

Université de Montréal

Évaluation du modèle dimérique de cotransport Na^+ -D-glucose pour l'interprétation des études cinétiques du transport de glucose et de la liaison de phlorizine sur vésicules de membrane à bordure en brosse isolées du cortex rénal de lapin.

par

Natalia Oulianova

Département de Physiologie

Faculté de Médecine

thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.) en Physiologie

(Mai, 1996)

Natalia Oulianova, 1996





**National Library
of Canada**

**Acquisitions and
Bibliographic Services**

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

**Bibliothèque nationale
du Canada**

**Acquisitions et
services bibliographiques**

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*

Our file *Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.

The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced with the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-21499-0

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Cette thèse intitulée:

Évaluation du modèle dimérique de cotransport Na^+ -D-glucose pour l'interprétation des études cinétiques du transport de glucose et de la liaison de phlorizine sur vésicules de membrane à bordure en brosse isolées du cortex rénal de lapin.

présentée par
Natalia Oulianova

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Président-rapporteur:	Christiane Malo	(Département de physiologie, U. de Montréal)
Membres du jury:	Alfred Berteloot	(directeur de recherche)
	Jean-Yves Lapointe	(Département de physique, U. de Montréal)
Examineur externe:	Édith Brot-Laroche	(INSERM U.178, 94807 Villejuif Cedex, France)
Représentant du doyen:	Léa Brakier-Gingras	(Département de biochimie, U. de Montréal)

SOMMAIRE

L'absorption intestinale et la réabsorption rénale des sucres et des acides aminés sont assurées par une famille de molécules qui permettent un transport actif de ces solutés par couplage avec le gradient électrochimique de Na^+ et qui sont en général localisées dans la membrane apicale des cellules épithéliales polarisées propres aux tissus intestinal et rénal. Le système de cotransport Na^+ -D-glucose (SGLT) en constitue l'exemple le plus étudié à ce jour et apparaît ainsi comme un modèle type pour l'étude des mécanismes moléculaires responsables du transfert d'énergie du gradient électrochimique d'un ion à un transporteur.

En se basant sur l'ensemble des études moléculaires et cinétiques réalisées jusqu'à présent, il semble désormais admis qu'une seule classe de protéines, nommées SGLT1 serait responsable du cotransport intestinal. La situation apparaît toutefois plus complexe dans le rein où les études cinétiques mettent en évidence deux voies de transport Na^+ -dépendant, soient une voie à haute affinité considérée comme l'expression fonctionnelle de SGLT1, et une voie à faible affinité, dont la nature moléculaire demeure le sujet de controverses.

Les études démontrant une séparation anatomique des deux voies de transport et leur localisation dans deux régions différentes du cortex rénal, jointes aux observations cliniques relatives aux syndromes de la malabsorption intestinale du glucose (Glc) et du galactose (Gal) et de la glycosurie rénale, ont conduit à l'hypothèse de deux transporteurs disposés en série le long du tubule contourné proximal. Le clonage récent des protéines hSGLT2, pSGLT2 et "rat-SGLT2" semble renforcer cette hypothèse. Cependant, bon nombre d'études suggèrent une structure oligomérique de SGLT1 et, donc, qu'un fonctionnement allostérique du transporteur pourrait être à l'origine de l'hétérogénéité cinétique observée dans le cortex rénal. Ces observations nous ont amenés à reconsidérer les cinétiques du transport de Glc et de la liaison de phlorizine (Pz) dans les vésicules de membrane à bordure en brosse (VMBB) du rein de lapin.

Nous confirmons tout d'abord l'hétérogénéité cinétique du cotransport Na^+ -D-Glucose dans le cortex rénal par la mise en évidence de voies à haute (HAG) et faible (LAG) affinités pour le Glc dont les valeurs de K_m diffèrent par plus de 30 fois. Par contre, une caractérisation détaillée révèle plusieurs inconsistances majeures avec l'hypothèse de deux transporteurs indépendants dans ce tissu. Nous démontrons ainsi que, contrairement aux trois clones SGLT2,

les deux systèmes transportent le Gal et sont inhibés par la Pz avec des K_i identiques. De plus, le K_m du système HAG rénal est 2.3 fois inférieur à celui du SGLT1 intestinal. Une étude comparative des effets du pH sur le transport de Glc dans les VMBB intestinales et rénales, permet de conclure que cette différence n'est pas artéfactuelle mais reflète plutôt une différence dans l'expression fonctionnelle de SGLT1 dans les deux tissus. La linéarité des graphes d'Arrhénius permet en outre de suggérer le peu d'importance de la composition lipidique et/ou de l'état physique des membranes dans la modulation de l'activité de SGLT1. Nous proposons donc des modifications post-transcriptionnelles différentes de ce système de transport dans le rein et l'intestin, liées éventuellement à la présence de sous-unités régulatrices différentes.

Nos études d'inhibition du transport de Glc par la Pz ont mis en relief le fait que la valeur unique du K_i est respectivement équivalente ou 10 fois supérieure aux valeurs de K_d de liaison de la Pz estimées dans d'autres laboratoires en conditions initiales d'équilibre. Nous nous sommes donc interrogés quant au mécanisme impliqué. D'autre part, la Pz est un acide faible. Nous nous sommes donc également demandés si l'hétérogénéité de liaison de la Pz généralement observée dans le rein ne pourrait pas être due à la présence simultanée de deux formes moléculaire différentes de Pz à pH physiologique. L'originalité de notre étude réside donc dans le choix des conditions expérimentales où des pH de 6.0 et de 8.6 permettent d'isoler 95% de la Pz sous ses formes respectivement neutre (HPz) et ionisée (Pz).

Nous démontrons ainsi que les deux formes de Pz se lient avec des affinités différentes sur le transporteur et, qu'à pH 8.6, il n'existe qu'une seule composante spécifique entièrement Na^+ -dépendante et Glc-sensible. A pH 6.0, toutefois il existe en outre une composante spécifique de faible affinité qui est insensible tant au Na^+ qu'au Glc et dont la nature, intimement reliée à la forme non ionisée de la Pz, pourrait traduire une interaction avec les lipides membranaires.

La comparaison des K_d de liaison de Pz en conditions initiales et à l'équilibre, de même que l'analyse des constantes de temps auxquelles cet équilibre est atteint, nous ont conduit à suggérer un mécanisme original de liaison en deux étapes: une liaison rapide de Pz, suivie par une isomérisation lente du transporteur et une occlusion de la Pz. La liaison de la Pz sur le transporteur peut donc être vue comme un film au ralenti du cotransport Na^+ -D-glucose dans lequel la Pz serait incapable de se dissocier du transporteur après réorientation des sites Na^+ et Glc vers le milieu intravésiculaire. L'existence d'une forme occluse de Pz est par ailleurs

démontrée par des relâchements lents de la Pz radioactive liée en présence de concentrations saturantes de Pz non marquée ou de Glc. Toutefois, une dissociation rapide est observée en absence de Na^+ dans les solutions d'efflux, et nous suggérons qu'un minimum de deux sites Na^+ doit être envisagé pour expliquer ces résultats.

Ces études démontrent qu'en dépit de la présence de deux voies de transport de Glc, il n'existe qu'une seule classe de sites Na^+ -dépendants spécifiques à la Pz, ce qui est compatible avec le K_i unique d'inhibition du transport de Glc par la Pz. Nous suggérons que l'hétérogénéité du transport dans les VMBB rénales est purement cinétique et, par conséquent, qu'elle ne reflète pas la diversité moléculaire reliée à la présence de systèmes SGLT1 et SGLT2 distincts. Nous proposons donc qu'un modèle dimérique ou tétramérique de cotransport, fonctionnant éventuellement selon le principe de demi-réactivité des sites, serait entièrement compatible avec nos études de transport du Glc et de liaison de la Pz.

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE	iii
TABLE DES MATIERES	vi
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES TABLEAUX	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiii
REMERCIEMENTS	xiv
AVANT-PROPOS	xv
Généralités	xv
Contexte de la recherche	xviii
CHAPITRE I: <u>HÉTÉROGÉNÉITÉ MOLÉCULAIRE ET CINÉTIQUE DU</u>	
<u>COTRANSPORT Na⁺-D-GLUCOSE</u>	1
I. <u>HÉTÉROGÉNÉITÉ MOLÉCULAIRE DU COTRANSPORT</u>	1
I.1. Maladies génétiques associées au cotransport Na ⁺ -D-glucose	1
I.2. SGLT1 - système à haute affinité pour le Glc (HAG)	1
I.2.a) structure moléculaire du SGLT1 intestinal	1
I.2.b) structure moléculaire de SGLT1 rénal	2
I.2.d) localisation tissulaire	2
I.3. SGLT2 - système à faible affinité pour le Glc (LAG)	4
I.3.a) structure moléculaire de SGLT2	4
I.3.b) localisation tissulaire	6
II <u>ÉTUDES CINÉTIQUES DU COTRANSPORT Na⁺-D-GLUCOSE</u>	6
II.1. Principes et buts de la modélisation cinétique.	6
II.2. Modèles d'étude et approches expérimentales	8

II.2.a) Cellules isolées et cultures cellulaires	8
II.2.b) vésicules de membrane à bordure en brosse (VMBB) . . .	10
II.2.c) expression de cotransporteur Na ⁺ -D-glucose dans les ovocytes de <i>Xenopus</i>	11
II.3. Transport du Glc et de ses analogues dans l'intestin.	12
II.3.a) premières études sur vésicules	12
II.3.b) études récentes sur vésicules	14
II.3.c) études sur ovocytes	16
II.4. Liaison de phlorizine dans l'intestin	16
II.5. Concept actuel du cotransport Na ⁺ -D-glucose rénal	19
II.6. Transport du Glc et de ses analogues dans le rein	21
II.6.a) études sur vésicules	21
II.6.b) études sur cultures cellulaires d'origine rénale	22
II.7. Liaison de phlorizine dans le rein	24
II.7.a) caractéristiques cinétiques de la liaison	24
II.7.b) site à haute affinité pour la Pz (HAP)	24
II.7.c) site à faible affinité pour la Pz (LAP)	25
II.7.d) études d'inhibition du transport par la Pz	26
III. <u>HÉTÉROGÉNÉITÉ CINÉTIQUE VERSUS HÉTÉROGÉNÉITÉ</u>	
<u>MOLÉCULAIRE</u>	27
III.1. Modélisation cinétique pour une protéine monomérique	27
III.1.a) études sur vésicules	27
III.1.b) études sur les lignées cellulaires établies	27
III.1.c) études sur ovocytes	29
III.2. Arguments en faveur d'une structure oligomérique du transporteur . . .	32
III.2.a) études d'inactivation aux irradiations	32
III.2.b) régulation du cotransport Na ⁺ /D-Glucose	32

III.3. Modélisation cinétique pour une protéine oligomérique	33
III.3.a) hétérogénéité du cotransport rénal	33
III.3.b) hétérogénéité du cotransport intestinal	36
IV. <u>CONCLUSIONS ET JUSTIFICATION DE LA RECHERCHE</u>	39
IV.1. Résumé	39
IV.2. Choix du modèle expérimental	41
IV.2.a) Concept de vitesse initiale	41
IV.2.b) technique de filtration rapide	42
IV.2.c) fonctionnement général de l'AFER	42
IV.2.d) protocole expérimental	44
IV.2.e) analyse cinétique	47
IV.2.f) choix de l'espèce animale	49
IV.2.g) choix des conditions expérimentales	50
 CHAPITRE II:	
Article un: "Sugar transport heterogeneity in the kidney: two independent transporters or different transport modes through an oligomeric protein ? 1. Glucose transport studies"	52
 CHAPITRE III:	
Article deux: "Sugar transport heterogeneity in the kidney: two independent transporters or different transport modes through an oligomeric protein ? 2. Phlorizin binding studies"	98
 CHAPITRE IV:	
Article trois: "Sugar transport heterogeneity in the kidney: two independent transporters or different transport modes through an oligomeric protein ? 3. Mechanism of phlorizin binding and implications"	145
 CHAPITRE V:	
Article quatre: "Comparative studies of pH-effects on intestinal and renal SGLT1 activities in rabbit brush-border membrane vesicles"	204

CHAPITRE VI:	<u>DISCUSSION</u>	232
	Commentaires généraux	233
I	<u>VALIDATION DE L'APPROCHE EXPÉRIMENTALE</u>	234
II	<u>HÉTÉROGÉNÉITÉ DU COTRANSPORT Na⁺-D-GLUCOSE DANS LES VMBB RÉNALES DE LAPIN</u>	236
	II.1. Paramètres cinétiques	236
	II.1.a) SGLT1 intestinal et voie HAG rénale	236
	II.1.b) nature possible de la voie LAG	237
	II.2. Études du transport de galactose	238
	II.3. Effet de la température	239
	II.3.a) HAG versus SGLT1 intestinal et SGLT1 cloné	239
	II.3.b) HAG versus LAG	240
	II.4. Effet du pH	241
	II.4.a) HAG versus SGLT1 intestinal et SGLT1 cloné	241
	II.4.b) HAG versus LAG	243
	II.5. Études d'inhibition par la phlorizine	244
III	<u>HOMOGÉNÉITÉ DE LA LIAISON HAP DANS LES VMBB RÉNALES</u>	245
	III.1. Hétérogénéité de la liaison de Pz dans le rein	245
	III.1.a) effet du pH sur LAP	246
	III.1.b) effet du pH sur HAP	247
	III.1.c) implications pour la modélisation cinétique	247
	III.2. Mécanisme de liaison de la Pz	248
	III.2.a) caractéristiques principales	248
	III.2.b) implications de l'étape d'isomérisation lente	249
	III.2.b.1) implications pour la caractérisation cinétique	249
	III.2.b.2) implications pour la modélisation cinétique	250

IV <u>CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES</u>	251
IV.1. Conclusions	251
IV.2. Perspectives	256
RÉFÉRENCES	258

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Vision actuelle du transport actif transépithélial dans les cellules absorbantes de l'intestin et du rein selon l'hypothèse du gradient de Na^+ .	xvi
Figure 2.	Structure secondaire présumée de SGLT1.	3
Figure 3.	Schéma du mécanisme de transport transépithélial du Glc.	7
Figure 4.	Formalisme cinétique du transport d'un substrat (S) couplé au Na^+ .	9
Figure 5.	Schéma du modèle du canal à barrière.	13
Figure 6.	Modèle de la liaison en deux points d'attachement pour la phlorizine.	18
Figure 7.	Schéma de répartition spatiale des néphrons entre les différentes zones du rein.	20
Figure 8.	Modèle de fixation au hasard des substrats.	27
Figure 9.	Modèle de cotransport à huit états.	29
Figure 10.	Modèle de cotransport à six états.	30
Figure 11.	Modèle dimérique du cotransporteur Na^+ -D-glucose dans le cortex et la médulla externes du rein.	34
Figure 12.	Modèle des interactions entre SGLT1 et RS1 dans les ovocytes de <i>Xenopus</i> .	35
Figure 13.	Modèle dimérique de cotransport.	37
Figure 14.	Modèle de cotransport à demi-réactivité de sites.	38
Figure 15.	Appareil à Filtration et Échantillonnage Rapides (AFER)	43
Figure 16.	Schéma de la chambre de mélange de l'AFER	44
Figure 17.	Relation entre les temps de prélèvement et le volume de l'échantillon	46
Figure 18.	Efficacité de la solution d'arrêt.	48
Figure 19.	Modèle allostérique de cotransport Na^+ -D-glucose dans le rein	254

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.	Membres de la famille des transporteurs Na ⁺ -indépendants (GLUT).	xvii
Tableau II.	Membres de la superfamille des transporteurs Na ⁺ -dépendants	xix
Tableau III.	Paramètres cinétiques déterminés pour les transporteurs de la famille SGLT	5

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
AFER	appareil à filtration et échantillonnage rapides
AMG	α -methyl-D-glucose
ATP	adénosine triphosphate
ARN	acide ribonucléique
dpm	désintégration par minute
FCCP	carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
Gal	galactose
Glc	glucose
GLUT	famille des transporteurs de glucose Na ⁺ -indépendants
HAG	" <i>high affinity glucose</i> " (transport)
HAP	" <i>high affinity phlorizin</i> " (liaison)
HNF1	Hepatocyte nuclear factor 1
LAG	" <i>low affinity glucose</i> " (transport)
LAP	" <i>low affinity phlorizin</i> " (liaison)
MBB	membrane à bordure en brosse
MBL	membrane basolatérale
Pt	phlorétine
Pz	phlorizine
SAAT1	clone codant pour le transporteur Na ⁺ /acide aminé
SGLT	sodium-glucose-cotransporteur
SGLT1	clone codant pour le transporteur Na ⁺ /D-glucose à haute affinité
SGLT2	clone codant pour le transporteur Na ⁺ /D-glucose à faible affinité
SNST1	clone codant pour le transporteur Na ⁺ /nucléoside
TCP	tubule contourné proximal
VMBB	vésicules de membrane à bordure en brosse

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Dr. Alfred Berteloot pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, ce qui m'a permis d'acquérir une expérience enrichissante tant du point de vue professionnel que personnel.

Je voudrais remercier tous mes collègues et amis du laboratoire pour leur aide et soutien constants. Mes remerciements s'adressent en particulier à Claudie Leroy, Catherine Chenu, Pierre Bissonnette, Saïd Falk et Christiane Malo pour leur amitié, leur disponibilité et une aide fort appréciées.

Je tiens également à souligner le bon esprit d'équipe et d'entraide des membres du GRTM et je les remercie de leur accueil chaleureux.

AVANT-PROPOS

Généralités

La notion de transport membranaire englobe trois mécanismes principaux de translocation des solutés organiques et des ions à travers les membranes biologiques. Le premier type de mécanisme est la *diffusion simple* qui permet l'équilibration de ces molécules de part et d'autre de la membrane. La vitesse de transport ne dépend que de paramètres physiques tels que le poids moléculaire, la liposolubilité et le degré d'ionisation des molécules. Le second type de mécanisme ou *diffusion facilitée* est, contrairement à la diffusion simple, un phénomène saturable qui témoigne ainsi d'une interaction des molécules avec des transporteurs membranaires spécifiques dont le nombre régit la vitesse maximale de transport. Dans les deux cas, cependant, la translocation du substrat peut s'effectuer dans l'un ou l'autre sens et la direction du flux net est imposée par le gradient de concentration qui prévaut à travers les membranes. Le dernier type de mécanisme ou *transport actif* permet, contrairement aux précédents, une accumulation des solutés contre leur gradient de concentration. C'est donc un processus qui nécessite un apport d'énergie externe dont la nature permet de faire une subdivision supplémentaire entre *transport actif primaire et secondaire*. Dans le cas du transport actif primaire, l'énergie est fournie par l'hydrolyse de molécules à haut potentiel énergétique comme l'ATP. Dans le cas du transport actif secondaire, l'énergie est fournie par le gradient de concentration d'un ion-activateur. La présence et le maintien de ce gradient sont généralement assurés par un transport actif de type primaire. Cette énergie est récupérée au niveau de transporteurs membranaires spécifiques qui permettent un couplage entre le flux de l'ion et du soluté organique. Le concept d'un tel mécanisme de transfert d'énergie a été formulé par Crane (1960, 1977) dans "l'hypothèse du gradient de Na⁺" pour le transport intestinal des sucres.

L'absorption du glucose (Glc) s'effectue dans les cellules épithéliales intestinales et rénales et implique des fonctions polarisées de transport: la membrane apicale est le siège du transport Na⁺-dépendant assuré par les protéines de la famille SGLT, tandis que le transport Na⁺-indépendant, dû au fonctionnement des transporteurs de la famille GLUT (Tab.I), a lieu dans la membrane baso-latérale (Fig.1). Le gradient électrochimique de Na⁺ est maintenu par l'activité

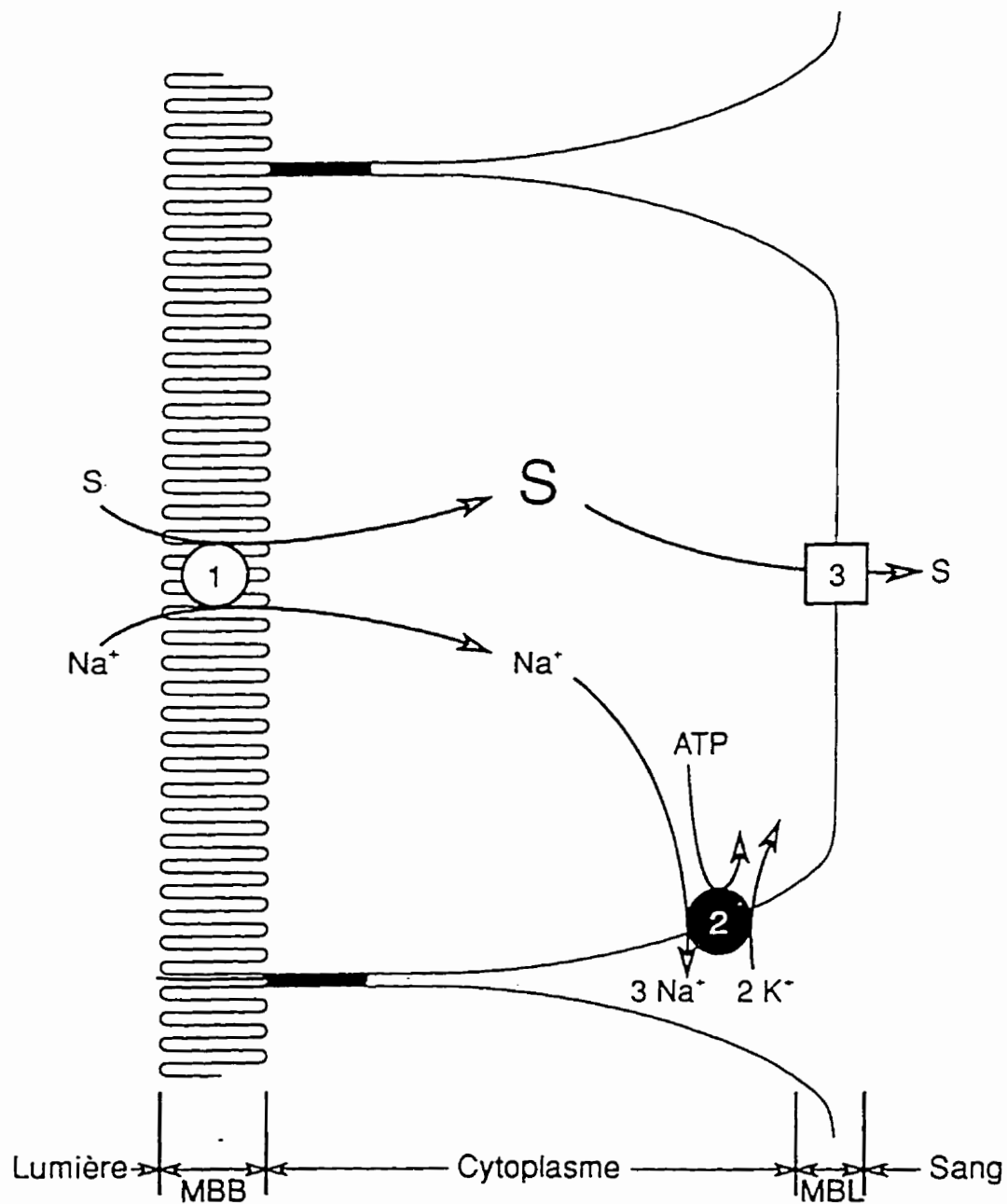


Figure 1. Vision actuelle du transport actif transépithélial dans les cellules absorbantes de l'intestin et du rein selon l'hypothèse du gradient de Na⁺. (1)-SGLT1, (2)-pompe Na⁺-K-ATPase, (3)- GLUT

Les membres de la famille des transporteurs Na⁺-indépendants (GLUT)

Isoforme	Distribution tissulaire
GLUT1	Barrière hémato-encéphalique, placenta, tissus foetaux, <i>pars recta</i> du tubule proximal du rein et lignées cellulaires
GLUT2	Foie, intestin, segment proximal du tubule contourné proximal du rein, cellules β des îlot de Langerhans, cerveau
GLUT3	Cerveau, rein et lignées cellulaires
GLUT4	Muscle squelettique et cardiaque, tissu adipeux.
GLUT5*	Intestin, spermatozoïde, astrocytes
GLUT6	pseudo-gène sans transcrit connu
GLUT7	Réticulum endoplasmique

Tiré de Kahn, 1992; Mueckler, 1994

* Transporteur de fructose.

de la Na⁺, K⁺-ATPase située elle aussi dans la membrane baso-latérale. Ce concept a ensuite été étendu par Mitchell (1961) aux ions H⁺ et par Schultz et Zalusky (1965) aux acides aminés.

Actuellement, plusieurs systèmes de transport couplé au Na⁺ sont connus et clonés (Tableau.II, rev. Reizer et al., 1994).

Contexte de la recherche

Le cotransport Na⁺-D-glucose présente un intérêt particulier compte tenu du rôle important du Glc dans l'organisme en tant que substrat utilisé pour la synthèse d'ATP, et comme précurseur dans la synthèse des acides nucléiques, des acides aminés, des graisses et des macromolécules telles que les glycoprotéines et les glycolipides.

La première étape du métabolisme du Glc est son absorption dans l'intestin grêle et sa réabsorption dans le rein après la filtration glomérulaire. Dans ces deux organes, le transport actif du Glc contre son gradient de concentration est localisé dans la membrane apicale des cellules épithéliales (Fig.1). La surface absorbante de cette membrane est considérablement accrue par la présence de microvillosités qui lui confèrent un aspect en bordure en brosse (MBB - membrane en bordure en brosse). Les similarités fonctionnelles et structurales des MBB de l'intestin et du rein (Maddox et Gennari, 1987) permettent d'élargir le choix des modèles expérimentaux pour l'étude du phénomène du cotransport Na⁺-D-glucose. Bien que ces deux organes restent le site majeur d'expression du cotransport Na⁺-D-glucose, sa présence a aussi été mise en évidence dans les poumons (Oelberg et al., 1994; rev. Strang, 1991; Kemp et Boyd, 1992), où son rôle peut être d'une grande importance dans la réabsorption du liquide alvéolaire, et dans les cellules mésangiales (Wakisaka et al., 1995) pour lesquelles les études actuelles ne permettent pas encore de définir un rôle précis.

Une attention particulière a été portée à l'implication du cotransport Na⁺-D-glucose dans le *diabète mellitus*. Pour ces études, on utilise généralement des animaux traités à la streptozotocine, une toxine spécifique aux cellules β du pancréas qui sont responsables de la production de l'insuline. L'hyperglycémie qui en résulte révèle une différence dans la réponse des systèmes de cotransport Na⁺-D-glucose du rein et de l'intestin. Alors que l'augmentation du transport a été unanimement constatée dans l'intestin (Burant et al., 1994; Fedorak et al., 1987; 1989; Ferraris et al., 1993), on observe soit une augmentation (Blank et al., 1989; 1985; Carney

Les membres de la superfamille des transporteurs Na⁺-dépendants

Abréviations	Description	Espèce
PanF	Na ⁺ /pantotenate	<i>Escherichia coli</i> , Lapin
PutP	Na ⁺ /proline	<i>Escherichia coli</i>
SNST	Na ⁺ /nucléoside	Lapin
SMIT	Na ⁺ /myo-inositol	Chien, MDCK
SGLT1	Na ⁺ /glucose	Porc, Homme, Lapin, Rat
Hu14(hSGLT2)	Na ⁺ /glucose	Homme
rat-SGLT2	Na ⁺ /glucose	Rat
SAAT1(pSGLT2)	Na ⁺ /glucose	LLC-PK ₁
PROT, GAT, SERT, DAT, TAUT, NET, CHOT, GLYT, NTT...	Na ⁺ /neuro transmetteurs	Rat, Homme, Chien, Lapin, Souris
NaP _i -1	Na ⁺ /P _i	Lapin
EMRB	Résistance aux drogues multiples	<i>Escherichia coli</i>
NABA-RAT	Na ⁺ /acides biliaires	Rat, Homme, Souris

Tiré de Reizer et al., 1994

et al., 1979; Kumar et al, 1988), soit une diminution du cotransport Na^+ -dépendant dans le rein (Harris et al., 1986; Nakhooda et al., 1977; Yasuda et al., 1990). La plupart des études s'accordent sur le fait que c'est le nombre de transporteurs qui est altéré lors du diabète. Cependant, les causes exactes de cette modulation sont probablement très complexes et demeurent encore inconnues à l'heure actuelle. Bien qu'une augmentation du cotransport Na^+ -D-glucose intestinal chez les animaux diabétiques risque d'aggraver une hyperglycémie déjà établie, elle indique toutefois une réponse adaptative à la carence intracellulaire en glucose.

Le Na^+ est un élément essentiel pour le métabolisme et la balance hydrique de l'organisme. Le couplage du transport des solutés organiques avec le Na^+ est d'une importance vitale car il permet, d'une part, d'absorber ou de réabsorber des quantités importantes de substances nutritives et de Na^+ et, d'autre part, d'éviter la déshydratation grâce à la réabsorption concomitante d'eau.

Cet aperçu du rôle du cotransport Na^+ -D-glucose dans l'organisme souligne l'importance de la compréhension de ce mécanisme de transport tant d'un point de vue physiologique que fonctionnel.

CHAPITRE I: HÉTÉROGÉNÉITÉ MOLÉCULAIRE ET CINÉTIQUE DU COTRANSPORT Na⁺-D-GLUCOSE

I. HÉTÉROGÉNÉITÉ MOLÉCULAIRE DU COTRANSPORT

I.1. Maladies génétiques associées au cotransport Na⁺-D-glucose

Les observations cliniques relatives à la *malabsorption intestinale du glucose et du galactose* et à la glycosurie rénale (Desjeux, 1995) témoignent chez l'homme de l'existence de différences majeures entre les mécanismes du cotransport Na⁺-D-glucose dans l'intestin et le rein. Selon ces observations, en effet, le syndrome de *malabsorption du glucose et du galactose* se traduit par une perte complète de la fonction intestinale de cotransport alors que la réabsorption rénale n'est affectée que du tiers seulement en absence de galactosurie (Scriver et al., 1976). Inversement, la glycosurie rénale n'affecte pas l'absorption intestinale du Glc, ce qui suggère une origine génétique différente des systèmes de cotransport Na⁺-D-glucose dans l'intestin et le rein.

I.2. SGLT1 - système à haute affinité pour le Glc (HAG)

I.2.a) structure moléculaire du SGLT1 intestinal

En 1987, la structure primaire d'un cotransporteur Na⁺-D-glucose intestinal de lapin a été déduite de sa séquence nucléotidique. L'ARNm codant pour ce transporteur, nommé SGLT1, a été identifié en utilisant une nouvelle technique de clonage utilisant l'expression dans les ovocytes de *Xenopus laevis* (Hediger et al., 1987a,b). Plus tard, un ADNc homologue à 85% au clone de lapin a été isolé de l'intestin humain (Hediger et al., 1989a). Ainsi, l'ADNc de SGLT1 code pour une protéine de 662 acides aminés pour un poids moléculaire de 73 080 Da. Selon les prédictions des graphes d'hydrophobicité, la protéine est hydrophobe (rev. Hediger et Rhoads, 1994) et sa structure secondaire comporterait 14 segments transmembranaires avec les résidus NH₂ et COOH terminaux situés du côté extracellulaire (Turk et al., 1996) (Fig.2) ou le résidu COOH terminal situé du côté intracellulaire (Turner et al., 1996). Il a été démontré que la glycosylation d'un résidu asparagine en position 248 (Hediger et al., 1991) n'est pas

indispensable pour la fonction de transport (Hirayama et Wright, 1992). Le gène codant pour SGLT1 est localisé dans le chromosome 22 (Hediger et al., 1989b; Turk et al., 1994) et le clonage de SGLT1 chez des patients atteints de *malabsorption du glucose et du galactose* a permis de déterminer qu'une simple substitution de l'acide aspartique en position 28 par un résidu asparagine est responsable de l'inactivation complète du transporteur (Turk et al., 1991, Desjeux, 1995). D'autres mutations de SGLT1 sont également capables de conduire à une inactivation du cotransport intestinal (Martin, et al., 1996) et ont été observées chez les patients atteints de *malabsorption du glucose et du galactose*.

I.2.b) structure moléculaire de SGLT1 rénal

Bien avant le clonage de SGLT1, plusieurs tentatives avaient visé à identifier et à purifier le cotransporteur Na⁺/D-glucose rénal en utilisant différentes approches comme la solubilisation suivie de la reconstitution dans des liposomes (rev. Koepsell, 1986; Silverman et Speight, 1986; Wu et Lever, 1987b), le marquage du transporteur par liaison covalente avec des analogues du D-glucose (Neeb et al., 1985; 1987) ou par des anticorps monoclonaux (Koepsell et al., 1988; Wu et Lever, 1987a). L'utilisation d'analogues du D-glucose liés de façon covalente à des protéines membranaires a permis d'identifier plusieurs polypeptides appartenant à des molécules de taille similaire au SGLT1 (Neeb et al., 1987). En raison de la présence dans le rein d'un système de cotransport du Glc semblable à celui de l'intestin, l'ADNc codant pour SGLT1 a été utilisé comme sonde en vue d'identifier les ARNm complémentaires dans le cortex rénal de lapin (Coady et al., 1990) et, tant dans le cortex que dans la médulla externe, on a pu isoler un clone similaire à SGLT1. Ainsi, la comparaison des séquences des transporteurs rénal et intestinal montre qu'il existe plus de 99% d'homologie entre les ADNc des deux transporteurs (Coady et al., 1990; Morrison et al., 1991). Un ADNc codant pour SGLT1 a également été isolé des cellules LLC-PK₁ (Ohta et al., 1990) et sa séquence en acides aminés présente 86% d'identité avec le SGLT1 de rat.

I.2.d) localisation tissulaire

Des études immunocytochimiques ont permis de confirmer la localisation de SGLT1 dans les BBM intestinales de lapin (Hwang et al., 1991). Puisque le fonctionnement du transporteur

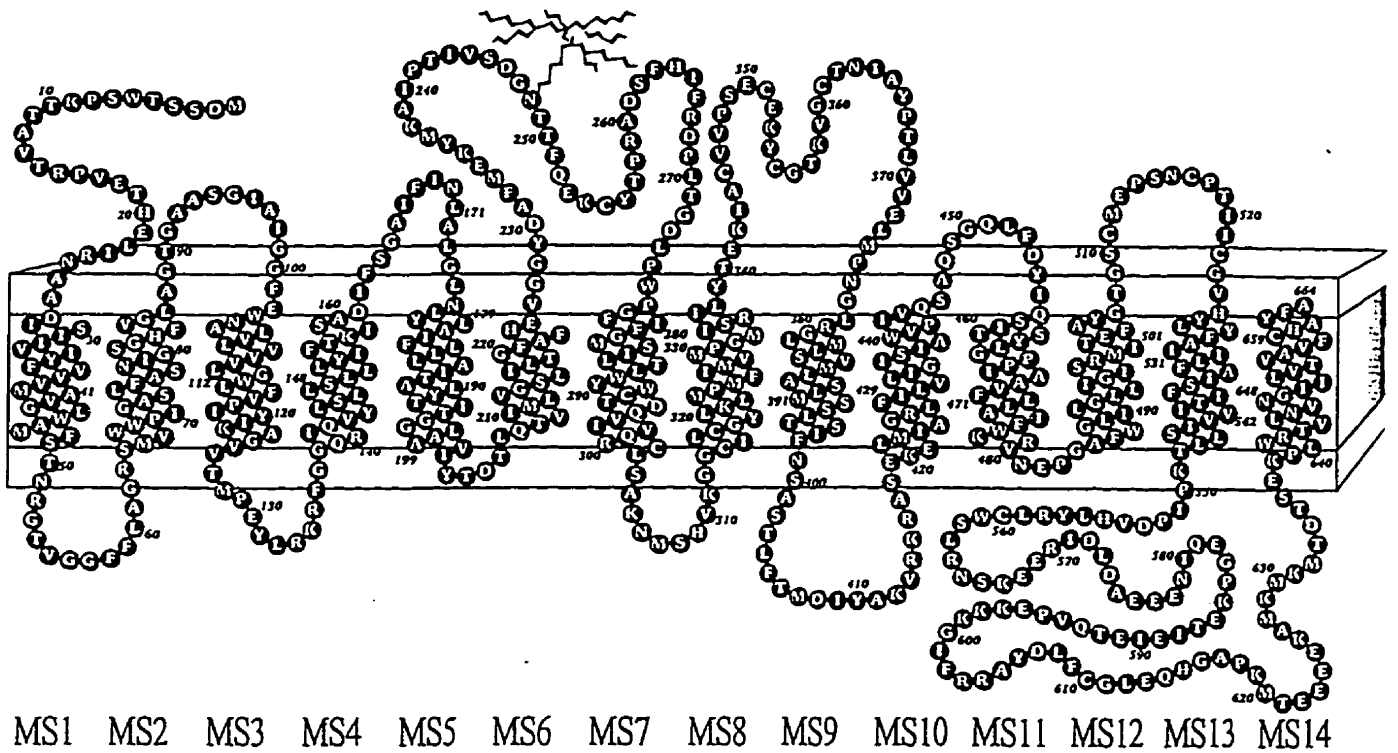


Figure 2. Structure secondaire présumée de SGLT1.

Le modèle proposé est déterminé par la glycosylation des sites potentiels dont la séquence NNSS de N-glycosylation a été incorporée dans les endroits stratégiques de la séquence primaire de hSGLT1 (tiré de Turk et al., 1996)

juxta-médullaire présente des caractéristiques similaires à SGLT1 (Turner et Moran, 1982a), il a été suggéré que SGLT1 s'exprime uniquement dans le segment S₃ et représente le seul transporteur s'exprimant dans les cellules LLC-PK₁. Cette hypothèse semble être renforcée par le fait que ces cellules expriment GLUT1 au niveau baso-latéral (Ohta et al., 1990) et que leur phénotype ressemble à celui des cellules du segment S₃, qui est le seul à exprimer GLUT1 (Thorrens et al., 1990). Par conséquent, on s'attend à une colocalisation de SGLT1 et GLUT1 exclusivement dans ce segment. Cependant, les études de localisation de SGLT1 dans le rein à l'aide de techniques immunocytochimiques ont révélé la présence de ce transporteur dans les segments S₁, S₂, et S₃ (Takata et al., 1991; Silverman et al., 1993; Cramer et al., 1992). Il faut admettre, cependant, que les anticorps utilisés dans ces études pouvaient reconnaître un épitope commun à d'autres transporteurs Na⁺-dépendants, ce qui engendre une ambiguïté dans l'interprétation des résultats. Toutefois, l'ARNm de SGLT1 a également été détecté dans toutes les régions du cortex rénal (Coady et al., 1990; Pajor et al., 1992; Lee et al., 1994; You et al., 1995).

I.3. SGLT2 - système à faible affinité pour le Glc (LAG)

I.3.a) structure moléculaire de SGLT2

Dans le cadre de l'hypothèse de la présence de deux transporteurs indépendants et disposés en série le long du TCP (Turner et Moran, 1982 a,b,c), les nombreuses tentatives visant à cloner le deuxième transporteur de Glc par hybridation avec un ADNc-SGLT1 ont permis de cloner une famille de transporteurs présentant une forte homologie avec SGLT1. Deux d'entre eux (Hu14 et SAAT1) ont été proposés comme second transporteur potentiel de Glc, celui à faible affinité et à haute capacité (LAG). Le clone Hu14, dont l'ADNc a été isolé à partir du rein humain (Wells et al., 1992b), présente 59% d'identité avec le SGLT1 intestinal humain. L'expression fonctionnelle de Hu14 dans les ovocytes montre un K_m, une stoechiométrie et une insensibilité au galactose (Gal) (Kanai et al., 1994) qui correspondent au système de transport décrit par Turner et Moran (1982a) dans le cortex externe de lapin. Sur cette base, les auteurs (Kanai et al., 1994) l'ont nommé hSGLT2. Récemment, le même groupe (You et al., 1995) a décrit et localisé SGLT2 chez le rat. Ces auteurs ont démontré, par injections concomitantes des

Les paramètres cinétiques déterminés pour les transporteurs de la famille SGLT après injection des ARNc dans les ovocytes de *Xenopus laevis*.

	SGLT1	SGLT2
K_m^{glucose}	0.1 - 0.3 mM	2 - 3 mM (hSGLT2)* rat-SGLT2***
$K_m^{\text{galactose}}$	0.4 mM	> 20 mM (pSGLT2)**
K_m^{Na}	32 mM	260 - 300 mM (Hu14-hSGLT2), rat-SGLT2, 10 mM (pSGLT2)
$K_i^{\text{phlorizine}}$	7 - 12 μM	16 - 37 μM (pSGLT2) 1 μM (Hu14-SGLT2)
stoechiométrie	2 : 1	1 : 1
$\text{Na}^+ : \text{Glc}$		

* Kanai et al., 1994

** Mackenzie et al., 1994

*** You et al., 1995

ARNm et des ARNm complémentaire, que le SGLT2 de rat est responsable du transport de Glc observé dans les ovocytes injectés. Entre-temps, le groupe de Wright (Mackenzie et al., 1994) a également décrit un transporteur de Glc à faible affinité précédemment identifié comme le transporteur d'acides aminés SAAT1 (Kong et al., 1993) et cloné à partir d'ADNc total des cellules LLC-PK₁. L'ADNc de ce clone code pour une protéine de 660 acides aminés dont la séquence présente 76% d'identité avec SGLT1. Ce transporteur présente également des caractéristiques cinétiques semblables au système LAG décrit par Turner et Moran et a été nommé pSGLT2.

I.3.b) localisation tissulaire

La technique d'hybridation *in situ* avec les sondes ARNc complémentaire a révélé la présence des ARNm-SGLT2 exclusivement dans le cortex externe du rein (Kanai et al., 1994; You et al., 1995). Concernant pSGLT2 (SAAT1), malheureusement, aucune information sur sa localisation dans le rein n'est encore disponible mais la distribution tissulaire de SAAT1 n'est pas restreinte au rein et en particulier a été détectée dans l'intestin (Kong et al., 1993). Toutefois, contrairement au SAAT1-pSGLT2, dont l'injection d'ARNm stimule le transport de 27 fois, Hu14-rSGLT2 stimule le transport de seulement 4.5 fois et une forte homologie avec le transporteur des nucléosides SNST1 (Pajor et Wright, 1992) laisse supposer que ce clone pourrait plutôt représenter un transporteur de nucléosides.

Le résumé des paramètres cinétiques de SGLT1 et des trois clones de SGLT2 est présenté dans le Tableau III. Le concept actuel du mécanisme général du transport de Glc, tel que suggéré par l'ensemble des résultats présentés dans cette section, est illustré dans la Fig.3.

II ÉTUDES CINÉTIQUES DU COTRANSPORT Na⁺-D-GLUCOSE

II.1. Principes et buts de la modélisation cinétique.

Le processus de cotransport peut être présenté comme un enchaînement de réactions permettant la liaison du substrat et du cosubstrat sur le transporteur faisant face au milieu extracellulaire, leur translocation à travers la membrane, puis leur libération du côté cytoplasmique. Le cycle se termine par le retour du transporteur libre à la surface membranaire

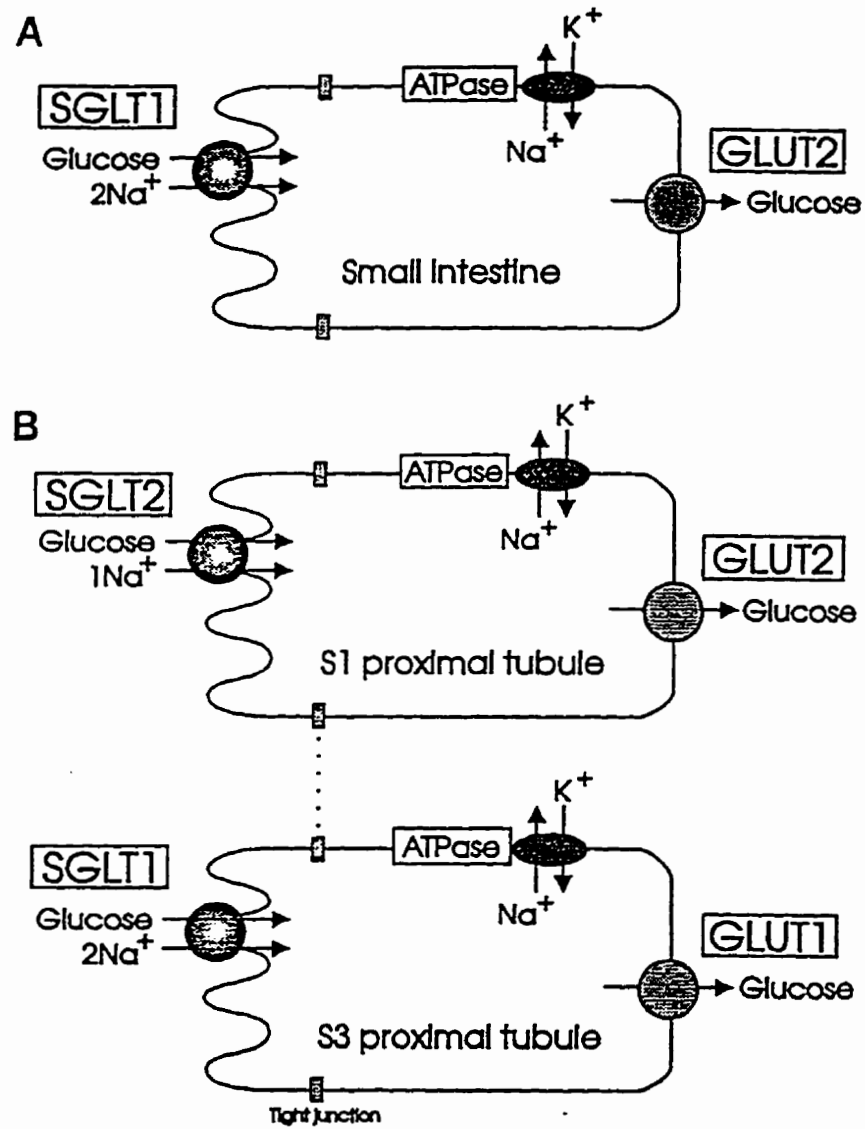


Figure 3. Schéma du mécanisme de transport transépithélial du Glc. (A) dans l'intestin; (B) dans le tubule contourné proximal selon l'hypothèse de deux transporteurs indépendants disposés en série (tiré de Hediger, 1994)

externe. Pour décrire ce phénomène, on utilise des schémas analogues à ceux décrivant les réactions enzymatiques (Fig.4). Ceci permet de dériver les équations de vitesse initiale caractéristiques d'un modèle et de les utiliser pour l'analyse des données expérimentales. Le but principal des études cinétiques est donc de comparer le comportement du système, prédit par les différents modèles, aux résultats expérimentaux en vue de sélectionner le modèle le plus plausible.

Dans le cas du cotransport Na^+ -dépendant, le schéma cinétique présenté à la Fig.4 permet de visualiser plusieurs aspects du mécanisme de cotransport qui intéressent le cinéticien: i) les étapes limitantes du cycle de transport; ii) les réactions et les étapes sensibles au potentiel membranaire; iii) les étapes probables de translocation et d'isomérisation; iv) l'ordre des interactions entre le Na^+ , le transporteur libre et le substrat aux interfaces membranaires externe et interne; v) la stoechiométrie du couplage entre le Na^+ et le substrat. Enfin, des schémas cinétiques analogues s'appliquent également aux phénomènes d'inhibition et de liaison des substrats non-transportés.

