du piège ionique

La technique du piège ionique, associée à une technique d'électrophysiologie, possède une excellente résolution temporelle et un faible niveau de bruit électrique. En effet, des mesures effectuées en conditions hors équilibre démontrent qu'il est possible, à la suite d'un pulse de voltage, de détecter la concentration dans le piège ionique en 20 ms. En supposant un modèle de fonctionnement des électrodes sélectives à séparation de charge sans transport au travers de la résine, il est très raisonnable de supposer qu'une électrode sélective puisse avoir une telle résolution temporelle. Mais encore, en raison de la possibilité de modification rapide du potentiel, il est possible d'enregistrer plusieurs pulses identiques et de les moyenner. De cette façon, la technique du piège ionique est en mesure de détecter des changements de voltage de 10 μV représentant un changement de concentration de 0.04% par rapport à la concentration de l'ion primaire dans le bain. Ce niveau de détection, dans un milieu à 10 mM sodium, correspond à un changement de concentration de 4 μM soit, pour un volume de 10 pL, un changement du nombre d'ions sodium de 40 fmol. En conditions 0 mM Na^+ , et à pH acide, il est possible d'augmenter le niveau de détection de l'électrode sélective aux protons. En effet, nous avons choisi une concentration de tampon de 1.5 mM MES afin d'obtenir une faible capacité tampon et de plus grands changements de pH. Il est possible de diminuer

cette concentration, mais au risque d'altérer facilement le pH des solutions utilisées (résidus dans une bouteille, changement de pH durant la perfusion, etc).

Malgré ses excellentes performances, la technique du piège ionique présente quelques faiblesses :