II.2. Modèles d'étude et approches expérimentales

II.2.a) Cellules isolées et cultures cellulaires

Au fur et à mesure que progressait notre connaissance du phénomène de cotransport Na^+ -D-glucose et de sa localisation, les études de ce système de transport se sont faites sur des modèles expérimentaux de plus en plus ciblés et raffinés afin d'isoler davantage le transporteur en question. La technique des organes perfusés (comme l'intestin ou les tubules rénaux isolés (rev. Ulrich, 1976; Barfuss et Schafer, 1981) ne permet pas d'isoler fonctionnellement un système particulier de transport. Les flux transépithéliaux du substrat étudié sont influencés par le métabolisme cellulaire, lui-même susceptible d'affecter les systèmes de transport aux membranes apicale et baso-latérale, et par la contribution de la voie paracellulaire. L'inconvénient majeur que constitue cette voie paracellulaire peut être éliminé par l'utilisation de la technique des cellules isolées, qui a été appliquée essentiellement aux entérocytes de poulet (rev. Kimmich, 1990). Cependant, l'interférence du métabolisme cellulaire avec les systèmes de transport persiste, ce

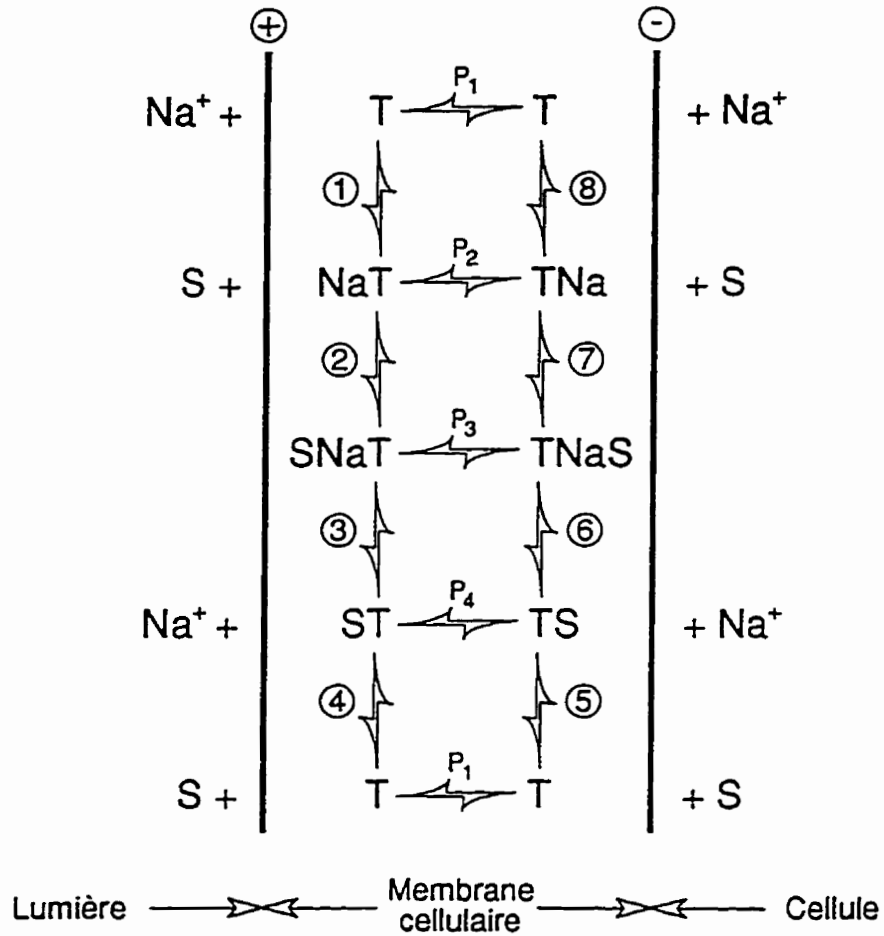


Figure 4. Formalisme cinétique du transport d'un substrat (S) couplé au Na⁺. T: transporteur, P₁₋₄: probabilités de translocation. Voir explications dans le texte. (d'après Crane, 1977)

qui rend nécessaire l'utilisation d'un analogue non-métabolisé du Glc, l' α -methylglucose (AMG).

De nombreuses études ont été également réalisées en utilisant des lignées cellulaires (LLC-PK₁) (Rabito et Ausiello, 1980; Amsler et Cook, 1982; Moran et al., 1982, 1988; Murer et al., 1984; Yoneyama et Lever, 1988; Ohta et al., 1990; Shioda et al., 1994; Wu et Lever, 1989, 1994; Yet et al., 1994) dérivées du tubule contourné proximal (TCP) et des cultures primaires du TCP (Bell et al., 1988; Chung et al., 1982; Sakhrani et al., 1984). L'attrait de ces modèles expérimentaux repose sur la possibilité de contrôler la composition chimique du milieu par rapport aux modèles *in vivo*, de faire des transfections d'ADNc et d'étudier le mécanisme de régulation du cotransport Na⁺-D-glucose dans des conditions où, à l'opposé des vésicules membranaires, les interactions entre le transporteur et la membrane cellulaire sont préservées au niveau du cytosquelette. Toutefois, les cellules isolées et en culture présentent certains désavantages en tant que modèle expérimental puisqu'y subsistent les interactions éventuelles entre transporteurs apicaux et baso-latéraux. D'autre part, la composition chimique du milieu de culture et l'état de différenciation cellulaire sont des facteurs susceptibles d'influencer l'expression des systèmes de transport. Les conditions expérimentales telles que le pH et l'O₂ pourraient, par l'intermédiaire du métabolisme cellulaire, modifier la fonction de transport, facteurs auxquels s'ajoute le phénomène du recyclage des transporteurs.

II.2.b) vésicules de membrane à bordure en brosse (VMBB)

Dans ce contexte, l'isolement de MBB d'origine intestinale (Hopfer et al., 1973; rev. Semenza et al., 1984) et rénale (Malathi et al., 1979), qui ont une tendance à former des vésicules closes conservant l'orientation naturelle de la membrane, est une technique qui s'est imposée comme un modèle expérimental de choix pour les études cinétiques. Cette approche permet en effet d'éliminer les facteurs liés au métabolisme cellulaire et d'imposer un contrôle rigoureux des conditions expérimentales non limité par la survie cellulaire (rev. Berteloot et Semenza, 1990; Murer et al., 1984; Turner, 1983). Les VMBB sont pratiquement dépourvues d'organelles et d'enzymes intracellulaires, ce qui permet d'utiliser les substrats physiologiques comme le Glc ou le Gal. Contrairement aux cellules intactes, les VMBB sont enveloppées par une couche aqueuse non-mélangée très mince, ce qui augmente la précision de l'évaluation des paramètres cinétiques. La possibilité de choisir la composition chimique du milieu intravésiculaire permet d'étudier les

efflux du substrat, ce qui n'est pas le cas avec les cellules intactes pour lesquelles la composition du milieu intracellulaire n'est pas contrôlée. Il faut noter que dans le cas des VMBB, la technique de préparation des vésicules inversées n'est pas encore disponible. La purification des membranes cellulaires permet de les enrichir en protéines membranaires et donc d'élargir l'utilisation des vésicules pour les études des enzymes membranaires, des transporteurs, des lipides et des protéines liées au cytosquelette de même que pour les études biochimiques et immunologiques.

Malheureusement, les VMBB présentent une certaine hétérogénéité de taille et leur contamination éventuelle par les membranes baso-latérales impose un contrôle régulier des nouvelles préparations. De plus, les vésicules perdent la polarisation fonctionnelle propre aux cellules entières et, en absence des pompes à Na^+ , la dissipation rapide du gradient de Na^+ limite l'accumulation du substrat à une phase transitoire ("overshoot"), raccourcissant ainsi la période des mesures de vitesses initiales d'influx (rev. Berteloot et Semenza, 1990).

II.2.c) expression de cotransporteur Na^+ -D-glucose dans les ovocytes de *Xenopus*

Le développement de nouvelles techniques de biologie moléculaire, couplé à l'utilisation de systèmes d'expression tel que les ovocytes de *Xenopus laevis* a permis de cloner et de caractériser de nombreuses protéines responsables du transport des solutés organiques couplé au Na^+ (rev. Reizer et al., 1994; Hediger et al., 1987a,b). La technique de clonage par expression peut être rendue encore plus sélective par l'injection concomitante d'ARNm complémentaire et est également utilisable pour isoler des ADNc (rev. Hediger et Rhoads, 1994). La caractérisation électrophysiologique des transporteurs exprimés dans un ovocyte est également avantageuse par rapport aux cellules intactes. Même si la taille d'un ovocyte est beaucoup plus grande que celle d'une cellule (1mm vs 10-15 μm de diamètre), le taux d'expression des transporteurs est généralement très élevé et, dans le cas du transport Na^+ -D-glucose, l'absence de cotransport endogène rend cette fonction exclusive au clone injecté. Toutefois, dans l'ovocyte tout comme dans les cellules intactes, la présence de Na^+ intracellulaire peut affecter le fonctionnement d'un transporteur qui, en outre, s'exprime dans un environnement non-habituel qu'est la membrane d'ovocyte. Une nouvelle technique dite du "cut-open oocyte" (Taglialatela et al., 1992; Costa et al., 1994; Chen et al., 1995) permet de contourner ce problème en perfusant l'ovocyte avec une

solution de composition contrôlée. La technique électrophysiologique de "voltage-clamp" permet de mesurer avec une haute précision des courants générés par le cotransport, même de courte durée (les courants pré-stationnaires) mais, malheureusement, s'applique seulement aux systèmes électrogènes. D'autre part, le choix des conditions expérimentales est limité par la survie et le métabolisme de l'ovocyte, de même que par la disponibilité des molécules clonées.

Malgré les inconvénients de chaque technique, l'ensemble de ces méthodes a permis d'établir certaines caractéristiques importantes du fonctionnement du cotransport Na⁺-D-glucose.

II.3. Transport du Glc et de ses analogues dans l'intestin.

II.3.a) premières études sur vésicules

En 1980, Dorando et Crane démontrent que le cotransport Na⁺-D-glucose intestinal, jusqu'alors considéré comme homogène, est assuré par deux voies dans l'intestin grêle de lapin, l'une à haute affinité HAG et l'autre à faible affinité LAG (rev. Crane, 1977). Ces deux voies ont une sensibilité différente au Na⁺ (Kaunitz et al., 1982; Dorando et Crane, 1980). Par contre, Hopfer et Groseclose (1980) décrivent une seule classe de sites de transport de Glc chez le lapin. Cette différence est probablement due au choix des conditions expérimentales puisque Dorando et Crane ont utilisé les conditions de gradient *zero-trans* (Na⁺_{in} = 0 mM, Glc_{in} = 0 mM), tandis que Hopfer et Groseclose ont mesuré le transport selon la technique de l'échange à l'équilibre. L'utilisation de cette technique a été le sujet de nombreuses critiques (Berteloot et Semenza, 1990; Kaunitz et Wright, 1984; Kessler et Semenza, 1983; Semenza et al., 1984) quant à son application pour la discrimination des modèles cinétiques. La présence de sites internes, chacun spécifique au Na⁺ ou au Glc, a été suggérée par Kessler et Semenza (1983) qui ont démontré le fonctionnement asymétrique du transporteur (rev. Semenza et al., 1984; Kessler et Semenza, 1983). En se basant en partie sur leurs travaux antérieurs relatifs à la liaison de Pz (Toggenburger et al., 1982), ces auteurs ont suggéré que le transporteur libre est chargé négativement et, qu'en absence de potentiel membranaire, les sites de liaison sont préférentiellement orientés vers l'intérieur (Fig.5). L'existence d'une charge négative sur le transporteur libre a aussi été proposée plus tard lors des travaux sur cellules isolées (Restrepo et Kimmich, 1985) et sur le cotransporteur Na⁺-D-glucose cloné (Parent et al, 1992a,b).

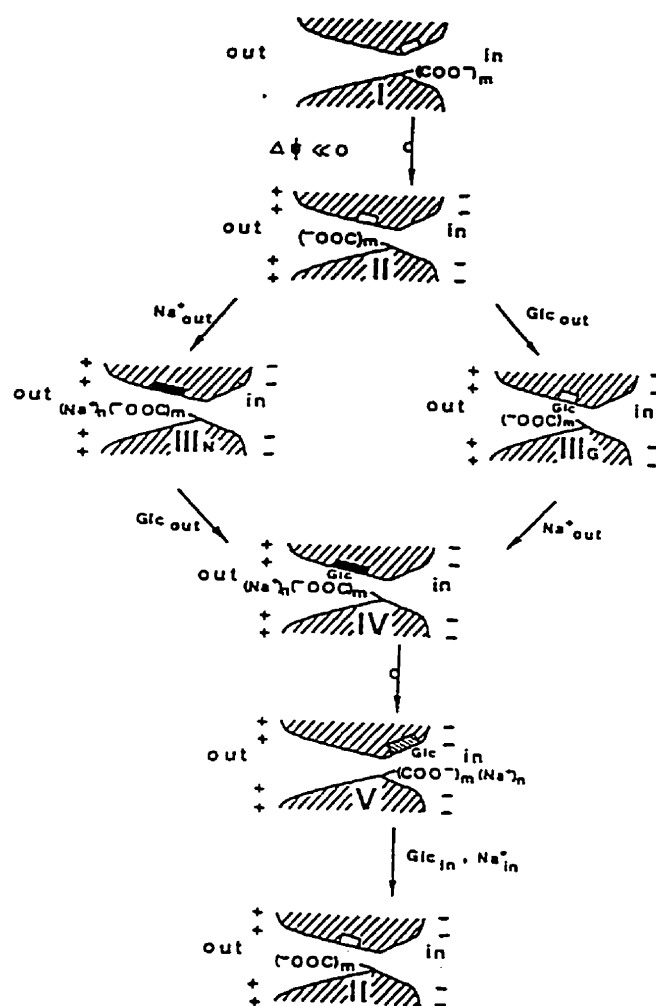


Figure 5. Schéma du modèle du canal à barrière (tiré de Kessler et Semenza, 1983)

Il faut souligner que l'avènement des membranes isolées comme modèle expérimental a mis en évidence les imperfections des techniques utilisées précédemment; le contrôle insuffisant des conditions expérimentales du transport (rev. Kimmich, 1990; Berteloot et Semenza, 1990) peut conduire à une interprétation erronée des résultats (Kimmich, 1990; Malo et Berteloot, 1991; Crane, 1985). En effet, il fallait se rendre compte qu'avec une miniaturisation du modèle - le diamètre des vésicules représente 250 nm (Dorando et Crane, 1984) - et très petites quantités de substrat impliqué dans le transport mesuré, des variations de concentration ou de potentiel membranaire aussi minimes soient-elles peuvent induire une erreur importante d'évaluation cinétique. Ceci peut en partie expliquer la diversité des résultats obtenus selon les techniques et les conditions expérimentales utilisées.

L'importance du contrôle efficace du potentiel membranaire lors de l'étude des systèmes de transport impliquant des flux ioniques a été également soulignée (rev. Kimmich, 1990). Les études les plus récentes accordent donc une attention très particulière au contrôle de tous les paramètres expérimentaux tels que la stabilité des vésicules (Maenz et al., 1991), les techniques de mesure et de prélèvement des échantillons (Berteloot et al., 1991; Béliveau, 1987) et l'analyse des données expérimentales (Dorando et Crane, 1984; Malo et Berteloot, 1991; Chenu, thèse 1992).

II.3.b) études récentes sur vésicules

Dans cette optique, des études très poussées ont été conduites par Chenu et Berteloot (1993; Chenu, thèse, 1992) dans les VMBB intestinales de lapin. Les résultats obtenus démontrent la présence d'une seule classe de sites de transport pour le Glc et le Gal, ces deux sucres partageant la même voie de transport (Chenu et Berteloot, 1993). Ces mêmes auteurs ont testé systématiquement toutes les conditions expérimentales susceptibles de révéler des voies multiples de transport observées précédemment (rev. Crane, 1985; Kimmich, 1990; Brot-Laroche et al., 1986) telles que: i) la présence ou l'absence d'un potentiel membranaire; ii) une forte ou une faible concentration extravésiculaire de Na^+ ; et, iii) l'augmentation de la température (Chenu et Berteloot, 1993). Or, dans toutes ces conditions, une cinétique simple de type Michaelis - Menten a été observée. Le coefficient de couplage entre le Na^+ et le Glc (stoechiométrie) a d'abord été mesuré par la méthode dite du "static head", telle qu'introduite par Turner et Moran

(1982 b) dans les études du transport rénal. Le principe de cette technique consiste à fixer les concentrations de Na^+ et de $^3\text{H-Glc}$ interne et, après dilution des vésicules, à faire varier la concentration de Na^+ externe pour trouver les conditions de l'équilibre thermodynamique (le gradient de concentrations de Na^+ est contrebalancé par le gradient opposé de concentrations de Glc), c'est-à-dire celles qui génèrent un flux nul de $^3\text{H-Glc}$. Puisque le degré de précision des mesures par cette technique s'est avéré insuffisant, compte tenu du petit volume vésiculaire avec lequel se fait l'échange, ces études ont été complétées par l'analyse des courbes d'hyperaccumulation transitoire ("overshoot") (Chenu, thèse, 1992). Ces données confirment ainsi la stoechiométrie de $2\text{Na}^+ : 1\text{Glc}$ ($n = 1.75$) observée précédemment dans les cellules isolées d'intestin de poulet (rev. Kimmich, 1990), pour le site à haute affinité des VMBB intestinales de lapin et de veau (Kaunitz et al., 1982; 1984), ainsi que dans l'intestin foetal humain (Malo, 1988). Dans ce dernier cas, les sites HAG et LAG ont pu être séparés grâce à leur sensibilité différentielle au 3-O-methylglucose (Malo, 1990). Néanmoins, dans les mêmes conditions expérimentales, on ne distingue la présence que d'une seule classe de sites dans les VMBB intestinales de l'humain adulte (Malo et Berteloot, 1991).

Des études d'effet de la température n'ont pas permis de mettre en évidence un éventuel second site de transport dans l'intestin de lapin (Chenu et Berteloot, 1993), contrairement aux travaux sur l'intestin de cobaye (Brot-Laroche et al., 1986), ce qui pourrait s'expliquer par une différence entre les espèces étudiées. Cependant, en utilisant une approche expérimentale similaire, Malo (1993) a réévalué les cinétiques de transport dans les VMBB intestinales de cobaye à 25° et à 35°C et a démontré la présence d'une seule classe de sites de transport à ces deux températures. Ces derniers résultats sont en accord avec les travaux de Lostao et al. (1992) qui, en mesurant l'inhibition compétitive du transport de Glc par le Gal, démontrent la présence d'une seule voie de transport d'AMG à 25° et 37°C dans l'intestin de cobaye. En s'appuyant sur les résultats de ces études, Malo (1993) a suggéré que la mise en évidence du système LAG par Brot-Laroche et al. (1986) serait le fait d'une estimation erronée de la composante non-spécifique Na^+ -indépendante due à la contamination par le Glc du sorbitol, utilisé comme substitut du Glc.

En plus des effets du potentiel membranaire et de la température, l'effet du pH sur le cotransport Na^+ -D-glucose a été décrit pour l'intestin de lapin (Hoshi et al., 1986). Les auteurs démontrent la présence dans les VMBB intestinales d'un transport de Glc activé par un gradient de pH et inhibé par la Pz en absence totale de Na^+ .

II.3.c) études sur ovocytes

Umbach et al. (1990) ont démontré que SGLT1 est électrogénique, ce qui est en accord avec l'hypothèse de Crane (1960) et les premières observations de Murer et Hopfer (1974), et que les courants Pz-sensibles de Na⁺ via SGLT1 persistent même en absence de Glc externe. Depuis, des études électrophysiologiques ont démontré une stoechiométrie de 2Na⁺ : 1Glc et des paramètres cinétiques du transporteur SGLT1 cloné identiques à ceux établis dans les VMBB intestinales (rev. Wright, 1993; Parent et Wright, 1993). Cependant, suite à l'observation par Umbach et al. (1990) d'un découplage des flux de Na⁺ et de Glc, une vérification que deux ions Na⁺ sont réellement cotransportés avec le Glc s'avérait nécessaire. Le cotransport de Glc avec deux ions Na⁺ a été confirmé par la comparaison des courants dûs au transport et par le contrôle direct des concentrations de Na⁺ et de Glc des deux côtés de la membrane en utilisant la technique de "cut-open oocyte" (Chen, et al., 1995). Une approche électrophysiologique a permis de mesurer les courants pré-stationnaires (Parent et al., 1992a) qui mettent en évidence l'existence de changements conformationnels électrogéniques du transporteur en présence de Na⁺ (Loo et al., 1993; 1993b). Ceci avait également été suggéré par les observations de Peerce et Wright (1987) basées sur l'utilisation de sondes fluorescentes.

Le transporteur SGLT1 cloné peut transporter le Glc suite à l'imposition d'un gradient de pH (Hirayama et al., 1994) en absence totale de Na⁺, démontrant ainsi que les ions H⁺ peuvent se substituer aux ions Na⁺ pour l'activation du transporteur. Le fait que SGLT1 peut s'exprimer dans différents systèmes où le transport endogène de Glc est absent (Birnir et al., 1990; Smith, Hirayama et Wright, 1992) suggère que la présence de la protéine SGLT1 seule suffit à assurer le cotransport Na⁺-D-glucose dans l'intestin. Ces observations du comportement du SGLT1 cloné ainsi que son rôle dans le syndrome de malabsorption intestinale du Glc et du Gal (Turk et al., 1991) ont permis de conclure (rev. Wright, 1993) que SGLT1 est le seul transporteur impliqué dans l'absorption intestinale du Glc.

II.4. Liaison de phlorizine dans l'intestin

Les études de liaison de la Pz avaient pour but de quantifier le nombre de transporteurs (Ferraris et al, 1986) et d'évaluer les cinétiques d'inhibition du transport. Cependant, en raison de la présence de lactase-phlorizine hydrolase dans les MBB d'intestin (Malathi et Crane, 1969;

Rossi et al., 1992), les données sur la liaison de Pz au niveau des MBB de ce tissu (Alvarado, 1967; Toggenburger et al., 1978) deviennent difficilement interprétables. La situation est compliquée par la présence de deux produits d'hydrolyse, le Glc et la phlorétine (Pt), dont le premier est transporté alors que l'autre ne l'est pas. Toutefois, puisque l'inhibition du transport de Glc par la Pz a été observée dans l'intestin, Diedrich (1968) a suggéré que la Pt serait réellement l'inhibiteur du cotransport intestinal.

Dans cette optique, seule la quantification des sites de liaison à l'équilibre peut être fiable, indépendamment du fait que ce soit la Pz ou la Pt qui se lie au transporteur. Quant à l'interprétation des constantes d'affinité pour la Pz, il convient d'être prudent car elles peuvent refléter au moins deux phénomènes pouvant s'influencer mutuellement à savoir: le transport de Glc et la liaison de Pt sur le transporteur. Cependant, Minami et al. (1993) ont démontré que la présence de Pz dans la diète induit l'activité lactase-phlorizine hydrolase et stimule la liaison de Pz dans l'intestin. L'absence de ces effets lorsque la Pz a été remplacée par la Pt suggère, selon les auteurs, que les effets observés sont dus à la Pz et non à son aglycone.

Ces réserves mises à part, on peut constater que l'affinité de la Pz pour le transporteur est 100 fois plus grande que celle du Glc. D'autre part, la liaison de Pz est Na^+ -dépendante avec une stoechiométrie de liaison de $2\text{Na}^+ : 1\text{Pz}$ (Restrepo et Kimmich, 1986) et peut être accélérée par un potentiel membranaire négatif du côté interne des VMBB (Toggenburger et al., 1978; Restrepo et Kimmich, 1986). En utilisant le 6-deoxy-D-glucose et le D-xylose comme substrats, Alvarado (1967) a démontré la présence de deux classes de sites d'inhibition du transport de Glc par la Pz et par la Pt. Selon l'auteur, les deux sites d'inhibition sont voisins et le transport de Glc par l'un d'eux est inhibé de façon compétitive avec une grande affinité pour la Pz. L'autre site peut accepter l'aglycone de la Pz soit la Pt elle-même et ainsi inhiber le transport de façon allostérique (Fig.6).

Les expériences ayant pour but de calculer le "turnover" du transporteur en comparant le nombre de sites de liaison avec les V_{\max} de transport du Glc donnent une valeur de 5 à 125 sec^{-1} (rev. Kimmich, 1990). Selon Kimmich, cette vitesse peu élevée caractérise les étapes limitantes dues aux changements conformationnels dans un système macromoléculaire plutôt que la diffusion dans un canal.

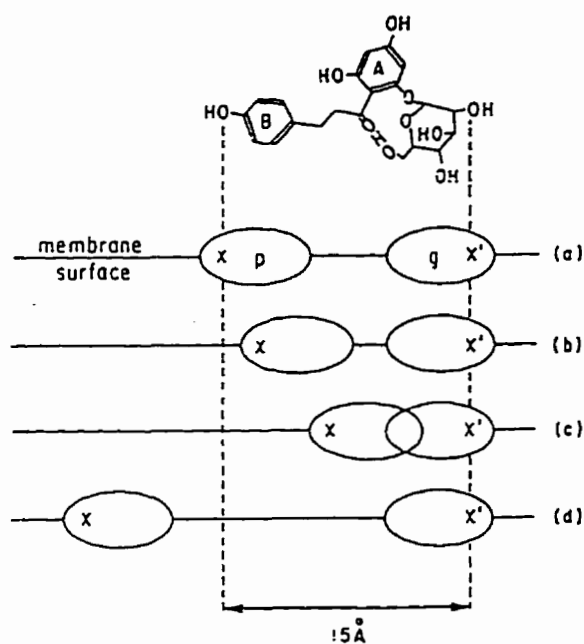


Figure 6. Modèle de la liaison en deux points d'attachement pour la phlorizine. (p)-site phloretine, (g)-site glucose. Le Glc peut se lier en position C-6 avec la participation des groupements OH en position C-3 et C-4. Phloretine peut se lier par l'anneau phénolique B et probablement A. La Pz s'oriente de façon à exposer tous les groupements OH pour une interaction avec le transporteur. La liaison est optimale si les sites de liaison X(p) et X'(g) sont séparés par une distance de 15 Å (a) (tiré de Alvarado, 1967)

II.5. Concept actuel du cotransport Na⁺-D-glucose rénal

Si, dans l'intestin, l'ensemble des résultats les plus récents semble confirmer la présence d'une classe de sites de transport Na⁺-dépendant, en accord avec les études de l'expression de SGLT1 dans l'ovocyte, la situation est beaucoup plus complexe dans le rein.

Turner et Silverman, en étudiant le cotransport Na⁺-D-glucose dans les VMBB préparées à partir du cortex entier de rein humain (1977) et de chien (1978), ont mis en évidence des cinétiques de transport plus complexes que celles du type Michaelis-Menten. Ils ont alors suggéré que l'hétérogénéité du cotransport rénal serait due à la présence de plus d'un transporteur Na⁺-dépendant le long du TCP. Plus tard, Barfuss et Shafer (1981), utilisant la méthode de microperfusion *in vitro*, ont également démontré chez le lapin une hétérogénéité de la réabsorption du Glc le long du tubule proximal. Cependant, puisqu'ils ont mesuré le flux transépithélial de Glc, l'hétérogénéité observée pouvait être le résultat de différences dans le métabolisme cellulaire ou dans la perméabilité des membranes baso-latérales entre les différents segments du tubule. Pour cette raison, Turner et Moran (1982a,b,c) ont isolé les MBB des différentes régions du cortex rénal de lapin afin de comparer les propriétés du cotransport Na⁺-D-glucose au niveau apical le long du TCP. Ils se sont basés sur l'organisation structurale du néphron (Kaissling et Kriz, 1979) selon laquelle le cortex externe contient majoritairement le segment contourné du TCP tandis que le cortex adjacent à la médulla (médulla externe) contient majoritairement le segment droit du TCP (Fig.7). Dans ces conditions, les VMBB isolées de ces deux régions proviennent respectivement des cellules du type S₁ et S₃. Ces deux populations de VMBB démontrent des propriétés de cotransport très différentes et contiennent chacune une seule classe de sites de transport. Dans le cortex externe, le système de transport présente une faible affinité pour le Glc mais une grande capacité de transport (LAG - low affinity glucose). Au contraire, dans la médulla externe, le système de transport est de type haute affinité - faible capacité (HAG - high affinity glucose).

Dans la même série de publications, Turner et Moran décrivent des études avec la phlorizine (Pz), un inhibiteur spécifique du cotransporteur Na⁺-D-glucose de l'intestin et du rein (Alvarado, 1967; Diedrich, 1963; 1966) qui n'est pas transporté par cette protéine (Stirling, 1967). Ils démontrent que les deux systèmes de transport ont une sensibilité différente pour la Pz, le système du cortex externe étant plus sensible à l'inhibiteur que le système médullaire. Par

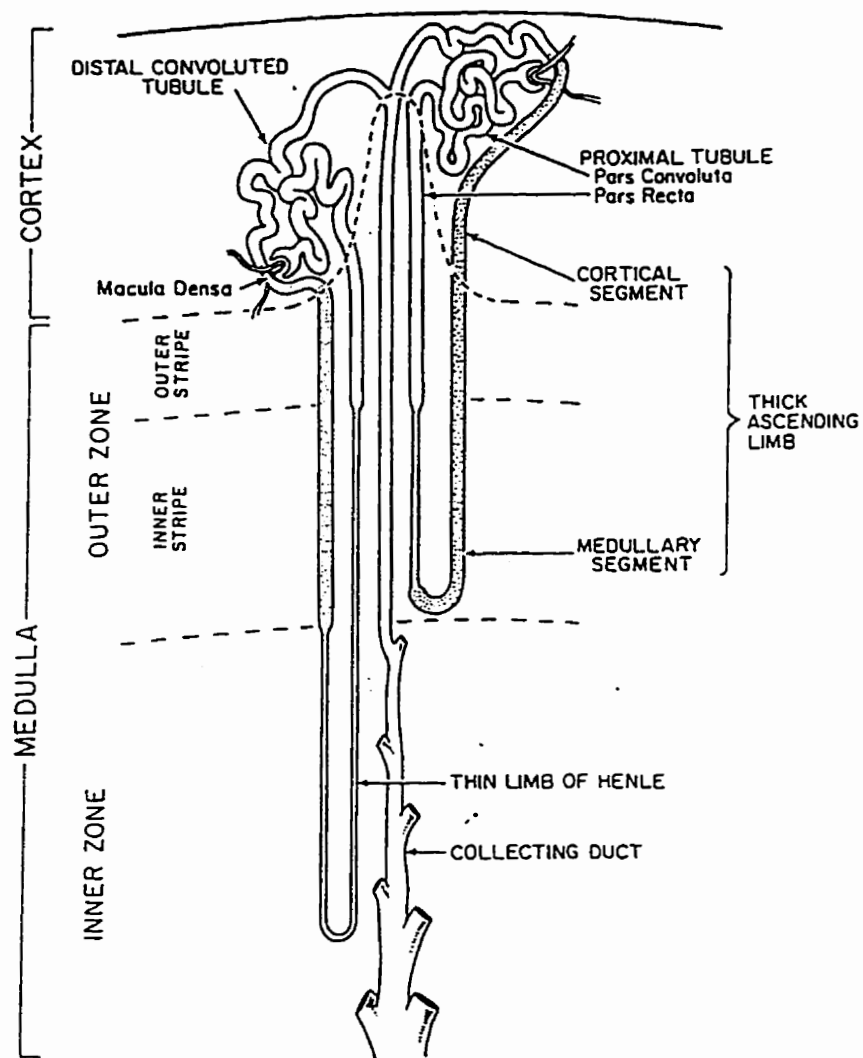


Figure 7. Schéma de répartition des néphrons entre les différentes zones du rein (tiré de Tisher et Madsen, 1986)

contre, le Gal, un substrat qui dans l'intestin emprunte la même voie que le Glc, est mieux accepté par le système médullaire que cortical. Toutefois, Roigaard-Petersen et al. (1986) ont démontré que le Gal est bien transporté par les deux systèmes de transport dans les VMBB rénales de lapin. Un autre paramètre cinétique important comme la stoechiométrie du cotransport apparaît également différente pour les deux systèmes de transport: le système cortical LAG présente une stoechiométrie de $1\text{Na}^+ : 1\text{Glc}$ tandis que le système médullaire HAG fonctionne avec une stoechiométrie de $2\text{Na}^+ : 1\text{Glc}$.

L'ensemble de ces résultats a conduit Turner et Moran à proposer l'hypothèse de la présence d'un minimum de deux transporteurs distincts disposés en série le long du TCP. Ils ont suggéré en outre que leurs propriétés fonctionnelles différentes permettraient d'assurer une réabsorption massive de Glc via LAG dans la première portion du tubule puis de réabsorber le Glc restant dans la partie distale du tubule via HAG. Cette hypothèse est donc conforme aux observations cliniques du syndrome de *malabsorption intestinale du glucose et du galactose* où le transport intestinal de Glc est déficient alors que la réabsorption rénale n'est affectée que du tiers seulement.

II.6. Transport du Glc et de ses analogues dans le rein

II.6.a) études sur vésicules

Malgré une contribution importante des travaux de Turner et Moran (1982a,b,c) à la compréhension du mécanisme de réabsorption du Glc, le choix des conditions expérimentales particulières (échange à l'équilibre ou gamme restreinte de concentrations de Glc qui est différente pour chaque population de vésicules utilisées) peut conduire à une interprétation erronée des résultats expérimentaux. Toutefois, ces travaux ont ouvert la voie à une nouvelle étape dans l'étude de l'origine de l'hétérogénéité du cotransport rénal. Ainsi, les deux populations de VMBB issues des différentes régions du cortex rénal ont été étudiées chez le rat (Blank et al., 1989), le porc (Koepsell et al., 1990), le chien (Silverman et al., 1993) et le lapin (Pajor et al., 1992). Sauf chez le chien, une gamme de concentrations de Glc plus étendue et des conditions expérimentales mieux contrôlées (osmolarité, potentiel membranaire) ont permis de montrer la

présence de deux systèmes de transport dans les VMBB issues de deux régions différentes du cortex rénal. Quant aux études chez le chien (Silverman et al., 1993), la gamme de concentrations de Glc utilisée pour chacune des populations de VMBB a été sensiblement la même que dans les études de Turner et Moran (1982a), ce qui pourrait expliquer les résultats similaires de ces deux séries de travaux.

Il est remarquable, lorsqu'on compare les paramètres cinétiques estimés dans le rein de lapin pour les deux systèmes de transport, qu'aucun de ces systèmes ne puisse s'identifier au système SGLT1 intestinal. Puisque l'hétérogénéité du cotransport a été démontrée dans toutes les régions du cortex rénal (Blank et al., 1989; Koepsell et al., 1990; Silverman et al., 1993; Pajor et al., 1992), une autre hypothèse a été proposée, à savoir celle de deux modes de transport par une protéine unique (Blank et al., 1989). Turner et Moran ont suggéré, sans jamais le vérifier cependant, que l'hétérogénéité du cotransport pourrait être générée par des environnements lipidiques différents entre les segments S_1 , S_2 et S_3 (Turner et Moran, 1982a). Des études plus récentes (Horio et al., 1986; Moriyama et al., 1989; Levi et Cronin, 1990) indiquent, effectivement, des différences dans la composition lipidique et dans la fluidité membranaire de ces segments. D'autre part, il a été démontré que des modifications de la fluidité membranaire affectent le transport du Glc en modifiant son K_m (Imai et al., 1992) chez le rat ou son V_{max} chez le rat (Carrière et Le Grimellec, 1986; Molitoris et Linn, 1987) et le lapin (Horio et al., 1986; Moriyama et al., 1989). Dans le rein de lapin, le système cortical de cotransport Na^+/Glc est plus sensible aux changements de fluidité membranaire que le système médullaire (Horio et al., 1986). Selon ces auteurs, la différence observée dans les réponses des deux systèmes serait due à des degrés variables de fluidité membranaire (Moriyama et al., 1989). Cependant, l'observation de K_m similaires pour SGLT1 dans les VMBB intestinales, dans les ovocytes, et dans les cellules LLC-PK₁ suggère que la fluidité membranaire ne saurait représenter un facteur déterminant de la modulation des activités de transport.

II.6.b) études sur cultures cellulaires d'origine rénale

Pour comprendre l'origine de l'hétérogénéité du cotransport rénal de Glc, des études ont été également réalisées en utilisant des cultures primaires de TCP et des lignées cellulaires dérivées du TCP, les LLC-PK₁. Dans cette lignée cellulaire, la présence d'un seul système de

transport a été décrite tout d'abord par Rabito et Ausiello (1980) qui rapportent un K_m^{Glc} similaire à celui du SGLT1 intestinal humain (0.8 mM). Il est intéressant de noter qu'un K_m identique (Sakhrani et al., 1984) a été également observé dans les cultures primaires de TCP chez le lapin. Les études cinétiques sur cellules intactes (Bennett et Kimmich, 1992; Sakhrani et al., 1984; Misfeldt et Sanders, 1982) ou sur vésicules préparées à partir des cellules LLC-PK₁ (Moran et al., 1982; Lever, 1982) montrent une stoechiométrie de transport de $2Na^+ : 1Glc$. Le système de transport qui s'exprime dans les cellules LLC-PK₁ est donc de type HAG avec des paramètres cinétiques similaires au système SGLT1 intestinal.

Le phénotype des cellules LLC-PK₁ ressemble à celui des cellules du segment S₃ (Thorens et al., 1990), ce qui est en accord avec l'hypothèse de Turner et Moran (1982c). Cependant, les cultures primaires de TCP expriment également un système unique de cotransport avec des caractéristiques cinétiques similaires à celles qui ont été observées dans les cellules LLC-PK₁ (Sakhrani et al., 1984). Pourtant, ces populations cellulaires sont fort différentes.

Les cellules originant des cultures primaires présentent une sensibilité aux hormones comme T₃ (triiodothyronine) et PTH (parathormone) ce qui est à l'opposé de la réponse hormonale observée dans les cellules LLC-PK₁ (Chung et al., 1982; Bell et al., 1988). De plus, dans les cultures primaires, la Pz identifie la présence membranaire du cotransporteur de Glc bien avant que la confluence cellulaire soit atteinte (Sakhrani et al., 1984) alors que dans les cellules LLC-PK₁, l'apparition de l'activité du cotransporteur est concomitante à la différenciation cellulaire (Wu et Lever, 1989; Amsler et Cook, 1982). Plus tard, en utilisant un clone dérivé des cellules LLC-PK₁ qui exprime les marqueurs du segment S₁ du TCP (Yoneyama et Lever, 1988), Yet et al. (1994) montrent également la présence d'un SGLT1 fonctionnel. Donc, malgré les différences multiples entre les cultures cellulaires originant du TCP, un système unique de cotransport présente les caractéristiques du transporteur intestinal. Il faut rappeler à ce propos que pSGLT2 a été cloné à partir de l'ADNc des cellules LLC-PK₁.

Comme pour le transporteur intestinal, la glycosylation n'est pas indispensable au maintien du transport dans les cellules LLC-PK₁. Par contre, les VMBB des cellules LLC-PK₁ n'ont plus aucune activité de transport après un traitement préalable des cellules à la tunicamycine. Puisque la Pz continue de reconnaître la présence membranaire du transporteur (Wu et Lever, 1994), cette observation suggère que la glycosylation pourrait induire ou stabiliser une conformation

moléculaire appropriée pour le transport. D'autre part, le système de transport des cellules LLC-PK₁, en dépit de ses similitudes avec le système SGLT1 intestinal, démontre une très faible affinité pour le Gal (Ohta et al., 1990; Rabito et Ausiello, 1980). On peut donc constater que les cultures cellulaires ne sont pas un modèle expérimental approprié pour répondre à la question concernant l'origine de l'hétérogénéité du cotransport Na⁺-D-glucose observée dans les tubules ou les VMBB rénales.

II.7. Liaison de phlorizine dans le rein

II.7.a) caractéristiques cinétiques de la liaison

Tout comme dans l'intestin, la Pz est reconnue comme un inhibiteur compétitif et réversible de la réabsorption du Glc dans le rein (Silverman, 1974) alors que la perfusion de Pt est apparue sans effet sur l'élimination urinaire de ³H-phlorizine (Minami et al., 1993). Le fait que la phlorizine-hydrolase soit absente des VMBB rénales de lapin (Chesney et al., 1974; Berger et Sacktor, 1970) et de rat (Glossmann et Neville, 1972; Bode et al., 1972) a permis d'étudier les cinétiques de liaison de la Pz sur le récepteur Na⁺-dépendant du Glc. Ces études chez le lapin et le rat démontrent la présence de deux classes de sites de liaison spécifiques à la Pz dans les MBB du cortex rénal (Chesney et al., 1974; Glossmann et Neville, 1972). Des résultats similaires ont été obtenus chez le porc (Koepsell et al., 1990). En général, selon ces études, le site à haute affinité (HAP - high affinity Pz) ($K_d = 0.2 - 8 \mu\text{M}$) est Na⁺-dépendant et inhibé de façon compétitive par le Glc et ses analogues. Le site à faible affinité (LAP - low affinity Pz) ($K_d > 100 \mu\text{M}$) est au contraire Na⁺-indépendant et n'est pas spécifique au Glc. Chez le chien, une seule classe de sites à haute affinité a été décrite (Silvermann et Black, 1975), ce qui est probablement lié à l'utilisation d'une gamme restreinte de concentrations de Pz dans ces expériences.

II.7.b) site à haute affinité pour la Pz (HAP)

Aronson (1978) a démontré sur VMBB rénales de lapin que la liaison de Pz sur le site HAP dépend du potentiel membranaire. Ceci est en accord avec les observations de la dépendance en potentiel de la liaison du Na⁺ et de l'électrogénéité du cotransport rénal de Glc

(Beck et Sacktor, 1975). Cependant, la dissociation de la Pz n'est pas dépendante du potentiel membranaire (Aronson, 1978). Ces observations ont été confirmées par Restrepo et Kimmich (1986) sur des entérocytes isolés. Selon Aronson, la dépendance en Na^+ de la liaison de Pz suit une stoechiométrie de 1 : 1. Une stoechiométrie identique a également été démontrée dans les VMBB du cortex externe chez le lapin (Turner et Moran, 1982b) et le chien (Turner et Silverman, 1981), alors qu'une stoechiométrie de $2\text{Na}^+ : 1\text{Pz}$ a été suggérée pour les entérocytes isolés (Restrepo et Kimmich, 1986). Dans les cellules LLC-PK₁, les mesures de flux transépithéliaux montrent une stoechiométrie de $1\text{Na}^+ : 1\text{Pz}$ (Misfeldt et Sanders, 1982) ou de $2\text{Na}^+ : 1\text{Pz}$ (Bennett et Kimmich, 1992). Dans les VMBB préparées à partir des cellules LLC-PK₁, des stoechiométries de $1\text{Na}^+ : 1\text{Pz}$ (Lever, 1984) ou de $2\text{Na}^+ : 1\text{Pz}$ (Moran et al., 1988) ont été observées.

Ces différences de stoechiométries pourraient être dues à des conditions expérimentales inappropriées (gamme de concentrations en substrat insuffisamment étendue, difficultés de contrôle du potentiel membranaire et des concentrations intracellulaires de Na^+ dans les cellules intactes) ou pourraient refléter les propriétés des différents modèles expérimentaux.

II.7.c) site à faible affinité pour la Pz (LAP)

La plupart des auteurs considèrent que le site à faible affinité (LAP) n'appartient pas au transporteur puisqu'il n'est ni Na^+ -dépendant ni Glc sensible. Cependant, en étudiant la liaison de Pz dans les VMBB du cortex et de la médulla externes chez le porc, Koepsell et al. (1990) ont démontré l'existence de deux classes de sites de liaison de Pz (HAP et LAP) qui sont présents dans un rapport fixe de 1 : 1 dans chacune des deux populations de VMBB. De plus, ils ont montré qu'un potentiel membranaire négatif à l'intérieur des VMBB affecte non seulement le site Na^+ -dépendant mais également le site insensible au Glc.

Cette observation a conduit les auteurs à proposer l'hypothèse de l'appartenance des deux sites à un cotransporteur Na^+ -D-glucose unique. Les études de la liaison covalente d'un analogue de la cyclosporine sur le cotransporteur rénal (Ziegler et al., 1990) appuient cette hypothèse puisque les deux sites de liaison de Pz sont affectés, quoique de manière différente, par la liaison de cet analogue. La liaison de Pz sur le site HAP inhibe la liaison de cyclosporine de façon compétitive. Par contre, la liaison de Pz sur le site LAP stimule la liaison de cyclosporine de

façon allostérique et cet effet est plus prononcé en absence qu'en présence de Na^+ . Cette hypothèse est donc différente de celle proposée par Alvarado (1967) pour l'intestin.

II.7.d) études d'inhibition du transport par la Pz

Dans le débat sur l'origine de l'hétérogénéité du transport rénal de Glc, les études d'inhibition du transport par la Pz dans les VMBB du cortex et de la médulla externes montrent un K_i unique et identique dans les deux populations de vésicules chez le chien (Silverman et Speight, 1993). L'inhibition de la liaison de Pz par le Glc ou le Gal chez le lapin (Turner et Moran 1982c) montre également un K_i unique et identique dans les deux populations de vésicules, quoique ces K_i soient différents pour le Glc et le Gal. Cependant, lorsque les mêmes auteurs ont mesuré l'inhibition par la Pz de l'échange de Glc à l'équilibre, le K_i estimé dans les VMBB du cortex externe était 50 fois plus petit que celui de la médulla externe. Ceci a conduit Turner et Moran à proposer l'hypothèse que le système de transport LAG correspond au site de liaison HAP et que, selon cette caractéristique, il correspondrait donc au transporteur intestinal. Cette hypothèse, comme on peut le constater, est en désaccord complet avec les paramètres cinétiques estimés pour les trois protéines clonées (Tableau III).

D'autre part, en perfusant le TCP de lapin, Brazy et Dennis (1978) ont trouvé que le transport apical de Glc est inhibé à la fois de façons compétitive et non-compétitive par la Pz. Ils ont proposé que l'inhibiteur aurait plus d'un type d'interaction avec le transporteur. Cette observation serait compatible avec la présence de deux classes de sites de liaison de Pz tel que proposé dans le modèle de Koepsell (1990). En comparant les capacités d'inhibition de la Pz et de son dérivé, la 4'-déoxyPz, entre l'intestin de hamster et les reins de chien (Diedrich, 1963) et de rat (Bode et al. 1972), Bode et al. ont suggéré que la structure du récepteur doit être différente dans l'intestin et dans le rein. Il est remarquable, en dépit d'un transport de Glc hétérogène, que la liaison de Pz ou sa dissociation suivent une cinétique du type Michaelis-Menten (Glossmann et Neville, 1972; Chesney et al., 1974). De plus, malgré une inhibition instantanée du transport du Glc, la liaison de Pz n'atteint l'équilibre qu'au bout de 5 min seulement.

III. HÉTÉROGÉNÉITÉ CINÉTIQUE VERSUS HÉTÉROGÉNÉITÉ MOLÉCULAIRE

III.1. Modélisation cinétique pour une protéine monomérique

III.1.a) études sur vésicules

En 1980, Dorando et Crane se sont basés sur les influences réciproques du Na^+ et du Glc à moduler l'activité du cotransporteur dans les VMBB intestinales pour proposer un modèle de liaison des ligands au hasard, cet ordre d'addition générant l'existence d'une voie HAG (Na^+ suivi par Glc) et d'une voie LAG (Glc suivi par Na^+) (Figure 8). Cependant, Hopfer et Groseclose (1980), en observant dans les conditions d'échange à l'équilibre ($\text{Na}^+_{\text{in}} = \text{Na}^+_{\text{out}}$ et $\text{Glc}_{\text{in}} = \text{Glc}_{\text{out}}$) une seule voie de transport, ont proposé un modèle de liaison ordonnée dans lequel la liaison externe du Na^+ précède celle du Glc. Bien que l'interprétation des résultats obtenus par cette technique puisse être ambiguë, les auteurs remettent en question l'hypothèse que la réorientation du transporteur chargé est l'étape limitante du transport. Enfin, Turner et Silverman (1981) ont proposé que la liaison de Pz sur le récepteur des MBB du rein de chien s'effectue au hasard avec une stoechiométrie de $1\text{Na}^+ : 1\text{Pz}$.

Comme on peut le constater, tous ces modèles correspondent à un seul système de transport avec stoechiométrie de $1\text{Na}^+ : 1\text{Glc(Pz)}$ et ne s'appliquent pas aux travaux démontrant une stoechiométrie de $2\text{Na}^+ : 1\text{Glc(Pz)}$.

III.1.b) études sur les lignées cellulaires établies

Un modèle où les liaisons de Pz et de Na^+ se font au hasard a également été proposé pour les cellules LLC-PK₁ dans lesquelles un seul système de transport s'exprime avec une stoechiométrie de $2\text{Na}^+ : 1\text{Pz}$ (Moran et al., 1988). Dans les cellules LLC-PK₁ intactes, Misfeldt et Sanders (1982) ont proposé un mécanisme de transport en deux étapes avec une stoechiométrie de $2\text{Na}^+ : 1\text{Glc}$. Selon ces auteurs, le premier ion Na^+ et la molécule de Glc se lient sur le transporteur et c'est la liaison du second ion Na^+ qui induit la translocation du substrat.

Bennett et Kimmich (1992), lors d'études électrophysiologiques dans les cellules LLC-PK₁, ont trouvé une stoechiométrie de $2\text{Na}^+ : 1\text{Pz}$ et ont proposé, en accord avec leurs études précédentes (Kimmich, 1990), un modèle à huit états où l'ordre de liaison est $1\text{Na}^+, 1\text{Glc}, 1\text{Na}^+$.

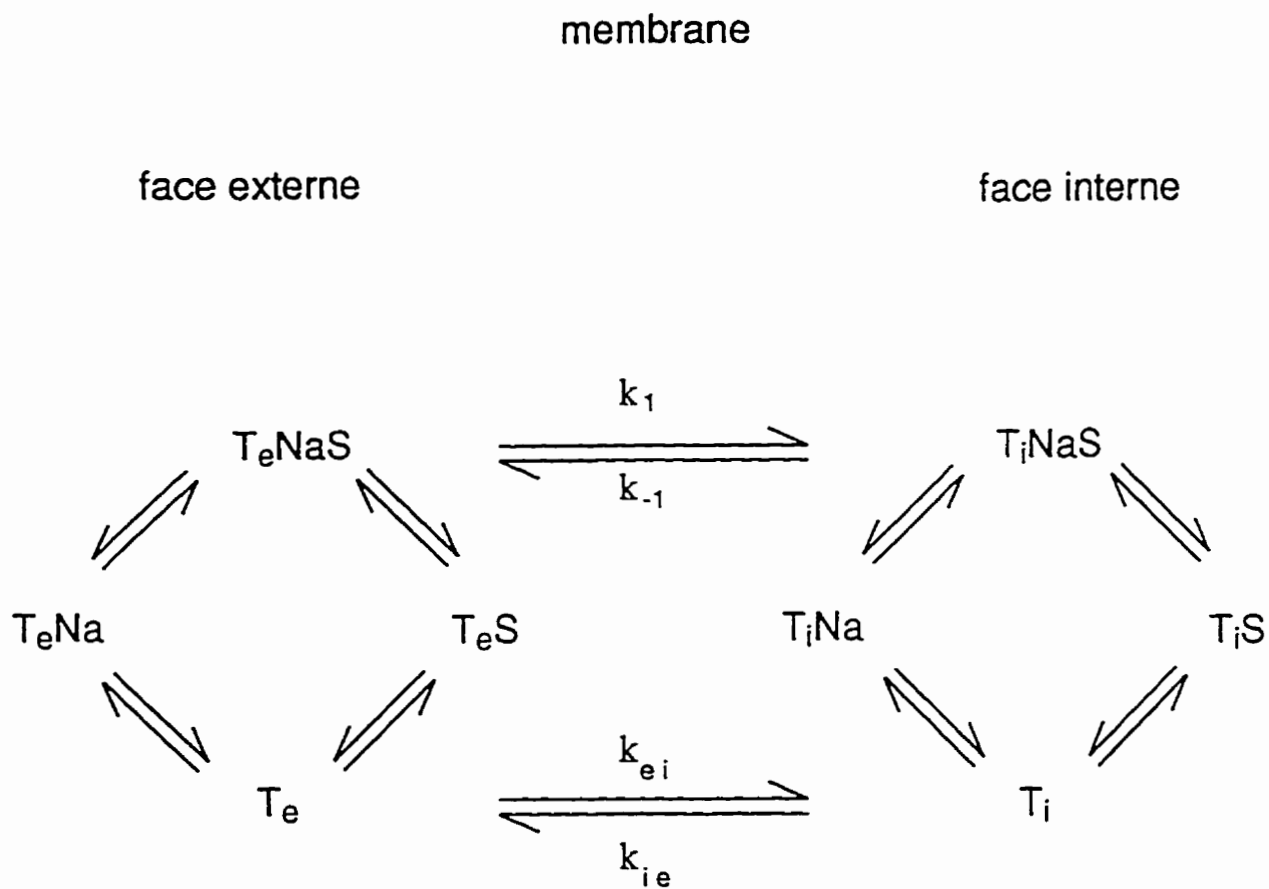


Figure 8. Modèle de fixation au hasard des substrats

La voie $T_e-T_eNa-T_eNaS$ représente le site à haute affinité et faible capacité et la voie $T_e-T_eS-T_eSNa$ rend compte du site à faible affinité et grande capacité (T: transporteur; Na: ion sodium; S: glucose. Les indices e et i réfèrent aux configuration respectivement externes et internes du transporteur (d'après Dorando et Crane, 1980)

Ce modèle prévoit que i) la liaison du premier Na^+ sur la face membranaire externe, ii) la dissociation du second Na^+ du côté interne et iii) la réorientation du transporteur libre dépendent toutes du potentiel membranaire (Figure 9). Selon ces auteurs, ce modèle serait compatible avec les résultats d'Aronson (1978) suggérant que la liaison de Pz pourrait être interprétée selon l'ordre de liaison 1 Na^+ , 1 Pz, 1 Na^+ . Étant donné que la liaison du second Na^+ ne dépend pas du potentiel, elle ne pouvait pas être détectée dans les conditions expérimentales choisies par Aronson, d'où la stoechiométrie de 1 Na^+ : 1Pz proposée par cet auteur.

III.1.c) études sur ovocytes

Finalement, les études électrophysiologiques avec le SGLT1 cloné ont conduit à proposer un modèle simple à six états dans lequel la liaison simultanée de deux ions Na^+ est suivie par celle d'une molécule de Glc (Parent et al., 1992b; 1993) (Fig.10). Selon ce modèle, la liaison des deux ions Na^+ n'est pas en équilibre rapide et dépend du potentiel membranaire, ce qui est différent du modèle de Bennett et Kimmich. L'asymétrie fonctionnelle est due à la dissociation rapide de Na^+ interne et au retour également rapide du transporteur libre à la surface externe. Dans ce modèle l'étape limitante peut varier en fonction des conditions expérimentales: ce serait la translocation du transporteur libre à des concentrations saturantes de Na^+ et de Glc externes et la dissociation interne du Na^+ dans des conditions de potentiel membranaire négatif. Le site de liaison du Na^+ est localisé dans un segment moléculaire enfoui dans la membrane et, par conséquent, la réorientation du transporteur libre est également dépendante du potentiel.

À l'opposé de la modélisation du mécanisme de liaison de Pz qui apparaît beaucoup plus simple du fait de son homogénéité dans le rein, la modélisation de l'hétérogénéité du cotransport intestinal et rénal de Glc reste un domaine quasiment inexploré. Crane (1985) a suggéré plusieurs hypothèses sur l'origine de cette hétérogénéité: les deux phénomènes cinétiques représentent i) deux voies de transport par le même transporteur, ii) deux transporteurs indépendants ou iii) un artefact induit par des conditions expérimentales inadéquates. Puisque, selon l'auteur, aucune des trois hypothèses n'était plausible, il a suggéré qu'il pourrait s'agir de différents états d'agrégation d'une même molécule.

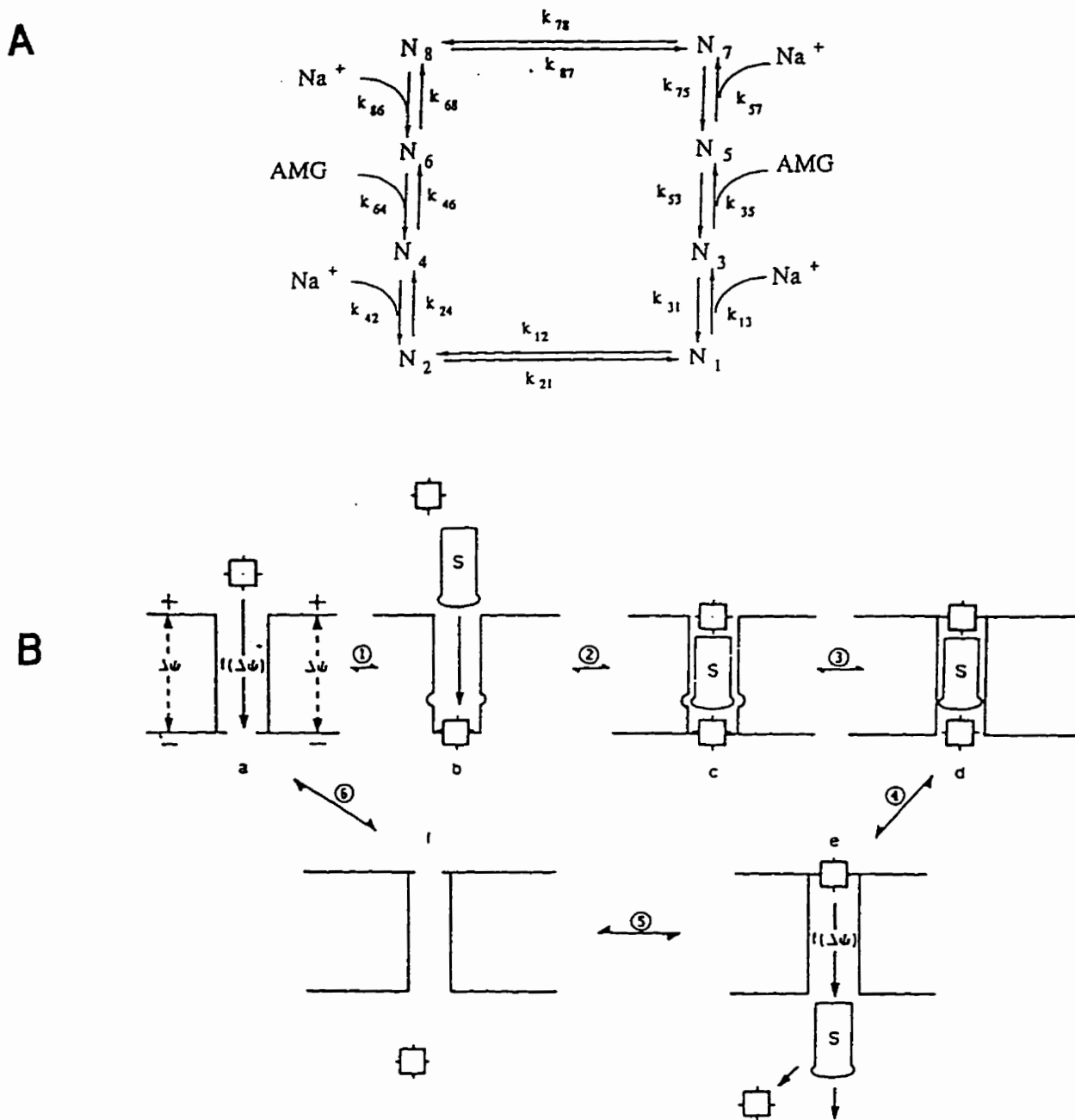


Figure 9. Schéma (B) du modèle de cotransport Na^+ -dépendant à huit états (A)

La stoechiométrie du transport est de $2\text{Na}^+ : 1 \text{Glc}$ avec l'ordre de liaison $1\text{Na}^+(\text{carré}) : 1\text{Glc}(\text{S}) : 1\text{Na}^+(\text{carré})$. Voir les explications dans le texte (tiré de Kimmich, 1990; Bennett et Kimmich, 1996)

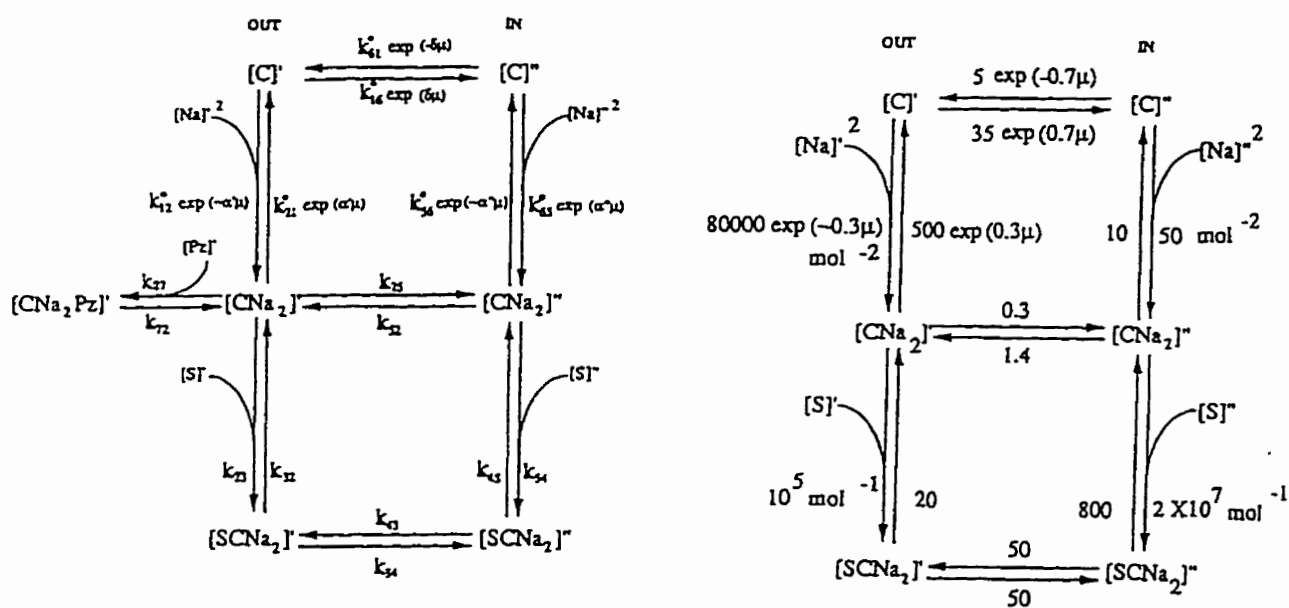


Figure 10. Modèle du cotransport Na⁺-dépendant à six états

La stoechiométrie du transport est de 2Na⁺ : 1Glc avec l'ordre de liaison 2Na⁺ -1Glc. Voir explications dans le texte (tiré de Parent et al., 1992b)

III.2. Arguments en faveur d'une structure oligomérique du transporteur

III.2.a) études d'inactivation aux irradiations

Selon les études d'inactivation aux irradiations, réalisées dans les VMBB intestinales de lapin, la taille du système du transport est de 290 KDa (Béliveau et al., 1988; Stevens et al., 1990). Les auteurs proposent donc que le cotransporteur fonctionne comme un homotétramère *in situ*. Des études identiques dans les VMBB rénales montrent qu'une simple exponentielle suffit à décrire la perte d'activité de la liaison de Pz en fonction de la dose. Ceci a permis d'estimer une taille moléculaire de la protéine fonctionnelle à 230 KDa chez le veau (Lin et al., 1984) ou à 110 KDa chez le lapin (Turner et Kempner, 1982). Une unité fonctionnelle additionnelle, trouvée chez le lapin (4×10^3 KDa), serait responsable de la perte de 50% de la liaison totale de Pz. L'existence de cette unité pourrait s'expliquer, selon Lin et al. (1984), par la formation d'agrégats de récepteurs de Pz dans les MBB de cette espèce.

Des études similaires ont été réalisées sur l'activité de transport du Glc dans les VMBB rénales de lapin (Takahashi et al., 1985) et de veau (Lin et al., 1984) afin de déterminer la taille du transporteur. Dans ces études, la perte d'activité du transport de Glc en fonction de la dose suit également une fonction monoexponentielle correspondant à des tailles fonctionnelles de 344-345 KDa chez les deux espèces. Puisque la taille du transporteur est plus élevée que celle du récepteur de Pz, il a été suggéré que le système de transport Na^+ -D-glucose pourrait: i) soit représenter une protéine oligomérique dont toutes les composantes ne sont pas indispensables à la liaison de Pz (rev. Koepsell et Spangenberg, 1994), ii) soit requérir la présence d'une protéine additionnelle pour effectuer la translocation du Glc (Lin et al., 1984). Plus tard, une structure oligomérique du transporteur rénal a été également proposée par Gérardi-Laffin et al. (1993) lors de l'immunodétection de la protéine sensible à la Pz et dissociable en présence de dithiothréitol.

III.2.b) régulation du cotransport Na^+ /D-Glucose

En comparant l'activité du transport renal de glucose avec l'abondance des ARNm, Pajor et al. (1992) ont suggéré la présence d'un deuxième transporteur dans le cortex externe puisque, par analogie avec les cellules LLC-PK₁, l'expression de SGLT1 et l'activité de transport sont corrélées avec les niveaux d'ARNm (Ohta et al., 1990; Shioda et al., 1994). Dans ces conditions,

le faible taux cortical d'ARNm de SGLT1 ne pourrait pas assurer le transport de haute capacité habituellement observé dans les VMBB du cortex externe. Toutefois, il est important de noter que les nombreuses études faites sur tissus intacts *in vivo* démontrent une absence de corrélation entre l'activité du cotransport de Glc et l'abondance des ARNm (Lescale-Matys et al., 1993; Miyamoto et al., 1991; Smith, Turvey et Freeman, 1992). De plus, il a déjà été démontré que l'ARNm-SGLT1 et la liaison de Pz augmentent rapidement au niveau des jonctions crypte-villosité alors que l'activité de transport ne se manifeste qu'à mi-hauteur pour atteindre son maximum au sommet de la villosité intestinale (Ferraris et al., 1992; Freeman et al., 1992; Smith, Turvey et Freeman, 1992).

Cette information invite, d'une part, à la prudence lors de la comparaison des résultats obtenus avec différents modèles expérimentaux et suggère, d'autre part, la présence d'une régulation du cotransport Na⁺-D-glucose. Effectivement, le groupe de Koepsell a récemment cloné une protéine associée à la membrane et nommée RS1 qui est susceptible de modifier l'activité et les propriétés cinétiques de SGLT1 lorsque les deux molécules sont coexprimées dans les ovocytes (Veyhl et al., 1993). Curieusement, cette modulation d'activité fait apparaître une hétérogénéité cinétique du cotransport où aucun des deux K_m mesurés ne correspond à celui de SGLT1 exprimé seul. Toutefois, les valeurs de K_m ressemblent à celles mesurées dans le rein par les études cinétiques sur VMBB. Puisque la masse moléculaire de RS1 (66 832 Da) est équivalente à celle de SGLT1, ces auteurs suggèrent que le système de cotransport Na⁺-D-glucose représenterait un hétéro-oligomère composé de polypeptides de types SGLT1 et RS1 et que d'autres transporteurs Na⁺-dépendants de la famille SGLT pourraient également s'associer avec la sous-unité RS1 (Veyhl et al., 1993). Il faut noter que des ARNm homologues à RS1 ont été détectés dans le cortex et la médulla externes du rein, l'intestin grêle, le foie et les cellules LLC-PK₁.

III.3. Modélisation cinétique pour une protéine oligomérique

III.3.a) hétérogénéité du cotransport rénal

En ce qui concerne le cotransport rénal, à notre connaissance, seul le groupe de Koepsell (1990) a proposé un modèle qui tient compte de l'hétérogénéité du transport par l'analyse des

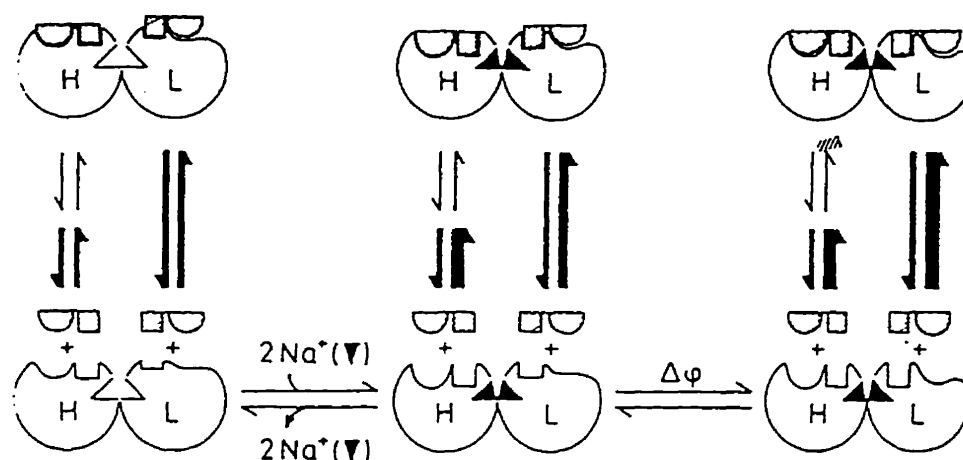


Figure 11. Modèle dimérique du cotransporteur Na^+ -D-glucose dans le cortex et la médulla externes du rein.

L'une des sous-unités est de haute (H) et l'autre de faible (L) affinité pour la Pz ($\square\cup$). Chaque sous-unité contient 1 site pour la Pz (composé du site glucose (\square) et du site phloretine (\cup)) et 1 site pour le Na^+ (\blacktriangledown). De ce fait, la Pz peut se lier en présence ou en absence de Na^+ par sa moitié glucose ou phloretine, respectivement. L'augmentation de l'affinité des deux sites de Pz lors de la liaison du Na^+ et de l'imposition d'un potentiel membranaire négatif est représentée par l'épaisseur des flèches qui rend compte des vitesses d'association et de dissociation de la Pz (tiré de Koepsell et al., 1990)

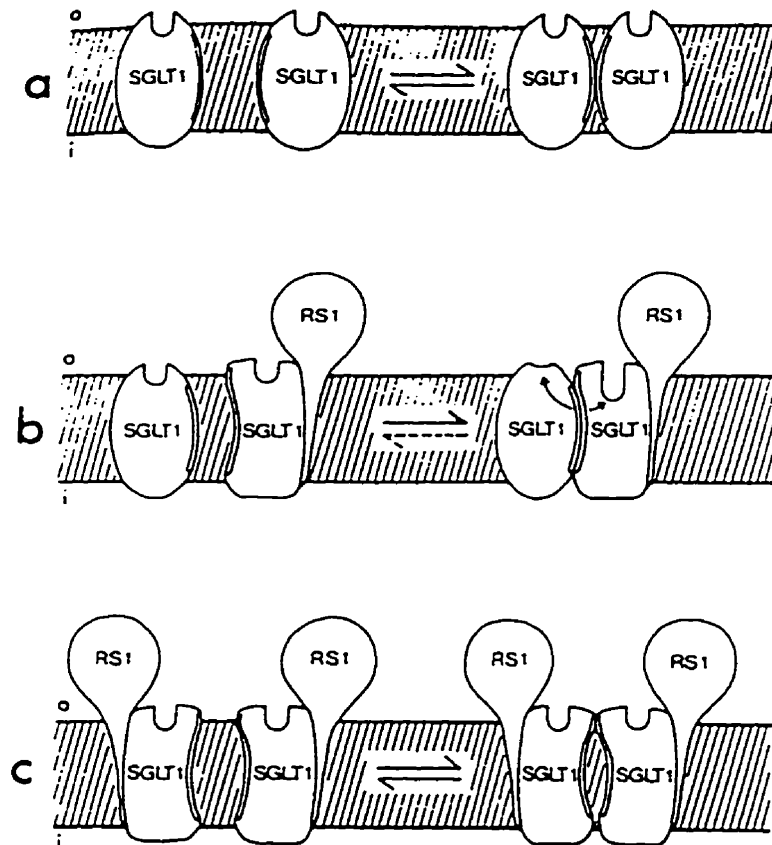


Figure 12. Modèle des interactions entre SGLT1 et RS1 dans les ovocytes de *Xenopus*. Le cotransport Na^+ -D-glucose est exprimé dans les ovocytes après l'injection de: (a) SGLT1-ARNc seul, (b) co-injection stoechiométrique de SGLT1-ARNc et RS1-ARNc, (c) co-injection de SGLT1-ARNc et l'excès de RS1-ARNc. L'interaction entre les molécules SGLT1 est représentée par la double ligne. L'affinité du site de liaison pour le Glc est proportionnelle à sa profondeur (tiré de Koepsell et Spangenberg, 1994)

modèles de liaison de Pz (Fig.11). Selon ces auteurs, le transporteur est un homodimère dont l'une des sous-unités possède le site HAP et l'autre le site LAP. Dans ces études, un modèle de deux sites indépendants avec liaison de Pz en deux étapes décrit le mieux les résultats expérimentaux. Ce modèle a été modifié par la suite en assumant la participation de sous-unité RS1 (Fig.12) (Koepsell et Spangenberg, 1994).

III.3.b) hétérogénéité du cotransport intestinal

En reprenant l'idée d'un transporteur multimérique, Chenu et Berteloot (1993) ont proposé un modèle allostérique de cotransport où la structure minimale de base serait celle d'un homodimère (Fig.13). Le concept de ce modèle allostérique repose sur une coopérativité négative entre les sous-unités lors de la liaison du Glc et sur une coopérativité positive lors de la liaison du Na⁺. Chaque sous-unité posséderait deux sites de liaison, soit 1 pour le Na⁺ et 1 pour le Glc (Peerce et al., 1985,1986). La liaison des ligands serait ordonnée (Na⁺ suivi par Glc). Dans ce cas, une partie de l'énergie du gradient électrochimique de Na⁺ pourrait être transférée au transporteur sous forme d'énergie conformationnelle.

La liaison du Glc sur l'une des sous-unités induirait un changement conformationnel qui diminuerait l'affinité de liaison d'une autre molécule de Glc sur le second site. C'est la liaison de cette seconde molécule de Glc qui serait responsable de l'apparition de la voie à faible affinité. En fonction de la concentration de Glc, une ou deux molécules peuvent se fixer et procurer ainsi des stoechiométries différentes de 2Na⁺ : 1Glc ou de 2Na⁺ : 2Glc (ce qui est équivalent à 1Na⁺ : 1Glc) aux concentrations respectivement faibles ou fortes de Glc. Dans les deux cas, deux ions Na⁺ se fixent habituellement grâce à la coopérativité positive. Ce modèle tient donc compte des stoechiométries différentes qui ont été observées antérieurement dans l'intestin et le rein.

Toutefois, les études destinées à vérifier la compatibilité du modèle avec les données expérimentales n'ont montré la présence que d'une seule voie de transport (Chenu et Berteloot, 1993). Pour accommoder ces résultats avec une structure dimérique ou tétramérique du transporteur, les auteurs ont introduit le concept de demi-réactivité de sites. Ainsi, le transporteur serait formé d'une paire de monomères ou de dimères fonctionnant en opposition de phase, ce qui n'affecterait aucune des propriétés cinétiques prédites par le modèle allostérique dans le cas du tétramère (Fig.14).

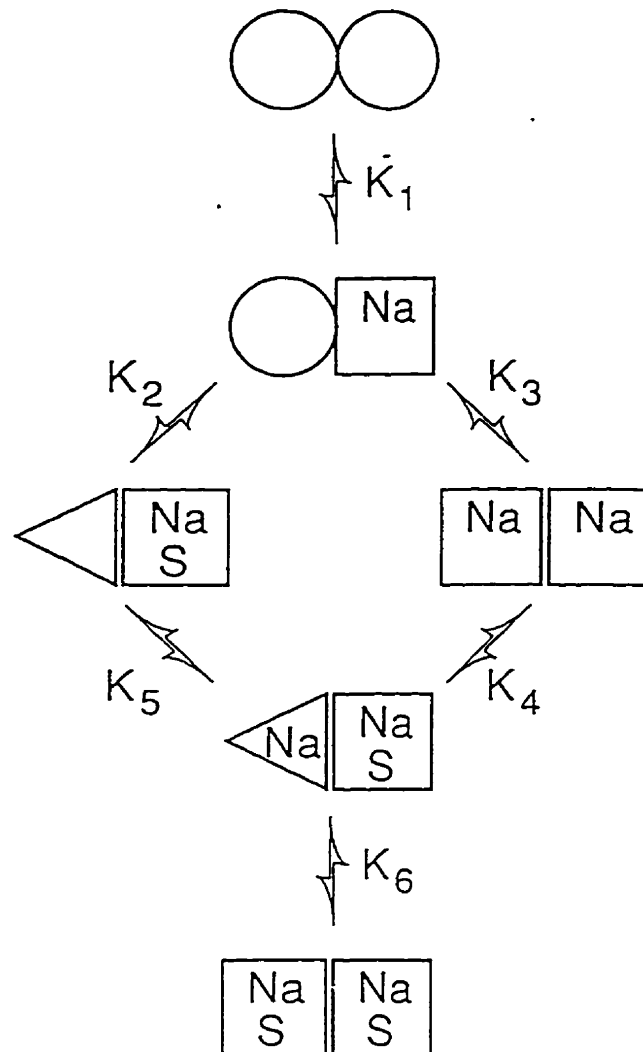


Figure 13. Modèle dimérique de cotransport.

Le dimère libre présente une conformation symétrique (cercles). La liaison des ions Na^+ induit des changements conformationnels (carré) facilitant la liaison du substrat (S). La liaison d'une première molécule de S induirait un changement conformationnel (triangle) provoquant une diminution de l'affinité du second site pour le S. La liaison d'une deuxième molécule de S devient possible lorsque deux ions Na^+ sont liés et restaure ainsi la symétrie initiale (tiré de Chenu et Berteloot, 1993)

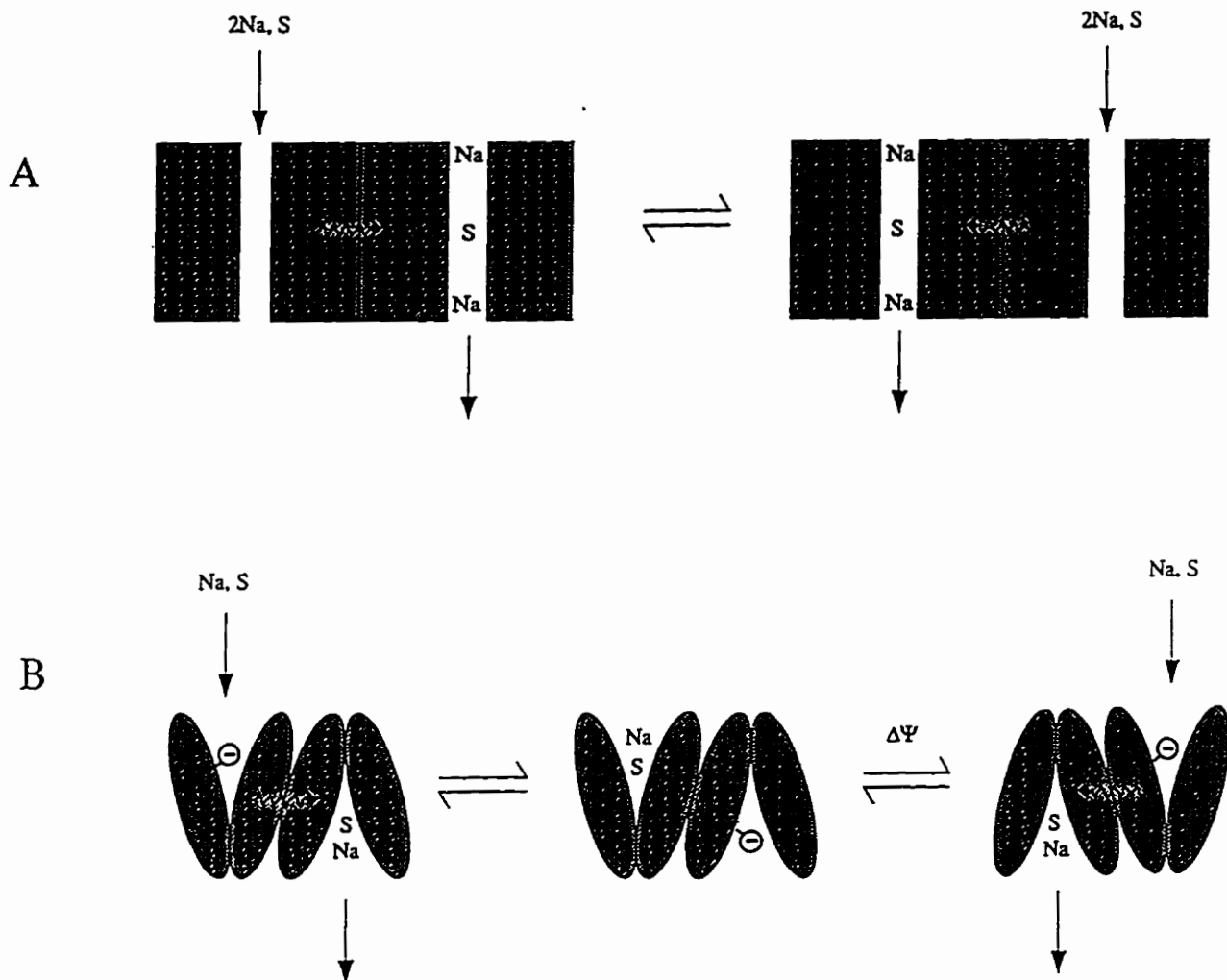


Figure 14. Modèles de cotransport à demi-réactivité de sites.

La structure du cotransporteur correspondrait à celle d'un homodimère ou d'un homotétramère composé de monomères ou de dimères antisymétriques. En **A** inspiré du modèle de Kimmich (1992). En **B** inspiré du modèle de Kessler et Semenza (1983). La charge négative libérée par le départ du Na^+ interne réagit à la présence du potentiel membranaire et permet une réorientation transmembranaire des sites grâce à un changement conformationnel (tiré de Chenu et Berteloot, 1993)

Ce modèle intestinal présente un intérêt indiscutable puisqu'il offre une solution élégante et physiologique aux problèmes d'hétérogénéité et de stoechiométries variables tout en proposant un mécanisme de transfert d'énergie du gradient électrochimique d'un ion à un transporteur. Il est d'autre part possible que ce modèle puisse s'appliquer aux autres systèmes de transport. L'application de ce modèle à l'hétérogénéité du cotransport rénal de Glc reste cependant à vérifier.

IV. CONCLUSIONS ET JUSTIFICATION DE LA RECHERCHE

IV.1. Résumé

En examinant l'ensemble des résultats concernant le cotransport de Glc Na⁺-dépendant dans l'intestin et dans le rein, certaines observations laissent supposer un mécanisme assez particulier et probablement plus complexe que celui de deux transporteurs distincts fonctionnant de façon indépendante. Il serait donc opportun de résumer ici certains des résultats et des observations pour appuyer cette hypothèse et justifier la recherche présentée dans cette thèse.

Premièrement, les études cinétiques ont démontré la présence de deux classes de sites impliqués dans le transport rénal du Glc. Par contre, les études cinétiques de la liaison de Pz ne révèlent l'existence que d'une seule classe de sites Na⁺-dépendants pour cet inhibiteur. Pourtant, les deux modes de transport du Glc sont sensibles à la Pz puisque l'inhibition du transport est complète. On pourrait bien sûr argumenter qu'en dépit d'une spécificité différente des transporteurs HAG et LAG pour le Glc et le Gal, leur affinité pour la Pz est similaire. Cependant, Turner et Moran (1982c) ont rapporté un K_i unique et identique de transport du Glc et du Gal dans les deux populations de vésicules, quoique ces K_i soient différents pour le Glc et le Gal.

Deuxièmement, tel qu'inféré de la stoechiométrie de 2Na⁺ : 1Glc et de l'affinité élevée pour le Glc et le Gal du transporteur médullaire, le mode de transport HAG a été considéré comme celui qui correspond au système SGLT1 intestinal. Pourtant, c'est le système du cortex externe qui a été assimilé à SGLT1 de par sa haute sensibilité à la Pz (Turner et Moran, 1982b). Si on admet que la Pz est un inhibiteur compétitif du transport de Glc qui se lie donc sur le transporteur par sa moitié glucose, on peut alors s'interroger sur les raisons pour lesquelles les

affinités pour le Glc et la Pz seraient si différentes (plus de 100 fois pour le site HAG et plus de 3000 fois pour le site LAG). Il faut en plus noter qu'aucun des K_m estimés pour chacun des deux sites assurant le transport rénal de Glc ne correspond à celui estimé pour le système SGLT1 intestinal. Toutefois, une des molécules clonées dans le rein est presque identique (99% d'homologie) à celle clonée dans l'intestin.

Troisièmement, les études de la localisation de SGLT1 dans le rein remettent en question l'hypothèse de deux transporteurs indépendants disposés en série le long du TCP. En accord avec cette hypothèse, cependant, il a été suggéré que les cellules LLC-PK₁, qui n'expriment que le système SGLT1, seraient représentatives du segment S₃. Néanmoins, les cellules originant de cultures primaires du TCP expriment également le seul système de transport SGLT1. On pourrait argumenter ici qu'il ne s'agit que d'une expression sélective due à la différenciation cellulaire en culture. Cependant, les études d'hybridation de l'ARNm rénal avec l'ADNc-SGLT1 intestinal démontrent la présence de SGLT1 tant dans le cortex que dans la médulla externes chez le lapin. Ces observations suggèrent fortement qu'il pourrait en fait s'agir de différents modes de fonctionnement d'un transporteur unique qui, pour cette raison, serait forcément associé à d'autres structures membranaires.

En faveur de cette hypothèse, on pourrait aussi évoquer les études visant à corréler l'activité de transport, le nombre de sites de liaison de Pz et la quantité d'ARNm-SGLT1 le long de l'axe crypte-villosité intestinal. Dans les cryptes, en effet, l'ARNm-SGLT1 est déjà présent et la Pz reconnaît le transporteur dans la membrane quand il n'y a pas encore d'activité de transport (Smith, Turvey et Freeman, 1992; Freeman et al., 1992). De même, la quantité d'ARNm et le nombre de sites de liaison de Pz ne changent plus à partir de la jonction crypte-villosité alors que l'activité de transport augmente progressivement de la mi-hauteur au sommet de la villosité (Smith, Turvey et Freeman, 1992; Freeman et al., 1992; Ferraris et al., 1992). D'autre part, la réponse adaptative à une diète riche en glucides suggère une régulation post-transcriptionnelle puisque la concentration membranaire de SGLT1 n'est pas corrélée avec la quantité d'ARNm (Lescale-Matys et al., 1993).

Finalement, un argument majeur en faveur d'une structure oligomérique possible du système de cotransport SGLT1 nous est fourni par les travaux du groupe de Koepsell (Veyhl et al., 1993) suite au clonage d'une protéine régulatrice RS1 dont l'injection stoechiométrique avec

SGLT1 dans les ovocytes induit l'expression de deux modes de transport dont aucun des K_m ne ressemble à celui de SGLT1 lorsqu'il est injecté seul. La sous-unité RS1 a un poids moléculaire de 66 832 Da et code pour une protéine de 623 acides aminés qui pourrait donc facilement former un hétérotétramère 2SGLT1 : 2RS1 de poids moléculaire équivalent à celui d'un homotétramère tel que proposé par Stevens et al. (1990).

Les observations précédentes nous ont donc conduit à réévaluer les cinétiques du cotransport Na^+ -D-glucose dans le rein de lapin en vue d'essayer de résoudre laquelle des deux hypothèses, deux transporteurs indépendants ou un transporteur unique de type allostérique, est la plus compatible avec une nouvelle série de résultats expérimentaux.

IV.2. Choix du modèle expérimental

L'ensemble des travaux présentés dans cette thèse a été réalisé sur des VMBB issues des cellules épithéliales de l'intestin et du TCP de rein de lapin. Les nombreux avantages de ce modèle expérimental ont été présentés dans la section (II.2.b.). Toutefois, pour assurer des études cinétiques fiables, l'utilisation des VMBB pour les mesures du transport impose certaines exigences dans le choix des conditions expérimentales.

IV.2.a) Concept de vitesse initiale

Puisque les études cinétiques sont utilisées pour sélectionner des modèles plausibles, il est nécessaire que les conditions expérimentales correspondent à celles assumées lors de la dérivation de ces modèles. En général, l'analyse d'un modèle est basée sur l'**hypothèse de l'état stationnaire** avec (Turner et Moran, 1985) ou sans (Sanders, 1986) **équilibre rapide** pour la liaison des substrats aux interfaces membranaires qui permet de réduire la complexité des équations à dériver. Ces deux prémisses se traduisent sur le plan expérimental par des conditions de vitesse initiale où la vitesse du transport est constante (linéarité des courbes d'accumulation du substrat en fonction du temps). Tel que mentionné précédemment, cette période de linéarité est très courte compte tenu du rapport surface/volume vésiculaire élevé, ce qui entraîne une dissipation rapide des gradients de concentration des substrats.

En général, la vitesse initiale de transport est mesurée en conditions *zéro-trans* (absence de Na^+ et de Glc à l'intérieur des vésicules). La mesure de captation du substrat à différents

temps de prélèvement à partir du même mélange vésicules/milieu d'incubation constitue une approche dynamique. Elle a été introduite de façon systématique par Dorando et Crane (1984) qui, étant limités par le nombre de prélèvements, ont utilisé la régression polynomiale pour déterminer la vitesse initiale. Cette méthode d'analyse des vitesses initiales a été validée par Chenu et Berteloot (1993) en utilisant un appareil à filtration et échantillonnage rapides (AFER) (Berteloot et al., 1991, brevet US #5,330,717). L'automatisation des opérations permet de mesurer la captation sur des séquences temporelles très courtes conduisant à une analyse plus simple par régression linéaire. Les deux méthodes d'analyse ont été systématiquement comparées pour valider leur utilisation dans l'analyse des vitesses initiales du transport (Chenu et Berteloot, 1993).

IV.2.b) technique de filtration rapide

Cette technique, introduite par Hopfer et al. (1973) pour les études sur VMBB, est devenue classique pour mesurer l'accumulation d'un substrat à l'intérieur des VMBB. Le principe de la technique peut se résumer en trois étapes: 1) Les vésicules sont incubées dans un milieu de transport contenant le substrat radioactif pendant un temps t ; 2) la réaction est arrêtée à l'aide d'une solution d'arrêt froide; 3) le mélange est d'abord filtré sur nitrocellulose puis rincé avec la solution d'arrêt. La radioactivité retenue sur le filtre est comptée. Cette quantité représente le substrat accumulé dans les vésicules, lié aux deux surfaces membranaires et, enfin, lié de façon non-spécifique sur le filtre.

L'AFER permet une automatisation complète des trois étapes de la technique de filtration rapide avec un temps de résolution de 250 ms pour les deux premières étapes. Il permet de contrôler la température du milieu d'incubation et d'appliquer une approche dynamique avec la possibilité de 18 prélèvements à partir du même milieu réactionnel. La résolution et la précision des mesures permettent d'étudier les influx, les efflux, les cinétiques de liaison et de libération des substrats. L'extrapolation au temps *zéro* des courbes de captation permet d'estimer la liaison non-spécifique du substrat ainsi que la diffusion passive (Malo et Berteloot, 1991).

IV.2.c) fonctionnement général de l'AFER

Une photographie de l'AFER est présentée sur la Fig.15 Les vésicules sont introduites

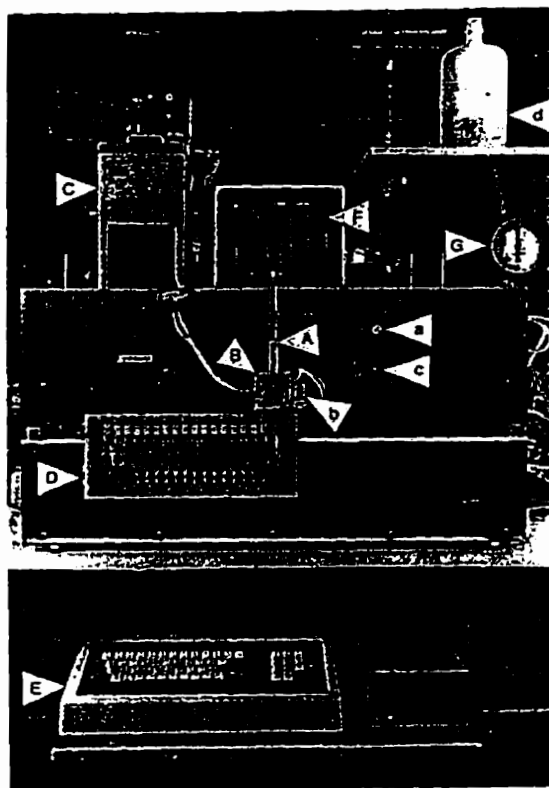


Figure 15. Appareil à Filtration et Échantillonnage Rapide (AFER)

(A) injecteur de vésicules; (B) chambre d'incubation; a) contrôle de la pression dans la chambre; b) valve permettant le lavage de la chambre; c) interrupteur: position lavage ou transport; (C) bain thermostaté; (D) chariot qui porte les unités de filtration; d) solution d'arrêt; (E) micro-ordinateur et clavier; (F) écran de contrôle et (G) contrôle du circuit à air comprimé (tiré de Berteloot et al., 1991)

dans un tube à piston et placées dans l'injecteur (A) qui est fixé au-dessus de la chambre d'incubation (B). Le milieu de transport est aspiré dans la chambre en créant une légère pression négative en tournant le bouton (a), puis maintenu à l'intérieur en ajustant la pression pour réduire au maximum la fréquence d'apparition de bulles. La température de la chambre est contrôlée à l'aide d'un circuit d'eau branché sur un bain thermostaté (C) et une sonde de température, installée dans la chambre même, permet de régler la température du bain en tenant compte des déperditions de chaleur le long du circuit d'eau. Les vésicules sont injectées dans la chambre en retirant manuellement l'aiguille qui libère le ressort de l'injecteur (Fig.16) et le signal électrique déclenché par la chute du piston est alors transmis à l'ordinateur. La durée de l'injection ne dépasse pas 5 ms et permet donc une détermination précise du temps *zéro*. Une cellule photo-électrique a été placée à la sortie de la chambre pour mesurer la durée du prélèvement. Une relation linéaire entre le volume prélevé et la durée du prélèvement a été obtenue avec les différentes combinaisons possibles des paramètres ajustables (Fig.17) (Berteloot et al., 1991). Ces paramètres ont été choisis pour obtenir un prélèvement d'environ 50 μ l. Au moment de l'injection, les vésicules sont dispersées dans le milieu et mélangées par un système d'agitation magnétique pendant 100 ms (Fig.15). Le mélange est ensuite échantillonné dans les 18 unités de filtration montées sur un support (D) qui se déplace latéralement. Chaque unité de filtration est connectée au réservoir de solution d'arrêt (d) et les procédures de filtration et de rinçage s'effectuent automatiquement. La séquence d'échantillonnage est fixée par l'utilisateur et affichée à l'écran, de même que le nombre et la durée des rinçages (F). Le support de chaque filtre peut monter (position de filtration) et descendre, ce qui permet de récupérer les filtres et ensuite de compter la radioactivité. Finalement, un circuit d'eau supplémentaire (b), commandé par le bouton (c), permet le rinçage de la chambre d'incubation.