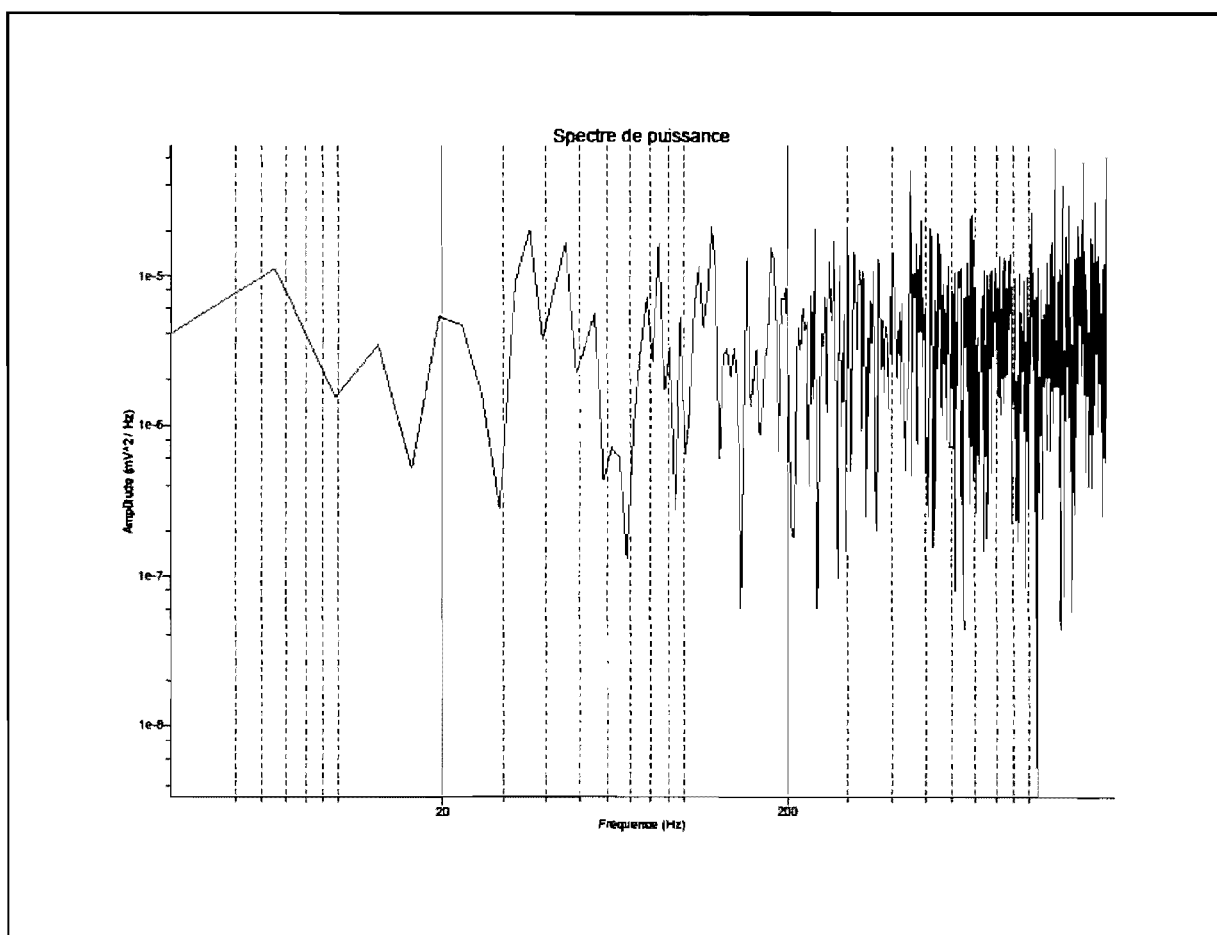
1. Les conditions ioniques doivent être altérées afin de permettre la détection de changement de concentration par l'électrode. En effet, une électrode sélective, possédant une réponse logarithmique, est beaucoup moins sensible lorsque son ion primaire est présent en grande quantité. En ce qui nous concerne, ceci se traduit par l'abaissement de la concentration de Na^+ de 90 mM à 10 mM. Cette concentration de Na^+ , non physiologique, pour le transport de glucose dû à SGLT1, est très basse et l'activité n'est donc pas étudiée en conditions physiologiques.
2. Les mesures sont toujours produites à partir de conditions basales où un équilibre est toujours présent entre le bain et le piège ionique. Les valeurs de pente ou de bolus sont alors données relativement à la condition basale. Lorsque nous varions le potentiel, nous perdons la valeur du potentiel d'inversion du flux ionique transmembranaire.
3. La technique du piège ionique n'est adaptée qu'aux cellules de large diamètre ($> 30 \mu\text{m}$). En effet, l'utilisation de petites électrodes sélectives augmenterait la résistance de l'électrode et diminuerait donc sa capacité à produire une réponse suffisamment rapide. Une optimisation de la quantité de résine et du diamètre de l'électrode permettraient, sans doute, de diminuer la taille minimale de la cellule pouvant être utilisée. Il paraît néanmoins peu probable qu'un diamètre inférieur à $10 \mu\text{m}$ puisse produire une réponse assez rapide.
4. Puisque le volume sous l'électrode sélective est inconnu et qu'il ne peut qu'être estimé, nous ne connaissons pas la quantité d'ions (en mol) qui ont quitté ou pénétré le piège.

5. Un excellent inhibiteur est nécessaire pour obtenir des mesures de bolus pré-stationnaires. En effet, les changements de concentrations mesurés sont si faibles que le courant traversant la résistance en série du bain contamine nos mesures de concentration. Ces dernières doivent être corrigées en se basant sur le bolus mesuré en présence d'un inhibiteur.

5. Conclusion et perspectives

Nous avons présenté, dans ce mémoire, les résultats du développement d'une nouvelle technique permettant la mesure de l'activité de transport des protéines de transport membranaire électroneutres ou électrogéniques. Cette technique, basée sur l'utilisation d'électrodes sélectives à faible impédance, est en mesure de détecter, à l'équilibre, l'activité de transport des protéines de transport membranaire électroneutres. De plus, les changements de concentration ioniques associés aux étapes partielles du cycle de cotransport peuvent être détectés avec une excellente résolution temporelle et avec un faible niveau de bruit électrique. Pour y arriver, nous avons choisi d'exprimer le cotransport SGLT1, dont les caractéristiques pré-stationnaires et stationnaires sont bien connues, dans des ovocytes de *Xenopus laevis*. Notre approche est en mesure de détecter la captation de Na^+ et de H^+ lorsque ces ions activent le transport. Cette captation reproduit bien les mesures de transfert de charge et sont donc en concordance avec le modèle de fonctionnement actuel de SGLT1 : la liaison de l'ion se fait en proportion du nombre de transporteurs vides qui ont été transloqués. Malgré ses excellentes performances, la technique du piège ionique possède un inconvénient majeur : les conditions expérimentales doivent être choisies afin d'obtenir une capacité de détection optimale par l'électrode sélective. Ceci nous amène à étudier la protéine de transport membranaire dans des conditions non physiologiques (10 mM Na^+ versus 90 mM Na^+ en conditions physiologiques de batraciens). Nous croyons que cette technique permettra de mieux comprendre l'activité des transporteurs électroneutre, les mécanismes de couplage complexe, la stœchiométrie des cotransporteurs, l'ordre de liaison, etc.