IV.2.d) protocole expérimental

Afin de préserver la capacité fonctionnelle des vésicules et de stabiliser complètement le volume intravésiculaire, nous avons utilisé le protocole de congélation des vésicules dans l'azote liquide en aliquots et leur décongélation à la température de la pièce juste avant l'essai (Maenz et al., 1991). 20 ou 40 μ l de vésicules sont introduits dans un tube à piston. Le tube est placé dans l'injecteur qui est lui-même vissé sur le haut de la chambre dans laquelle 480 μ l ou 960 μ l

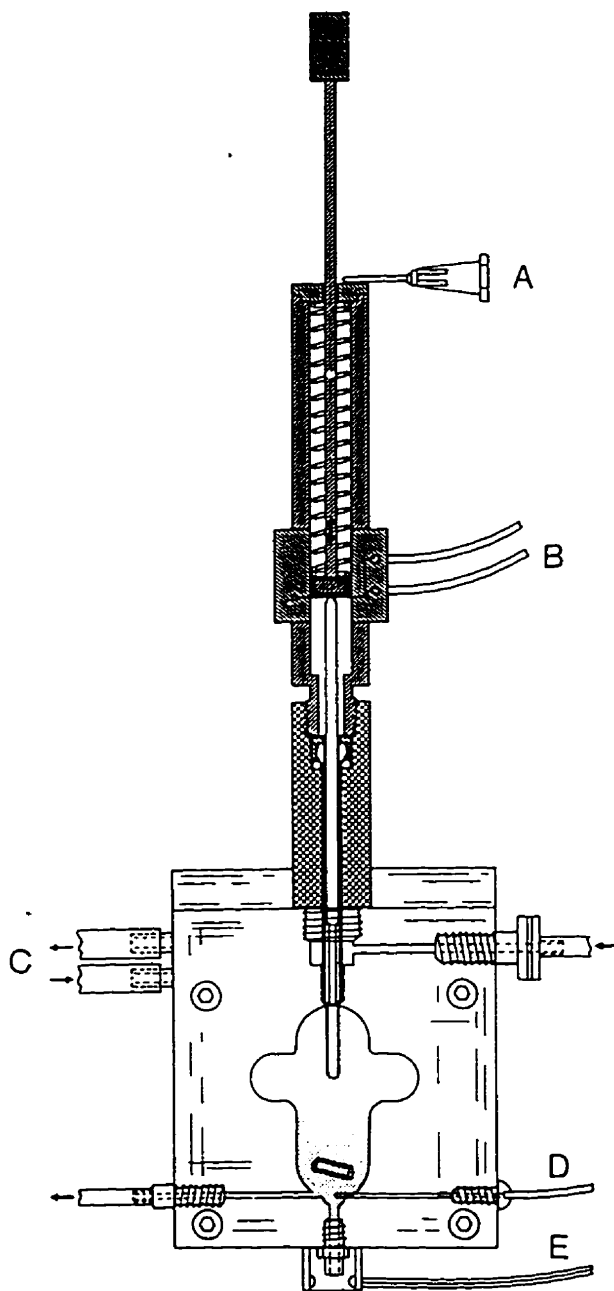


Figure 16. Schéma de la chambre de mélange de l'AFER

(A) aiguille qui déclenche l'injection des vésicules et le signal de départ; (B) jonction électrique qui transmet le signal de départ au micro-ordinateur; (C) circuit d'eau maintenu à une température constante; (D) sonde de température qui permet de contrôler la température de la chambre à l'écran; et (E) cellule photo-électrique qui enregistre le temps de passage des prélèvements (tiré de Berteloot et al., 1991)

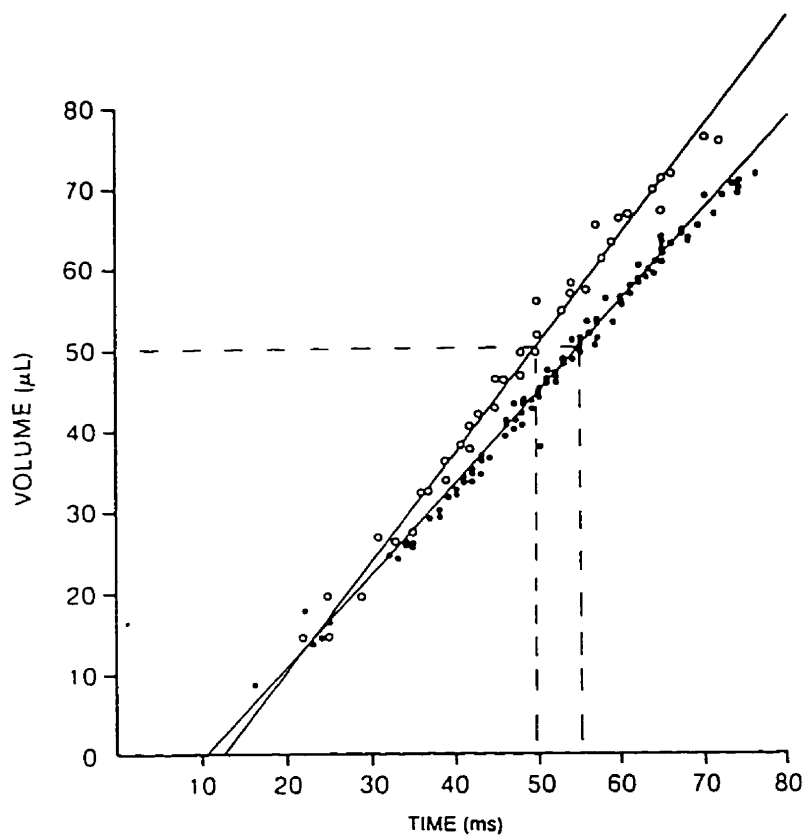


Figure 17. Relation entre temps de prélèvement et volumes des échantillons en absence (●) et en présence de vésicules (○). Le temps de prélèvement est mesuré par la cellule photo-électrique placée à la sortie de la chambre et le volume de l'échantillon par l'absorbance d'une substance colorée (pyranine). Les lignes sont les ajustements réalisés avec l'équation d'une droite (Berteloot et al., 1991)

de milieu de transport sont aspirés. La température du milieu s'ajuste après quelques secondes. Les filtres en nitrocellulose avec des pores de 0.65 μm (Micro Filtration System) sont trempés dans la solution d'arrêt (ceci réduit le bruit de fond) et déposés dans les unités de filtration. Les puits sont alors remplis automatiquement (1 ml) avec la solution d'arrêt à 4°C. La concentration de Na^+ dans cette dernière solution est toujours équivalente à la somme des concentrations cationiques du milieu d'incubation. La phlorizine y est utilisée de façon obligatoire uniquement pour les études cinétiques du transport de Glc et non pour la liaison de phlorizine. L'aiguille qui maintient l'injecteur en position armée est alors ôtée et l'essai est effectué automatiquement. Un cycle d'une filtration suivi de trois rinçages dure 28 secondes, pendant lesquelles l'efflux est minime (Fig.18) (Berteloot et al., 1991). Les filtres sont alors récupérés, placés dans les minifioles de verre contenant 5 ml de liquide à scintillation BetaBlend (ICN Biomedicals) et la radioactivité ^3H est déterminée en utilisant le compteur à scintillation Beckman LS 6000SC.

IV.2.e) analyse cinétique

Les comptes en dpm sont normalisés par rapport à un volume de 50 μl , puis transformés en nombre de moles de substrat transporté ou lié, en tenant compte de l'activité spécifique du traceur et finalement exprimés par rapport à la quantité de protéines présentes dans les 50 μl d'échantillon.

Les courbes de captation du Glc ou de liaison de la Pz en fonction du temps sont respectivement analysées par régression linéaire ou mono-/bi-exponentielles à l'aide du programme "*Enzfitter*" (Robin J. Leatherbarrow copyright (c) 1987, Elsevier-Biosoft). En général, on utilise une routine de pondération dite "robuste" qui minimise l'influence des points qui s'écartent de la courbe moyenne. Les vitesses initiales de transport du Glc ou de liaison de la Pz sont estimées respectivement par la pente de la droite ou par le coefficient d'ordre 1 d'un polynôme du second degré \pm son erreur standard de régression. La liaison à l'équilibre est estimée par l'amplitude des exponentielles avec une constante de vitesse de premier ordre nécessaire pour atteindre cet équilibre.

Pour augmenter la précision des mesures et permettre une évaluation statistique, chaque essai est répété de 3 à 5 fois sur une même préparation de vésicules. Dans ce cas, l'analyse avec le programme "*Enzfitter*" utilise soit une pondération simple qui rend compte du degré de

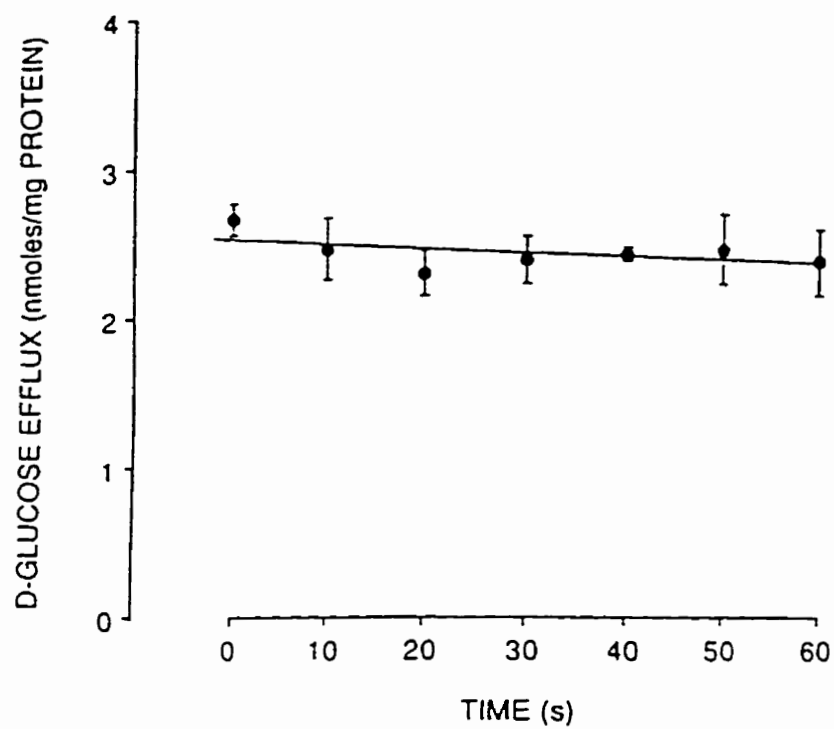


Figure 18. Efficacité de la solution d'arrêt. La solution d'arrêt à 0°C est isoosmotique et isotonique aux solutions de transport des vésicules et contient du Na⁺ (192 mM) et 1 mM Phlorizine. L'efflux est mesuré à partir du sommet de l'"overshoot", c'est à dire quand la concentration de glucose est maximale à l'intérieur des vésicules (tiré de Berteloot et al., 1991)

la dispersion des données de chaque essai, soit une pondération explicite où l'erreur standard de la moyenne sert de facteur de pondération.

Les paramètres cinétiques sont déterminés à partir des courbes de déplacement du substrat radioactif par le substrat froid (Malo et Berteloët, 1991). Cette technique consiste à incuber les VMBB en présence d'une concentration fixe de radiotracer et de concentrations variables de substrat froid, ce qui entraîne un déplacement compétitif du traceur par le substrat froid sur les sites spécifiques. De ce fait, la courbe de déplacement mesurée va refléter exclusivement les phénomènes spécifiques aux sites de liaison du substrat. Le déplacement complet du traceur par une concentration saturante de substrat froid correspond ainsi à un phénomène non-spécifique incluant la liaison non-spécifique et la diffusion passive. Cette technique est avantageuse puisque elle permet: i) de mesurer sélectivement les phénomènes spécifiques; ii) de déterminer la composante non-spécifique directement à partir de la courbe de déplacement; iii) d'utiliser des quantités minimales de substrat radioactif en réduisant ainsi la pollution et le coût des expériences. D'autre part, la mesure directe des composantes spécifiques et non-spécifiques permet d'éliminer le traitement mathématique des données qui est susceptible d'introduire des déviations des graphes Eadie-Hofstee et donc des estimations artéfactuelles des paramètres cinétiques, contrairement à l'analyse des courbes $v = f(S)$ par régression non linéaire, en utilisant les équations de transport complètes (Brot-Laroche et al., 1986).

IV.2.f) choix de l'espèce animale

Nous avons porté notre choix sur le lapin parce que le système de transport Na^+ -D-glucose et la liaison de Pz ont été bien caractérisés chez cette espèce grâce aux nombreuses études cinétiques réalisées avec les organes perfusés (le TCP rénal ou les tranches du tube intestinal) et les VMBB.

Dans le rein, l'hypothèse de la présence de deux systèmes indépendants de transport disposés en série le long du TCP a été proposée suite aux travaux de Turner et Moran (1982a,b,c) sur les VMBB rénales de lapin. Éventuellement, cette caractérisation des systèmes de transport dans les VMBB originant du cortex et de la médulla externes, respectivement (Turner et Moran, 1982a,b,c), permettra de comparer les cinétiques de transport du Glc et de liaison de la Pz dans les VMBB issues du cortex rénal entier (utilisées dans nos études) et leurs réponses aux différents

facteurs physiques et chimiques tels que la T° , le pH, les analogues du substrat et les inhibiteurs.

La molécule SGLT1 responsable du transport de Glc intestinal (Hediger et al., 1987a,b) et rénal (Coady et al., 1990) a également été clonée, pour la première fois, chez le lapin. Actuellement, la caractérisation du système de transport chez le lapin est donc très avancée suite à l'expression fonctionnelle de SGLT1 dans les ovocytes de *Xenopus laevis* et dans les membranes naturelles de VMBB.

Des études cinétiques très poussées dans les VMBB intestinales de lapin (Chenu et Berteloot, 1993), effectuées en utilisant une nouvelle méthode d'analyse des données (Malo et Berteloot, 1991) et l'automatisation complète de la technique de filtration rapide par l'AFER, concluent de façon définitive que le cotransport Na^+ -D-glucose dans l'intestin de lapin est le fait d'un transporteur unique.

Il nous est donc paru important de comparer l'expression fonctionnelle de(s) molécule(s) responsable(s) du transport rénal de Glc chez cette même espèce en utilisant l'AFER et une méthode d'analyse similaire à celle utilisée pour les études cinétiques sur VMBB intestinales.

IV.2.g) choix des conditions expérimentales

Puisque la préparation de deux populations de VMBB à partir du cortex et de la médulla externes ne garantit pas la séparation anatomique des deux modes de transport, nous avons donc opté pour la préparation de VMBB issues du cortex entier. Nous avons ainsi privilégié la possibilité de tester les effets de différentes conditions expérimentales sur les deux modes de cotransport, notamment en ce qui concerne leur spécificité pour le Gal et leurs réponses vis-à-vis de la température, du pH, et de l'inhibition par la Pz. Les résultats obtenus sont présentés dans le chapitre (II) qui conclue à des incompatibilités majeures avec ce qui est à présent connu des caractéristiques cinétiques des transporteurs SGLT1 et SGLT2 clonés.

En étudiant les effets d'analogues de la Pz sur la β -glucosidase intestinale, Evans et al. (1980) ont décrit des changements dans le spectre d'absorption de la Pz en fonction du pH. Plus tard, Fuhrmann et al. (1992) ont étudié les effets du tautomérisme kéto-énol sur les propriétés d'inhibition par la Pt du transport de Glc dans les érythrocytes humains. Puisque les spectres d'absorption de la Pz et de la Pt sont très similaires, nous avons voulu tester l'effet du pH sur les propriétés de liaison de la Pz dans le rein en conditions de Na^+ à l'équilibre. Le chapitre (III)

présente ces résultats qui démontrent, dans toutes les conditions expérimentales évaluées, l'existence d'un site unique de liaison de Pz de type HAP et Na^+ -dépendant. Un modèle plausible de la liaison de Pz est également proposé dans le chapitre (IV).

En conditions de pH variable, non seulement la structure de la Pz mais également celle du transporteur lui-même peuvent être affectées. De plus, des études cinétiques sur VMBB intestinales de lapin (Hoshi et al., 1986) et sur le système SGLT1 exprimé dans les ovocytes (Hirayama et al., 1994) démontrent que les ions H^+ peuvent se substituer au Na^+ pour assurer le cotransport. Nous avons donc finalement étudié la réponse des deux modes de transport rénal par comparaison au SGLT1 intestinal en présence simultanée de gradients de Na^+ et de H^+ de même qu'en présence d'un gradient de Na^+ quand le pH varie de façon symétrique de part et d'autre de la membrane. Ces résultats sont présentés dans le chapitre (V) qui conclut à des différences majeures entre l'expression du système SGLT1 dans les tissus intestinal et rénal.

CHAPITRE II: Article un: "Sugar transport heterogeneity in the kidney: two independent transporters or different transport modes through an oligomeric protein ? 1. Glucose transport studies"

**SUGAR TRANSPORT HETEROGENEITY IN THE KIDNEY:
TWO INDEPENDENT TRANSPORTERS OR DIFFERENT
TRANSPORT MODES THROUGH AN OLIGOMERIC PROTEIN ?
1. GLUCOSE TRANSPORT STUDIES**

by

Nathalie OULIANOVA and Alfred BERTELOOT*

Address: Membrane Transport Research Group
Department of Physiology
Faculty of Medicine
Université de Montreal
CP 6128, succursale "Centre-Ville"
Montreal (Québec) Canada H3C 3J7

Phone: (514)-343-5634

Fax: (514)-343-2111

(*): To whom correspondence and reprint requests should be addressed

RUNNING TITLE: SUGAR TRANSPORT HETEROGENEITY IN THE KIDNEY

KEY WORDS: Na⁺-dependent sugar transport; substrate specificity; phlorizin inhibition; temperature dependence; membrane vesicles (rabbit kidney)

ABSTRACT

The kinetics of Na⁺/D-glucose cotransport (SGLT) were reevaluated in rabbit renal brush border membrane vesicles isolated from the whole kidney cortex using a fast-sampling, rapid-filtration apparatus (FSRFA, US patent # 5,330,717) for uptake measurements. Our results confirm SGLT heterogeneity in this preparation, and both high (HAG) and low (LAG) affinity glucose transport pathways can be separated over the 15-30°C range of temperatures. It is further shown that: i) Na⁺ is an essential activator of both HAG and LAG; ii) similar energies of activation can be estimated from the linear Arrhenius plots constructed from the V_{max} data of HAG and LAG, thus suggesting that the lipid composition and/or the physical state of the membrane do not affect much the functioning of SGLT; iii) similar V_{max} values are observed for glucose and galactose transport through HAG and LAG, thus demonstrating that the two substrates share the same carrier agencies; and iv) phlorizin inhibits both HAG and LAG competitively and with equal potency (K_i = 15 μM). Individually, these data do not allow to resolve conclusively the issue as to whether the kinetic heterogeneity of SGLT results from the expression in the proximal tubule of either two independent transporters (rSGLT1 and rSGLT2) or a unique transporter (rSGLT1) showing allosteric kinetics. All together and compared to the kinetic characteristics of the cloned SGLT1 and SGLT2 systems, they do point out to a number of inconsistencies that lead us to conclude to the latter possibility although it is recognized that the two alternatives are not mutually exclusive. It is further suggested, from the differences in the K_m values of HAG transport in the kidney as compared to the small intestine and SGLT1 cRNA-injected oocytes, that renal SGLT1 activity is somehow modulated, maybe through heteroassociation with (a) regulatory subunit(s) that might also contribute quite significantly to sugar transport heterogeneity in the kidney proximal tubule.

INTRODUCTION

In the "Na⁺ gradient hypothesis" regarding transcellular absorption of sugars by intestinal and renal epithelial cells [15], glucose is first accumulated within the cell by secondary active transport through the apical brush border membrane (BBM)¹. Over the last 25 years, studies using BBM vesicles (BBMV) [6,51,53,69] and isolated cells [26] have greatly contributed to characterize Na⁺-dependent D-glucose cotransport (SGLT) in terms of substrate and inhibitor specificities, Na⁺ activation, membrane potential dependency, and mechanism of cotransport. It has been generally assumed, up to the early eighties, that SGLT expression in mammals is homogeneous [15]. However, the studies of Barfuss and Schafer [1] using the isolated perfused tubule technique, and those of Turner and Moran [59-61] in renal BBMV, which both demonstrated kinetic heterogeneity of SGLT along the rabbit proximal tubule, seem to have put a definitive end to this assumption. Still, the molecular basis of this heterogeneity has not been firmly established yet.

Genetic defects of SGLT systems are expressed in selective congenital glucose/galactose malabsorption by the small intestine and familial renal glycosuria, and a minimum of two SGLT genes appear necessary to explain the clinical findings [16,50]. The studies of Turner and Moran [59-61] were interpreted along these lines and it was concluded to the existence of both high-affinity glucose (HAG, $K_m = 0.35$ mM) and low-affinity glucose (LAG, $K_m = 6$ mM) pathways in the kidney with distinct kinetic properties and expression patterns along the proximal tubule. According to these authors [59-61], the LAG system would i) be found predominantly in the outer cortex (proximal convoluted tubule, S1 and S2 cell-types), ii) handle galactose very poorly, iii) present high affinity phlorizin (HAP) binding sites, and iv) demonstrate a 1 Na⁺ : 1 glucose stoichiometry. In contrast, the HAG system would i) be found predominantly in the outer medulla (late proximal straight tubule, S3 cell-types), ii) handle both glucose and galactose, iii) present low affinity phlorizin (LAP) binding sites, and iv) demonstrate a 2 Na⁺ : 1 glucose stoichiometry. Since then, the latter system has been ascribed to the expression in the kidney of the SGLT1 gene [14,40-41], a cloned entity first isolated from the rabbit (rSGLT1, [21]) and human (hSGLT1, [22]) small intestines and shown to have the kinetic characteristics expected for the HAG pathway using *in vitro* expression systems [7,45,65,69]. There is some controversy, however, as to which of the three clones recently isolated from human (Hu14-hSGLT2, [25,68]), pig (SAAT1-pSGLT2, [31,35]), and

rat (rat SGLT2 [71]) kidney cDNA libraries might in fact represent the former system: i) sugar-evoked currents in Hu14-hSGLT2 cRNA-injected oocytes were < 1 nA [25], in contrast to those of 1000-2000 nA observed for SGLT1 and SAAT1-pSGLT2 [35]; ii) the close relationship of Na⁺-dependent nucleoside cotransport to Hu14 and the substantial evolutionary distance of Hu14 from the established SGLTs suggest that Hu14 is a nucleoside carrier [48]; iii) the expression of SAAT1-pSGLT2 mRNA was reported to be strong in intestine, spleen, liver, and muscle but low in kidney [31], so that it has even been proposed that SAAT1-pSGLT2 be renamed SGLT3 [71]; and iv) to our knowledge, the localization of SAAT1-pSGLT2 along the nephron has yet to be established, a quite important matter in view of the recent demonstration of SGLT activity in dog distal thick ascending limbs [67]; indeed, SAAT1-pSGLT2 was cloned from the pig kidney cell line LLC-PK₁ [31] showing functional differentiation patterns of proximal tubule cells [33,47] but hormonal sensitivity which resembles to some extent that of the medullary thick ascending loop [24]. Still, the recent finding that patients with glucose-galactose malabsorption do not show glucosuria [58,70] should be taken as strong evidence for molecular heterogeneity of SGLT systems in the kidney.

It would thus appear that the main question to address at this time is not whether there is more than one SGLT system in the kidney but rather whether the kinetic heterogeneity observed in BBMV isolated from the kidney cortex and/or medulla is the unique and direct consequence of this molecular diversity. Indeed, the validity of the latter equation rests on a number of assumptions that may require thorough examination. For example, in the years following Turner and Moran's studies [59-61], a number of papers appeared that also reported SGLT heterogeneity in intestinal BBMV [10,18,20]. However, a careful reevaluation of such studies using similar preparations from the human [38], rabbit [2], and guinea-pig [37] small intestines clearly indicated that SGLT1 is the only glucose carrier involved in these tissues, and the latter conclusion is strongly supported by the concomitant demonstration that patients with glucose-galactose malabsorption bear a single point mutation in the SGLT1-cDNA that fully accounts for the intestinal defect [58,70]. On a theoretical point of view too, it should be appreciated that kinetic heterogeneity may also result from particular transport mechanisms relating to either monomeric [6,18,26,51,53] or oligomeric proteins [13,29,30]. Indeed, following the demonstration by inactivation radiation studies that the intestinal and renal SGLT proteins may form oligomeric complexes [2,55-56,62], a number of reports appeared [8,19,29-30,66] that challenged the interpretation of Turner and Moran's results [59-61].

In agreement with such studies, Chenu and Berteloot [13] proposed a quite simple dimeric model of cotransport with mixed positive and negative cooperativities for Na^+ and glucose binding, respectively, that may fully account for the kinetic properties usually taken as evidence for the existence of two distinct SGLT transport systems: 1) upward deviations from linearity in Eadie-Hofstee plots, 2) different Na^+ :glucose stoichiometries at low and high sugar concentrations, and 3) partial inhibition by substrate analogues and/or inhibitors. While the first two predictions of this model could not be demonstrated in the rabbit jejunum [13] and hSGLT1-cRNA injected oocytes [12], results that do not rule out, however, a polymeric structure of the SGLT1 protein [13], it has been shown since that the extent of cooperativity between subunits may be modulated through their association with RS1-type proteins which can be found in the small intestine (pig, rabbit, sheep, man) and in both the renal outer cortex and outer medulla (pig, rabbit, man) [30,66]. Finally, the possibility that the anatomical separation achieved by Turner and Moran [59-61] may only be apparent should also be considered. As noted by the authors themselves although never addressed, the possibility remains that the two SGLT pathways observed in their studies are, in fact, manifestations of the same transport protein in different lipid environments [59]. Moreover, it would also appear from recent studies that the regulation of SGLT1 activity is post-transcriptional since it is correlated with the protein concentration in the BBM membrane [52] but not with the amount of homologous mRNA [32]. Accordingly, the studies of Pajor et al. [44] concluding to molecular evidence for two SGLTs in the rabbit kidney should be considered as indirect evidence only and do not rule out the possibility of different post-transcriptional modifications (whether related or not to the differential expression of RS1-like polypeptides) of a unique protein in the S1/S2 as compared to the S3 segments of the proximal tubule. It thus seems fair to conclude that the "two independent carrier hypothesis" of Turner and Moran [59-61] is not the sole interpretation of their kinetic data and, as such, needs further reassessment.

In this paper, we thus reevaluated the kinetics of renal SGLT using rabbit renal BBMV isolated from the whole kidney cortex and a fast-sampling, rapid-filtration apparatus (FSRFA [5], US patent # 5,330,717) for uptake measurements. It should be emphasized that no attempt was made in our studies to separate the HAG and LAG transport pathways according to regional differences along the proximal tubule on the rationale that: i) a full separation may not be easily achieved by dissection alone, as acknowledged by Turner and Moran [59,61] in their original studies and clearly

indicated by the more recent work of Pajor et al. [44] and Silverman et al. [54], ii) the low yield in BBMVs which is expected following anatomical separation would preclude extensive kinetic studies to be performed, iii) kinetic separation may only be apparent (see discussion above), and iv) it would be possible to analyze simultaneously the kinetic characteristics of the two transport pathways with respect to a number of critical issues relating to the involvement of the SGLT1 and SGLT2 transport systems in this preparation. While our results do confirm the kinetic heterogeneity of SGLT in kidney BBMVs, it is also shown that both of the HAG and LAG transport pathways demonstrate similar energies of activation (E_a) for a full catalytic cycle (V_{max}), accept galactose as an alternative substrate, and are inhibited competitively by phlorizin with identical K_i values. Comparisons of HAG expression in rabbit intestinal and renal BBMVs, and of SGLT characteristics in renal BBMVs vs cRNA-injected oocytes expressing the cloned SGLT1 and SGLT2 systems lead us to conclude that the kinetic heterogeneity observed in our studies most likely reflects different transport properties of rSGLT1 rather than coexpression of distinct rSGLT1 and rSGLT2 proteins.

MATERIALS AND METHODS

1) Materials

Rabbits were purchased from the Maple Lane Farm (Clifford, Ontario) or the "Ferme de Sélection Cunipur" (St-Valérien, Québec). D-[1-³H(N)]-glucose (specific activity 10-15 Ci/mmol) was supplied by New England Nuclear (NEN), the BCA (bicinchoninic acid) protein assay kit by Pierce, unlabeled D-glucose by Sigma, phlorizin and ultrapure salts by Aldrich, and amiloride hydrochloride and scintillation cocktail (β-blend) by ICN Biomedicals. Cellulose nitrate filters (12.5 mm diameter, 0.65 μm pore size) were obtained from Micro Filtration Systems (MFS). All other chemicals were of the highest purity available.

2) Preparation of Brush Border Membrane Vesicles

Large batches of renal BBMVs were prepared from the whole kidney cortex of male, 2.0-2.5 kg New-Zealand white rabbits essentially as described previously for the rabbit jejunum [3,13,36]. Briefly, cortex slices were introduced into the homogenate media (18 mM HEPES-Tris buffer pH 7.0 containing 1 mM EDTA and 250 mM sucrose) at a 1:20 ratio (w:v), and homogenized at 4 °C in a Warring blender for 1 min at full speed. BBM were precipitated by addition of 10 mM MgCl₂ [13,36], purified in a P₂ fraction [3], and resuspended in a minimal volume of 50 mM HEPES-Tris buffer (pH 7.0) containing 300 mM mannitol and 0.1 mM MgSO₄ [13]. The P₂ fractions were divided into 500 μl aliquots and frozen in liquid N₂ [13,36]. On the day of use, a suitable number of aliquots of frozen P₂ were thawed and diluted at a 1:10 ratio (w:v) in the resuspension buffer (50 mM HEPES-Tris buffer (pH 7.0) containing 0.1 mM MgSO₄, 300 mM mannitol, and 200 mM KI) to which was added 3 μM valinomycin to ensure full equilibration of the cation [13,36]. BBMVs were prepared as a final P₄ pellet [3] and resuspended in the valinomycin-free resuspension buffer at a protein concentration of 28-35 mg/ml [13]. To insure stability of the preparation over the course of the experiment, 25 μl aliquots of BBMVs were frozen in liquid N₂ until the time of assay [13,36].

3) Uptake Assays

Initial rates of Na⁺-dependent, ³H-D-glucose uptake were determined under zero-trans gradient conditions of both ion and substrate using the automated FSRFA developed in our

laboratory [5]. For each assay, 20 μl of BBMV were thawed, prewarmed, and loaded into the apparatus. Uptake was initiated by injecting the vesicles into 480 μl of 50 mM HEPES-Tris buffer (pH 7.0) containing 0.1 mM MgSO_4 , 0.5 mM amiloride, 300 mM mannitol, 50 mM KI, 150 mM of either NaI or choline iodide for Na^+ -gradient or Na^+ -free conditions, respectively, and 4 μM tracer D-glucose or galactose. For kinetic parameter determinations, 12 concentrations of cold D-glucose or galactose were used (0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, and 200 mM) and osmolarity was kept constant by varying mannitol concentrations to satisfy a total concentration of cold substrate + mannitol of 300 mM. For phlorizin inhibition studies, the uptake media also contained 0.5, 1, 5, 10, 30, and 50 μM of the SGLT inhibitor. Uptakes were performed in the thermostated chamber of the FSRFA [5] and determined by a 9-point automatic sequential sampling of the uptake mixture at 1 s intervals [13]. At each time point, 50 μl of the uptake mixture was injected into 1 ml of ice-cold stop solution (50 mM HEPES-Tris buffer (pH 7.0) containing 0.1 mM MgSO_4 , 300 mM mannitol, 1 mM phlorizin, and 200 mM of either NaCl or choline chloride for Na^+ -gradient or Na^+ -free conditions, respectively). The stopped mixture was then filtered through 0.65 μm cellulose nitrate filters, and the filters were washed three times with 1 ml of ice-cold stop solution [5,13]. The substrate content of the vesicles was then determined by liquid scintillation counting as described previously [13].

Under the conditions of our uptake assays, the initial rates of 50 μM D-glucose uptake were linear with protein concentrations over the range 1-35 mg protein/ml [13]. Protein was measured with the BCA assay kit using bovine serum albumin as a standard.

4) Data analysis

Four (phlorizin inhibition studies) or five (all other studies) uptake time courses were run at each of the substrate concentrations used in the respective experiments. Initial rates of tracer transport (v_p^* , $\text{pmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein) were determined over the 1-7 s time course of the assays by linear (15-25 $^\circ\text{C}$) or polynomial (30 $^\circ\text{C}$) regression analysis as justified previously [13]. The kinetic parameters of glucose and galactose transport were estimated by nonlinear regression analysis of the initial rate data, thus assuming that the added cold substrate acts as an ideal competitive inhibitor of tracer transport [6,13,38]. The equations used corresponded to either one or two Michaelis-Menten components working in parallel with passive diffusion (referred to in the

following as the one-site or the two-sites models, respectively) and have been both justified and given in full in a previous paper from our group, as well as the strategy aimed at model discrimination [13]. The best model fit to the data is reported in all of the figures, and an Eadie-Hofstee transformation of the carrier-mediated process is also presented where appropriate for visual appraisal of the goodness of fit [6,13,38]. Linear and nonlinear regression analyses were performed using a commercial software (Enzfitter, R.J. Leatherbarrow, copyright 1987, Elsevier-Biosoft). Since both of the robust and explicit weighting routines of this software were used for data analysis, the errors associated with v_i determinations and kinetic parameter values reported in this paper represent the standard errors of regression (SER) on these parameters. When shown, the evaluation of the 95% confidence intervals was performed using the commercial software "P.Fit" (copyright 1990 Fig.P Software Corp., Biosoft).

RESULTS

1) Heterogeneity of SGLT in renal BBMV

The dependence of the initial rates of tracer D-glucose (4 μM) transport upon increasing cold substrate concentrations is shown in Fig. 1 for two similar experiments performed at 20 °C using different batches of BBMV and cold glucose concentrations. In both experiments, the initial rate data were best described by the two-sites model equation, and the kinetic parameter values corresponding to the HAG and LAG transport pathways are given in Table 1. The reproducibility of our kinetic approach appears very good, as also clearly demonstrated in Fig. 1 where it can be appreciated that the two fits are not significantly different from each other at the 95% confidence level. The uptake time courses generated at each of the glucose concentrations tested in the two independent experiments were thus pooled to determine a unique set of initial rates of tracer uptake. The kinetic heterogeneity of SGLT in rabbit renal BBMV purified from the whole kidney cortex is best emphasized by the Eadie-Hofstee transformation of the pooled data (inset of Fig. 1 with kinetic parameters as given in Table 1).

2) Transport heterogeneity and Na^+ -independent glucose transport

The possibility that glucose transport in renal BBMV might occur in the complete absence of Na^+ [11,23] was evaluated by comparing: i) tracer D-glucose uptake (4 μM) in the presence of 150 mM Na^+ and 200 mM cold glucose, experimental conditions which should give, according to the kinetic parameter values of Table 1, a reliable estimate of the diffusional component of transport, and ii) tracer D-glucose uptake (4 μM) in the presence of 150 mM choline substituted for Na^+ , experimental conditions that provide, as clearly indicated by the displacement curve in Fig. 1, the highest sensitivity for measuring any carrier-mediated transport. As illustrated in Fig.2, the uptake data under conditions (i) and (ii) were not significantly different from each other at the 95% confidence level, thus clearly demonstrating that Na^+ is mandatory for glucose transport through the HAG and LAG pathways, and that Na^+ -independent transport does not contribute in any way to SGLT heterogeneity. Moreover, the mean slope value of $0.039 \pm 0.003 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$ estimated for the pooled data in Fig. 2 is equivalent to a k_D value of $9.20 \pm 0.07 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein} \cdot \text{mM}^{-1}$ in these experiments, in agreement with the data in Table 1 at 20 °C.

3) Heterogeneity of Na⁺-D-Galactose cotransport in renal BBMV.

Hu14 [68], a human cDNA claimed to represent hSGLT2 [25], and SAAT1, a cDNA cloned from LLC-PK₁ cells [31] and later proposed to represent pSGLT2 [35], were reported not to transport or to transport very weakly D-galactose, respectively, when expressed in *Xenopus laevis* oocytes. As shown in Fig. 3, however, heterogeneity of both D-glucose and D-galactose transport could be readily observed at 25 °C in our renal BBMV preparations. Moreover, Table 2 indicates that high and low affinity galactose transport occurred with V_{max} values similar to those of HAG and LAG transport, thus showing that the two substrates do share the two transport pathways. Interestingly too, galactose was transported with lower affinity than glucose through both pathways; however, the K_m for galactose relative to glucose transport through the HAG and LAG routes were increased by 3.9- and 7.8-fold, respectively.

4) Phlorizin inhibition of SGLT in renal BBMV

Based on phlorizin inhibition studies of SGLT in rabbit renal BBMV isolated from the outer cortex and outer medulla, it has been reported that the HAP and LAP binding sites correspond to the LAG and HAG transport pathways, respectively [61]. In agreement with Turner and Moran's studies [61], an IC_{50} value $\approx 1 \mu\text{M}$ was estimated for phlorizin inhibition of α -methylglucose (AMG) transport through Hu14/hSGLT2 [25] (this value is equivalent to $K_i \approx 0.4 \mu\text{M}$ when assuming competitive inhibition and considering both the AMG concentration of 2 mM used and the K_m value of 1.6 mM for AMG transport reported in the studies of Kanai et al. [25]). In contrast, K_i values of 16-18 μM (at holding membrane potentials V_m of -110 to -50 mV) or $\approx 37 \mu\text{M}$ (at $V_m = -10$ mV) were determined for phlorizin inhibition of AMG transport through pSGLT2 [35], and these values thus appear higher than the K_i values of 6-10 μM estimated for rSGLT1 [7,65,69].

This question was thus reevaluated in our rabbit renal BBMV preparations by repeating at 25 °C the experiments of Fig. 1 for different concentrations of phlorizin. The initial rate data were best-fitted to the two-sites model equation as shown in Fig. 4 for representative concentrations of phlorizin, and the corresponding kinetic parameter values are given in Table 3. Fig. 5 clearly indicates that the V_{max} of both HAG and LAG transport were unaffected by phlorizin, thus demonstrating that phlorizin inhibits competitively the two transport pathways (it should be noted that the mean V_{max1} and V_{max2} values of 41 ± 6 and $524 \pm 49 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein, respectively,

compare fairly well to those determined in Table 2 for a different membrane preparation). Therefore, the apparent Michaelis constants (K_a) in Table 3 were fitted to Equation (1) in which K_m and K_i have their usual meanings.

$$K_a = K_m \cdot \left[1 + \frac{(I)}{K_i} \right] \quad (1)$$

These results are shown in Fig. 6 from which K_{m1} and K_{m2} values of 0.113 ± 0.007 and 3.3 ± 0.2 mM could be estimated for HAG and LAG transport, respectively, in agreement with the results of Table 2. Interestingly, however, similar K_i values of 15.3 ± 3.0 and 14.5 ± 2.2 μ M were observed for phlorizin inhibition of the two SGLT pathways.

5) Temperature effects

The temperature dependence of SGLT has been analyzed in rat [27], hog [17] and rabbit [28] renal BBMV. Nonlinear Arrhenius plots were found showing either a transition temperature at 15 °C [17,27] or curvilinearity [28] over the whole range of temperatures. Since these early studies did not resolve the HAG and LAG transport pathways, such nonlinear plots are compatible with SGLT heterogeneity in renal BBMV, as also inferred from the studies of Brot-Laroche et al. [10] in guinea-pig intestinal BBMV where a LAG transport pathway seemed to be activated at higher temperatures.

This hypothesis was tested in our renal BBMV preparations as follows. Experiments similar to those of Fig. 1 were repeated at 15 and 30 °C. The kinetic data at these two temperatures could be best resolved when assuming a two-sites model with kinetic parameters as given in Table 4. It was then possible to construct the Arrhenius plots pertaining to the kinetic parameters determined in Tables 1-4 (Fig. 7) from which the following observations can be made: i) linear plots are obtained over the 15-30 °C range of temperatures for all kinetic parameters, although the K_m of the LAG transport pathway proves to be quite insensitive to temperature (mean value = 2.9 ± 0.5 mM, Fig. 7B, open circles); ii) similar E_a values can be determined from the V_{max} data pertaining to the HAG and LAG transport pathways ($E_a = 45.0 \pm 3.1$ and 40.2 ± 2.2 kcal . K⁻¹ . mol⁻¹ for HAG and LAG, respectively, Fig. 7A); and iii) an E_a value of 25.7 ± 2.1 kcal . K⁻¹ . mol⁻¹ can be estimated from the K_m data relative to HAG transport (Fig. 7B, closed circles) which falls within the range of $E_a = 18.0 \pm 3.4$ kcal . K⁻¹ . mol⁻¹ that can be calculated for passive diffusion of glucose (Fig. 7B, open triangles).

DISCUSSION

1) General comments

In this paper, the kinetics of SGLT were reevaluated in rabbit renal BBMV isolated from the whole kidney cortex, and it should be emphasized first that our kinetic experiments: i) involved a dynamic approach [6,18] in which the true initial rates of transport were determined from 4 to 5 uptake time courses recorded under all experimental conditions with a FSRFA [5,13,38], ii) evaluated the kinetic parameters of transport by weighted, nonlinear regression analysis of the initial rate data relative to tracer concentration that precludes undue transformations of the experimental data and avoids a number of complications associated with it [5,6,13,38], and iii) paid particular attention to the stability of the vesicle preparation [36] and to the control of temperature, pH, osmolarity, ionic strength, and membrane potential which was clamped to 0 mV using iodide as a highly permeant anion [4]. From the results of Fig. 1 and Table 1 at 20 °C, and Tables 2-3 at 25 °C, it can be concluded that the use of BBMV prepared from the same large batch of P₂ fractions minimizes animal-to-animal variations of uptake data and that our experimental conditions insure high reproducibility of the results. Therefore, meaningful comparisons can be made between experiments without costly and time-consuming data replication.

It is important to emphasize next that SGLT heterogeneity was observed in rabbit kidney BBMV under experimental conditions that failed to reveal similar heterogeneity in equivalent preparations from the rabbit [13] and human [38] jejunum. The present studies thus validate further our kinetic approach aimed at resolving multi component transport systems [6,13,38] and confirm those of Turner and Moran [59] showing that the initial rate data in the whole kidney cortex is compatible with the presence of both HAG and LAG transport pathways. Still, the K_m values reported in Tables 1 (20 °C) and 4 (15 °C) appear lower than those of 0.35 and 6.0 mM previously estimated at 17 °C in a similar preparation for HAG and LAG transport, respectively [59]. This apparent discrepancy can be easily resolved from the consideration that Turner and Moran's data [59] were obtained at a 40 mM Na⁺ concentration rather than the saturating Na⁺ concentration of 150 mM used throughout our experiments [60,61].

2) SGLT expression in rabbit renal and intestinal BBMV

Because a cDNA clone with full identity to intestinal rSGLT1 has been isolated from the rabbit kidney cortex [40], it can be assumed, as also done by a number of authors [25,30,35,44,54,71], that the HAG pathway should represent the functional expression of the SGLT1 protein in this tissue. In this respect, Na^+ was found to be an essential activator of SGLT in the rabbit kidney (Fig. 2), a property clearly demonstrated for rSGLT1 in the small intestine [13]. Still, under symmetrical conditions (20 °C, 0 mV, and 150 mM Na^+ gradient), the K_m value of HAG transport is some 2.3 ± 0.4 -fold lower in the former as compared to the latter tissue ($60 \pm 8 \mu\text{M}$ in Table 1 versus $139 \pm 5 \mu\text{M}$ in [13], respectively). It can thus be concluded that this highly significant difference should reflect how rSGLT1 is expressed functionally in renal as compared to intestinal BBMV. Interestingly, a similar difference is seen in man for HAG transport in the jejunum ($K_m = 0.6$ - 0.9 mM in [38]) and the kidney ($K_m \approx 0.3$ mM in [63]). Therefore, these data point to the fact that the same SGLT1 gene leads to differential expression of the SGLT1 protein in the two tissues.

One is thus led to question whether rSGLT1 activity is modulated by the lipid composition and/or the physical state of the membrane. A conclusive answer to this question may not be given at this time. However, the following pieces of evidence point out to a minor role of these two elements in affecting SGLT1 activity: i) it is quite remarkable that similar K_m values have been reported for SGLT1 expression in intestinal BBMV (see values reported above) and oocytes injected with rSGLT1-cRNA (100-200 [45] and 117-126 [66] μM) or hSGLT1-cRNA (0.8 [34] and 1.2 [12] mM); ii) the temperature studies of Fig. 7 show linear Arrhenius plots for the V_{\max} ($E_a = 45.0 \pm 3.1$ kcal \cdot K $^{-1}$ \cdot mol $^{-1}$) and K_m (25.7 ± 2.1 kcal \cdot K $^{-1}$ \cdot mol $^{-1}$) data regarding glucose transport through the renal HAG pathway; and iii) if one also assumes linearity in the Arrhenius plots of intestinal SGLT1 between 20 and 35 °C, quite similar E_a values of 32.7 and 15.8 kcal \cdot K $^{-1}$ \cdot mol $^{-1}$ can be calculated from our previous studies in rabbit jejunal BBMV [13] for the V_{\max} and K_m data, respectively. Indeed, our conclusion contrasts with that of previous studies in which: i) the Arrhenius plots were constructed from the initial rate data estimated at one substrate concentration only [9,17,27-28], and ii) the renal HAG and LAG pathways were not resolved [17,27-28]. Because initial rate equations of transport mechanisms are complex functions of both microscopic constants and substrate concentrations, and since different rate-limiting steps may govern transport activity at different temperatures, linear Arrhenius plots are not usually expected under these conditions, even when

considering the simplest case of a unique transport protein. Therefore, the E_a values of 45.0 ± 3.1 kcal . K^{-1} . mol⁻¹ determined in our studies from the V_{max} data (Fig. 7A) may only be compared to those of 17.4-21.0 kcal . K^{-1} . mol⁻¹ calculated from the Q_{10} values of Parent et al. [46] pertaining to the V_{max} of rSGLT1 in cRNA-injected oocytes. In contrast also to the studies of Parent et al. [46], the K_m of HAG transport in renal BBMV shows a strong temperature dependence (Fig. 7B). The reason for these differences is not obvious at this time but for the fact that such experiments are more difficult to perform in oocytes studies [46].

The conclusion above that the lipid composition and/or the physical state of the membrane do not affect much the functioning of rSGLT1 would suggest that post-transcriptional modifications of the protein may be responsible for the differential expression of rSGLT1 in the small intestine and the kidney, in agreement with recent studies showing that the regulation of SGLT1 activity is correlated with the protein concentration in the BBM membrane [52] but not with the amount of homologous mRNA [32]. The nature of this modification cannot be assessed at this time. Still, the decrease in the K_m value associated with rSGLT1 (HAG) expression in the kidney (60 ± 8 μ M, Table 1), and the apparition of a LAG pathway in this tissue ($K_m = 2.9 \pm 0.5$ mM, mean of the 6 experiments performed at different temperatures), are features which are indeed reminiscent of those reported by Veyhl et al. [66] upon coinjection of RS1 with rSGLT1 into *Xenopus* oocytes: under these conditions, the K_m of rSGLT1 decreased from 117-126 to 17-29 μ M and a low affinity pathway with K_m value of 0.9-1.9 mM appeared [66]. Unfortunately, however, the range of K_m values reported for SAAT1-pSGLT2 (1.7-4.0 mM in [35]), Hu14-hSGLT2 (1.6 mM in [25]), and rat SGLT2 (3 mM in [71]) in cRNA-injected oocytes also encompasses that determined for the LAG pathway in the above studies.

3) Kinetic characteristics of the renal LAG pathway

Following Turner and Moran's hypothesis [59-61] in which the renal HAG and LAG pathways would represent distinct transport systems, the latter has been ascribed to the expression of a SGLT2 protein [25,35,71] that has yet to be cloned in the rabbit. However, this simple equation ignores the following facts: i) a number of inactivation radiation studies agree that the intestinal and renal SGLT proteins may form oligomeric complexes [2,55-56,62]; ii) a number of reports appeared [8,19,29-30,66] that challenge the interpretation of Turner and Moran's results [59-61]; iii) Chenu

and Berteloot [13] proposed a quite simple dimeric model of cotransport that may fully account for the kinetic properties usually taken as evidence for the existence of two distinct SGLT transport systems; and iv) in agreement with this model, it was suggested that the extent of cooperativity between subunits might be modulated through their association with RS1-type proteins [30,66]. Moreover, as discussed under Introduction, there is some controversy in the literature as to which of the three clones recently isolated from kidney libraries [31,68,71] might in fact qualify to represent SGLT2 activity [25,35,71]. The question arises, then, as to what extent could the kinetic heterogeneity observed in BBMV isolated from the kidney cortex and/or medulla be the sole consequence of the proposed molecular diversity and, as discussed in details below, our studies do point out a number of inconsistencies with regard to this hypothesis.

a) Galactose transport studies

It was reported by Turner and Moran [59] that galactose is a poor inhibitor of glucose transport through LAG as compared to HAG, and K_i values of 54-77 and 2.0-2.6 mM (ratio of 27-30-fold) can be estimated from the data of Table 2 in [59] for the former and the latter pathways, respectively. Similarly, Roigaard-Petersen et al. [49] separated low (outer cortex, $K_m \approx 15$ mM) and high (outer medulla, $K_m = 0.15$ mM) affinity galactose transport pathways (ratio of 100-fold) in the rabbit kidney. Qualitatively at least, then, our results agree with these previous studies (ratio of 55-fold, see Table 2) and bring further evidence, from the similar V_{max} values of glucose and galactose transport through both of the HAG and LAG pathways (Table 2), that the two substrates do share the same transport routes. Moreover, in contrast to the finding of preferential glucose uptake through LAG only [49] and through SAAT1-pSGLT2 [35] as compared to rSGLT1 [7], our studies clearly indicate, in agreement with those of Turner and Moran [47] in the kidney, that glucose is the preferred substrate of both intestinal rSGLT1 [13] (the K_m for galactose as compared to glucose transport was reduced 2.9-fold in these studies) and the renal HAG and LAG pathways (Table 2). These discrepancies may indeed relate to the facts that: i) the kinetic studies of Roigaard-Petersen et al. [49] were not done under initial rate conditions, and ii) the studies of Birnir et al. [7] did not fully resolved the K_m of glucose and galactose transport in rSGLT1-cRNA injected oocytes. Still, in the present studies, the apparent affinity of galactose versus glucose transport through LAG was decreased by 7.8-fold as compared to 3.9-fold only through HAG (Table 2), and these results also agree qualitatively with those of Turner and Moran [59] (ratios of 9-13- and 6-7-fold can be

estimated in outer cortex and medulla, respectively). Quite obviously, then, these results could be taken as evidence for two distinct and independent glucose transporters. However: i) neither Hu14-hSGLT2 [25] nor rat SGLT2 [71] seem to transport galactose to any significant extent, and ii) SAAT1-pSGLT2 [35] was reported to transport galactose with very low affinity ($K_m > 20$ mM); however, a more realistic K_m value of 385 mM would account for the data of Fig. 1 in [35] as can be calculated from the current values and kinetic parameters of sugar transport given in the text² [35]. Accordingly, there is a major difference in the galactose transport characteristics between the putative SGLT2s and the rabbit renal LAG pathway that might eventually be accounted for by species differences. Still, the available evidence also suggests that galactose transport is a distinctive property of the SGLT1 protein, so that our kidney results are also compatible with the concept that HAG and LAG transport might represent two different transport modes through the same rSGLT1 protein. In the dimeric model of Chenu and Berteloot [13], a possible interpretation would be that a higher negative cooperativity is associated with galactose as compared to glucose binding to a second substrate site (subunit). Indeed, the rate of the conformational change induced upon binding of the first substrate molecule to the transporter might be linked to the structure of the pyranose ring.

b) Phlorizin inhibition studies

It should be emphasized first that our studies appear as the most complete ones to date that ever tried to determine simultaneously the inhibitory effect of phlorizin on HAG and LAG transport pathways in BBMV isolated from the whole kidney cortex. Our results confirm beyond any doubt that phlorizin inhibits competitively renal SGLT through both pathways (Fig. 5) and demonstrate, quite unexpectedly in fact, that phlorizin is equally potent at inhibiting the two glucose transport routes (Fig. 6). One is thus led to question the experimental evidence which served to establish the notion that the rabbit kidney HAG and LAG pathways should show differential inhibition by phlorizin.

It turns out that Turner and Moran [59] concluded first that phlorizin is less effective in inhibiting D-glucose flux in outer medullary vesicles than in the outer cortical preparation when looking at phlorizin inhibition of glucose transport in the two BBMV populations. This conclusion does not seem to be justified, however, because their data of Table 2 in [59] merely report on phlorizin inhibition at a fixed glucose concentration of 1 mM. Accordingly, from the relative inhibition values reported in that Table (60 mM NaCl inward gradient at 17 °C) and the kinetic

parameters of glucose transport given in [59], K_i values of 7.5-11 and 5.4-15 μM can be calculated at 10-100 μM phlorizin for the outer cortical and outer medullary tissues, respectively. Interestingly, these values are not that different from ours (15 μM , Fig. 6) and could well have been taken as evidence for similar sensitivities of the HAG and LAG transport systems relative to phlorizin inhibition.

In further studies performed under equilibrium exchange conditions (60 mM NaCl and 1 mM glucose), Turner and Moran [61] were able to resolve consistent K_d (1.48 μM) and K_i (1.36 μM) values for phlorizin binding and phlorizin inhibition of glucose transport in the outer cortex but failed to do so in the outer medulla. Still, because a low affinity binding component ($K_d = 102 \mu\text{M}$ at 37 °C and 60 mM NaCl equilibrated across the BBMV) could be observed in BBMV isolated from the latter tissue, and because a $K_{0.5}$ value of 51 μM was determined for phlorizin inhibition of 1 mM glucose transport under equilibrium exchange conditions (20 °C and 60 mM NaCl) in this preparation, it was concluded that HAG transport should be associated with LAP binding. These two data sets are internally inconsistent, however: i) a $K_{0.5}$ value higher than the K_d value would have been expected in the equilibrium exchange experiments (and the more so since a K_d value higher than 100 μM would be likely upon decreasing the temperature from 37 to 17 °C); and ii) the $K_{0.5}$ value does not tell much about the K_i and/or K_d values in the absence of K_m value for glucose transport (for example, the $K_{0.5}$ value of 51 μM is fully compatible under the conditions of those experiments with a K_d and/or K_i value of 15 μM for an associated K_m value of 0.4 mM as reported for HAG by Turner and Moran [59,61]). Moreover, in the LLC-PK₁ cell line which seems to express SGLT1 almost exclusively [41], Moran et al. [39] reported K_d values of phlorizin binding at 37 °C that increase from 0.2 to 2.5 μM for Na⁺ concentrations decreasing from 500 to 100 mM. Similarly in the dog [54], K_i values of $\approx 0.9 \mu\text{M}$ were reported for phlorizin inhibition of SGLT under Na⁺-gradient conditions (150 mM NaSCN, 25 °C) in both of the outer cortical and outer medullary tissues. However, these results contrast with the phlorizin binding studies of Turner and Silverman [64] in the same species in which both HAP ($K_d \approx 1 \mu\text{M}$) and LAP ($K_d = 26 \mu\text{M}$) sites were found in the whole kidney cortex (100 mM NaCl equilibrated across the BBMV, 37 °C).

It thus seems fair to conclude that the situation is far from clear at this time, so that further insights to resolve those questions should come from the comparison of transport inhibition and phlorizin binding studies on the same preparation. Moreover, an interesting observation that stems

from the above discussion is that the K_i value of 15 μM found in our studies is close to one order of magnitude higher than the K_d values of phlorizin binding usually recorded in the rabbit [61] and dog [64] kidneys, and in LLC-PK₁ cells [39]. Indeed, part of the discrepancy with the latter studies may be accounted for by differences in assay conditions (temperature, Na⁺ concentrations). Quite importantly, however, because the K_d of phlorizin binding in the kidney are usually determined at equilibrium (incubation times of 5 min or more) while the K_i of SGLT inhibition are determined under initial rate conditions, the question arises, then, as to what extent could those conflictory results i) reflect the fact that phlorizin may bind to different conformational states of the transporter(s) under these two sets of experimental conditions or, alternatively, ii) be a direct consequence of the phlorizin binding mechanism itself. In this respect, it should be noted that Toggenburger et al. [57] reported that large differences could be observed in the time course of phlorizin binding in renal vs intestinal BBMV from rat and rabbit, and that the binding velocity appeared to correlate with the K_d and K_i values. Quite interestingly too, the apparent K_i values in the rabbit small intestine decreased from 40-50 μM at 0.1 s to approx. 7 μM in the time interval 1.3-1.8 s [57]. Those questions were specifically addressed in the following two papers [42-43] where it is shown that: i) phlorizin binding studies in the whole rabbit kidney cortex appear homogeneous, ii) the difference in K_d values observed under initial rate and equilibrium conditions is a characteristic feature of the phlorizin binding mechanism itself, and iii) the K_d values of 12-30 μM estimated under initial binding conditions are in the range of the K_i value of 15 μM (Fig. 6) reported in this paper.

It is quite remarkable, then, that our K_d and K_i values: i) lie within the range of 5-30 μM determined by Toggenburger et al. [57] in rabbit intestinal BBMV (under initial rate conditions at room temperature, and in the presence of a 100 mM inward Na⁺-gradient, higher K_d values were observed at decreasing membrane potential while similar K_d and K_i values were estimated for phlorizin binding and phlorizin inhibition of glucose transport), ii) are similar to those determined in rSGLT1 cRNA-injected oocytes (5-15 μM in [69]), but iii) are lower and higher, respectively, than those reported for SAAT1-pSGLT2-mRNA (37 μM at -10 mV but decreasing to \approx 16 μM at hyperpolarizing potentials of -70 to -110 mV in [35]) and Hu14-hSGLT2-mRNA ($K_i \approx$ 0.4 μM as could be calculated from the data of Kanai et al. [25]) injected oocytes. It can thus be concluded that our results on phlorizin inhibition of SGLT (and binding [42-43]) in rabbit renal BBMV are

compatible with the known expression of rSGLT1 in the small intestine [21] and the kidney [14,40-41], so that our kidney results are also compatible with the concept that HAG and LAG may represent two different transport modes through the same rSGLT1 protein. In the dimeric model of Chenu and Berteloot [13], a possible interpretation would be that phlorizin binding, in contrast to glucose and galactose binding during transport, would occur in the absence of significant cooperativity between subunits, as also suggested in the pig by the work of Koepsell et al. [29].

Indeed, it could be argued that our kinetic studies may not be able to distinguish close K_i values for the phlorizin inhibition of glucose transport through rSGLT1 and rSGLT2 proteins. This is true only within the 95% confidence intervals of the K_i values determined in Fig. 6 for the HAG (9.8-20.2 μM) and LAG (11.1-17.9 μM) pathways (results not shown). It could be argued as well that phlorizin interaction with a SGLT2 protein may vary quite widely from species to species, a possibility that cannot be readily evaluated at this time. Still, in both cases, should rSGLT2 represent the LAG transport pathway in our BBMVs preparations, it can be stated that this transporter would have phlorizin binding properties similar to those of rSGLT1 in spite of a 27- and 55- fold difference in transport affinities for glucose and galactose, respectively (Table 2).

c) Temperature studies

To fully appreciate the results of Fig. 7A showing similar E_a for the renal HAG and LAG pathways, let us first consider the temperature dependence of two closely related proteins like rSGLT1 and hSGLT1 (there is 84% identity and 94% similarity into the amino acid sequences of the two transporters [69]). From our earlier studies in human jejunal BBMVs [38], and if we assume linearity of the Arrhenius plots over the range 20-35 °C of temperatures, it would appear that the K_m of hSGLT1 is insensitive to temperature and that a low E_a of 11.0 kcal . mol⁻¹ can be calculated from the V_{max} data. Clearly, the picture is quite different from that observed in rabbit jejunal BBMVs [13] and discussed earlier, so that the important conclusion to be drawn from such a comparison is that closely related proteins may show very different responses to temperature. Accordingly, the temperature dependence (or the lack thereof) of the kinetic parameters and the E_a values estimated from them may essentially reflect a property of the kinetic mechanism itself. Indeed, Loo et al. [34] have shown salient differences in the rate constant values characterizing a similar kinetic mechanism of sugar transport through hSGLT1 and rSGLT1. Accordingly, it may be quite difficult to assume, from the similar E_a values implicated in a full catalytic cycle leading to glucose transport

through the HAG and LAG pathways in the kidney (Fig. 7A), that the two transport routes would correspond to SGLT1 and SGLT2 (there is only 59% or 76% identity between Hu14/hSGLT2 and hSGLT1 [25,68] or pSGLT2 and pSGLT1 [35], respectively). Rather, our temperature studies demonstrate a higher increase with temperature of the kinetic efficiency (V/K ratio) of LAG as compared to HAG. In the dimeric model of cotransport proposed by Chenu and Berteloot [13], this behavior could be interpreted as a decrease with increasing temperatures in the negative cooperativity associated with glucose binding to the subunits.

4) Summary and general conclusions

In conclusion, when taken individually, the results presented in this paper do not allow to resolve conclusively the issue as to whether SGLT in the whole kidney cortex results from the expression in the proximal tubule of two independent transporters (rSGLT1 and rSGLT2) or from the expression of a unique transporter (rSGLT1) showing allosteric kinetics. When taken altogether, however, they do point out to a number of inconsistencies as to: i) the kinetic parameters of rSGLT1 expression in the small intestine [13] and cRNA-injected oocytes [45,66] as compared to the kidney (this study), and ii) the substrate specificity and the phlorizin inhibition characteristics usually associated with SGLT1 and SGLT2 activities [25,35,59-61]. One is thus left with either of the following two alternatives which are not necessarily mutually exclusive: i) rSGLT1 and rSGLT2 are coexpressed in renal BBMVs but structural similarities [35] give them a number of overlapping functional characteristics; ii) rSGLT1 activity is somehow modulated, for example through association with (a) regulatory subunit(s) as would be compatible with the studies of Koepsell's group [30,66], such as to mask rSGLT2 expression. The first consideration may be difficult to reconcile with the conclusion that two closely related proteins like hSGLT1 and rSGLT1 present very different behaviour relative to temperature effects in the small intestine when the HAG and LAG pathways show similar E_a for a full catalytic cycle in the kidney. The second consideration, however, in conjunction with the dimeric structure proposed by Koepsell et al. [29-30] and the kinetic features of the dimeric model proposed by Chenu and Berteloot [13], could well account for the results presented in these studies, as discussed above for each experiment. Still, the presence of (a) regulatory subunit(s) may complicate quite significantly the above picture since the binding of the subunit(s) to a dimeric SGLT1 may not be stoichiometric [30,66]. It can thus be suggested that such a heteroassociation might also contribute quite significantly to sugar transport heterogeneity in the kidney proximal tubule.

FOOTNOTES

1. The abbreviations used are: AMG: α -methylglucose; BBM: brush border membrane; BBMV: brush border membrane vesicles; BCA: bicinchoninic acid; EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid; FSRFA: fast-sampling, rapid-filtration apparatus; HAG: high affinity glucose; HAP: high affinity phlorizin; HEPES: N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]; LAG: low affinity glucose; LAP: low affinity phlorizin; SER: standard error of regression; SGLT: Na⁺/D-glucose cotransport; Tris: tris[hydroxymethyl]aminomethane.
2. At a holding potential of -50 mV, the K_m of α -methylglucose transport is 1.7 mM and a substrate concentration of 20 mM induced a current of 560 nA [28]. A I_{max} value of 608 nA can thus be calculated from the Michaelis-Menten Equation (2)

$$\frac{I_{max} * 20}{1.7 + 20} = 560 \quad (2)$$

In the same oocyte and at the same holding potential, 20 mM galactose induced a current of 30 nA, so that a K_m of 385 mM can be estimated for galactose transport from the Michaelis-Menten Equation (3)

$$\frac{608 * 20}{K_m + 20} = 30 \quad (3)$$

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by grant MT-7607 from the Medical Research Council of Canada. N.O. was supported by a fellowship from the GRTM. The technical assistance of Mrs. C. Leroy has been greatly appreciated.

REFERENCES

1. Barfuss, D.W., and Schafer, J. 1981. Differences in active and passive glucose transport along the proximal nephron. *Am. J. Physiol.* **240**: F322-F332
2. Béliveau, R., Demeule, M., Ibnoul, K.H., Bergeron, M., Beaugard, G., and Potier, M. 1988. Radiation-inactivation studies on brush-border-membrane vesicles. General considerations and application to the glucose and phosphate carriers. *Biochem. J.* **252**: 807-813
3. Berteloot, A. 1984. Characteristics of glutamic acid transport by rabbit intestinal brush-border membrane vesicles. Effect of Na⁺-, K⁺-, and H⁺-gradients. *Biochim. Biophys. Acta* **775**: 129-140
4. Berteloot, A. 1986. Highly permeant anions and glucose uptake as an alternative for quantitative generation and estimation of membrane potential differences in brush-border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **857**: 180-188
5. Berteloot, A., Malo, C., Breton, S., and Brunette, M. 1991. A fast sampling, rapid filtration apparatus: principal characteristics and validation from studies of D-glucose transport in human jejunal brush-border membrane vesicles. *J. Membrane Biol.* **122**: 111-125
6. Berteloot, A., and Semenza, G. 1990. Advantages and limitations of vesicles for the characterization and kinetic analysis of transport systems. *Meth. Enzymol.* **192**: 409-437
7. Birnir, B., Loo, D.D., and Wright, E.M. 1991. Voltage-clamp studies of the Na⁺/glucose cotransporter cloned from rabbit small intestine. *Pflügers Arch.* **418**: 79-85
8. Blank, M.E., Bode, F., Baumann, K., and Diedrich, D.F. 1989. Computer analysis reveals changes in renal Na⁺-glucose cotransporter in diabetic rats. *Am. J. Physiol.* **257**: C385-C396
9. Brasitus, T.A., Schachter, D., and Mamounas, T.G. 1979. Functional interactions of lipids and proteins in rat intestinal microvillus membranes. *Biochemistry* **18**: 4136-4144
10. Brot-Laroche, E., Serrano, M., Delhomme, B., and Alvarado, F. 1986. Temperature sensitivity and substrate specificity of two distinct Na⁺-activated D-glucose transport systems in guinea pig jejunal brush border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* **261**: 6168-6176
11. Centelles, J.J., Kinne, R.K.H., and Heinz, E. 1991. Energy coupling of Na⁺/glucose cotransport. *Biochim. Biophys. Acta* **1065**: 239-249

12. Chen, X.-Z., Coady, M.J., Jackson, F., Berteloot, A., and Lapointe, J.-Y. 1995. Thermodynamic determination of the Na⁺:glucose coupling ratio for the human SGLT1 cotransporter. *Biophys. J.* **69**: 2405-2414
13. Chenu, C., and Berteloot, A. 1993. Allosterism and Na⁺-D-glucose cotransport kinetics in rabbit jejunal vesicles: compatibility with mixed positive and negative cooperativities in a homo-dimeric or tetrameric structure and experimental evidence for only one transport protein involved. *J. Membrane. Biol.* **132**: 95-113
14. Coady, M.J., Pajor, A.M., and Wright, E.M. 1990. Sequence homologies among intestinal and renal Na⁺/glucose cotransporters. *Am. J. Physiol.* **259**: C605-C610
15. Crane, R.K. 1977. The gradient hypothesis and other models of carrier-mediated active transport. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **78**: 99-159
16. Desjeux, J.-F. 1995. Congenital selective Na⁺, D-glucose cotransport defect leading to renal glucosuria and congenital selective intestinal malabsorption of glucose and galactose. *In: The Metabolic Basis of Inherited Diseases*. C.R. Scriver, editor. pp. 3563-3580. McGraw-Hill, New York
17. De Smedt, H., and Kinne, R. 1981. Temperature dependence of solute transport and enzyme activities in hog renal brush border membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **648**: 247-253
18. Dorando, F.C., and Crane, R.K. 1984. Studies of the kinetics of Na⁺ gradient-coupled glucose transport as found in brush-border membrane vesicles from rabbit jejunum. *Biochim. Biophys. Acta* **772**: 273-287
19. Gerardi-Laffin, C., Delque-Bayer, P., Sudaka, P., and Poirée, J.C. 1993. Oligomeric structure of the sodium-dependent phlorizin binding protein from kidney brush-border membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1151**: 99-104
20. Harig, J.M., Barry, J.A., Rajendran, V.M., Soergel, K.H., and Ramaswamy, K. 1989. D-glucose and L-leucine transport by human intestinal brush-border membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* **256**: G618-G623
21. Hediger, M.A., Coady, M.J., Ikeda, T.S., and Wright, E.M. 1987. Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose cotransporter. *Nature* **330**: 379-381

22. Hediger, M.A., Turk, E., and Wright, E.M. 1989. Homology of the human intestinal Na⁺/glucose and *E. coli* Na⁺/proline cotransporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 5748-5752
23. Hilden, S., and Sacktor, B. 1982. Potential-dependent D-glucose uptake by renal brush border membrane vesicles in the absence of sodium. *Am. J. Physiol.* **242**: F340-F345
24. Horster, M.F., and Stopp, M. 1986. Transport and metabolic functions in cultured renal tubule cells. *Kidney Int.* **29**: 46-53
25. Kanai, Y., Lee, W.S., You, G., Brown, D., and Hediger, M.A. 1994. The human kidney low affinity Na⁺/glucose cotransporter SGLT2. *J. Clin. Invest.* **93**: 397-404
26. Kimmich, G.A. 1990. Membrane potentials and the mechanism of intestinal Na⁺-dependent sugar transport. *J. Membrane Biol.* **114**: 1-27
27. Kinne, R., Murer, H., Kinne-Saffran, E., Thees, M., and Sachs, G. 1975. Sugar transport by renal plasma membrane vesicles. *J. Membrane Biol.* **21**: 375-396
28. Kippen, N., Hirayama, B., Klinenberg, J.R., and Wright, E.M. 1979. Transport of p-aminohippuric acid, uric acid and glucose in highly purified rabbit renal brush border membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **556**: 161-174
29. Koepsell, H., Fritsch, G., Korn, K., and Madrala, A. 1990. Two substrate sites in the renal Na⁺-D-glucose cotransporter studied by model analysis of phlorizin binding and D-glucose transport measurements. *J. Membrane Biol.* **114**: 113-132
30. Koepsell, H., and Spangenberg, J. 1994. Function and presumed molecular structure of Na⁺-D-glucose cotransport systems. *J. Membrane Biol.* **138**: 1-11
31. Kong, C-T., Yet, S-F., and Lever, J.E. 1993. Cloning and expression of a mammalian Na⁺/amino acid cotransporter with sequence similarity to Na⁺/glucose cotransporters. *J. Biol. Chem.* **268**: 1509-1512
32. Lescale-Matys, L., Dyer, J., Scott, D., Freeman, T.C., Wright, E.M., and Shirazi-Beechey, S.P. 1993. Regulation of the ovine intestinal Na⁺/glucose co-transporter (SGLT1) is dissociated from mRNA abundance. *Biochem. J.* **291**: 435-440
33. Lever, J.E. 1986. Expression of differentiated functions in kidney epithelial cell lines. *Miner. Electrol. Metab.* **12**: 14-1934.
34. Loo, D.D.F., Hazama, A., Supplisson, S., Turk, E., and Wright, E.M. 1993. Relaxation kinetics of the Na⁺/glucose cotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 5767-5771

35. Mackenzie, B., Panayotova-Heiermann, M., Loo, D.D.F., Lever, J.E., and Wright, E. 1994. SAAT1 is a low affinity Na⁺/glucose cotransporter and not an amino acid transporter. *J. Biol. Chem.* **269**: 22488-22491
36. Maenz, D.D., Chenu, C., Bellemare, F., and Berteloot, A. 1991. Improved stability of rabbit and rat intestinal brush border membrane vesicles using phospholipase inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* **1069**: 250-258
37. Malo, C. 1993. Ontogeny of Na⁺/D-glucose cotransport in guinea-pig jejunal vesicles: only one system is involved at both 20°C and 35°C. *Biochim. Biophys. Acta* **1153**: 299-307
38. Malo, C., and Berteloot, A. 1991. Analysis of kinetic data in transport studies: new insights from kinetic studies of Na⁺-D-glucose cotransport in human brush-border membrane vesicles using a fast sampling, rapid filtration apparatus. *J. Membrane Biol.* **122**: 127-141
39. Moran, A., Davis, L.J., and Turner, R.J. 1988. High affinity phlorizin binding to the LLC-PK₁ cells exhibits a sodium : phlorizin stoichiometry of 2:1. *J. Biol. Chem.* **263**: 187-192
40. Morrisson, A.I., Panayotova-Heiermann, G., Feigl, B., Schölermann, B., and Kinne, R.K.H. 1991. Sequence comparison of the sodium-D-glucose cotransport systems in rabbit renal and intestinal epithelia. *Biochim. Biophys. Acta* **1089**: 121-123
41. Ohta, T., Isselbacher, K.J., and Rhoads, D.B. 1990. Regulation of glucose transporters in LLC-PK₁ cells: effect of D-glucose and monosaccharides. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 6491-6499
42. Oulianova, N., and Berteloot, A. 1996. Sugar transport heterogeneity in the kidney: two independent transporters or different transport modes through an oligomeric protein? 2. Phlorizin binding studies. *J. Membrane Biol.*, **submitted**
43. Oulianova, N., and Berteloot, A. 1996. Sugar transport heterogeneity in the kidney: two independent transporters or different transport modes through an oligomeric protein? 3. Mechanism of phlorizin binding and implications. *J. Membrane Biol.*, **submitted**
44. Pajor, A.M., Hirayama, B.A., and Wright E.M. 1992. Molecular evidence for two renal Na⁺/glucose cotransporters. *Biochim. Biophys. Acta* **1106**: 216-220
45. Parent, L., Supplisson, S., Loo, D.D.F., and Wright, E.M. 1992. Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter. I. Voltage-clamp studies. *J. Membrane Biol.* **125**: 49-62
46. Parent, L., and Wright, E.M. 1993. Electrophysiology of the Na⁺/glucose cotransporter. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* **48**: 263-281

47. Rabito, C.A. 1986. Sodium cotransport processes in renal epithelial cell lines. *Miner. Electrol. Metab.* **12**: 32-41
48. Reizer, J., Reizer, A., and Saier, M.H.Jr. 1994. A functional superfamily of sodium/solute symporters. *Biochim. Biophys. Acta* **1197**: 133-166
49. Roigaard-Petersen, H., Jacobsen, C., and Iqbal Sheikh, M. 1986. Characteristics of D-galactose transport systems by luminal membrane vesicles from rabbit kidney. *Biochim. Biophys. Acta* **856**: 578-584
50. Scriver, S.R., Chesney, R.W., and McInnes, R.R. 1976. Genetic aspects of renal tubular transport: Diversity and topology of carriers. *Kidney Int.* **9**: 149-171
51. Semenza, G., Kessler, M., Hosang, M., Weber, J., and Schmidt, U. 1984. Biochemistry of the Na⁺-D-glucose cotransporter of the small intestine brush-border membranes: the state of the art in 1984. *Biochim. Biophys. Acta* **779**: 343-379
52. Shirazi-Beechey, S.P., Hirayama, B.A., Wang, Y., Scott, D., Smith, M.W., and Wright, E.M. 1991. Ontogenetic development of lamb intestinal sodium-glucose co-transporter is regulated by diet. *J. Physiol. London* **437**: 699-708
53. Silverman, M. 1991. Structure and function of hexose transporters. *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 757-794
54. Silverman, M., Speight, P., and Ho, L. 1993. Identification of two unique polypeptides from dog kidney outer cortex and outer medulla that exhibit different Na⁺/D-glucose cotransport functional properties. *Biochim. Biophys. Acta* **1153**: 43-52
55. Stevens, B.R., Fernandez, A., Hirayama, B., Wright, E.M., and Kempner, E.S. 1990. Intestinal brush border membrane Na⁺/glucose cotransporter functions in situ as a homotetramer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 1456-1460
56. Takahashi, M., Malathi, P., Preiser, H., and Jung, C.Y. 1985. Radiation inactivation studies on the rabbit kidney sodium-dependent glucose transporter. *J. Biol. Chem.* **260**: 10551-10556
57. Toggenburger, G., Kessler, M., and Semenza, G. 1982. Phlorizin as a probe of the small intestinal Na⁺, D-glucose cotransporter. A model. *Biochim. Biophys. Acta* **688**: 557-571
58. Turk, E., Zabel, B., Mundlos, S., Dyer, J., and Wright, E.M. 1991. Glucose/galactose malabsorption caused by a defect in the Na⁺/D-glucose cotransporter. *Nature* **350**: 354-356
59. Turner, R.J., and Moran, A. 1982. Heterogeneity of sodium-dependent D-glucose transport sites along the proximal tubule: evidence from vesicle studies. *Am. J. Physiol.* **242**: F406-F414

60. Turner, R.J., and Moran, A. 1982. Stoichiometric studies of the renal outer cortical brush border membrane D-glucose transporter. *J. Membrane Biol.* **67**: 73-80
61. Turner, R.J., and Moran, A. 1982. Further studies of proximal tubular brush border membrane D-glucose transport heterogeneity. *J. Membrane Biol.* **70**: 37-45
62. Turner, R.J., and Kempner, E.S. 1982. Radiation inactivation studies of the renal brush-border membrane phlorizin-binding protein. *J. Biol. Chem.* **257**: 10794-10797
63. Turner, R.J., and Silverman, M. 1977. Sugar uptake into brush border vesicles from normal human kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 2825-2829
64. Turner, R.J., and Silverman, M. 1981. Interaction of phlorizin and sodium with the renal brush-border membrane D-glucose transporter: stoichiometry and order of binding. *J. Membrane Biol.* **58**: 43-55
65. Umbach, J.A., Coady, M.J., and Wright, E.M. 1990. Intestinal Na⁺/glucose cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes is electrogenic. *Biophys. J.* **57**: 1217-1224
66. Veyhl, M., Spangenberg, J., Puschel, B., Poppe, R., Dekel, C., Fritzsche, G., Haase, W., and Koepsell, H. 1993. Cloning of a membrane-associated protein which modifies activity and properties of the Na⁺-D-glucose cotransporter. *J. Biol. Chem.* **268**: 25041-25053
67. Vinay, P., Senecal, J., Noël, J., Chirinian, C., Vinay, M.C., Ammann, H., Boulanger, Y., Gougoux, A., and Berteloot, A. 1991. Basolateral glucose transport in distal segments of the dog nephron. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **69**: 964-977
68. Wells, R.G., Pajor, A.M., Kanai, Y., Turk, E., Wright, E.M., and Hediger, M.A. 1992. Cloning of a human cDNA with similarity to the sodium-glucose cotransporter. *Am. J. Physiol.* **263**: F459-F465
69. Wright, E.M. 1993. The intestinal Na⁺/glucose cotransporter. *Annu. Rev. Physiol.* **55**: 575-589
70. Wright, E.M., Turk, E., Zabel, B., Mundlos, S., and Dyer, J. 1991. Molecular genetics of intestinal glucose transport. *J. Clin. Invest.* **88**: 1435-1440
71. You, G., Lee, W.-S., Barros, E.J.G., Kanai, Y., Huo, T.-L., Khawaja, S., Wells, R.G., Nigam, S.K., and Hediger, M.A. 1995. Molecular characteristics of Na⁺-coupled glucose transporters in adult and embryonic rat kidney. *J. Biol. Chem.* **270**: 29365-29371

LEGENDS TO TABLES

- Table 1:** Kinetic parameters of SGLT transport at 20°C in rabbit renal BBMV isolated from the whole kidney cortex. Values shown were determined from the data presented in Fig. 1.
- Table 2:** Kinetic parameters of glucose and galactose transport at 25°C in rabbit renal BBMV isolated from the whole kidney cortex. Values shown were determined from the data presented in Fig. 3.
- Table 3:** Effects of phlorizin on the kinetic parameters of SGLT transport at 25°C in rabbit renal BBMV isolated from the whole kidney cortex. Values shown were determined from the data presented in Fig. 4.
- Table 4:** Kinetic parameters of SGLT transport at 15 and 30°C in rabbit renal BBMV isolated from the whole kidney cortex. Experimental conditions were as described in the legend to Fig. 1, and kinetic parameters were estimated by nonlinear regression analysis as indicated in the text.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1: SGLT heterogeneity in renal BBMV at 20°C. BBMV were resuspended in 50 mM HEPES-Tris buffer (pH 7.0) containing 0.1 mM MgSO₄, 300 mM mannitol, and 200 mM KI. The uptake medium contained (final concentrations): 50 mM HEPES-Tris buffer (pH 7.0), 0.1 mM MgSO₄, 0.5 mM amiloride, 100 mM mannitol, 50 mM KI, 150 mM NaI, 4 μM D-(³H)glucose, and 0-200 mM glucose. Osmolarity was kept constant by varying mannitol concentrations to satisfy a total concentration of glucose + mannitol of 200 mM. Values shown are the mean initial rates ± SER determined from 5 uptake time course recorded at each substrate concentration as described in the text. (○) and (●) represent two independent experiments. Missing error bars were smaller than the symbol size. The full lines shown are the best-fit curves corresponding to the two-site model, and the dashed-lines represent the 95% confidence interval of the regressions. All kinetic parameters are given in Table 1. Inset: Eadie-Hoffstee plot of the carrier-mediated component of SGLT constructed from the nonlinear regression analysis of the pooled data with kinetic parameters as given in Table 1. Dashed-lines represent the individual contribution of the HAG and LAG transport pathways to total transport. Error bars were voluntarily omitted for clarity of the figure.

Figure 2: Transport heterogeneity and Na⁺-independent glucose transport. BBMV were resuspended as described in the legend to Fig. 1. The uptake media contained (final concentrations): 50 mM HEPES-Tris buffer (pH 7.0), 0.1 mM MgSO₄, 0.5 mM amiloride, 50 mM KI, 4.24 μM D-(³H)glucose, and either 100 mM mannitol, 200 mM glucose and 150 mM NaI (●) or 300 mM mannitol and 150 mM choline iodide (○). Ten uptake time course were recorded at 20 °C under each of these experimental conditions. The linear regression lines ($y = a \cdot t + b$) shown are the best-fit lines over all individual data points in each experiment. Regression parameters: a (pmol · s⁻¹ · mg⁻¹ protein), 0.0356 ± 0.0045 (●), 0.0423 ± 0.0030 (○); and b (pmol · mg⁻¹ protein), 0.236 ± 0.026 (●), 0.257 ± 0.017 (○).

- Figure 3:** Heterogeneity of Na⁺-D-Galactose cotransport in renal BBMV at 25°C. Experimental conditions were as described in the legend to Fig. 1 (●) or galactose was substituted for glucose in the uptake media (○). Values shown are the mean initial rates ± SER determined from 5 uptake time courses recorded at each substrate concentration as described in the text. Error bars were smaller than the symbol size. Lines shown are the best-fit curves corresponding to the two-site model. All kinetic parameters are given in Table 2. Inset: Eadie-Hoffstee plot of the carrier-mediated components of glucose (●) and galactose (○) transport.
- Figure 4:** Phlorizin inhibition of SGLT in renal BBMV at 25 °C. Experimental conditions were as described in the legend to Fig. 1 except that phlorizin concentrations of 0 (●), 1 (○), 10 (▲), and 50 (◆) μM were added to the uptake media. Values shown are the mean initial rates ± SER determined from 4 uptake time courses recorded at each substrate concentration as described in the text. Error bars were smaller than the symbol size. Lines shown are the best-fit curves corresponding to the two-site model. All kinetic parameters are given in Table 3. Inset: Eadie-Hoffstee plot of the carrier-mediated component of SGLT.
- Figure 5:** Mechanism of SGLT inhibition by phlorizin. The kinetic parameters V_{max} given in Table 3 were plotted against phlorizin concentrations. The linear regression lines and 95% confidence intervals shown demonstrate that phlorizin has no effect on the V_{max} of the HAG (●) and LAG (○) transport pathways, thus indicating the competitive nature of transport inhibition through both pathways.
- Figure 6:** K_i determination of SGLT inhibition by phlorizin. The kinetic parameters K_m given in Table 3 were plotted against phlorizin concentrations. The linear regression lines shown are the best-fit lines corresponding to Equation (1) in the text, and the identical intercepts of these lines on the x axis demonstrate that the HAG (●, full line) and LAG (○, dotted line) transport pathways are inhibited with equal potency by phlorizin. Estimated K_i values are given in the text.

Figure 7: Temperature effects on glucose transport through the HAG (●), LAG (○), and diffusional (Δ) pathways in renal BBMV. Arrhenius plots were constructed for the V_{\max} (A), and K_m and k_D (B) values given in Tables 1-4. The slope of the linear regression lines shown allow to calculate the energies of activation (E_a) given in the text (slope = $-E_a/2.3R$).

TABLE 1

Kinetic parameters	Experiment 1	Experiment 2	Pooled data
V_{max1} ($\mu\text{mol. s}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)	14.7 ± 1.5	20.5 ± 4.0	17.1 ± 2.4
K_{m1} (μM)	54 ± 6	68 ± 12	60 ± 8
V_{max2} ($\mu\text{mol. s}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)	147 ± 21	95 ± 23	119 ± 22
K_{m2} (mM)	2.7 ± 0.5	2.0 ± 0.8	2.3 ± 0.6
k_D ($\mu\text{mol. s}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein. mM}^{-1}$)	5.3 ± 1.4	9.2 ± 1.7	7.7 ± 1.6

TABLE 2

Kinetic parameters	SUBSTRATE	
	Glucose	Galactose
V_{max1} ($\mu\text{mol. s}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)	56 \pm 7	65 \pm 4
K_{m1} (μM)	99 \pm 11	384 \pm 16
V_2 ($\mu\text{mol. s}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)	546 \pm 49	633 \pm 95
K_{m2} (mM)	2.7 \pm 0.5	21.1 \pm 4.9
k_D ($\mu\text{mol. s}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein. mM}^{-1}$)	16.7 \pm 4.2	14.5 \pm 2.7

TABLEAU 3

Kinetic parameters	[Phlorizin] (μM)						
	0	0.5	1	5	10	30	50
$V_{\text{max}1}$ ($\text{pmol. s}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)	51 \pm 9	42 \pm 9	42 \pm 10	33 \pm 10	42 \pm 10	36 \pm 15	44 \pm 12
K_{s1} (μM)	119 \pm 19	130 \pm 26	120 \pm 28	122 \pm 33	234 \pm 44	390 \pm 130	447 \pm 102
$V_{\text{max}2}$ ($\text{pmol. s}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)	515 \pm 49	433 \pm 43	545 \pm 45	556 \pm 134	586 \pm 57	503 \pm 57	528 \pm 89
K_{s2} (mM)	3.6 \pm 0.7	3.6 \pm 0.7	3.2 \pm 0.6	4.5 \pm 1.5	6.1 \pm 1.1	9.1 \pm 2.4	15.6 \pm 5.4
k_D ($\text{pmol. s}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein. mM}^{-1}$)	25.7 \pm 1.3	24.3 \pm 1.4	23.8 \pm 1.3	34.0 \pm 4.8	20.7 \pm 1.0	21.8 \pm 1.2	23.4 \pm 1.8

TABLE 4

Kinetic parameters	TEMPÉRATURE	
	15 °C	30 °C
V_{max1} ($\mu\text{mol. s}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)	4.1 \pm 0.3	365 \pm 87
K_{m1} (μM)	29 \pm 3	311 \pm 38
V_{max2} ($\mu\text{mol. s}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)	49 \pm 10	1457 \pm 139
K_{m2} (mM)	3.2 \pm 0.8	3.1 \pm 1.1
k_D ($\mu\text{mol. s}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein. mM}^{-1}$)	3.6 \pm 0.4	17.8 \pm 1.3

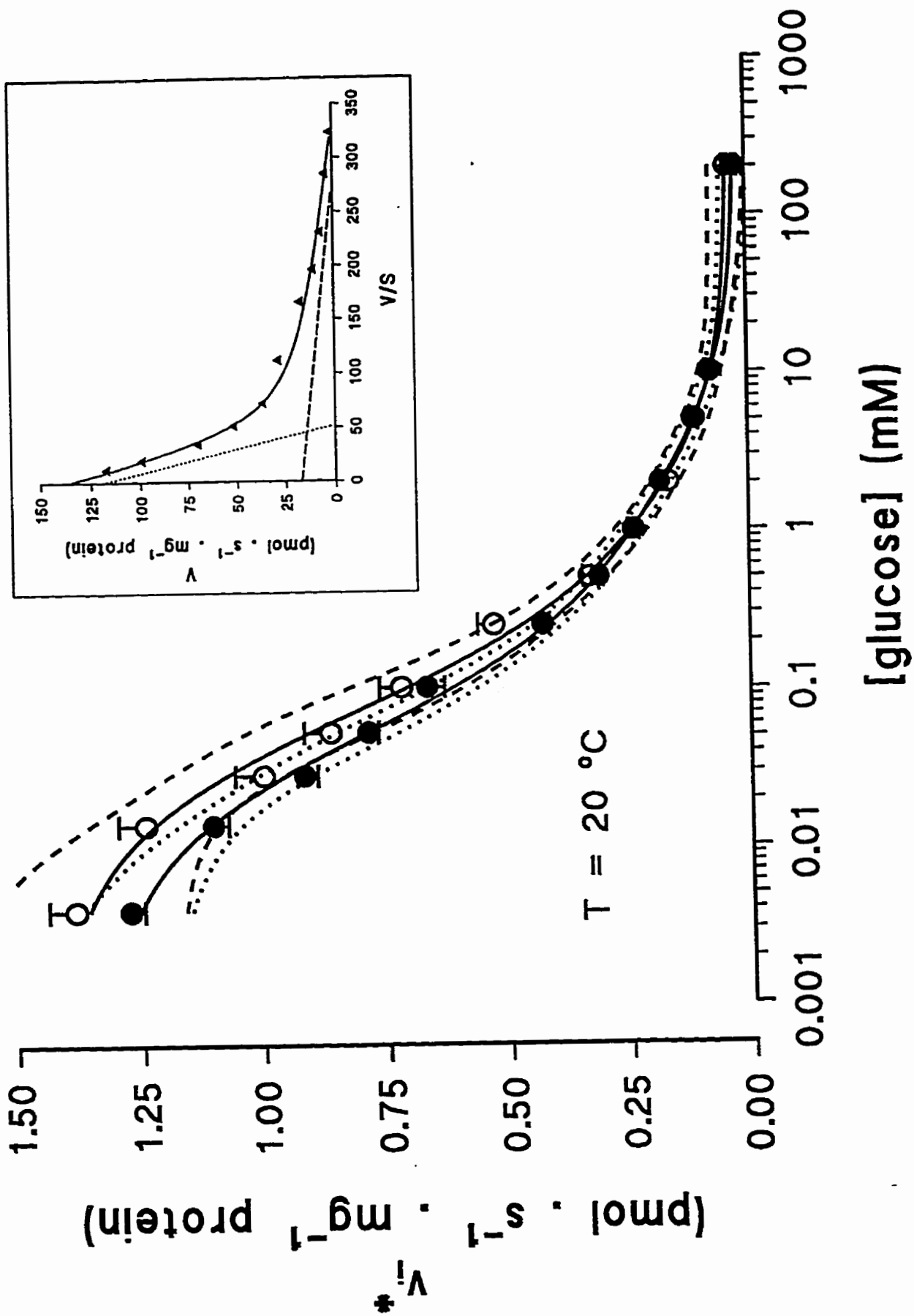


Figure 1.