Appendice 1



Bibliographie

- Abramson, J., I. Smirnova, V. Kasho, G. Verner, H. R. Kaback, *et al.* (2003). "Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*." Science **301**(5633): 610-5.
- Abriel, H. and J.-D. Horisberger (1999). "Feedback inhibition of rat amiloride-sensitive epithelial sodium channels expressed in *Xenopus laevis* oocytes." J Physiol **516**(1): 31-43.
- Ammann, D. and P. Anker (1985). "Neutral carrier sodium ion-selective microelectrode for extracellular studies." Neuroscience Letters **57**(3): 267-271.
- Andrade, S. L., A. Dickmanns, R. Ficner and O. Einsle (2005). "Crystal structure of the archaeal ammonium transporter Amt-1 from *Archaeoglobus fulgidus*." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(42): 14994-9.
- Bakker, E., M. Lerchi, T. Rosatzin, B. Rusterholz and W. Simon (1993). "Synthesis and characterization of neutral hydrogen ion-selective chromoionophores for use in bulk optodes." Analytica Chimica Acta **278**(2): 211-225.
- Bakker, E., M. Nägele, U. Schaller and E. Pretsch (1995). "Applicability of the phase boundary potential model to the mechanistic understanding of solvent polymeric membrane-based ion-selective electrodes." Electroanalysis **7**(9): 817-822.
- Berteloot, A. (2003). "Kinetic mechanism of Na⁺-glucose cotransport through the rabbit intestinal SGLT1 protein." J Membr Biol **192**(2): 89-100.
- Bezanilla, F. and C. M. Armstrong (1975). "Kinetic properties and inactivation of the gating currents of sodium channels in squid axon." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **270**(908): 449-58.
- Bissonnette, P., J. Noel, M. J. Coady and J. Y. Lapointe (1999). "Functional expression of tagged human Na⁺-glucose cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes." J Physiol **520 Pt 2**: 359-71.
- Bossi, E., E. Centinaio, M. Castagna, S. Giovannardi, S. Vincenti, *et al.* (1999). "Ion binding and permeation through the lepidopteran amino acid transporter KAAT1 expressed in *Xenopus* oocytes." J Physiol **515 (Pt 3)**: 729-42.

- Bourgeois, F., M. J. Coady and J.-Y. Lapointe (2005). "Determination of transport stoichiometry for two cation-coupled myo-inositol cotransporters: SMIT2 and HMIT." J Physiol (Lond) **563**(2): 333-343.
- Bruns, D., F. Engert and H. D. Lux (1993). "A fast activating presynaptic reuptake current during serotonergic transmission in identified neurons of *Hirudo*." Neuron **10**(4): 559-72.
- Charron, F. M., M. G. Blanchard and J. Y. Lapointe (2006). "Intracellular hypertonicity is responsible for water flux associated with Na⁺/glucose cotransport." Biophys J **90**(10): 3546-54.
- Chen, X. Z., M. J. Coady, F. Jackson, A. Berteloot and J. Y. Lapointe (1995). "Thermodynamic determination of the Na⁺: glucose coupling ratio for the human SGLT1 cotransporter." Biophys J **69**(6): 2405-14.
- Chen, X. Z., M. J. Coady, F. Jalal, B. Wallendorff and J. Y. Lapointe (1997). "Sodium leak pathway and substrate binding order in the Na⁺-glucose cotransporter." Biophys J **73**(5): 2503-10.
- Chen, X. Z., M. J. Coady and J. Y. Lapointe (1996). "Fast voltage clamp discloses a new component of presteady-state currents from the Na⁽⁺⁾-glucose cotransporter." Biophys J **71**(5): 2544-52.
- Coady, M. J., B. Wallendorff, D. G. Gagnon and J. Y. Lapointe (2002). "Identification of a novel Na⁺/myo-inositol cotransporter." J Biol Chem **277**(38): 35219-24.
- Cougnon, M., P. Bouyer, P. Hulin, T. Anagnostopoulos and G. Planelles (1996). "Further investigation of ionic diffusive properties and of NH₄⁺ pathways in *Xenopus laevis* oocyte cell membrane." Pflugers Arch **431**(4): 658-67.
- Danker, T., B. Gassner, H. Oberleithner and A. Schwab (1996). "Extracellular detection of K⁺ release during migration of transformed Madin-Darby canine kidney cells." Pflugers Arch **433**(1-2): 71-6.
- Dayton, S. M. and J. S. Martin (1982). "Transepithelial transport in cell culture: Stoichiometry of Na⁺/phlorizin binding and Na⁺/d -glucose cotransport. A two-step, two-sodium model of binding and translocation." Journal of Membrane Biology **V70**(3): 191-198.

- DeFelice, L. J. and T. Goswami (2007). "Transporters as Channels." Annual Review of Physiology **69**(1): 87-112.
- Duquette, P. P., P. Bissonnette and J. Y. Lapointe (2001). "Local osmotic gradients drive the water flux associated with Na(+)/glucose cotransport." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(7): 3796-801.
- Eskandari, S., D. D. F. Loo, G. Dai, O. Levy, E. M. Wright, *et al.* (1997). "Thyroid Na⁺/I⁻ Symporter. MECHANISM, STOICHIOMETRY, AND SPECIFICITY." J. Biol. Chem. **272**(43): 27230-27238.
- Eskandari, S., E. M. Wright and D. D. Loo (2005). "Kinetics of the reverse mode of the Na⁺/glucose cotransporter." J Membr Biol **204**(1): 23-32.
- Fesce, R., S. Giovannardi, F. Binda, E. Bossi and A. Peres (2002). "The relation between charge movement and transport-associated currents in the rat GABA cotransporter rGAT1." J Physiol **545**(Pt 3): 739-50.
- Forlani, G., E. Bossi, C. Perego, S. Giovannardi and A. Peres (2001). "Three kinds of currents in the canine betaine-GABA transporter BGT-1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes." Biochim Biophys Acta **1538**(2-3): 172-80.
- Forster, I., N. Hernando, J. Biber and H. Murer (1998). "The voltage dependence of a cloned mammalian renal type II Na⁺/Pi cotransporter (NaPi-2)." J Gen Physiol **112**(1): 1-18.
- Forster, I. C., J. Biber and H. Murer (2000). "Proton-Sensitive Transitions of Renal Type II Na⁺-Coupled Phosphate Cotransporter Kinetics." Biophys. J. **79**(1): 215-230.
- Forster, I. C., K. Kohler, J. Biber and H. Murer (2002). "Forging the link between structure and function of electrogenic cotransporters: the renal type IIa Na⁺/Pi cotransporter as a case study." Prog Biophys Mol Biol **80**(3): 69-108.
- Forster, I. C., C. A. Wagner, A. E. Busch, F. Lang, J. Biber, *et al.* (1997). "Electrophysiological characterization of the flounder type II Na⁺/Pi cotransporter (NaPi-5) expressed in *Xenopus laevis* oocytes." J Membr Biol **160**(1): 9-25.
- Frillingos, S., M. Sahin-Toth, J. Wu and H. R. Kaback (1998). "Cys-scanning mutagenesis: a novel approach to structure function relationships in polytopic membrane proteins." Faseb J **12**(13): 1281-99.