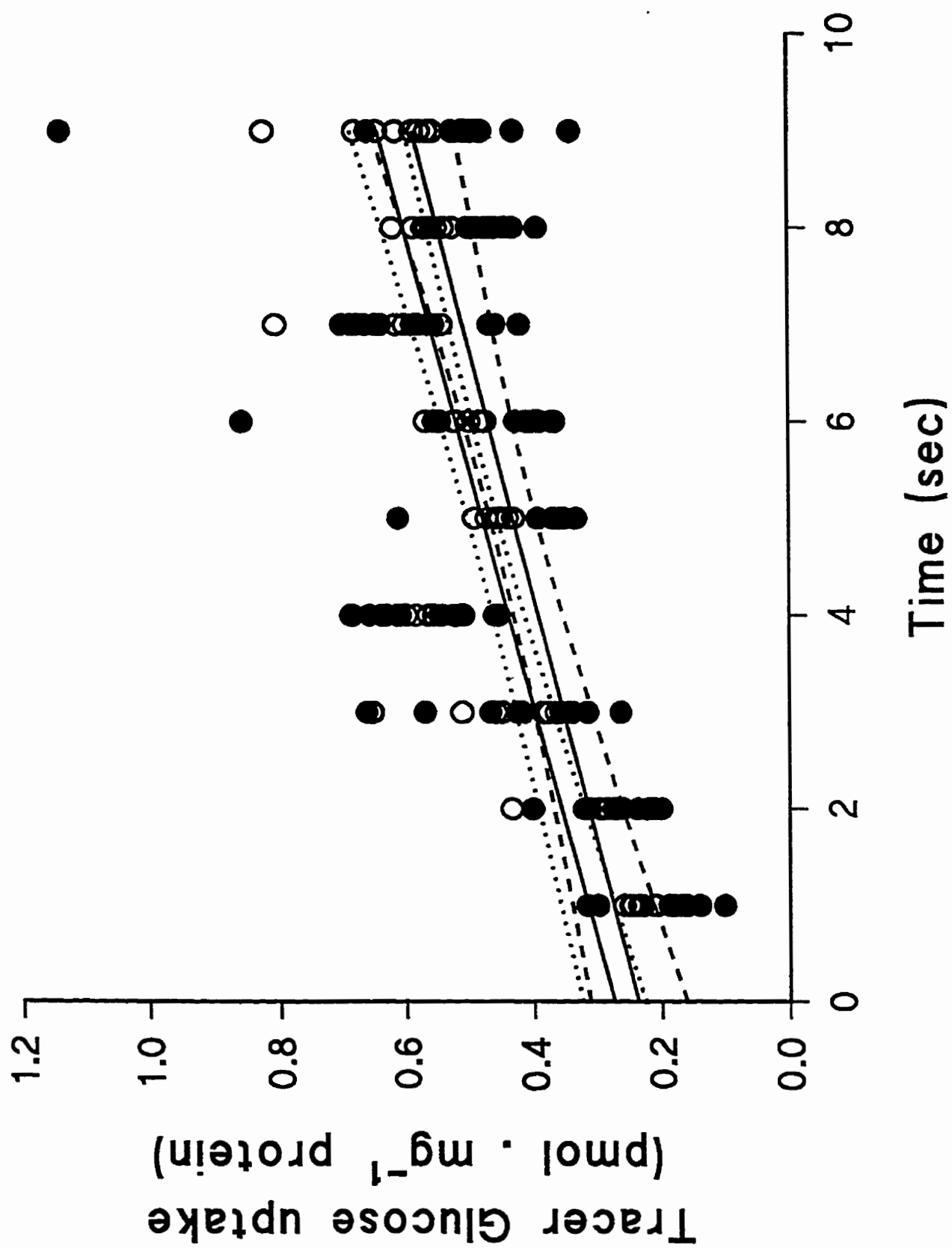


Figure 2.

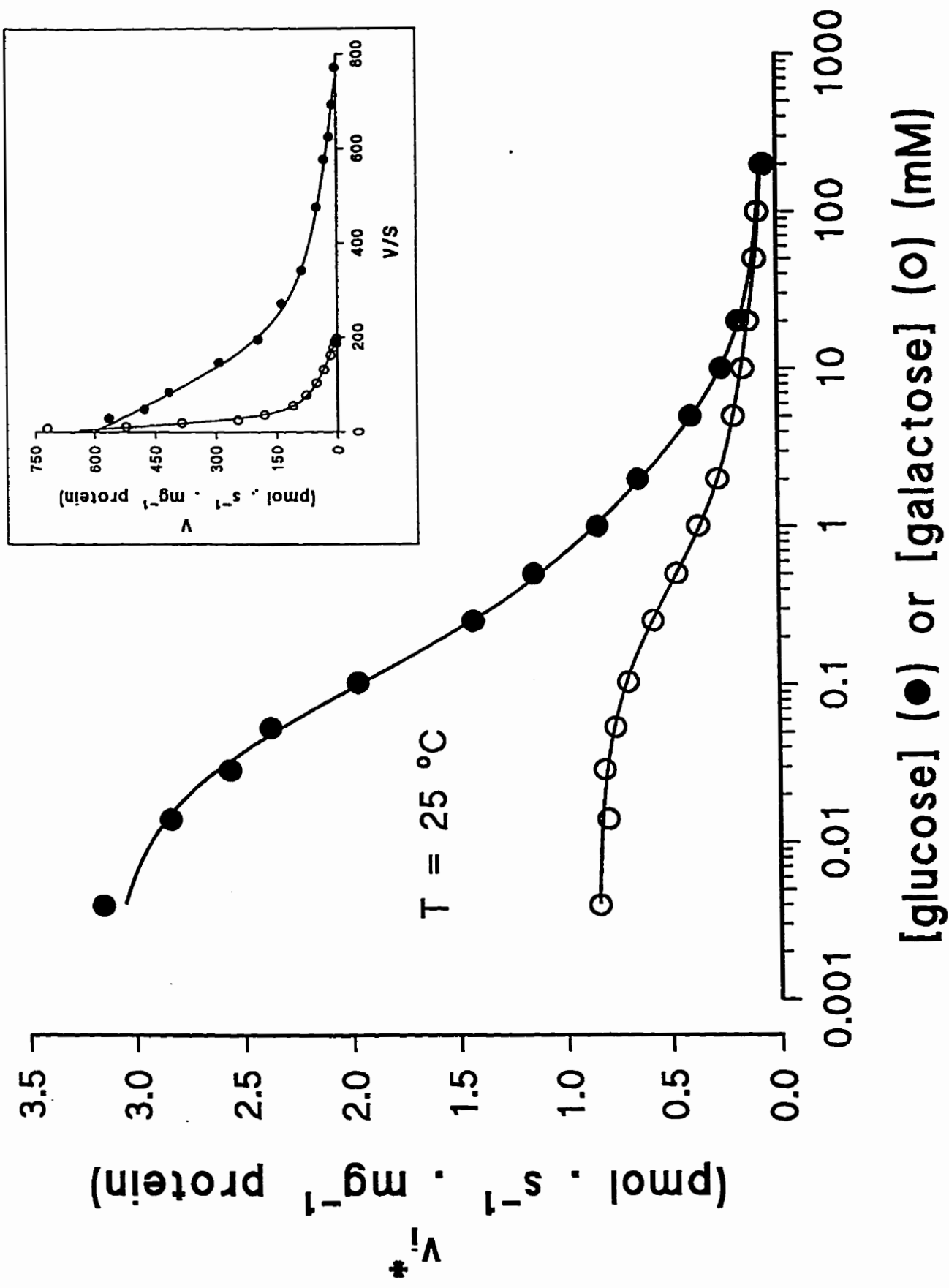


Figure 3.

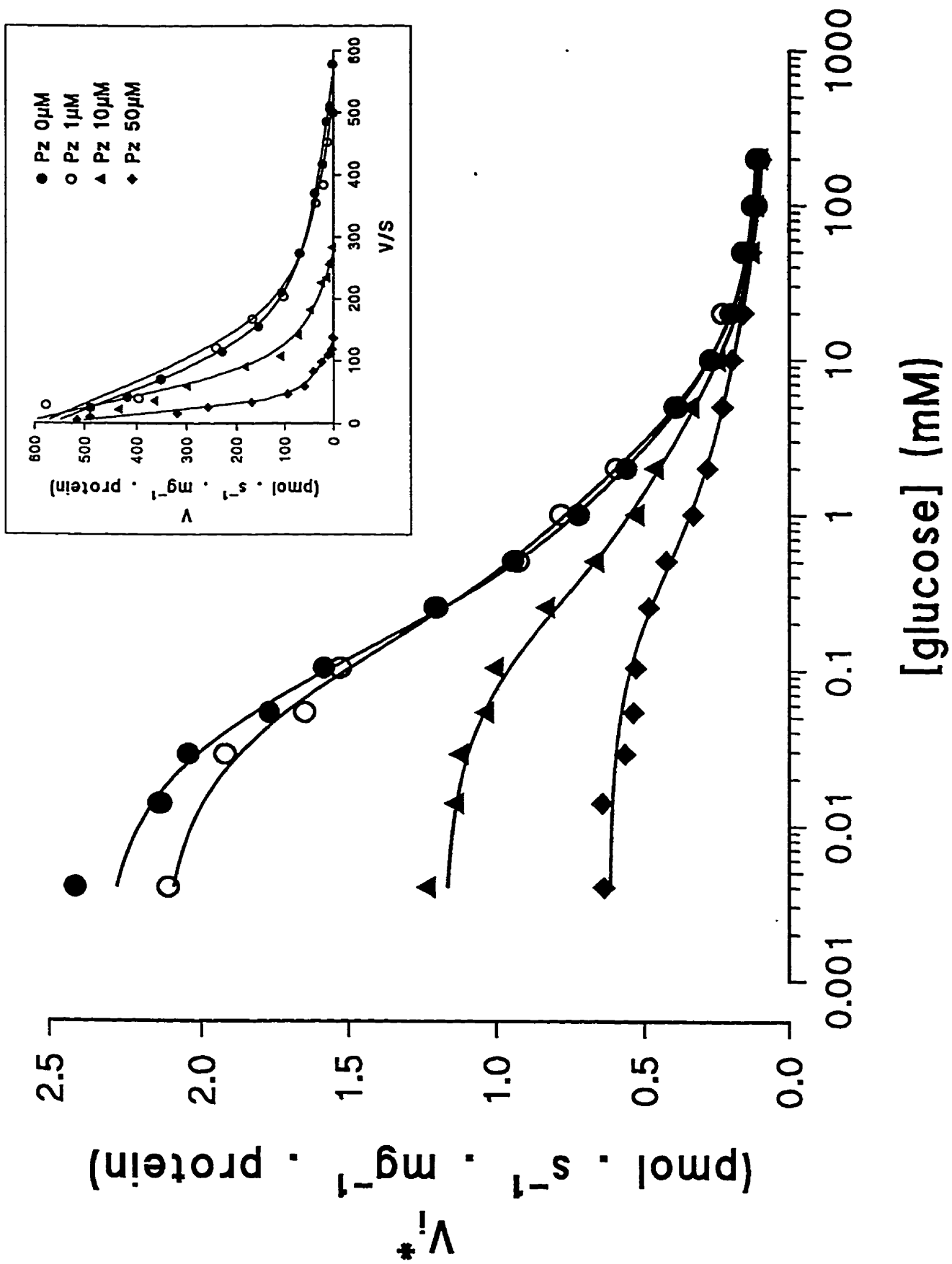


Figure 4.

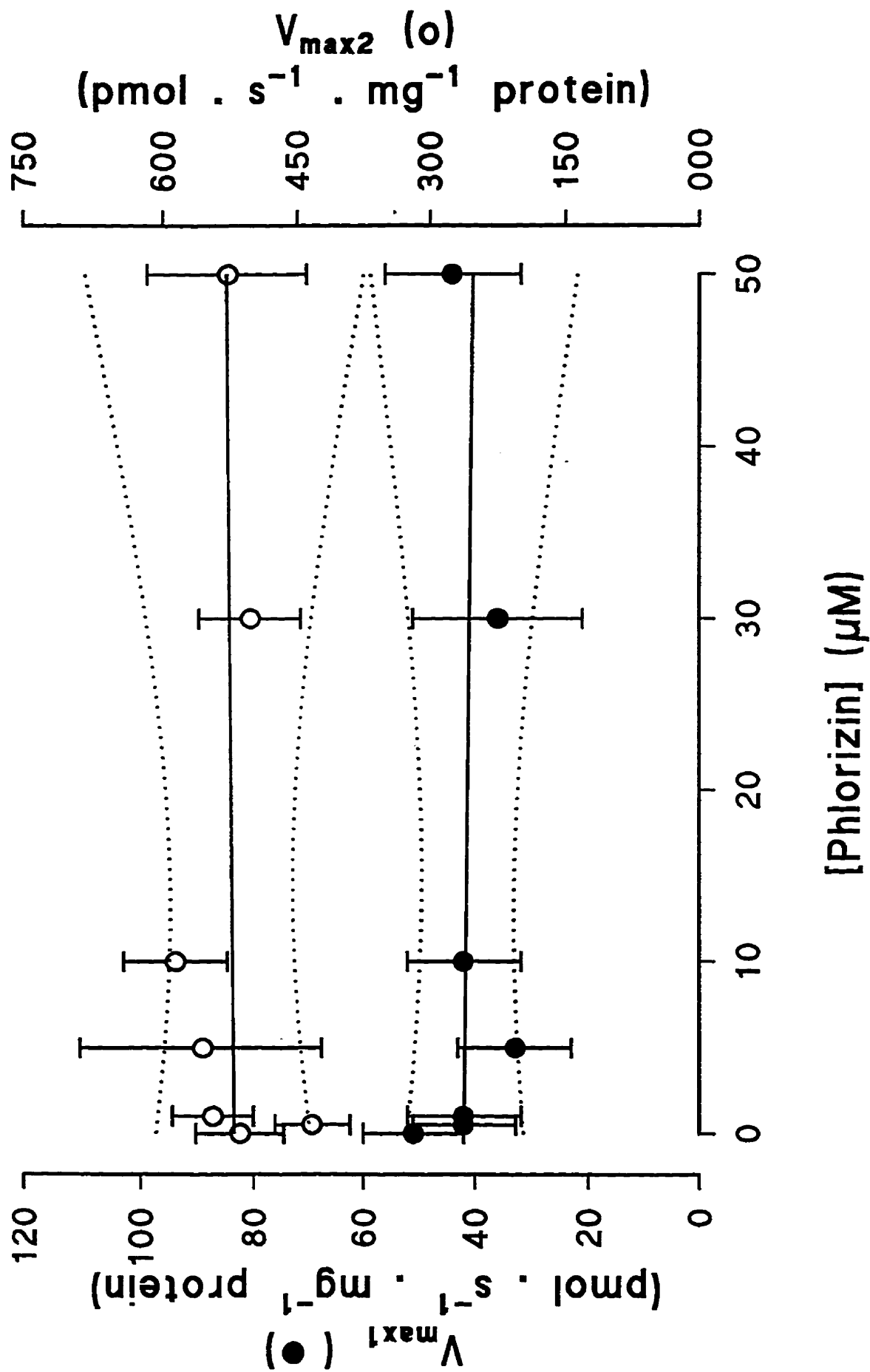


Figure 5.

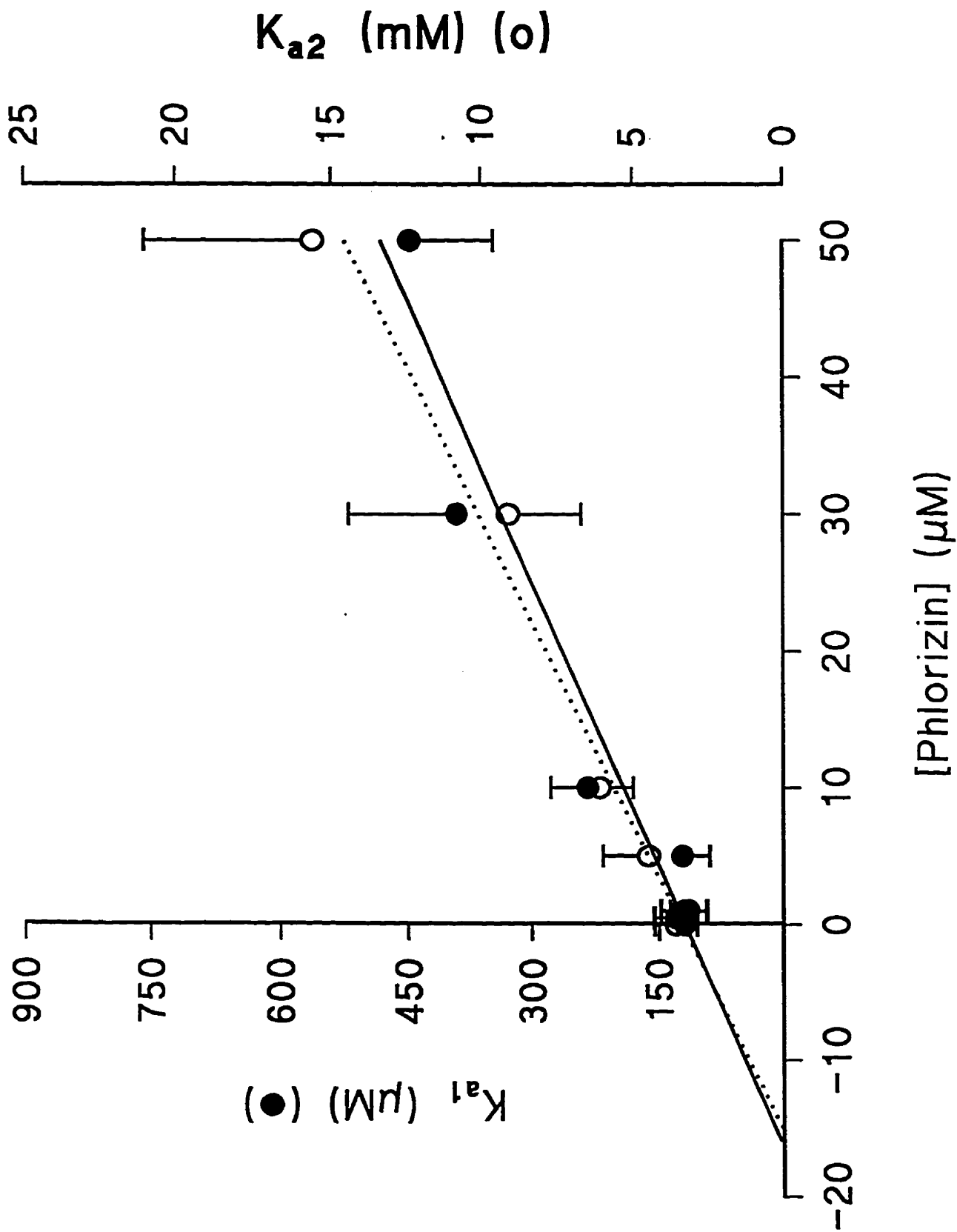
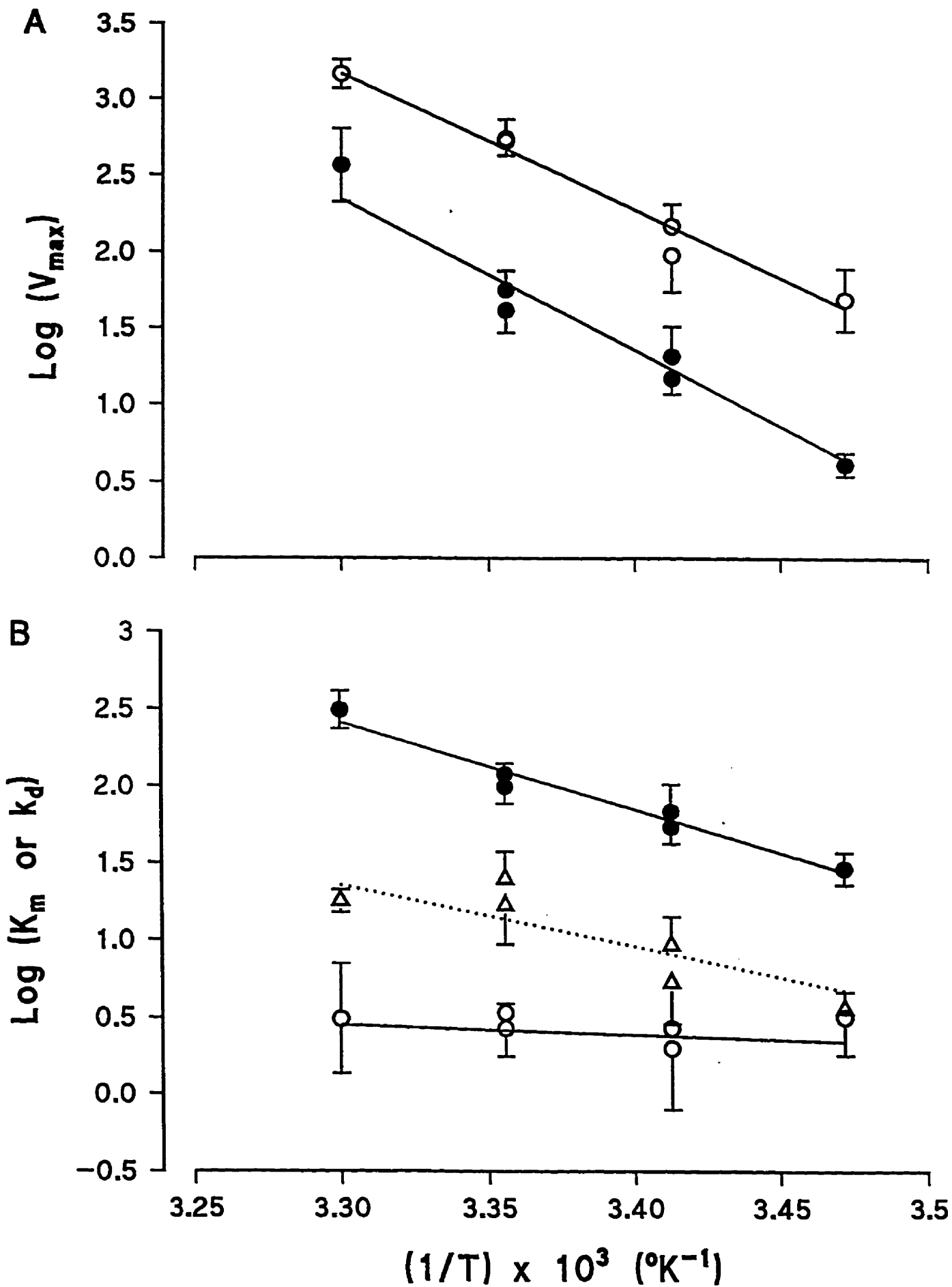


Figure 6.



CHAPITRE III: Article deux: "Sugar transport heterogeneity in the kidney: two independent transporters or different transport modes through an oligomeric protein ? 2. Phlorizin binding studies"

**SUGAR TRANSPORT HETEROGENEITY IN THE KIDNEY:
TWO INDEPENDENT TRANSPORTERS OR DIFFERENT
TRANSPORT MODES THROUGH AN OLIGOMERIC PROTEIN ?
2. PHLORIZIN BINDING STUDIES**

by

Nathalie OULIANOVA, and Alfred BERTELOOT*

Address: Membrane Transport Research Group
Department of Physiology
Faculty of Medicine
Université de Montreal
CP 6128, succursale "Centre-Ville"
Montreal (Québec) Canada H3C 3J7

Phone: (514)-343-5634

Fax: (514)-343-2111

(*): To whom correspondence and reprint requests should be addressed

RUNNING TITLE: PHLORIZIN BINDING IN THE KIDNEY

KEY WORDS: Na⁺-dependent sugar transport; phlorizin binding; allosteric kinetics; membrane vesicles (rabbit kidney)

ABSTRACT

The kinetics of phlorizin binding were reevaluated in rabbit renal brush border membrane vesicles isolated from the whole kidney cortex using a fast-sampling, rapid-filtration apparatus (FSRFA, US patent # 5,330,717) for uptake measurements. Because phlorizin is a weak acid with pK_a value of 7.31 ± 0.04 as determined under the conditions of the present experiments, binding studies were performed at pH 6.0 and 8.6 to isolate up to 95% of the phlorizin molecule under its neutral (HPz) and ionized (Pz⁻) forms, respectively. It is demonstrated that: i) HPz and Pz⁻ binding are slow processes, so that up to 5 min incubation are required to reach a steady-state (equilibrium binding); ii) at equilibrium, both forms of phlorizin bind with high affinity (K_d of 2.2 ± 0.2 and 5.2 ± 0.4 μ M for HPz and Pz⁻, respectively) to a similar number of Na⁺ and D-glucose sensitive binding sites (60-90 pmol.mg⁻¹ protein), thus qualifying to represent (a) Na⁺/D-glucose cotransport (SGLT) protein(s); iii) under initial binding conditions, however, there is a 6-fold increase in the apparent K_d values of HPz and Pz⁻ binding to the SGLT-related sites, and the apparent B_{max} values represent less than 10% of those estimated at equilibrium; iv) the HPz form only also interacts with a high number (about 6 nmol . mg⁻¹ protein at equilibrium) of very low affinity sites (K_d close to 0.5 mM) which appear both Na⁺-independent and glucose-insensitive, thus likely unrelated to any SGLT protein; and v) HPz binding likely involves a Na⁺/H⁺-dependent type of SGLT protein while Na⁺ appears mandatory for Pz⁻ binding. It is concluded that: i) the low affinity binding sites appear homogeneous and may represent phlorizin binding to membrane lipids; ii) the intrinsic affinity of the SGLT system(s) is higher relative to the neutral than to the charged form of the inhibitor and/or binding of the aglucone moiety of phlorizin is favored when its receptor sites on the transporter(s) are protonated; and iii) the results presented in this paper resolve the main conflicting issue as to the one order magnitude difference previously noted between the K_i of phlorizin inhibition of glucose transport and the K_d of phlorizin binding usually reported in the rabbit kidney. The question arises, however, as to what extent could the difference in the K_d values noted under initial vs steady-state conditions represent phlorizin binding on the same or different carrier proteins, and this issue is dealt with in the companion paper.

INTRODUCTION

Genetic defects of Na⁺-dependent D-glucose transport (SGLT)¹ are expressed in intestinal glucose/galactose malabsorption and renal glucosuria, and a minimum of two SGLT genes appear necessary to explain the clinical findings [11,36]. This conclusion is strongly supported by the demonstration that patients with glucose-galactose malabsorption, in which a single point mutation in the SGLT1 cDNA fully accounts for the intestinal defect, do not show glucosuria [41,47]. In agreement with the concept of two independent SGLT systems, the studies of Turner and Moran [42-44] brought evidence for kinetic heterogeneity of SGLT along the rabbit proximal tubule and characterized both high-affinity (HAG) and low-affinity (LAG) glucose transport pathways in brush border membrane vesicles (BBMV) purified from the outer medulla and outer cortex, respectively. Because a cDNA clone has been isolated from the rabbit kidney that shows > 99% identity with the rabbit intestinal SGLT1 (rSGLT1) gene [10,28], it is usually assumed, as also supported by recent indirect evidence [31], that HAG would represent the functional expression of renal rSGLT1 while LAG would characterize the activity of a different gene product (rSGLT2). However, there is some controversy: i) as to which of the three clones recently isolated from human (Hu14-hSGLT2, [20]), pig (SAAT1-pSGLT2, [24]), and rat (rat SGLT2, [48]) kidney cDNA libraries might in fact represent renal SGLT2 activity (see discussion in [24,29,34,48]), and ii) as to whether the kinetic heterogeneity observed in BBMV isolated from the kidney cortex and/or medulla is the unique and direct consequence of molecular diversity [6,8,17,21-22,29].

The latter question was more specifically revisited in recent studies from our group [29] by using rabbit renal BBMV isolated from the whole kidney cortex. Our results confirmed the kinetic heterogeneity of SGLT in this preparation under experimental conditions that failed to reveal similar heterogeneity in equivalent preparations from the rabbit [8] and human [26] jejunum. However, it was also reported [29] that the HAG and LAG transport pathways: i) show similar energies of activation (E_a) for a full catalytic cycle (V_{max}), ii) accept galactose as an alternative substrate, and iii) are inhibited competitively by phlorizin with identical K_i values. The comparisons of HAG expression in rabbit intestinal [8] and renal [29] BBMV, and of SGLT characteristics in renal BBMV [29] vs cRNA-injected oocytes expressing the cloned SGLT1 [32] and SGLT2 [20,24,48] systems, led us to suggest that the kinetic heterogeneity observed in our studies [29] most likely

reflects different transport properties of rSGLT1 rather than coexpression of distinct rSGLT1 and rSGLT2 proteins. Still, because the two hypotheses are not mutually exclusive, it was also realized that the above results alone might not be sufficient to resolve this issue conclusively. Clearly, then, further experiments are needed, and the rationale which led us to perform the studies presented in this and the following [30] papers can be justified from the considerations discussed below.

Quite unexpectedly in view of Turner and Moran's studies [42-44] concluding that high affinity (HAP) and low affinity (LAP) phlorizin binding would characterize the renal LAG and HAG transport pathways, respectively, our results demonstrated that phlorizin inhibits competitively and with equal potency ($K_i = 15 \mu\text{M}$) both transport routes [29]. The experimental evidence which served to establish the notion that the rabbit kidney HAG and LAG pathways should show differential inhibition by phlorizin was thus seriously questioned [29], and it was concluded that Turner and Moran's studies [42-44] might in fact agree rather than conflict with ours. However, it was also noted that our K_i value was within the range of 5-30 μM determined by Toggenburger et al. [40] in rabbit intestinal BBMV, but appeared close to one order of magnitude higher than the K_d values of HAP binding usually recorded in the rabbit [44] and dog [45] kidneys, and in LLC-PK₁ cells [27]. Because the K_d of phlorizin binding in the kidney is usually estimated at equilibrium (incubation times of 5 min or more) while the K_i of SGLT inhibition is determined under initial rate conditions, we further suggested that those conflictory results could just be apparent and either reflect the fact that phlorizin may bind to different conformational states of the transporter(s) under these two sets of experimental conditions or, alternatively, be a direct consequence of the phlorizin binding mechanism itself [29].

These questions are specifically addressed in this and the following [30] papers on an experimental and a more theoretical basis, respectively. It should be emphasized, however, that the following aspects may also need to be considered if one wishes to get a conclusive answer. Firstly, a number of studies established that phlorizin binding to renal and intestinal BBMV is a multi component system involving both HAP and LAP sites, the former only may appear as Na⁺ and glucose specific [1,7,9,13,18,37]. Secondly, phlorizin is a weak acid with estimated pK_a values of 7.2 [15] or 7.4 [39], so that similar amounts of the neutral (HPz) and negatively charged (Pz⁻) forms of the molecule are to be found at physiological pH. Indeed, such a heterogeneity in the phlorizin molecule itself could also contribute quite significantly to the multi component nature of the

phlorizin binding process(es) but, to our knowledge, this problem has never been addressed in full. Lastly, it would appear that the phlorizin binding mechanism itself has not been firmly established yet although: i) the early studies of Diedrich [13-14] and Alvarado [1] suggested that phlorizin binding to SGLT may involve both the glucose and aglucone moieties of the molecule, and ii) in agreement with this view, the more recent studies of Koepsell et al. [21] concluded to a two independent-sites, two-steps mechanism of phlorizin binding. However, neither the heterogeneity of the phlorizin molecule itself nor the characterization of the LAP binding component(s) were addressed in the latter studies.

In this paper, we thus reevaluated the kinetics of phlorizin binding using rabbit renal BBMV isolated from the whole kidney cortex, a fast-sampling rapid-filtration apparatus (FSRFA [4], US patent # 5,330,717) for uptake measurements, and pH conditions of 6.0 and 8.6 which isolate up to 95% of the phlorizin molecule under its HPz and Pz⁻ forms, respectively (see Fig. 1). It is concluded that both forms of phlorizin bind to Na⁺ and D-glucose sensitive sites while the HPz form only also interacts with a high number of very low affinity sites. It is also demonstrated that there is a close to 6-fold difference between the apparent K_d values measured under initial rate and equilibrium conditions. In the following paper [30], it is further shown that this behavior is a characteristic feature of the phlorizin binding mechanism itself, and we both analyze and discuss the implications of this new binding scheme relatively to SGLT transport heterogeneity in the kidney and to the mechanism of glucose transport through SGLT1.

MATERIALS AND METHODS

1) Materials

Rabbits were purchased from the "Ferme de Sélection Cunipur" (St-Valérien, Québec). [Phenyl-3,3',5,5'-³H, propanone-3-³H]-phlorizin (specific activity 47.6 Ci/mmol) was supplied by New England Nuclear (NEN), the BCA (bicinchoninic acid) protein assay kit by Pierce, unlabeled D-glucose by Sigma, phlorizin and ultrapure salts by Aldrich, and amiloride hydrochloride and scintillation cocktail (Beta-Blend) by ICN Biomedicals. Cellulose nitrate filters (12.5 mm diameter, 0.65 µm pore size) were obtained from Micro Filtration Systems (MFS). All other chemicals were of the highest purity available.

2) Preparation of Brush Border Membrane Vesicles

Large batches of renal BBMVs were prepared from the whole kidney cortex of male, 2.0-2.5 kg New-Zealand white rabbits essentially as described in a previous paper [29] regarding glucose transport studies. The P₂ fractions were resuspended in a minimal volume of 50 mM HEPES-Tris buffer (pH 7.0) containing 300 mM mannitol and 0.1 mM MgSO₄, divided into 500 µl aliquots, and frozen in liquid N₂ [8,25]. On the day of use, a suitable number of aliquots of frozen P₂ were thawed and diluted at a 1:10 ratio (w:v) in the resuspension buffers (see composition in the legends to figures) to which was added 3 µM valinomycin to ensure full equilibration of K⁺ [8,25]. BBMVs were prepared as a final P₄ pellet [3] and resuspended in the valinomycin-free resuspension buffers at a protein concentration of 28-35 mg/ml [8] as estimated with the BCA assay kit using bovine serum albumin as a standard. To insure stability of the preparation over the course of the experiment, 45 µl aliquots of BBMVs were frozen in liquid N₂ until the time of assay [8,25].

3) Uptake Assays

Uptake time courses of ³H-phlorizin binding were determined using the automated FSRFA developed in our laboratory [4]. For each assay, 40 µl of BBMVs were thawed, prewarmed, and loaded into the apparatus. Uptake was initiated by injecting the vesicles into 960 µl of the appropriate buffers (see composition in the legends to figures). For kinetic parameter determinations, cold phlorizin concentrations were varied from 0 to 1 mM. Uptakes were performed

in the thermostated chamber of the FSRFA [4] and followed in time by a 18-point automatic sequential sampling of the uptake mixture up to 400 s [9]. At each time point, 50 μ l of the uptake mixture was injected into 1 ml of ice-cold stop solution composed of 50 mM MES-Tris (pH 6.0) or Tris-MES (pH 8.6) buffers containing 0.1 mM MgSO₄, 300 mM mannitol, and 200 mM of either NaCl or KCl for Na⁺- or K⁺- equilibrium conditions, respectively. The stopped mixture was then filtered through 0.65 μ m cellulose nitrate filters, and the filters were washed three times with 1 ml of ice-cold stop solution [4,8]. Phlorizin uptake was then determined by liquid scintillation counting as described previously [8].

4) Absorption spectra of phlorizin

The absorption spectra of phlorizin were recorded on a Shimadzu UV-160 spectrophotometer by varying the wavelength (λ) from 250 to 350 nm. In these experiments, phlorizin was resuspended in 50 mM of the appropriate buffers (MES-Tris at pH 5.5-6.5, HEPES-Tris at pH 6.5-8.0, and Tris-MES at pH 8.0-9.5) containing 0.1 mM MgSO₄, 300 mM mannitol, and 200 mM NaCl.

5) Data analysis

The pK_a of phlorizin dissociation according to pH was estimated by nonlinear regression analysis to Equation (1)

$$OD = \frac{(OD_{\max} - OD_{\min}) 10^u}{1 + 10^u} + OD_{\min} \quad (1)$$

which is easily derived from the definition of K_a ($[Pz^-][H^+]/[HPz]$) and the conservation equation ($[\text{total phlorizin}] = [HPz] + [Pz^-]$). In this equation, OD is the measured optical density at 285 or 320 nm while OD_{max} and OD_{min} represent the maximum and minimum optical densities recorded at each wavelength. The temporary constant u in Equation (1) is equal to (pK_a - pH) or (pH - pK_a) for the data recorded at 285 and 320 nm, respectively.

The uptake time (t) courses of tracer phlorizin binding (B*, pmol . mg⁻¹ protein) were analyzed using Equation (2)

$$B^* = B_0^* + B_e^* (1 - e^{-k_{obs}t}) \quad (2)$$

in which B_0^* represents the y intercept while B_e^* stands for the steady-state level of bound tracer reached with first-order rate constant k_{obs} . The initial rates of tracer binding (B_i^* , pmol . s⁻¹ . mg⁻¹ protein) were determined over the 1-50 s time course of the assays by non linear regression analysis to a second-order polynomial equation [8].

The kinetic parameters of phlorizin binding were estimated by nonlinear regression analysis of the respective displacement curves of tracer (T) by cold substrate (S) according to Equation (3),

$$B^* = \sum_{j=1}^n \frac{B_{maxj} T}{K_{dj} + S + T} + k_D T \quad (3)$$

the derivation of which has been both justified and given in full in a previous paper from our group [8] and assumes the presence of n Michaelis-Menten components working in parallel with a nonspecific process with apparent rate constant k_D . The best model fit to the data is reported in all figures, and a Eadie-Hofstee transformation of the phlorizin-specific process(es) is also presented where appropriate for visual appraisal of the goodness of fit [5,8,26]. The strategy aimed at model discrimination has been described in a former paper from our group [8].

Linear and nonlinear regression analyses were performed using a commercial software (Enzfitter, R.J. Leatherbarrow, copyright 1987, Elsevier-Biosoft). Accordingly, the errors associated with the kinetic parameter values reported in this paper represent the standard errors of regression (SER) on these parameters.

RESULTS

1) pH-dependent interconvertible forms of phlorizin

The interconversion of phlorizin from a neutral (HPz) to a negatively charged (Pz⁻) form upon increasing the pH of the incubation medium from 5.5 to 9.5 is best shown in Fig. 1A by the pH dependence of the absorption spectra of phlorizin: the absorption maximum shifts from 285 nm at pH 5.5 to 320 nm at pH 9.5, and the extinction coefficient increases.

In Fig. 1B, the absorbance of phlorizin at 285 (solid symbols) and 320 nm (open symbols) was plotted against pH for 3 different concentrations of phlorizin. Nonlinear regression analysis of the 6 curves using Equation (1) thus allowed to determine a mean pK_a value of 7.31 ± 0.04 (range 7.25-7.36), a value quite close from that of 7.26 ± 0.06 previously determined for phloretin using a similar approach [16]. It is thus possible to calculate that 95% of the phlorizin molecule can be isolated under its HPz and Pz⁻ forms at pH 6.0 and 8.6, respectively.

2) Binding characteristics of the Pz⁻ form of phlorizin

In a first series of experiments, we measured the time course of tracer Pz⁻ (0.1 μM) binding at pH 8.6 under K⁺ or Na⁺ equilibrium conditions and in the presence or absence of either 1 mM cold phlorizin or 200 mM D-glucose. It is readily apparent from Fig. 2 that the addition of 1 mM Phlorizin under Na⁺ conditions (solid triangles) reduced Pz⁻ binding to the level seen in the K⁺ medium (open circles), and that the presence of 200 mM glucose in the K⁺ medium (open squares) did not modify the uptake time course of tracer Pz⁻ binding as compared to its absence under the same conditions (open circles). Although not shown for clarity in Fig. 2, uptake time courses similar to those recorded under control K⁺ conditions were also observed under Na⁺ and K⁺ conditions following the addition of 200 mM glucose and 1 mM phlorizin to the former and latter media, respectively. These results thus clearly indicate that: i) Pz⁻ binding in the absence of Na⁺ is not a saturable process and does not involve any glucose transporter, and ii) all of the specific Pz⁻ binding is Na⁺-dependent and D-glucose sensitive.

It is also readily apparent from Fig. 2 that the time courses of Pz⁻ binding corresponding to total (Na⁺ control conditions, closed circles) and non specific uptakes (all other conditions shown in Fig. 2) are well described by the first-order rate Equation (2), and the two curves extrapolate to

the same point on the y axis ($B_0^* = 0.070 \pm 0.012$ and 0.074 ± 0.004 pmol . mg⁻¹ protein under Na⁺ control and other conditions, respectively). It can thus be concluded that both of the specific and nonspecific components of Pz⁻ uptake are slow processes that fully equilibrate with similar first-order rate constants within the time range of our analysis ($t_{1/2}$ values of 82 ± 5 and 83 ± 9 s under Na⁺ control and other conditions, respectively). Moreover, from the equilibrium uptake values of the fitted data ($B_e^* = 1.204 \pm 0.025$ and 0.222 ± 0.009 under Na⁻ control and other conditions, respectively), it is possible to calculate that some 82 ± 5 % of total equilibrium Pz⁻ binding may occur on (a) Na⁺-dependent, D-glucose cotransporter(s).

3) Kinetics of Pz⁻ binding

The rather clear-cut characteristics of Pz⁻ binding described in the previous section allow to devise a simple experiment to analyze the kinetics of the Na⁻-dependent, D-glucose-sensitive component of Pz⁻ binding at pH 8.6. In the next series of experiments, we thus monitored the uptake time courses of tracer Pz⁻ binding at various concentrations of added cold phlorizin and, as shown in Fig. 3 for a representative set of phlorizin concentrations, the experimental data were fitted to Equation (2).

This analysis confirmed that the progress curves of Pz⁻ binding can be satisfactorily described by a first-order rate equation and that the B_0^* component of binding is insensitive to phlorizin concentrations with mean value as shown in Table 1. Moreover, Figs. 3 and 4 establish that the B_e^* term (equilibrium binding of tracer Pz⁻) is a saturable function relative to Pz⁻ concentrations. The data set in Fig. 4 is best fitted to Equation (3) when assuming one class only of specific binding sites ($n = 1$) working in parallel with a nonspecific process, and the associated values of the kinetic parameters B_{max} , K_{des} and apparent k_D are given in Table 1.

It would also appear from the visual inspection of Fig. 3 that the initial rates of tracer Pz⁻ binding (B_i^*) are less sensitive to cold phlorizin concentrations than the steady-state plateaus. The B_i^* values were thus estimated directly from the uptake data in Fig. 3 by nonlinear regression analysis to a second-order polynomial over the 0-50 s time range, and it should be noted that the B_0^* component of Pz⁻ binding evaluated by this approach is similar to that previously determined using Equation (2) (see Table 1). As shown in Fig. 5, the initial rate data is also best fitted to Equation (3) when assuming one class only of specific binding sites ($n = 1$) working in parallel with a nonspecific

process, and the associated values of the kinetic parameters B_{\max} , K_d , and apparent k_D are given in Table 1.

The validity of the conclusion as to the presence of a single class of Pz^- binding sites during the steady-state and initial phases of phlorizin binding can be visually appreciated from the Eadie-Hoffstee transformation of these data shown in the insets of Figs. 4 and 5, respectively. Interestingly, comparing the B_e^* and B_i^* data in Table 1, it is readily apparent that the parameters B_{\max} and K_d assume quite different values under initial rate and steady-state conditions.

4) Binding characteristics of the HPz form of phlorizin

Experiments similar to those shown in Fig. 2 were repeated at pH 6.0. In the Na^+ (Fig. 6A) and K^+ (Fig. 6B) media, the time courses of HPz binding could also be well described by the first-order rate Equation (2), and all curves extrapolated to the same point on the y axis ($B_0^* = 0.232 \pm 0.014$ and 0.229 ± 0.018 pmol . mg⁻¹ protein under Na^+ and K^+ conditions, respectively). Still, HPz binding appears more complex than Pz^- binding: i) cold phlorizin can displace tracer binding under Na^+ and K^+ conditions, and similar equilibrium levels of 0.89 ± 0.03 and 0.87 ± 0.04 pmol . mg⁻¹ protein were observed in the presence of 1 mM phlorizin in the Na^+ (Fig. 6A, solid triangles) and K^+ (Fig. 6B, open triangles) media, respectively; ii) although steady-state HPz binding was higher in the Na^+ (Fig. 6A, solid circles, 5.90 ± 0.09 pmol . mg⁻¹ protein) as compared to the K^+ (fig. 6B, open circles, 2.70 ± 0.10 pmol . mg⁻¹ protein) medium, there was also evidence for D-glucose sensitive HPz binding in both media, and similar levels of 2.48 ± 0.06 and 2.35 ± 0.09 pmol . mg⁻¹ protein were reached following 400 s incubation with 200 mM glucose under Na^+ (Fig. 6A, solid squares) and K^+ (Fig. 6B, open squares) conditions, respectively.

These results allow to conclude that HPz binding is a multi component process that may involve: i) nonspecific binding accounting for as much as 15 or 32% of total binding under Na^+ or K^+ conditions, respectively, at least if one assumes that the concentration of 1 mM phlorizin was saturating under the experimental conditions of Fig. 6 (but see next two sections); ii) phlorizin specific binding sites likely unrelated to D-glucose transport (insensitive to 200 mM cold glucose) representing 27 or 55% of total binding in the presence of Na^+ or K^+ , respectively; and iii) D-glucose specific binding sites that may qualify to represent (a) secondary active cotransporter(s) with either loose or strict specificity for Na^+ and H^+ (under K^+ conditions, H^+ -dependent binding would

account for 13% of total binding while, under Na^+ conditions, 58% or 52 and 6% of total binding would represent Na^+/H^+ -dependent or separate Na^+ - and H^+ -dependent processes, respectively). Clearly, then, the complexity of HPz binding requires more elaborated studies than those previously performed at pH 8.6 to fully describe the kinetics of HPz binding at pH 6.0.

5) Kinetics of HPz binding in the absence of Na^+

To further characterize HPz binding in the absence of Na^+ , experiments similar to those described in Fig. 3 were repeated at pH 6.0 in a K^+ medium containing or not 200 mM D-glucose (data not shown). The uptake time courses of HPz binding were fitted to Equation (2), and this analysis established that the first-order rate constant k_{obs} is insensitive to cold HPz over the whole range of concentrations with mean $t_{1/2}$ values of 49 ± 6 and 50 ± 7 s in the absence or presence of glucose, respectively (data not shown). Moreover, as apparent in Fig. 7, the B_e^* term (equilibrium HPz binding) is a saturable function of HPz concentrations, but full saturation was not achieved at the highest concentration of 1 mM. In the simplest case (control conditions in the presence of 200 mM glucose, open squares), the corresponding data set in Fig. 7 could be fitted to Equation (3) when assuming one class only of specific binding sites ($n = 1$) working in parallel with a nonspecific process. However, due to the lack of saturation over the range of HPz concentrations studied, the SER values associated to the determination of the kinetic parameters were rather high ($B_{\text{maxc}} = 5800 \pm 2600$ pmol \cdot mg $^{-1}$ protein; $K_{\text{dc}} = 410 \pm 140$ μM ; $k_{\text{D}} = 2.5 \pm 1.8$ pmol \cdot mg $^{-1}$ protein \cdot μM^{-1}). Still, it should be noted that the apparent k_{D} value of the nonspecific component of HPz binding was quite similar to that observed at pH 8.6 (see Table 1), and the latter k_{D} value was used as a prompt constant when refitting the experimental data in Fig. 7 to Equation (3). As expected and apparent from Table 2, the numerical values of the kinetic parameters were not affected much by this manipulation but the associated SER values have now decreased to acceptable levels.

In the more complex situation where HPz binding was studied in the absence of glucose (open circles), Fig 7 indicates the presence of an extra binding process that clearly shows up in the low range of substrate concentrations. However, the extraction of its kinetic parameters is made difficult due to the fact that this binding component contributes to a very small fraction only of total HPz binding (see also Fig. 6B). As was the case with a saturating concentration of glucose, reliable estimates of the kinetic parameters could only be obtained by using the k_{D} value reported in Table

1 as a prompt constant. It thus appears from Table 2: i) that the kinetic parameters of the specific, low affinity HPz binding sites are independent of the presence of glucose in the uptake media, and ii) that the apparent number of specific, high affinity HPz binding sites is similar to that previously observed at pH 8.6 (Table 1), thus suggesting that HPz binding may occur on the same glucose transport protein(s) and that H^+ may substitute for Na^+ as an obligatory activating cation.