- Fry, C. and S. Langley (2002). Ion-selective electrodes for biological systems, CRC.
- Gagnon, D. G., C. Frindel and J. Y. Lapointe (2007a). "Effect of substrate on the pre-steady-state kinetics of the Na⁺/glucose cotransporter." Biophys J **92**(2): 461-72.
- Gagnon, D. G., C. Frindel and J. Y. Lapointe (2007b). "Voltage-clamp fluorometry in the local environment of the C255-C511 disulfide bridge of the Na⁺/glucose cotransporter." Biophys J.
- Galli, A., L. J. DeFelice, B. J. Duke, K. R. Moore and R. D. Blakely (1995). "Sodium-dependent norepinephrine-induced currents in norepinephrine-transporter-transfected HEK-293 cells blocked by cocaine and antidepressants." J Exp Biol **198**(Pt 10): 2197-212.
- Gouaux, E. and R. MacKinnon (2005). "Principles of Selective Ion Transport in Channels and Pumps." Science **310**(5753): 1461-1465.
- Hazama, A., D. D. Loo and E. M. Wright (1997). "Presteady-state currents of the rabbit Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1)." J Membr Biol **155**(2): 175-86.
- Hediger, M. A., M. J. Coady, T. S. Ikeda and E. M. Wright (1987). "Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter." Nature **330**(6146): 379-381.
- Hilgemann, D. W. (1996). "Unitary cardiac Na⁺, Ca²⁺ exchange current magnitudes determined from channel-like noise and charge movements of ion transport." Biophys J **71**(2): 759-68.
- Hille, B. (2001). Ion channels of excitable membranes, Sinauer.
- Hirayama, B. A., D. D. Loo and E. M. Wright (1994). "Protons drive sugar transport through the Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1)." J Biol Chem **269**(34): 21407-10.
- Hirayama, B. A., D. D. Loo and E. M. Wright (1997). "Cation effects on protein conformation and transport in the Na⁺/glucose cotransporter." J Biol Chem **272**(4): 2110-5.
- Holmgren, M. and R. F. Rakowski (1994). "Pre-steady-state transient currents mediated by the Na/K pump in internally perfused *Xenopus* oocytes." Biophys J **66**(3 Pt 1): 912-22.

- Huang, Y., M. J. Lemieux, J. Song, M. Auer and D. N. Wang (2003). "Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*." Science **301**(5633): 616-20.
- Johnson, R. D. and L. G. Bachas (2003). "Ionophore-based ion-selective potentiometric and optical sensors." Analytical and Bioanalytical Chemistry **376**(3): 328-341.
- Kaback, H. R., M. Sahin-Toth and A. B. Weinglass (2001). "The kamikaze approach to membrane transport." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(8): 610-20.
- Kang, T. M. and D. W. Hilgemann (2004). "Multiple transport modes of the cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger." Nature **427**(6974): 544-8.
- Kang, T. M., V. S. Markin and D. W. Hilgemann (2003). "Ion fluxes in giant excised cardiac membrane patches detected and quantified with ion-selective microelectrodes." J Gen Physiol **121**(4): 325-47.
- Kotra, G. and H. Daniel (2007). "Flavonoid-glycosides are not transported by the human Na⁺/glucose transporter when expressed in *Xenopus laevis* oocytes, but effectively inhibit electrogenic glucose uptake." J Pharmacol Exp Ther.
- Lapointe, J. Y. (2007). "Response to Zeuthen and Zeuthen's Comment to the Editor: Enough Local Hypertonicity Is Enough." Biophys. J. **93**(4): 1417-1419.
- Lapointe, J. Y., M. P. Gagnon, D. G. Gagnon and P. Bissonnette (2002). "Controversy regarding the secondary active water transport hypothesis." Biochem Cell Biol **80**(5): 525-33.
- Lester, H. A., Y. Cao and S. Mager (1996). "Listening to neurotransmitter transporters." Neuron **17**(5): 807-10.
- Levy, S. and D. Tillotson (1987). "Ability of the Ca²⁺-selective microelectrodes to measure fast and local Ca²⁺ transients in nerve cells." Can J Physiol Pharmacol **65**(5): 904-14.
- Lindner, E., R. E. Gyurcsányi and B. D. Pendley (2001). "A glance into the bulk of solvent polymeric pH membranes." Pure Appl. Chem. **73**(1): 6.
- Loo, D. D., B. A. Hirayama, A. Cha, F. Bezanilla and E. M. Wright (2005). "Perturbation analysis of the voltage-sensitive conformational changes of the Na⁺/glucose cotransporter." J Gen Physiol **125**(1): 13-36.

- Loo, D. D., B. A. Hirayama, E. M. Gallardo, J. T. Lam, E. Turk, *et al.* (1998). "Conformational changes couple Na⁺ and glucose transport." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(13): 7789-94.
- Loo, D. D. F., A. Hazama, S. Supplisson, E. Turk and E. M. Wright (1993). "Relaxation Kinetics of the Na⁺/Glucose Cotransporter." Proceedings of the National Academy of Sciences **90**(12): 5767-5771.
- Loo, D. D. F., B. A. Hirayama, M. H. Karakossian, A.-K. Meinild and E. M. Wright (2006). "Conformational Dynamics of hSGLT1 during Na⁺/Glucose Cotransport." J. Gen. Physiol. **128**(6): 701-720.
- Lu, C. C. and D. W. Hilgemann (1999). "GAT1 (GABA:Na⁺:Cl⁻) cotransport function. Kinetic studies in giant *Xenopus* oocyte membrane patches." J Gen Physiol **114**(3): 445-57.
- Mackenzie, B., D. D. Loo and E. M. Wright (1998). "Relationships between Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) currents and fluxes." J Membr Biol **162**(2): 101-6.
- Mager, S., N. Kleinberger-Doron, G. I. Keshet, N. Davidson, B. I. Kanner, *et al.* (1996). "Ion binding and permeation at the GABA transporter GAT1." J Neurosci **16**(17): 5405-14.
- Mager, S., C. Min, D. J. Henry, C. Chavkin, B. J. Hoffman, *et al.* (1994). "Conducting states of a mammalian serotonin transporter." Neuron **12**(4): 845-59.
- Mager, S., J. Naeve, M. Quick, C. Labarca, N. Davidson, *et al.* (1993). "Steady states, charge movements, and rates for a cloned GABA transporter expressed in *Xenopus* oocytes." Neuron **10**(2): 177-88.
- Messerli, M. A., E. D. Corson and P. J. Smith (2007). "Measuring Extracellular Ion Gradients from Single Channels with Ion-Selective Microelectrodes." Biophys J.
- Miledi, R. and R. M. Woodward (1989). "Effects of defolliculation on membrane current responses of *Xenopus* oocytes." J Physiol **416**: 601-21.
- Mim, C., Z. Tao and C. Grever (2007). "Two Conformational Changes Are Associated with Glutamate Translocation by the Glutamate Transporter EAAC1." Biochemistry **46**(31): 9007-18.

- Morf, W. E. and W. Simon (1986). "Cation-Response Mechanism of Neutral Carrier Based Ion-Selective Electrode Membranes." Helvetica Chimica Acta **69**.
- Murakami, S., R. Nakashima, E. Yamashita, T. Matsumoto and A. Yamaguchi (2006). "Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism." Nature **443**(7108): 173-9.
- Murakami, S., R. Nakashima, E. Yamashita and A. Yamaguchi (2002). "Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB." Nature **419**(6907): 587-93.
- Newman, I. A. (2001). "Ion transport in roots: measurement of fluxes using ion-selective microelectrodes to characterize transporter function." Plant Cell Environ **24**(1): 1-14.
- Nicholson, C., G. T. Bruggencate, R. Steinberg and H. Stockle (1977). "Calcium modulation in brain extracellular microenvironment demonstrated with ion-selective micropipette." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(3): 1287-90.
- Oakley, B., 2nd (1987). "Measurement of potassium turnover in rod photoreceptors in toad isolated retina using ion-selective microelectrodes." Can J Physiol Pharmacol **65**(5): 1018-27.
- Parent, L., S. Supplisson, D. D. Loo and E. M. Wright (1992a). "Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter: I. Voltage-clamp studies." J Membr Biol **125**(1): 49-62.
- Parent, L., S. Supplisson, D. D. Loo and E. M. Wright (1992b). "Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter: II. A transport model under nonrapid equilibrium conditions." J Membr Biol **125**(1): 63-79.
- Peres, A., S. Giovannardi, E. Bossi and R. Fesce (2004). "Electrophysiological insights into the mechanism of ion-coupled cotransporters." News Physiol Sci **19**: 80-4.
- Pungor, E. (1995). "Ion-selective electrodes - Analogies and Conclusions." Electroanalysis **8**(4): 5.
- Pungor, E. (1998). "The Theory of Ion-Selective Electrodes." Analytical Sciences **14**(2): 249-256.
- Puntheeranurak, T., B. Wimmer, F. Castaneda, H. J. Gruber, P. Hinterdorfer, *et al.* (2007). "Substrate specificity of sugar transport by rabbit SGLT1: single-