6) Kinetics of HPz binding in the presence of Na^+

To further characterize HPz binding in the presence of Na^+ , experiments similar to those described in Fig. 3 were repeated at pH 6.0 in a Na^+ medium (data not shown), and the experimental data were fitted to Equation (2). As shown in Fig. 8, the B_e^* term is a saturable function of HPz concentrations and, for the same reasons already discussed in the previous section, an acceptable fit to Equation (3) could only be obtained when using the apparent k_D value observed at pH 8.6 (Table 1) as a prompt constant. The kinetic parameters of the low affinity sites ($B_{maxe2} = 5200 \pm 540$ pmol . mg⁻¹ protein, $K_{de2} = 590 \pm 80$ μ M) were similar to those determined in the K^+ medium (Table 2) while those of the Na^+ -dependent, high affinity sites are shown in Table 3. It should be noted that the apparent K_{de} value of the latter sites is some 200-300 fold lower than that of the former, and this huge difference in the affinities of the two classes of HPz binding sites suggests that the kinetic parameters of the high affinity sites may also be determined quite accurately when analyzing the experimental data over a more restricted range of substrate concentrations.

As indicated in Fig. 8 from the theoretical displacement curves separating the individual contributions to total measured binding of the Na^+ -activated (ligne 1) and Na^+ -independent (low affinity sites plus nonspecific binding, ligne 2) sites, the contribution of the former has already decreased by more than 90% at a cold phlorizin concentration of 20 μ M (arrow in Fig. 8) when the contribution of the latter has decreased by less than 5%. Accordingly, over the restricted 0-20 μ M range of cold phlorizin concentrations, the data in Fig. 8 should correspond to the situation expected when one class of specific binding sites only is working in parallel with a nonspecific component. In that case, however, the apparent diffusion constant would represent the sum $B_{maxe2}/K_{de2} + k_D$ as is obvious from Equation (3) with $n = 2$ when $(S+T) \ll K_{de2}$. As predicted, the analysis of the data in Fig. 8 over the 0-20 μ M range of HPz concentrations gave kinetic parameters for the high affinity sites which are identical to those given in Table 3 ($B_{maxe1} = 86 \pm 11$ pmol . mg⁻¹ protein; $K_{de1} = 2.2$

$\pm 0.3 \mu\text{M}$; apparent $k_D = 10.8 \pm 0.8 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ which is equivalent to the sum $B_{\text{maxe2}}/K_{\text{de2}} (8.8 \pm 2.2) + k_D (2.39 \pm 0.09) = 11.2 \pm 2.3$.

It should be noted that the apparent number of high affinity, Na^+ -dependent binding sites estimated in Fig. 8 (see Table 3) is within the range expected should the same SGLT protein(s) be involved at pH 6.0 and 8.6 (Table 1) and accept either of Na^+ or H^+ as activator ions at pH 6.0 (Table 2). The validity of this conclusion is indeed linked to the observation that H^+ -dependent binding may only represent less than 10% of total Na^+ -dependent HPz binding (see Fig. 6), so that its presence would be hardly detectable in a kinetic analysis. However, this conclusion is also compatible with the data of Table 2 and with the Na^+ - and H^+ -dependence of glucose transport demonstrated for rSGLT1 [19], in which case the lack of heterogeneity in the Na^+ -dependent fraction of HPz binding should be expected at the saturating concentration of 150 mM Na^+ used in our studies. In the initial rate data analysis discussed below, it is thus assumed that HPz binding at pH 6.0 is best described by the sum of a nonspecific and two specific (only one of which is Na^+ -dependent and glucose-sensitive) processes.

The initial rates of HPz binding (B_i^*) were estimated directly from the progress curves of phlorizin uptake using nonlinear regression analysis to a second-order polynomial over the 0-50 s time range. Because a direct fit of the resulting B_i^* data to Equation (3) with $n = 2$ failed to give reliable estimates of the kinetic parameters, the contribution to the initial rate data of the Na^+ -independent components of HPz binding were calculated as follows. From the multi component nature of HPz binding, it is logical to assume (but see further justification in the following paper [30]) that a full description of HPz uptake should be given by Equation (4)

$$B^* = B_0^* + \sum_{j=1}^3 B_{e_j}^* (1 - e^{-k_j t}) \quad (4)$$

which states that the steady state values of HPz binding $B_{e_1}^*$ (characterizing the specific, Na^+ -dependent and glucose-sensitive component of HPz binding), $B_{e_2}^*$ (characterizing the specific, Na^+ -independent and glucose-insensitive component of HPz binding), and $B_{e_3}^*$ (characterizing the nonspecific component of HPz binding) would be reached with specific first-order rate constants

k_1 , k_2 , and k_3 , respectively. Accordingly, the expression of the initial rate of HPz binding can be found from the first derivative of Equation (4) at $t = 0$ [46] and is given by Equation (5).

$$\left(\frac{dB^*}{dt} \right)_{t=0} = B_i^* = \sum_{j=1}^3 k_j B_{e_j}^* = \sum_{j=1}^3 B_{i_j}^* \quad (5)$$

Because the first-order rate constant of the Na^+ -independent and glucose-insensitive component of HPz binding (k_2) was found to be independent of HPz concentrations and equal to the first-order rate constant describing HPz uptake through the nonspecific component (see section 5 above), Equation (5) degenerates to Equation (6)

$$B_i^* = B_{i1}^* + k_2 (B_{e2}^* + B_{e3}^*) \quad (6)$$

in which $k_2 = 0.012 \text{ s}^{-1}$ (as determined in these experiments) and the term under brackets corresponds to the last two terms in Equation (3) when $n = 2$ with a k_D value as given in Table 1 and both $B_{\text{max}i2}$ and K_{di2} as given by $B_{\text{max}e2}$ and K_{de2} in Table 2. Thus, the contribution to the initial rate data of the Na^+ -independent components of HPz binding can be calculated at each phlorizin concentration and subtracted such as to isolate the exclusive contribution of the Na^+ -dependent and glucose-sensitive component of HPz binding. As shown in Fig. 9, the resulting B_{i1}^* values (closed circles) can be best-fitted to Equation (3) when assuming one class only of specific binding sites ($n = 1$) with kinetic parameters as shown in Table 3. It should be noted that similar results ($B_{\text{max}i1} = 7.4 \pm 0.7 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$; $K_{di1} = 11.7 \pm 1.2 \text{ } \mu\text{M}$) were obtained when fitting directly the uncorrected B_i^* data (open circles in Fig. 9) to Equation (3) with the parameter K_{di2} , $B_{\text{max}i2}$, and k_D fixed at the appropriate values as discussed above. Finally, because there is a close to 40-fold difference in the K_{di1} and K_{di2} values, it should be possible, as justified in Fig. 8 for the steady-state data, to obtain a good estimate of $B_{\text{max}i1}$ and K_{di1} in a more simple way by fitting the uncorrected B_i^* data directly to Equation (3) when assuming one specific component of HPz binding only ($n = 1$) working in parallel with a nonspecific component (apparent rate constant = $B_{\text{max}i2}/K_{di2} + k_D$). When this was done over the 0-50 μM range of HPz concentrations (over which the specific but Na^+ -independent and glucose-insensitive component of HPz binding is saturated to about 10% only), values of $B_{\text{max}i1}$ and K_{di1} similar to those given above were indeed found ($B_{\text{max}i1} = 7.9 \pm 0.8 \text{ pmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$; $K_{di1} = 12.4 \pm 1.5 \text{ } \mu\text{M}$).

DISCUSSION

1) General comments

The significance of our findings rests on the assumption that measured phlorizin uptake mostly represents binding to BBMV rather than transport into the intra vesicular space where subsequent binding would occur. The arguments supporting this assumption have been discussed at length by a number of authors [2,35,39-40] and do not need to be reconsidered in details here. The interpretation of our experimental findings also rests on the thesis that phlorizin competes with glucose for (a) specific binding site(s) that belong(s) to (at least part of) (a) SGLT system(s) present in the BBM of the rabbit proximal tubule. Competitive inhibition of SGLT by phlorizin has by now been well documented in the literature [1,7,9,13,18,37,39,42-44] and it would appear that this mechanism apply to both of the HAG and LAG transport pathways that can be separated kinetically in rabbit BBMV isolated from the whole kidney cortex [29]. Moreover, the HAP binding sites analyzed in our studies were found to be strictly Na^+ -dependent (with a possibility for H^+ - substitution, however), a property also demonstrated for the HAG and LAG transport pathways present in this preparation [29]. In those respects, then, it would appear that the Na^+ -dependent and D-glucose sensitive parts of HPz and Pz⁻ binding that were characterized in the present studies do qualify to represent specific binding to such (a) SGLT system(s).

The presence of both HAP and LAP sites for Pz in kidney BBMV appears as a redundant observation in the literature [7,9,18,37], and most authors seem to agree that the latter sites are unrelated to glucose transport through SGLT proteins. In the two studies where the kinetic parameters of those LAP sites have been determined, B_{max} values of 1250 [9] or 3000 [7] pmol . mg⁻¹ protein are reported with associated K_d values of 2.5 or 0.1 mM, respectively, and these figures compare with our own determinations (see Table 2). The apparent homogeneity of the LAP binding sites has been questioned [18], however, and their precise nature is not known. Still, in one study, it was reported that the affinity of the LAP sites did not change with temperature [9]. It now appears from our own studies that the detection of these sites is also tightly linked to the ionization state of the phlorizin molecule since such sites could only be observed at acidic pH. On this criteria alone, then, the LAP sites appear homogeneous, and one may propose either one of the following two alternatives: i) the LAP sites represent phlorizin binding to membrane lipids and/or ii) the LAP sites

represent phlorizin binding to an intra vesicular structure consecutively to its passive diffusion across the membrane. Point (ii) appears unlikely, however, because saturable binding of phlorizin to intestinal BBM, without intracellular accumulation, has been demonstrated by radioautography [38].

Finally, Pz⁻ and HPz binding to renal BBMV also involve a nonspecific component that may represent either partition of phlorizin within the lipid phase of the membrane or slow equilibration of phlorizin between the uptake medium and the intra vesicular space (the B_i^{*} value of 0.1743 ± 0.0063 pmol . mg⁻¹ protein accounting for the nonspecific component of Pz⁻ binding at equilibrium would correspond to an intra vesicular volume of 2.4 ± 0.1 μl . mg⁻¹ protein under the conditions of our experiments, a value compatible with that of 2.2 ± 0.2 μl . mg⁻¹ protein as calculated from the glucose equilibrium space recorded in previous experiments [29]).

2) Both HPz and Pz⁻ bind to (a) SGLT protein(s)

From the competitive nature of phlorizin inhibition of SGLT, the inference has been drawn that the glucose moiety of phlorizin (see Fig. 10) is an essential substituent of the inhibitor molecule and, in agreement with this view, an axial configuration of the hydroxyl group on C-4 (as in the galactoside) or a methylation at C-3 of the pyranose ring result in decreased affinity or absence of inhibition of the analogs, respectively [12]. Moreover, from the differences in the K_m of glucose transport and the K_i of its inhibition by phlorizin, it was also proposed that the aglucone moiety of the inhibitor facilitates the interaction of the glucosidic portion of the molecule with the receptor, so that the stability of the resulting complex is much greater than that formed with the free sugar (1,13). The activities determined for the analogs which differ from phlorizin only with respect to the aglucone portion of the molecule corroborate this postulate, and it was shown that the 4' position in the A ring, in contrast to the 4 position in the B ring system of phloretin (see Fig. 10), was not critical for activity [12]. The further report by Evans and Diedrich [15] that 4'-deoxyphlorizin and *para*-phlorizin (the 4'-glucoside of phlorizin, see Fig. 10) do not exhibit the pH-dependent shift characteristic of the absorption spectrum of phlorizin thus gives credit to our demonstration that both the HPz and Pz⁻ forms of phlorizin can bind to a similar number of transporter sites.

In this respect, it is worth noting that the similar pK_a values of 7.31 ± 0.04 and 7.26 ± 0.06 determined for phlorizin (Fig. 1B) and phloretin [16], respectively, may characterize the ionization

of different hydroxyl groups in the two molecules (the pK_a value would be associated to the keto-enol tautomerism of the α -hydroxyl group in the phloretin molecule [16,23], see Fig. 10). It is worth to also emphasize that our conclusion as to binding of HPz and Pz⁻ to the same transport protein(s) does not necessarily conflict with that of Toggenburger et al. [39] because these authors merely showed an increase in the K_i of phlorizin inhibition of SGLT and in the binding of phlorizin itself at increasing pH values. The latter observation is indeed compatible with the K_d values estimated for phlorizin binding at pH 6.0 (Table 3) and 8.6 (Table 1), and it could be further argued that the success of Toggenburger et al. [39] at measuring a K_i value relative to inhibition of SGLT activity at a pH value as high as 9.5 (where phlorizin is > 99% ionized to its Pz⁻ form) just supports our own data.

3) Implications regarding HPz and Pz⁻ binding to SGLT protein(s).

It can be concluded from the previous section that the affinity of the SGLT system(s) is decreased for Pz⁻ as compared to HPz binding due to either one or both of the following alternatives previously proposed by Toggenburger et al. [39]: i) the intrinsic affinity of the carrier(s) is higher relative to the neutral than to the charged form of the inhibitor; and/or ii) binding of the aglucone moiety of phlorizin is favored when its receptor sites on the transporter(s) are protonated.

The above issue is relevant to the earlier proposal that the 4-hydroxyl group in the B ring system of phlorizin (see Fig. 10) might be involved in secondary hydrogen bonding to a receptor site which is adjacent to, but removed from the plane of the glucose transporting site and located some 13-16 Å away from this site [1,12]. Moreover, because 4-metoxyphlorizin was about 80% as potent as the parent molecule to inhibit glucose reabsorption, it was proposed that the adjoining membrane substituent should be one which can donate hydrogen to form the bond [12]. Accordingly, deprotonation of this site on the carrier protein(s) at more basic pH would impair phlorizin binding through its aglucone moiety, and lower apparent affinity would be the result.

The above issue is also highly relevant to the demonstration that H⁺-dependent glucose transport through rSGLT1 occurs with lower affinity than Na⁺-dependent glucose transport [19]. In agreement with these data, our experiments at pH 6.0 show lower affinity for the H⁺-dependent and glucose-sensitive component of HPz binding than for its Na⁺-dependent counterpart (compare the K_{de} or K_{di} values in Tables 2 and 3). Thus, if one assumes that rSGLT1 is the only (or, at least, the

major) carrier protein to be revealed by glucose transport [29] and phlorizin binding [30] studies in the kidney, these results suggest: i) that the Na^+ concentration of 150 mM used in our experiments at pH 6.0 was saturating relative to H^+ , and ii) that the carrier- H^+ complex assumes a conformation which is different from that of the carrier- Na^+ complex, a conclusion compatible with an ordered addition of substrate binding to the transport protein in which the activator ion binds first (should the reverse situation holds true, one would have expected similar K_d of phlorizin binding in the Na^+ and H^+ media). The latter conclusion would thus agree with the kinetic mechanism of cotransport proposed for rSGLT1 by Parent et al. [33] and is indeed strongly supported by our failure to demonstrate Na^+ -independent but glucose-sensitive Pz^- binding (Fig. 2). In this respect, then, it could well be that the studies of Koepsell et al. [21] showing specific, glucose-sensitive but Na^+ -independent phlorizin binding at physiological pH values have in fact characterized H^+ -dependent transport if one assumes that the H^+ concentration at such pH is still sufficient to activate the carrier.

Clearly, then, detailed pH studies of both glucose transport and phlorizin binding will be needed to answer those issues conclusively, and such experiments are now in progress in our laboratory. Quite obvious from the discussion above, however, meaningful pH studies of phlorizin binding may have to await the availability or the synthesis of phlorizin analogs that do not dissociate in the relevant pH range.

4) Homogeneity or heterogeneity of Na^+ -dependent, D-glucose sensitive phlorizin binding?

The point was made in our previous studies on rabbit renal glucose transport [29] that a 2- to 3- fold difference in the K_i 's of phlorizin inhibition of the HAG and LAG transport pathways should have been resolved by our kinetic approach. This conclusion does not hold anymore in the present studies, and the apparent homogeneity of the high affinity, Na^+ -dependent and glucose-sensitive phlorizin binding sites (Figs. 4-5 and 8-9) is thus questionable. Still, the results presented in this paper undoubtedly resolve the main conflicting issue raised by our previous studies [29] in which a one order magnitude difference was noted between the K_i of phlorizin inhibition of glucose transport and the K_d of HAP binding to BBMV isolated from either dog [45] and rabbit [44] kidneys or LLC-PK₁ cells [27]. Indeed, the apparent K_i value of 15 μM estimated for the HAG and LAG transport pathways in our former studies [29] appear fully compatible with the apparent dissociation constant of phlorizin binding measured under initial rate conditions ($K_{di} = 10\text{-}30 \mu\text{M}$) but are some

6-fold higher than the dissociation constant of phlorizin binding estimated at equilibrium ($K_{de} = 2\text{-}5\ \mu\text{M}$). Moreover, these K_{de} values now agree quite reasonably well with those previously determined by Turner and Moran [44] on a similar preparation (1.7 and 1.9 μM at 17 °C, 60 mM Na^+ , and pH 7.4 in the outer cortex and outer medulla, respectively) and by Moran et al. [27] in LLC-PK₁ cells (0.2-2.5 μM at 37 °C and pH 7.4 for Na^+ concentrations decreasing from 500 to 100 mM). The question arises, then, as to what extent could the K_{di} and K_{de} values determined in our studies represent phlorizin binding on the same or different carrier proteins. This issue is dealt with in the following paper [30] where it is shown that the homogeneity of phlorizin binding can also be assessed from the progress curves of phlorizin binding, and that all of our analyses are fully consistent with a single mechanistic model of phlorizin binding which is thus unlikely to apply to two independent transporters with identical parameter values.

FOOTNOTES

1. The abbreviations used are: AMG: brush border membrane vesicles; BCA: bicinechonic acid; FSRFA: fast-sampling, rapid-filtration apparatus; HAG: high affinity glucose; HAP: high affinity phlorizin; HEPES: N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]; HPz: neutral form of phlorizin; LAG: low affinity glucose; LAP: low affinity phlorizin; MES: 2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid; Pz: ionized form of phlorizin; SER: standard error of regression; SGLT: Na⁺/D-glucose cotransport; Tris: tris[hydroxymethyl]aminomethane.
2. B_e^* : steady-state of tracer Pz binding; B_o^* : intercept with y axis; B_i^* : initial rate of tracer Pz binding; $B_{max\ i}$: maximal binding capacity under initial rate conditions; $B_{max\ e}$: maximal binding capacity under steady-state conditions; k_{obs} : first-order rate constant of equilibrium binding; K_{di} : apparent dissociation constant under initial rate conditions; K_{de} : apparent dissociation constant under steady-state conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by grant MT-7607 from the Medical Research Council of Canada. N.O. was supported by a fellowship from the GRTM. The technical assistance of Mrs. C. Leroy has been greatly appreciated.

REFERENCES

1. Alvarado, F. 1967. Hypothesis for the interaction of the phlorizin and phloretin with membrane carriers for sugars. *Biochim. Biophys. Acta* **135**: 483-495
2. Aronson, P. 1978. Energy-dependence of phlorizin binding to isolated renal microvillus membranes. *J. Membrane Biol.* **42**: 81-98
3. Berteloot, A. 1984. Characteristics of glutamic acid transport by rabbit intestinal brush-border membrane vesicles. Effect of Na⁺-, K⁺-, and H⁺-gradients. *Biochim. Biophys. Acta* **775**: 129-140
4. Berteloot, A., Malo, C., Breton, S., and Brunette, M. 1991. A fast sampling, rapid filtration apparatus: principal characteristics and validation from studies of D-glucose transport in human jejunal brush-border membrane vesicles. *J. Membrane Biol.* **122**: 111-125
5. Berteloot, A., and Semenza, G. 1990. Advantages and limitations of vesicles for the characterization and kinetic analysis of transport systems. *Meth. Enzymol.* **192**: 409-437
6. Blank, M.E., Bode, F., Baumann, K., and Diedrich, D.F. 1989. Computer analysis reveals changes in renal Na⁺-glucose cotransporter in diabetic rats. *Am. J. Physiol.* **257**: C385-C396
7. Bode, F., Baumann, K., Diedrich, D.F. 1972. Inhibition of [³H]phlorizin binding to isolated kidney brush border membranes by phlorizin-like compounds. *Biochim. Biophys. Acta* **290**: 134-149
8. Chenu, C., and Berteloot, A. 1993. Allosterism and Na⁺-D-glucose cotransport kinetics in rabbit jejunal vesicles: compatibility with mixed positive and negative cooperativities in a homo-dimeric or tetrameric structure and experimental evidence for only one transport protein involved. *J. Membrane Biol.* **132**: 95-113
9. Chesney, R., Sacktor, B., Kleinzeller, A. 1974. The binding of phlorizin to the isolated luminal membrane of the renal proximal tubule. *Biochim. Biophys. Acta* **332**: 263-277
10. Coady, M.J., Pajor, A.M., Wright, E.M. 1990. Sequence homologies among intestinal and renal Na⁺/glucose cotransporters. *Am. J. Physiol.* **259**: C605-C610
11. Desjeux, J.-F. 1995. Congenital selective Na⁺, D-glucose cotransport defect leading to renal glucosuria and congenital selective intestinal malabsorption of glucose and galactose. *In: The Metabolic Basis of Inherited Diseases*. C.R. Scriver, editor. pp. 3563-3580. McGraw-

Hill, New York

12. Diedrich, D.F. 1963. The comparative effects of some phlorizin analogs on the renal reabsorption of glucose. *Biochim. Biophys. Acta* **71**: 688-700
13. Diedrich, D.F. 1966. Competitive inhibition of intestinal glucose transport by phlorizin analogs. *Arch. Biochem. Biophys.* **117**: 248-256
14. Diedrich, D.F. 1968. Is phloretin the sugar transport inhibitor in intestine? *Arch. Biochem. Biophys.* **127**: 803-812
15. Evans, James O. and Diedrich, Donald F. 1980. The affinity of phlorizin-like compounds for a β -glucosidase in intestinal brush borders: comparison with the glucose transport system. *Arch. Biochem. Biophys.* **199**: 342-348
16. Fuhrmann, G.F., Dornedde, S., Frenking, G. 1992. Phloretin *keto-enol* tautomerism and inhibition of glucose transport in human erythrocytes (including effects of phloretin on anion transport). *Biochim. Biophys. Acta* **1110**: 105-111
17. Gerardi-Laffin, C., Delque-Bayer, P., Sudaka, P., and Poirée, J.C. 1993. Oligomeric structure of the sodium-dependent phlorizin binding protein from kidney brush-border membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1151**: 99-104
18. Glossmann, H., Neville, D.M. Jr. 1972. Phlorizin receptors in isolated kidney brush border membranes. *J. Biol. Chem.* **247**: 7779-7789
19. Hirayama, B.A., Loo, D.D.F., Wright, E.M. 1994. Protons drive sugar transport through the Na^+ /glucose cotransporter (SGLT1). *J. Biol. Chem.* **269**: 21407-21410
20. Kanai, Y., Lee, W.S., You, G., Brown, D., and Hediger, M.A. 1994. The human kidney low affinity Na^+ /glucose cotransporter SGLT2. *J. Clin. Invest.* **93**: 397-404
21. Koepsell, H., Fritsch, G., Korn, K., and Madrala, A. 1990. Two substrate sites in the renal Na^+ -D-glucose cotransporter studied by model analysis of phlorizin binding and D-glucose transport measurements. *J. Membrane Biol.* **114**: 113-132
22. Koepsell, H., and Spangenberg, J. 1994. Function and presumed molecular structure of Na^+ -D-glucose cotransport systems. *J. Membrane Biol.* **138**: 1-11
23. LeFevre, P.G., and Marshall, J.K. 1959. The attachment of phloretin and analogues to human erythrocytes in connection with inhibition of sugar transport. *J. Biol. Chem.* **234**: 3022-3026

24. Mackenzie, B., Panayotova-Heiermann, M., Loo, D.D.F., Lever, J.E., and Wright, E. 1994. SAAT1 is a low affinity Na⁺/glucose cotransporter and not an amino acid transporter. *J. Biol. Chem.* **269**: 22488-22491
25. Maenz, D.D., Chenu, C., Bellemare, F., and Berteloot, A. 1991. Improved stability of rabbit and rat intestinal brush border membrane vesicles using phospholipase inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* **1069**: 250-258
26. Malo, C., and Berteloot, A. 1991. Analysis of kinetic data in transport studies: new insights from kinetic studies of Na⁺-D-glucose cotransport in human brush-border membrane vesicles using a fast sampling, rapid filtration apparatus. *J. Membrane Biol.* **122**: 127-141
27. Moran, A., Davis, L.J., and Turner, R.J. 1988. High affinity phlorizin binding to the LLC-PK₁ cells exhibits a sodium:phlorizin stoichiometry of 2:1. *J. Biol. Chem.* **263**: 187-192
28. Morrison, A.I., Panayotova-Heiermann, M., Feigl, G., Schlölermann, B., Kinne R.K.H. 1991. Sequence comparison of the sodium-D-glucose cotransport systems in rabbit renal and intestinal epithelia. *Biochim. Biophys. Acta* **1089**: 121-123
29. Oulianova, N., and Berteloot, A. 1996. Sugar transport heterogeneity in the kidney: two independent transporters or different transport modes through an oligomeric protein? 1. glucose transport studies. *J. Membrane Biol.*, under revision
30. Oulianova, N., Falk, S., and Berteloot, A. 1996. Sugar transport heterogeneity in the kidney: two independent transporters or different transport modes through an oligomeric protein? 3. Mechanism of phlorizin binding and implications. *J. Membrane Biol.*, submitted
31. Pajor, A.M., Hirayama, B.A., and Wright E.M. 1992. Molecular evidence for two renal Na⁺/glucose cotransporters. *Biochim. Biophys. Acta* **1106**: 216-220
32. Parent, L., Supplisson, S., Loo, D.D.F., and Wright, E.M. 1992. Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter. I. Voltage-clamp studies. *J. Membrane Biol.* **125**: 49-62
33. Parent, L., Supplisson, S., Loo, D.D.F., and Wright, E.M. 1992. Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter. II. A transport model under non rapid equilibrium. *J. Membrane Biol.* **125**: 63-79
34. Reizer, J., Reizer, A., and Saier, M.H.Jr. 1994. A functional superfamily of sodium/solute

- symporters. *Biochim. Biophys. Acta* **1197**: 133-166
35. Restrepo, D., Kimmich, G.A. 1986. Phlorizin binding to isolated enterocytes: Membrane potential and sodium dependence. *J. Membrane Biol.* **89**: 269-280
 36. Scriver, S.R., Chesney, R.W., and McInnes, R.R. 1976. Genetic aspects of renal tubular transport: Diversity and topology of carriers. *Kidney Int.* **9**: 149-171
 37. Silverman, M., and Black, J. 1975. High affinity phlorizin receptor sites and their relation to the glucose transport mechanism in the proximal tubule of dog kidney. *Biochim. Biophys. Acta* **394**: 10-30
 38. Stirling, C.E. 1967. High-resolution radioautography of phlorizin-³H in rings of hamster intestine. *J. Cell Biol.* **35**: 605-618
 39. Toggenburger, G., Kessler, M., Rothstein, A., Semenza, G., Tannenbaum, C. 1978. Similarity in effect of Na⁺ gradient and membrane potentials on D-glucose transport by, and phlorizin binding to, vesicles derived from brush borders of rabbit intestinal mucosal cells. *J. Membrane Biol.* **40**: 269-290
 40. Toggenburger, G., Kessler, M., and Semenza, G. 1982. Phlorizin as a probe of the small intestinal Na⁺, D-glucose cotransporter. A model. *Biochim. Biophys. Acta* **688**: 557-571
 41. Turk, E., Zabel, B., Mundlos, S., Dyer, J., and Wright, E.M. 1991. Glucose/galactose malabsorption caused by a defect in the Na⁺/D-glucose cotransporter. *Nature* **350**: 354-356
 42. Turner, R.J., and Moran, A. 1982. Heterogeneity of sodium-dependent D-glucose transport sites along the proximal tubule: evidence from vesicle studies. *Am. J. Physiol.* **242**: F406-F414
 43. Turner, R.J., and Moran, A. 1982. Stoichiometric studies of the renal outer cortical brush border membrane D-glucose transporter. *J. Membrane Biol.* **67**: 73-80
 44. Turner, R.J., and Moran, A. 1982. Further studies of proximal tubular brush border membrane D-glucose transport heterogeneity. *J. Membrane Biol.* **70**: 37-45
 45. Turner, R.J., and Silverman, M. 1981. Interaction of phlorizin and sodium with the renal brush-border membrane D-glucose transporter: stoichiometry and order of binding. *J. Membrane Biol.* **58**: 43-55
 46. Wierzbicki, W., Berteloot, A., Roy, G. 1990. Pre-steady-state kinetics and carrier mediated transport: a theoretical analysis. *J. Membrane Biol.* **117**: 11-27

47. Wright, E.M. 1993. The intestinal Na⁺/glucose cotransporter. *Annu. Rev. Physiol.* **55**: 575-589
48. You, G., Lee, W-S., Barros, E.J.G., Kanai, Y., Huo, T-L., Khawaja, S., Wells, R.G., Nigam, S.K., Hediger, M.A. 1995. Molecular characteristics of Na⁺-coupled glucose transporters in adult and embryonic rat kidney. *J. Biol. Chem.* **270**: 29365-29371

LEGENDS TO TABLES

- Table 1:** Kinetic parameters of equilibrium and initial phlorizin binding at pH 8.6 under Na^+ -equilibrium conditions. Experimental conditions were as described in the legend to Fig. 3. The parameter B_0^* represents the y intercept in Fig. 3 and was determined from the data shown in that figure by nonlinear regression analysis to either Equation (2) in text (equilibrium binding) or a second-order polynomial (initial binding). The parameters B_{max} , K_d , and k_D correspond to the best-fit lines shown in Fig. 4 (equilibrium binding, indice e) and 5 (initial binding, indice i).
- Table 2:** Kinetic parameters of equilibrium phlorizin binding at pH 6.0 under K^+ -equilibrium conditions in the absence or presence of 200 mM D-glucose. Experimental conditions were as described in the legend to Fig. 7. The parameters B_{max} and K_d correspond to the best-fit lines shown in figure, and indices 1 and 2 stand for the glucose-sensitive and glucose-insensitive components of phlorizin binding, respectively.
- Table 3:** Kinetic parameters of equilibrium and initial phlorizin binding at pH 6.0 under Na^+ -equilibrium conditions. Experimental conditions were as described in the legend to Fig. 8. The parameters B_{max} and K_d correspond to the best fit lines shown in Figs. 8 (equilibrium binding, indice e) and 9 (initial binding, indice i), and indice 1 stands for the Na^+ -dependent (and glucose-sensitive) component of phlorizin binding.

LEGENDS TO FIGURES

- Figure 1:** pH-dependent dissociation of phlorizin. In A, the absorption spectra recorded as described in the text are shown for representative pH values of 5.5 (curve 1), 6.5 (curve 2), 7.5 (curve 3), and 9.5 (curve 4). In B, the pH-dependence of the optical densities (O.D.) recorded at 285 nm (solid symbols) and 320 nm (open symbols) are shown for the three concentrations of phlorizin indicated in the inset. Curves shown in B are the best-fit lines to Equation (1) in text from which a mean pK_a value of 7.31 ± 0.04 can be determined for the pH-dependent dissociation of phlorizin.
- Figure 2:** Uptake time courses of tracer phlorizin uptake (Pz^*) at pH 8.6 under K^+ - (open symbols) or Na^+ - (closed symbols) equilibrium conditions. BBMV were resuspended in 50 mM Tris-MES buffer (pH 8.6) containing 0.1 mM $MgSO_4$, 300 mM mannitol, and 200 mM KI (open symbols) or 50 mM KI plus 150 mM NaI (closed symbols). The uptake media contained (final concentrations): 50 mM Tris-MES buffer (pH 8.6), 0.1 mM $MgSO_4$, 0.5 mM amiloride, 300 mM mannitol ($\bullet, \blacktriangle, \circ$) or 100 mM mannitol plus 200 mM D-glucose (\square), 0.1 μM 3H -phlorizin (\bullet, \circ, \square) or 0.1 μM 3H -phlorizin plus 1 mM cold phlorizin (\blacktriangle), and 200 mM KI (open symbols) or 50 mM KI plus 150 mM NaI (closed symbols). Curves shown are the best-fit lines to the first-order rate Equation (2) in text with parameters as discussed under section 2 of Results.
- Figure 3:** Kinetics of tracer phlorizin binding (Pz^*) at pH 8.6 under Na^+ - equilibrium conditions. BBMV were resuspended in 50 mM Tris-MES buffer (pH 8.6) containing 0.1 mM $MgSO_4$, 300 mM mannitol, 50 mM KI, and 150 mM NaI. The uptake media contained (final concentrations): 50 mM Tris-MES buffer (pH 8.6), 0.1 mM $MgSO_4$, 0.5 mM amiloride, 300 mM mannitol, 50 mM KI, 150 mM NaI, 0.1 μM 3H -phlorizin, and either 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, or 1000 μM cold phlorizin. Curves shown for the representative concentrations of phlorizin indicated on the figure are the best-fit lines to the first-order rate Equation (2) in text with parameters as discussed under section 3 of Results.

Figure 4: Displacement curve of tracer phlorizin steady-state binding (B_e^*) at pH 8.6 under Na^+ -equilibrium conditions. Points shown correspond to the B_e^* term of Equation (2) in text as determined by nonlinear regression analysis to the data in Fig.3 (note that the SER values associated with the B_e^* values were smaller than the symbol size). Curve shown is the best-fit line to Equation (3) in text with $n = 1$ (one class only of specific binding sites) and kinetic parameters as given in Table 1. Inset: the validity of the latter model equation can be assessed visually from the Eadie-Hofstee transformation of the data shown in the main graph.

Figure 5: Displacement curve of tracer phlorizin initial binding (B_i^*) at pH 8.6 under Na^+ -equilibrium conditions. Data shown correspond to the initial rate of tracer phlorizin binding \pm SER values which were determined by nonlinear regression analysis to the data in Fig.3 as described in the text. Missing error bars were smaller than the symbol size. Curve shown is the best-fit line to Equation (3) in text with $n = 1$ (one class only of specific binding sites) and kinetic parameters as given in Table 1. Inset: the validity of the latter model equation can be assessed visually from the Eadie-Hofstee transformation of the data shown in the main graph.

Figure 6: Uptake time courses of tracer phlorizin uptake (Pz^*) at pH 6.0 under Na^+ (A) and K^+ (B) equilibrium conditions. BBMV were resuspended in 50 mM MES-Tris buffer (pH 6.0) containing 0.1 mM MgSO_4 , 300 mM mannitol, and 200 mM KI (open symbols) or 50 mM KI plus 150 mM NaI (closed symbols). The uptake media were (final concentrations): 50 mM MES-Tris buffer (pH 6.0), 0.1 mM MgSO_4 , 0.5 mM amiloride, 300 mM mannitol ($\bullet, \blacktriangle, \circ, \Delta$) or 100 mM mannitol plus 200 mM D-glucose (\blacksquare, \square), 0.1 μM ^3H -phlorizin ($\bullet, \blacksquare, \circ, \square$) or 0.1 μM ^3H -phlorizin plus 1 mM cold phlorizin (\blacktriangle, Δ), and 200 mM KI (open symbols) or 50 mM KI plus 150 mM NaI (closed symbols). Curves shown are the best-fit lines to the first-order rate Equation (2) in text with kinetic parameters as discussed under section 4 of Results.

Figure 7: Displacement curves of tracer phlorizin steady-state binding (B_e^*) at pH 6.0 under K^+ -equilibrium conditions. BBMVs were resuspended in 50 mM MES-Tris buffer (pH 6.0) containing 0.1 mM $MgSO_4$, 300 mM mannitol, and 200 mM KI. The uptake media were (final concentrations): 50 mM MES-Tris buffer (pH 6.0), 0.1 mM $MgSO_4$, 0.5 mM amiloride, 200 mM KI, 300 mM mannitol (\square) or 100 mM mannitol plus 200 mM D-glucose (\square), $0.078 \mu M$ 3H -phlorizin, and either 0, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, or 1000 μM cold phlorizin. The kinetics of phlorizin uptake (data not shown) were recorded and analyzed as in Fig. 3, so that the points shown correspond to the B_e^* term of Equation (2) in text. Error bars represent the associated SER values and, when not shown, were smaller than the symbol sizes. Curves shown are the best-fit lines to Equation (3) in text with $n = 1$ (\square , one class only of specific binding sites) or 2 (\circ , two classes of specific binding sites) and kinetic parameters as given in Table 2. More details as to the fitting procedure are given in section 5 of Results.

Figure 8: Displacement curves of tracer phlorizin steady-state binding (B_e^*) at pH 6.0 under Na^+ -equilibrium conditions. BBMVs were resuspended in 50 mM MES-Tris buffer (pH 6.0) containing 0.1 mM $MgSO_4$, 300 mM mannitol, 50 mM KI, and 150 mM NaI. The uptake media were (final concentrations): 50 mM MES-Tris buffer (pH 6.0), 0.1 mM $MgSO_4$, 0.5 mM amiloride, 300 mM mannitol, 50 mM KI, 150 mM NaI, $0.078 \mu M$ 3H -phlorizin, and either 0, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, or 1000 μM cold phlorizin. The kinetics of phlorizin uptake (data not shown) were recorded and analyzed as in Fig. 3, so that the points shown correspond to the B_e^* term of Equation (2) in text (note that the SER values associated with the B_e^* values were smaller than the symbol size). Curve shown with the data points is the best-fit line to Equation (3) in text with $n = 2$ (two classes of specific binding sites) and kinetic parameters as given in Table 3 or discussed in the text. More details as to the fitting procedure are given in section 6 of Results. Lines labeled 1 and 2 represent the individual contributions to the B_e^* data of the Na^+ -dependent and the two Na^+ -independent components of binding, respectively. Arrow shows that the

contributions to the B_0 data of components 1 or 2 have decreased by more than 90% or less than 5%, respectively, over the 0-20 μM range of phlorizin concentrations. Inset: the validity of the model equation used to fit the data shown in the main graph can be assessed visually from the Eadie-Hofstee transformation of these data.

Figure 9: Displacement curves of tracer phlorizin initial binding (B_0) at pH 6.0 under Na^+ -equilibrium conditions. Data shown correspond to the initial rates of tracer phlorizin binding \pm SER values which were determined as described in the text by nonlinear regression analysis to the same kinetic data that was used to construct Fig. 8. Missing error bars were smaller than the symbol size. Curves shown are the best-fit lines to Equation (3) in text with $n = 1$ (\bullet , one class only of specific binding sites) or 2 (\circ , two classes of specific binding sites) and kinetic parameters as given in Table 3 or discussed in section 6 of Results. Inset: the validity of the approach used to isolate the Na^+ -dependent component of binding as discussed in the text can be assessed visually from the Eadie-Hofstee plot of the corresponding data shown in the main graph.

Figure 10: Phlorizin structure as proposed by Diedrich [14-15]

TABLE 1

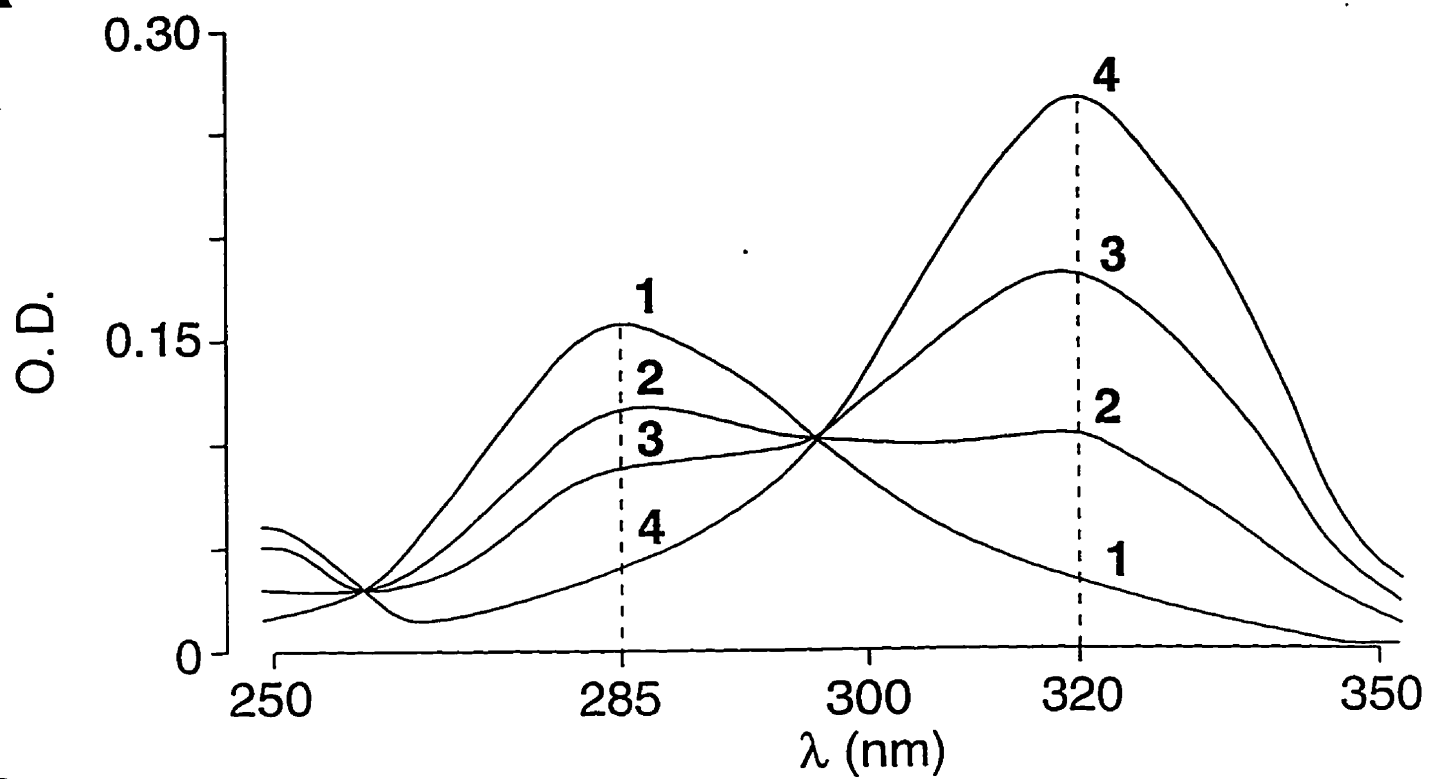
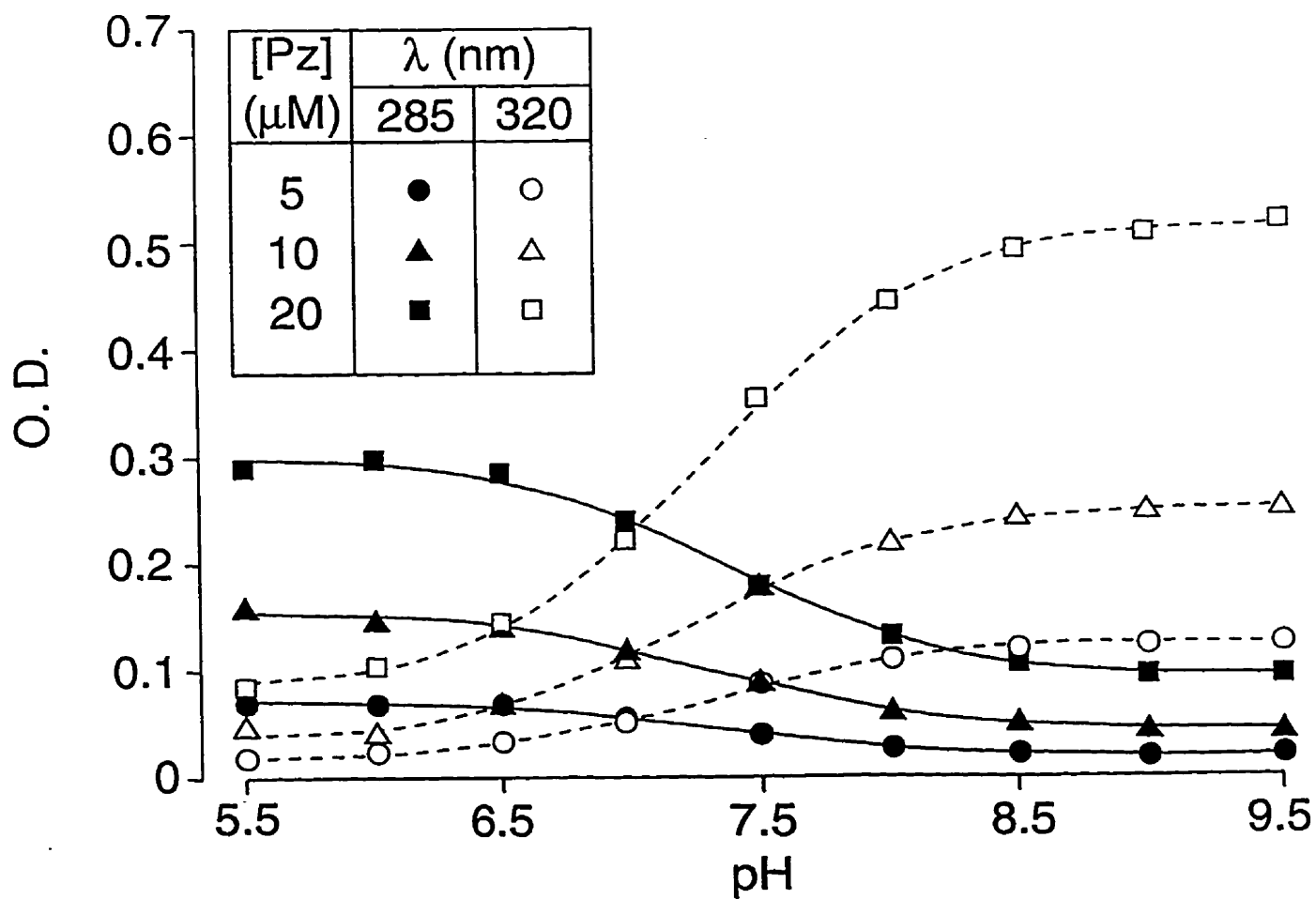
KINETIC PARAMETERS	EQUILIBRIUM BINDING	INITIAL BINDING
B_0 (y intercept) (pmol. mg ⁻¹ protein)	0.0783 ± 0.0064	0.0778 ± 0.0060
apparent k_b	2.39 ± 0.09 (pmol. mg ⁻¹ protein. μ M ⁻¹)	0.0214 ± 0.0021 (pmol. s ⁻¹ . mg ⁻¹ protein. μ M ⁻¹)
Maximum binding capacity	$B_{max} = 62 \pm 4$ (pmol. mg ⁻¹ protein)	$B_{max} = 4.0 \pm 0.6$ (pmol. s ⁻¹ . mg ⁻¹ protein)
Apparent dissociation constant (μ M)	$K_{d0} = 5.2 \pm 0.4$	$K_{d1} = 30 \pm 5$

TABLE 2

KINETIC PARAMETERS	CONTROL K ⁺ CONDITIONS	K ⁺ CONDITIONS WITH 200 mM GLUCOSE
$B_{\text{max}01}$ (pmol. mg ⁻¹ protein)	57 ± 9	--
$K_{\text{de}1}$ (μM)	14 ± 3	--
$B_{\text{max}02}$ (pmol. mg ⁻¹ protein)	5889 ± 689	6089 ± 208
$K_{\text{de}2}$ (μM)	464 ± 77	438 ± 18

TABLE 3

KINETIC PARAMETERS	EQUILIBRIUM BINDING	INITIAL BINDING
Maximum binding capacity	$B_{maxe1} = 86 \pm 7$ (pmol. mg ⁻¹ protein)	$B_{max1} = 7.6 \pm 0.7$ (pmol. s ⁻¹ . mg ⁻¹ protein)
Apparent dissociation constant (μM)	$K_{de1} = 2.2 \pm 0.2$	$K_{di1} = 12.1 \pm 1.4$

A**B****Figure 1.**

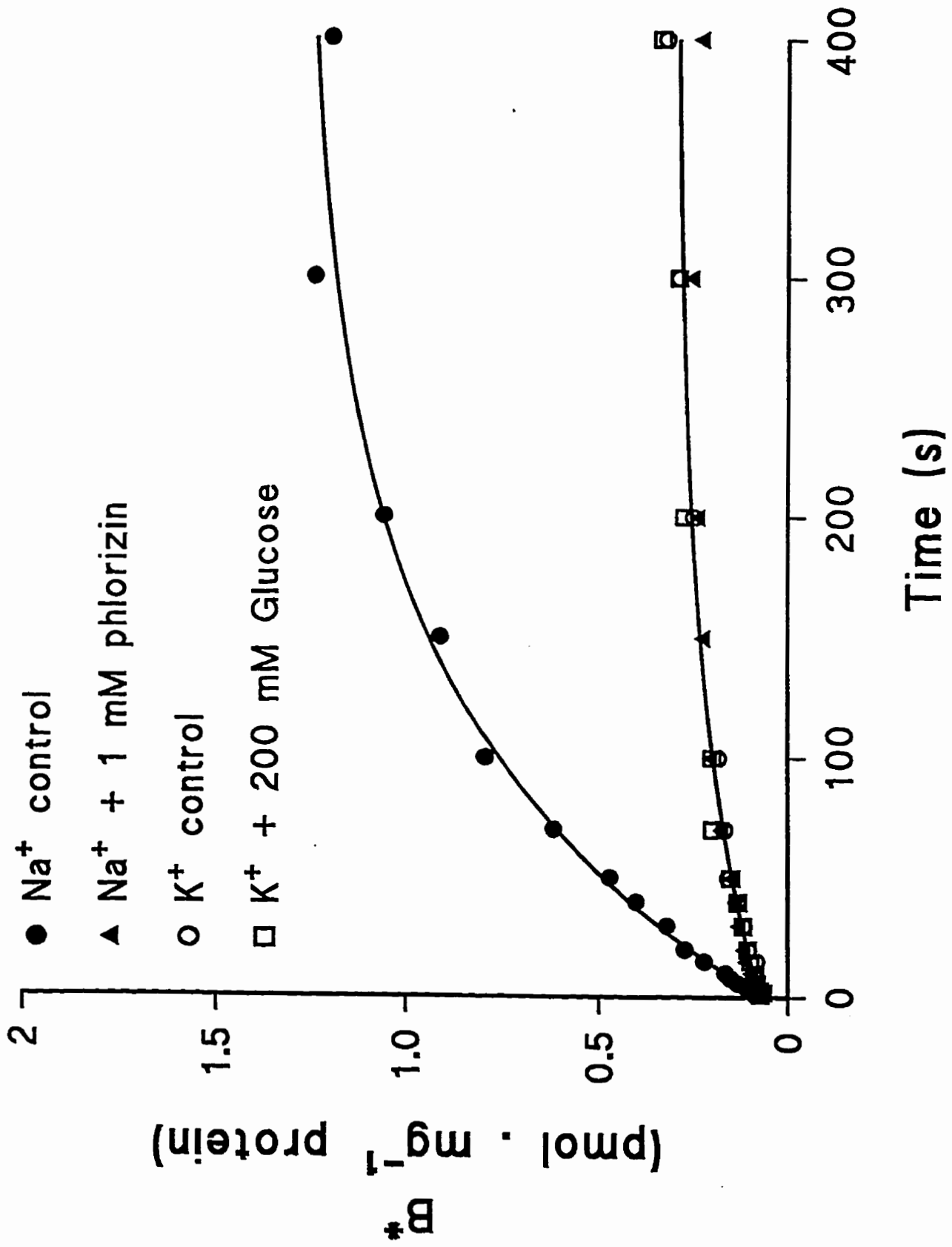


Figure 2.