- molecule atomic force microscopy versus transport studies." Biochemistry **46**(10): 2797-804.
- Quick, M., D. D. Loo and E. M. Wright (2001). "Neutralization of a conserved amino acid residue in the human Na⁺/glucose transporter (hSGLT1) generates a glucose-gated H⁺ channel." J Biol Chem **276**(3): 1728-34.
- R. A. Steiner, M. O., D. Ammann, W. Simon (1979). "Neutral carrier sodium ion-selective microelectrode for intracellular studies." Analytical Chemistry **51**(3): 351-353.
- Ryan, R. M. and J. A. Mindell (2007). "The uncoupled chloride conductance of a bacterial glutamate transporter homolog." Nat Struct Mol Biol **14**(5): 365-71.
- Sciortino, C. M. and M. F. Romero (1999). "Cation and voltage dependence of rat kidney electrogenic Na⁽⁺⁾-HCO⁽⁻⁾(3) cotransporter, rkNBC, expressed in oocytes." Am J Physiol **277**(4 Pt 2): F611-23.
- Sobczak, I. and J. S. Lolkema (2005). "Structural and mechanistic diversity of secondary transporters." Current Opinion in Microbiology **8**(2): 161-167.
- Su, A., S. Mager, S. L. Mayo and H. A. Lester (1996). "A multi-substrate single-file model for ion-coupled transporters." Biophys J **70**(2): 762-77.
- Taglialatela, M., L. Toro and E. Stefani (1992). "Novel voltage clamp to record small, fast currents from ion channels expressed in *Xenopus* oocytes." Biophys J **61**(1): 78-82.
- Thwaites, D. T. and C. M. Anderson (2007). "H⁺-coupled nutrient, micronutrient and drug transporters in the mammalian small intestine." Exp Physiol.
- Tóth, K., E. Lindner, E. Pungor, E. Zippel and R. Kellner (1988). "FTIR-ATR-spectroscopic analysis of Bis-Crown ether based PVC-membranes." Fresenius' Journal of Analytical Chemistry **331**(3): 448-453.
- Umbach, J. A., M. J. Coady and E. M. Wright (1990). "Intestinal Na⁺/glucose cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes is electrogenic." Biophys J **57**(6): 1217-24.
- Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, *et al.* (2001). "The Sequence of the Human Genome." Science **291**(5507): 1304-1351.

- von Heijne, G. (2007). "The membrane protein universe: what's out there and why bother?" Journal of Internal Medicine **261**(6): 543-557.
- Wadiche, J. I., J. L. Arriza, S. G. Amara and M. P. Kavanaugh (1995). "Kinetics of a human glutamate transporter." Neuron **14**(5): 1019-27.
- Werner E. Morf, W. S. (1986). "Cation-Response Mechanism of Neutral Carrier Based Ion-Selective Electrode Membranes." Helvetica Chimica Acta **69**(5): 1120-1131.
- Yernool, D., O. Boudker, Y. Jin and E. Gouaux (2004). "Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*." Nature **431**(7010): 811-8.
- Zeuthen, T. and E. Zeuthen (2007). "The mechanism of water transport in Na⁺-coupled glucose transporters (SGLT1) expressed in *Xenopus oocytes*." Biophys J.

Maxime Blanchard

(2-200-1-0) Maitrise en physique option biophysique et physiologie moléculaire

Description de l'article

Auteurs : Maxime Blanchard et Jean-Yves Lapointe

Titre : "Measuring ion transport activities in *Xenopus* oocytes using the Ion-Trap technique"

Journal : *American Journal of Physiology : Cell Physiology*

Date : Soumis le 22 novembre 2007.

L'article, d'une vingtaine de page, est terminé. Il a été soumis pour révision par jury de pairs le 22 novembre 2007. Il présente en détails le développement d'une technique. Les données présentées sont entièrement issues de mon travail personnel. J'ai activement participé à la rédaction de l'article en question.

Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Maxime Blanchard** inclut cet article dans son mémoire de maitrise qui a pour titre : *Étude du transport ionique membranaire par la mesure de concentration dans le microenvironnement externe de la membrane : mise au point de la technique du « piège ionique »*

Jean-Yves Lapointe

Coauteur

Signature

Date