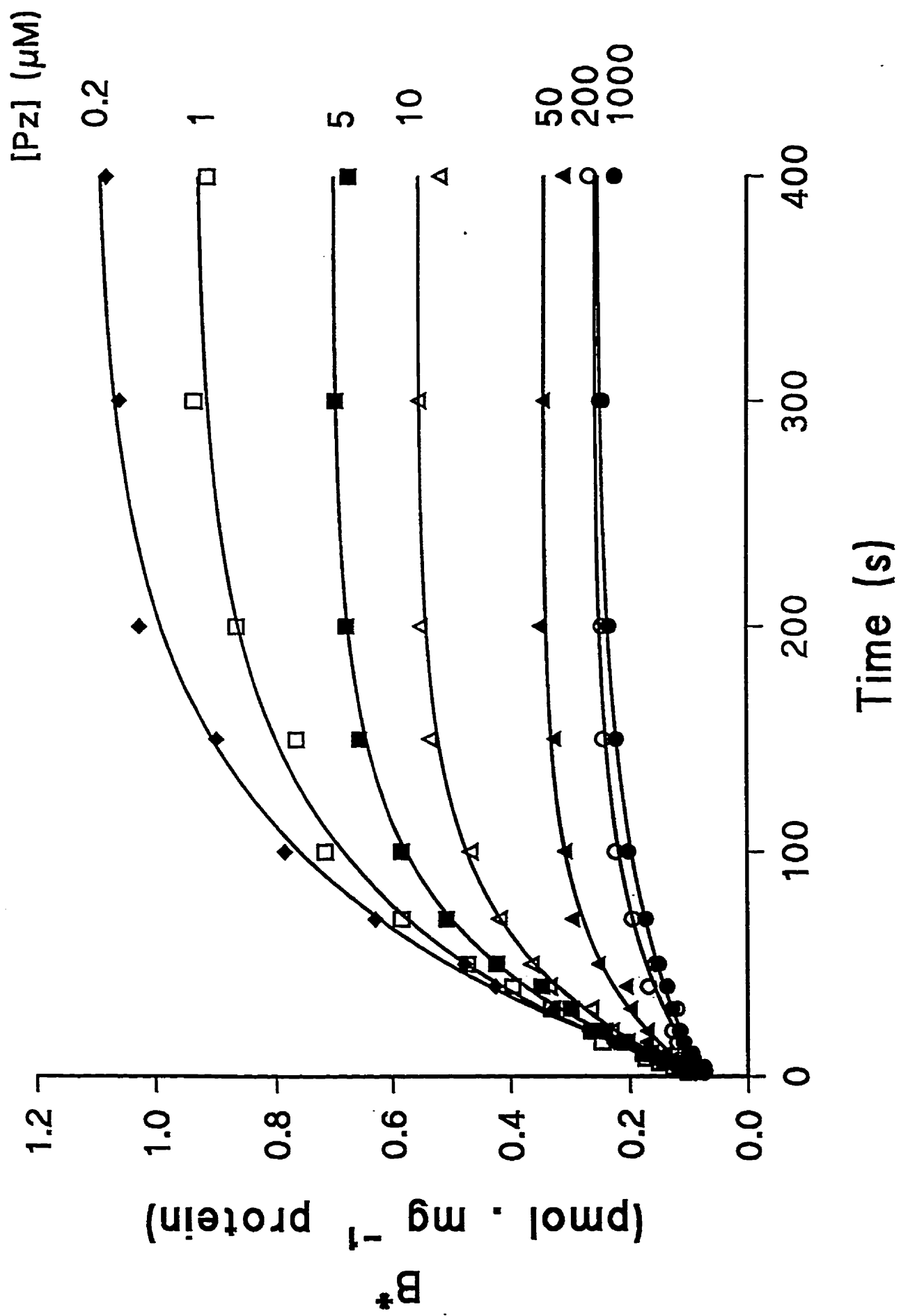


Figure 3.

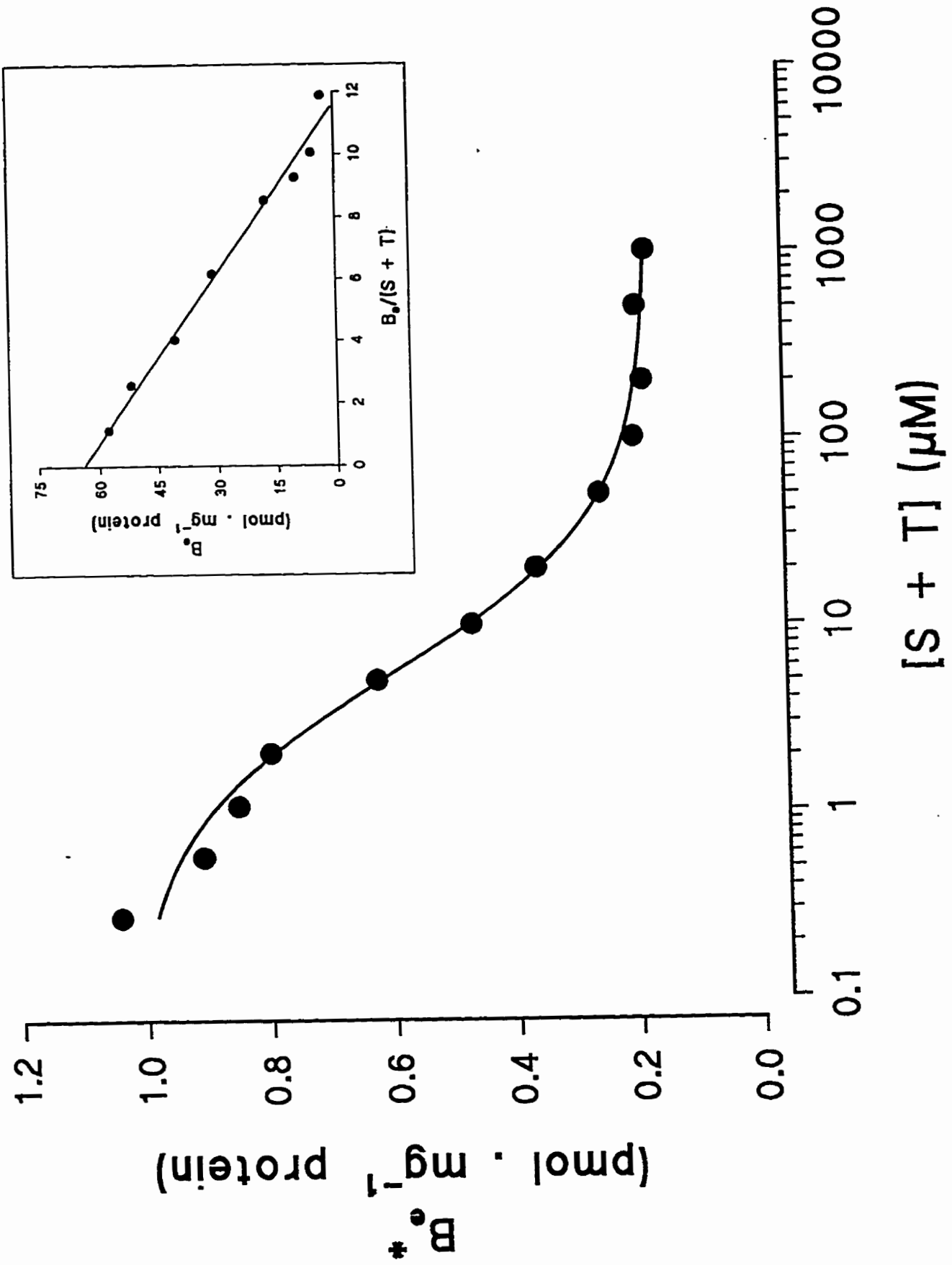


Figure 4.

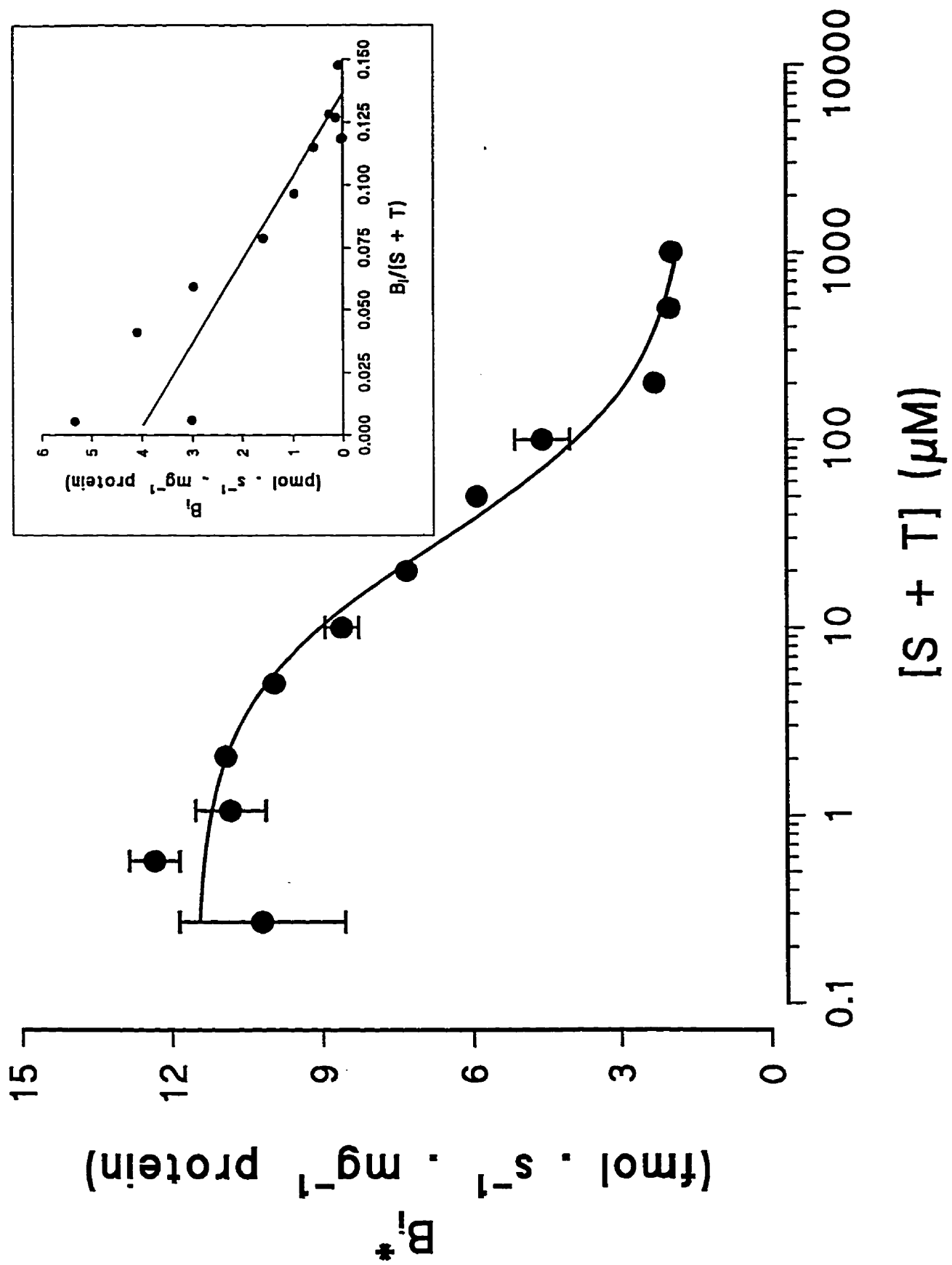


Figure 5.

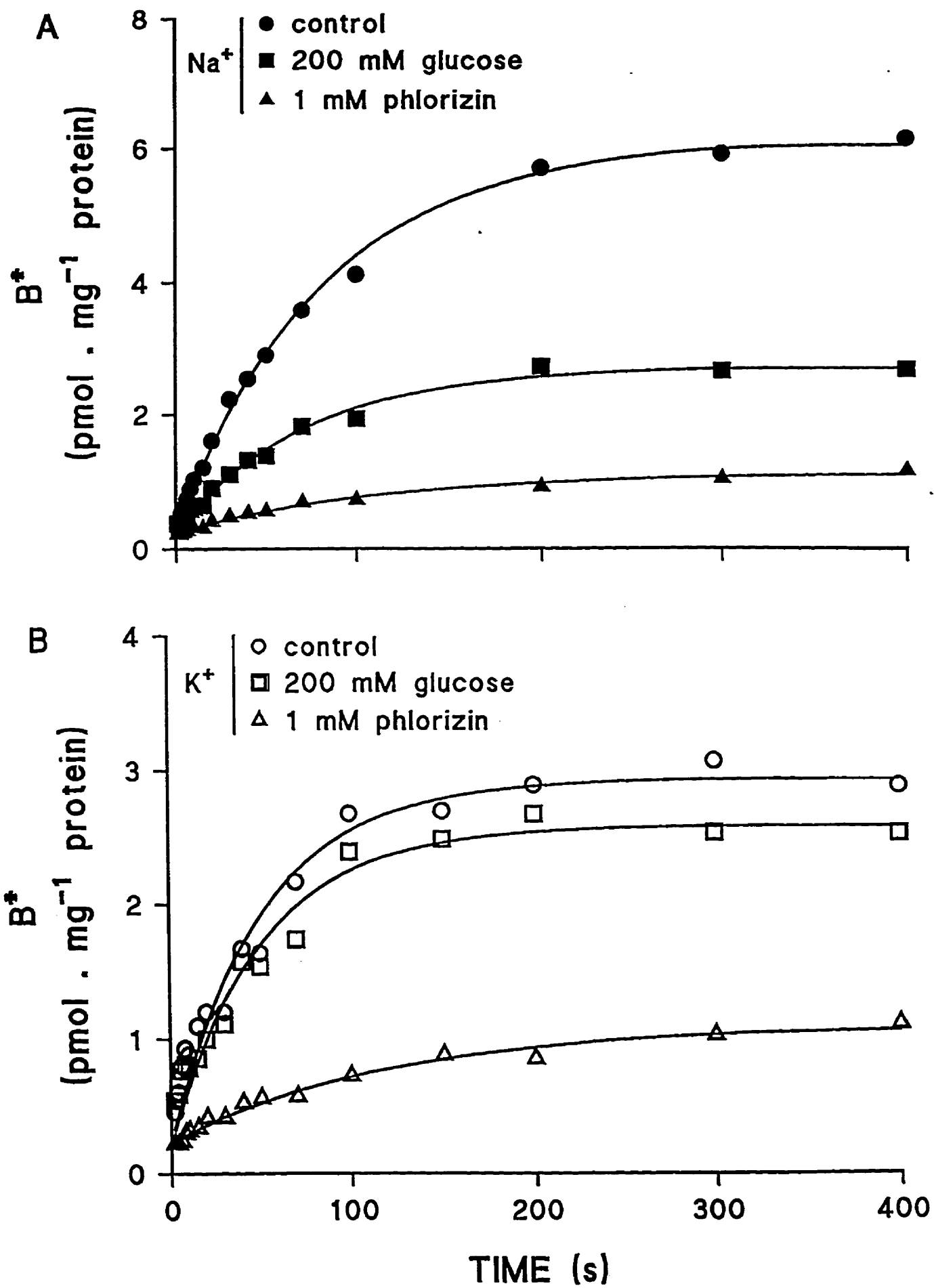


Figure 6.

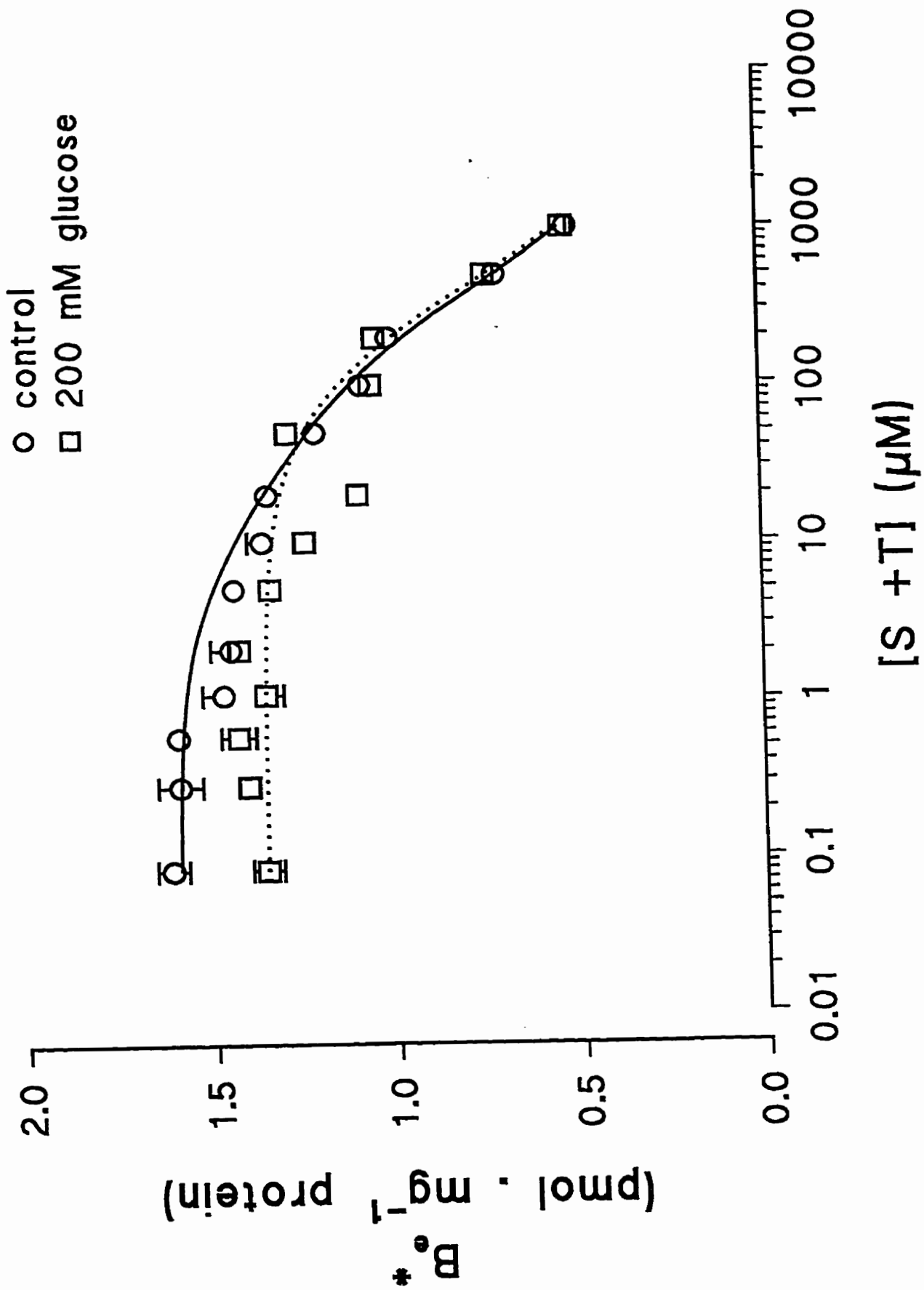


Figure 7.

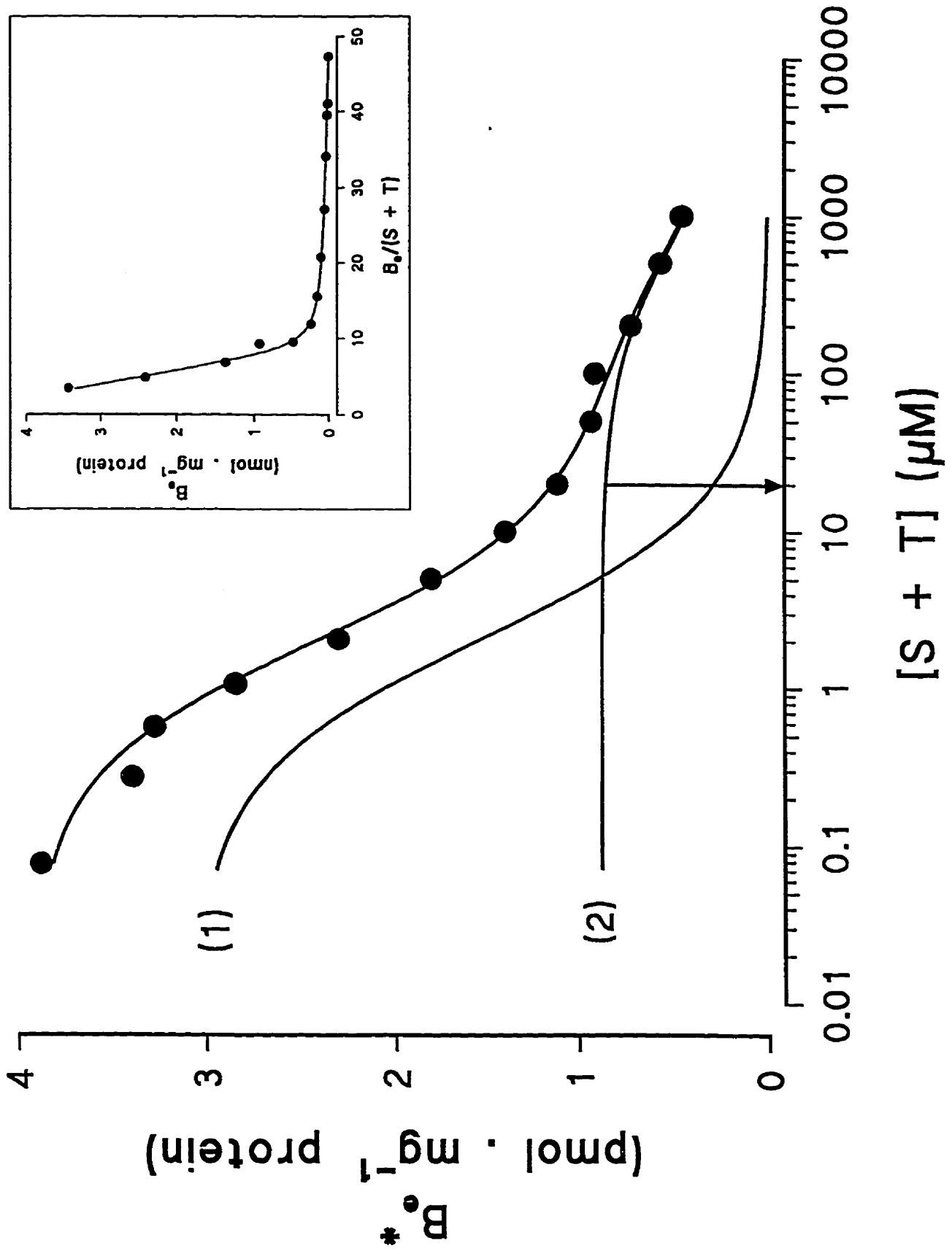


Figure 8.

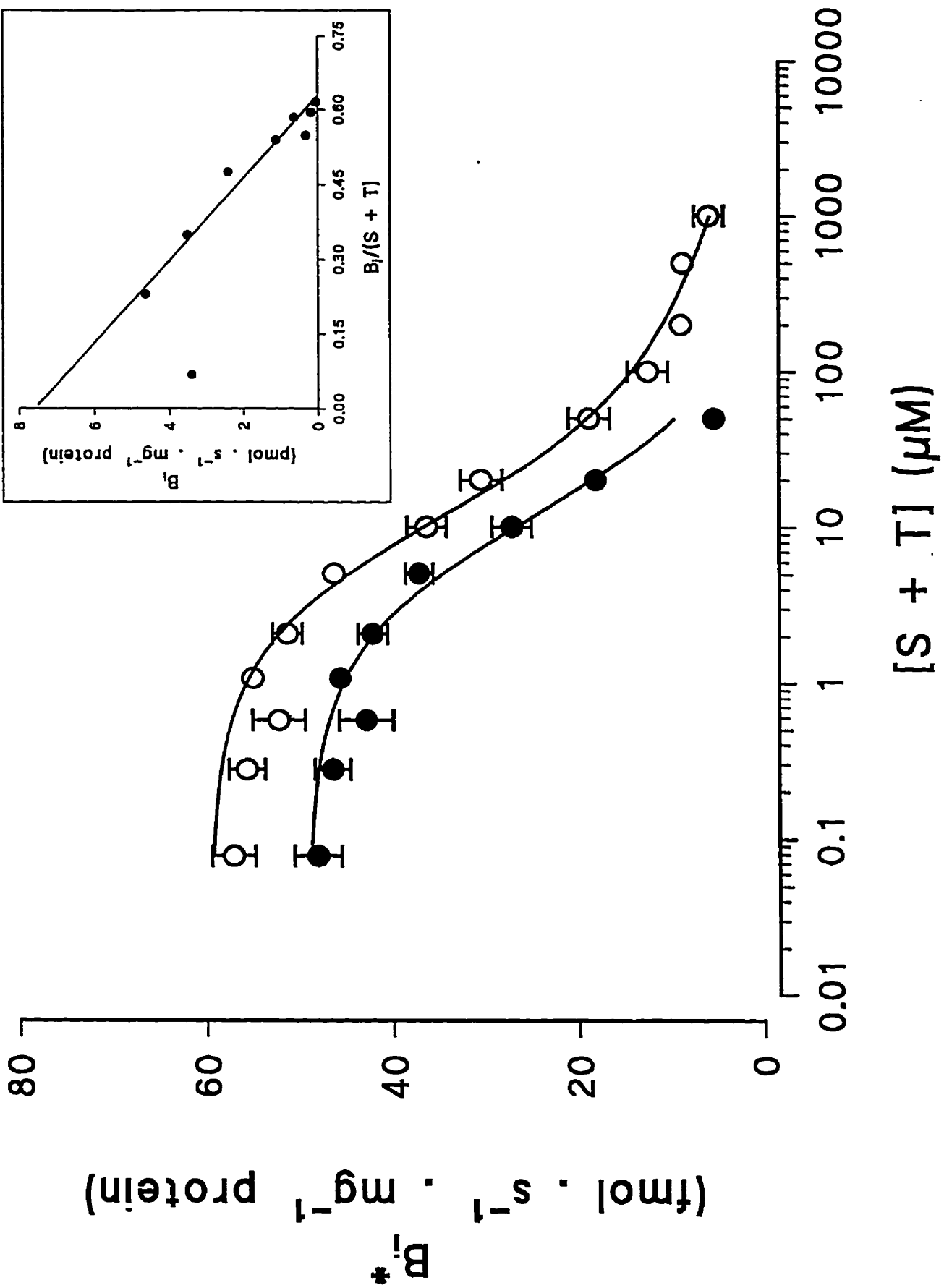


Figure 9.

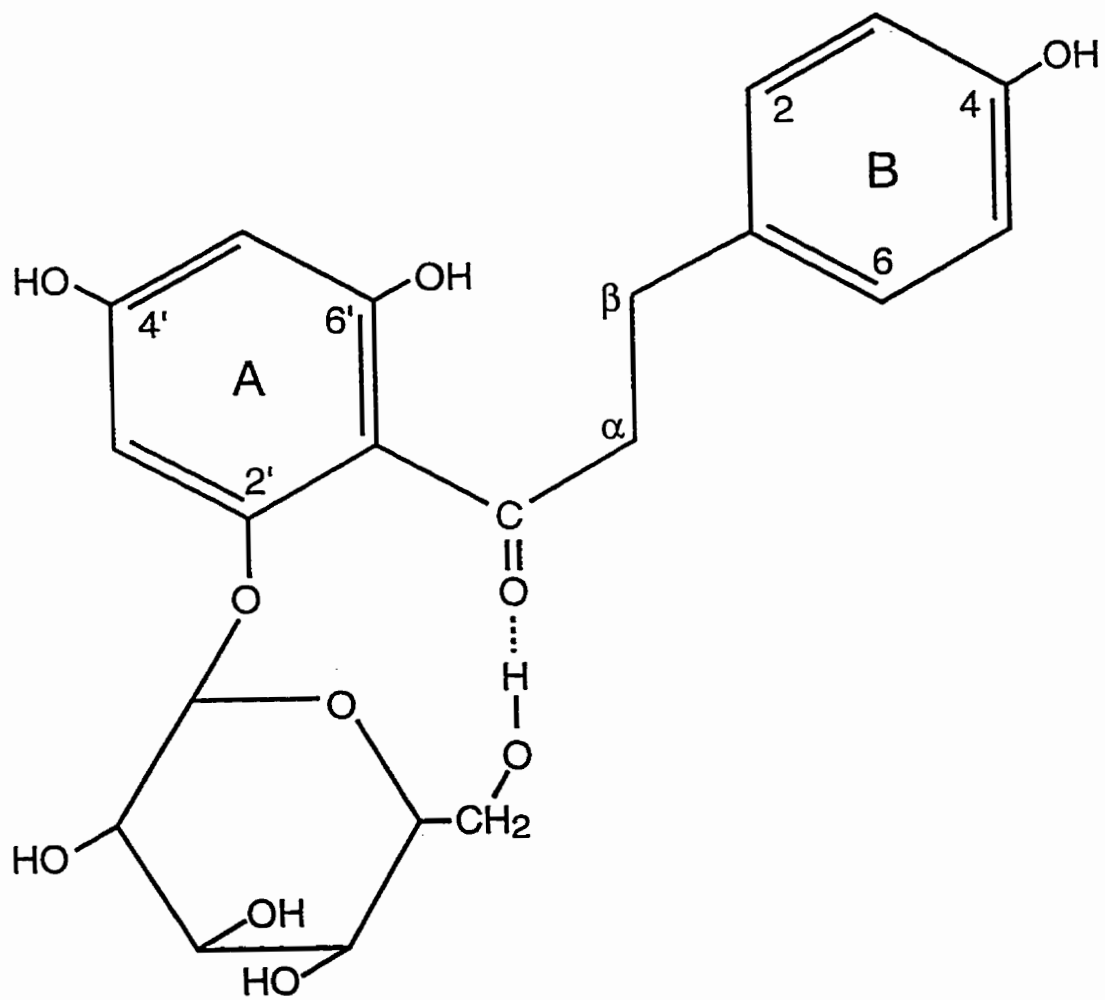


Figure 10.

CHAPITRE IV: Article trois: "Sugar transport heterogeneity in the kidney: two independent transporters or different transport modes through an oligomeric protein ? 3. Mechanism of phlorizin binding and implications"

**SUGAR TRANSPORT HETEROGENEITY IN THE KIDNEY:
TWO INDEPENDENT TRANSPORTERS OR DIFFERENT
TRANSPORT MODES THROUGH AN OLIGOMERIC PROTEIN ?
3. MECHANISM OF PHLORIZIN BINDING AND IMPLICATIONS.**

by

Nathalie OULIANOVA, Said FALK, and Alfred BERTELOOT*

Address: Membrane Transport Research Group
Department of Physiology
Faculty of Medicine
Université de Montreal
CP 6128, succursale "Centre-Ville"
Montreal (Québec) Canada H3C 3J7

Phone: (514)-343-5634

Fax: (514)-343-2111

(*): To whom correspondence and reprint requests should be addressed

RUNNING TITLE: PHLORIZIN BINDING MECHANISM

KEY WORDS: Na⁺-dependent sugar transport; phlorizin binding mechanism; allosteric kinetics; membrane vesicles (rabbit kidney)

ABSTRACT

The kinetics of high affinity phlorizin (HAP) binding were evaluated on a theoretical perspective with regards to the three most simple mechanisms of binding that may account for both rapid inhibition of Na⁺/D-glucose cotransport (SGLT) and slow binding of the inhibitor: i) one-step, rapid equilibrium mechanism (Scheme I) in which the rate of binding is dictated by slower steps in the transport cycle, ii) one-step, steady-state mechanism (Scheme II) in which the rate of binding is rate-limiting relatively to all other steps in the transport cycle, and iii) two-steps mechanism (Scheme III) in which rapid equilibrium binding of phlorizin to the transporter is followed by a slow isomerization step accounting for the (apparently) slow rate of binding. We also addressed the kinetics of phlorizin debinding at pH 8.6 in rabbit renal brush border membrane vesicles (BBMV) isolated from the whole kidney cortex using a fast-sampling, rapid-filtration apparatus (FSRFA, US patent # 5,330,717) for efflux measurements. It is demonstrated that: i) binding time course studies allow to distinguish unambiguously between the three proposed schemes; ii) Scheme III consistently accounts for the binding kinetics observed at pH 6.0 and 8.6; iii) rapid filtration techniques lead to a wash out of rapidly bound phlorizin, so that the carrier complex with inhibitor locked or occluded into the glucose site is the only one to contribute significantly to binding measurements; and iv) efflux kinetics follow the predictions of Scheme III in the presence of either 1 mM cold phlorizin or 200 mM D-glucose, but the absence of Na⁺ in the stop solution leads to rapid release of bound phlorizin. It is concluded that Scheme III: i) fully explains a 6-fold difference in the apparent K_d values characterizing initial and equilibrium binding conditions; ii) precludes an estimate of both the total number of binding sites and the true (although apparent) K_d of phlorizin binding from equilibrium binding measurements alone; iii) can be seen as a "slow-motion movie" of SGLT; and iv) requires a minimum of two Na⁺ ions to consistently account for phlorizin binding and release. We conclude to the homogeneity of HAP binding in kidney cortex BBMV, so that the high and low affinity glucose transport pathways most likely reflect different transport modes through a single protein that may qualify to represent rabbit SGLT1. A precise allosteric model of cotransport cannot be proposed at this time, however, but our studies appear compatible with either a negatively cooperative dimer, a dimer showing half-of-the-sites reactivity, or a combination of both.

INTRODUCTION

Whether the kinetic heterogeneity of Na⁺/D-glucose cotransport (SGLT)¹ first observed in the rabbit kidney proximal tubule [3,52-54] is the unique and direct consequence of the molecular diversity in renal SGLT proteins, a concept essentially supported by the consideration of the clinical findings associated with intestinal glucose/galactose malabsorption and renal glycosuria [12,41], is a question that was addressed by a number of laboratories over the last 15 years [6,8,17,22-23,32,34,44,58] and was more specifically revisited by our group in rabbit renal brush border membrane vesicles (BBMV) isolated from the whole kidney cortex [32-33]. Our glucose transport studies [32] confirmed the results of Turner and Moran [52] showing that the initial rate data in this preparation is compatible with the presence of both high-affinity glucose (HAG) and low-affinity glucose (LAG) transport pathways. However, the comparisons of HAG expression in rabbit intestinal [8] and renal [32] BBMV, and of SGLT characteristics in renal BBMV [32] vs cRNA-injected oocytes expressing the cloned SGLT1 [23,35] and SGLT2 [20,28,62] systems, led us to suggest that the HAG and LAG pathways expressed in the kidney proximal tubule most likely reflect different transport properties of SGLT1 rather than coexpression of distinct SGLT1 and SGLT2 proteins [32].

In support of the latter conclusion, our glucose transport studies in rabbit renal BBMV demonstrated that phlorizin inhibits competitively and with equal potency ($K_i = 15 \mu\text{M}$) both of the HAG and LAG transport routes [32]. The experimental basis which led Turner and Moran [52-54] to propose that low affinity phlorizin (LAP) and high affinity phlorizin (HAP) binding would characterize the former and the latter pathways, respectively, was thus seriously questioned [32], and it was concluded that Turner and Moran's studies [52-54] might in fact agree rather than conflict with ours [32]. Still, it was also noted that the K_i values estimated in our preparation [32], although lying within the range of 5-30 μM determined by Toggenburger et al. [50] for the K_d of phlorizin binding in rabbit intestinal BBMV under initial rate conditions, appeared close to one order of magnitude higher than the K_d values of 1.7 or 1.9 μM reported by Turner and Moran [54] for HAP binding under equilibrium conditions in the outer cortex or outer medulla, respectively. A reevaluation of the kinetics of phlorizin binding in rabbit renal BBMV resolved this issue by showing that our K_i value of 15 μM is fully compatible with the apparent dissociation constant of

phlorizin binding measured under initial rate conditions ($K_{di} = 10\text{-}30 \mu\text{M}$) but some 6-fold higher than the dissociation constant of phlorizin binding estimated at equilibrium ($K_{de} = 2\text{-}5 \mu\text{M}$) [33]. The question arises, then, as to what extent could the difference in the K_{di} and K_{de} values represent phlorizin binding on the same or different carrier proteins. Indeed, the former possibility may simply reflect the fact that the inhibitor binds to different conformational states of the same transporter under initial and equilibrium conditions or, alternatively, may just be a direct consequence of the binding mechanism itself. In this respect, it should be noted that large differences could be observed in the time course of phlorizin binding in renal vs intestinal BBMV from rat and rabbit, and that the binding velocity appeared to correlate with the K_d and K_i values [50]. Quite interestingly too, the apparent K_i values in the rabbit small intestine decreased from 40-50 μM at 0.1 s to approx. 7 μM in the time interval 1.3-1.8 s [50].

The observations of Toggenburger et al. [50] discussed above underscore the fact that neither the phlorizin binding nor the SGLT mechanisms themselves have been firmly established yet [21,42,61], and we think that the contrast between the slow rates of phlorizin binding usually reported in the kidney [9,18,22,33,50,57] on one hand, and the fast turnover rates of glucose transport noted in the small intestine and the kidney [21,42,61] on the other hand, could be highly relevant in this context. The early studies of Diedrich [13-16] and Alvarado [1] suggested that phlorizin binding to SGLT involves both the glucose and aglucone moieties of the molecule. In agreement with this proposal, Koepsell et al. [22] concluded more recently to a two independent-sites, two-steps mechanism of binding which was further rationalized in a dimer model of cotransport. Indeed, the concept of a polymeric structure of SGLT1 is also supported by inactivation radiation [4,45,47,51] as well as other studies [6,8,17,22-23,32,58], and the dimer model of cotransport proposed by Koepsell's group [22-23] would fit quite nicely within the framework of the allosteric mechanism of cotransport described by Chenu and Berteloot [8]. In the latter: i) the HAG and LAG transport pathways would be linked to the negative cooperativity between subunits postulated for glucose binding to the carrier during transport [8], and ii) the apparent homogeneity of phlorizin binding noted under both initial and equilibrium conditions [33] would indicate an absence of cooperativity for the nontransported inhibitor, as seems supported by the observations of Koepsell et al. [22]. In those last studies [22], however, the heterogeneity of the phlorizin molecule itself [16,33,50] was not addressed.

In this paper, the kinetics of phlorizin binding were first evaluated on a theoretical perspective, and it is demonstrated that uptake time course studies allow to distinguish unambiguously between the three most simple schemes that may account for slow inhibitor binding. Next, it is shown that the same two-steps mechanism of phlorizin binding consistently accounts for the uptake kinetics previously observed at pH 6.0 and 8.6 [33], and fully explains a 6-fold difference between the apparent K_d values measured under initial rate and equilibrium conditions [33]. Finally, we address the kinetics of phlorizin debinding at pH 8.6 in relation to the proposed mechanism, and we postulate the existence of a minimum of two Na^+ binding sites to reach a consistent picture of phlorizin binding and debinding kinetics. We conclude to the homogeneity of HAP binding in kidney cortex BBMV, so that the HAG and LAG transport pathways most likely reflect different transport modes through a single protein that may qualify to represent rabbit SGLT1 (rSGLT1).

THEORY

1) General approach

The formalism previously discussed and justified by Wierzbicki et al. [60] in the case of presteady-state kinetics was used to find out the time-dependent solutions of phlorizin binding, and the general and specific hypotheses, as well as the simplifications leading to the three most simple models of phlorizin binding considered in these studies, are discussed below.

2) General hypotheses

The general assumptions supporting the derivation of the binding equations presented in these studies regarding the kinetics of phlorizin binding are similar to those usually made in deriving transport equations [55-56]: i) the functioning of SGLT can be described according to a mobile-carrier type of mechanism, so that the Na^+ , glucose, and phlorizin binding sites are only accessible from one side of the membrane at a time; ii) the reorientation of the substrate sites are first-order processes whether considering the unloaded or either of the partially or fully loaded forms of the transporter; and iii) the total number of carriers (N_T) is constant and, at the steady-state, there is no net flux of carrier forms from one side of the membrane to the other.

2) Specific hypotheses and simplifications

The more specific assumptions and simplifications supporting the mathematical treatment given in section 1 of Results can be justified as follows from the consideration of the cotransport mechanism shown in Fig. 1A which was proposed and justified for rSGLT1 by Parent et al. [36]: i) phlorizin and glucose binding to the carrier are mutually exclusive processes, in agreement with the competitive mechanism observed for phlorizin inhibition of SGLT [1,7,9,13-14,18,32,43,49]; ii) phlorizin binds to a outward facing configuration of the carrier (N_3) only, a condition that may be satisfied if phlorizin itself is not transported at all through BBMV [46] or, alternatively, if the inward configuration of the relevant binding site precludes inhibitor binding [42]; and iii) under the experimental conditions used to record the kinetics of phlorizin binding in the preceding paper [33], i.e. no glucose in the intra- and extra- vesicular compartments and saturating Na^+ concentrations of 150 mM on both sides of the membrane, the Na^+ -loaded carrier complexes facing inward (N_6) or

outward (N_3) represent the only relevant carrier forms to be considered in the transport cycle, so that the model of Fig. 1A reduces to that of Fig. 1B.

3) The three possible schemes accounting for slow phlorizin binding

The general (although simplified) model of Fig. 1B predicts that the kinetics of phlorizin binding should be best described by a sum of two exponential functions [60]. However, because the time courses of tracer phlorizin uptake (B^*) recorded in the preceding paper [33] could be satisfactorily described by the first-order rate Equation (1)

$$B^* = B_0^* + B_e^* (1 - e^{-k_{obs}t}) \quad (1)$$

in which B_0^* represents the y intercept while B_e^* stands for the steady-state level of bound tracer reached with first-order rate constant k_{obs} , it can be assumed that only one of the two reactions involved in this mechanism is rate-limiting [60]. Accordingly, the two simple cases illustrated by schemes I and II in Fig. 2 have to be considered: i) in scheme I, it is assumed that phlorizin binding is fast as compared to carrier reorientation, so that the phlorizin binding step can be assumed to be under rapid equilibrium (dissociation constant $K_d = N_3(Pz)/N_7$), and the time course of phlorizin binding would be under control of the microscopic rate constants $k_{on} = k_{63}$ and $k_{off} = k_{36}$ which describe the in to out and out to in transitions of the Na^+ -loaded forms of the transporter; and ii) in scheme II, the reverse situation holds true, i.e. the reorientation of the Na^+ -loaded complexes is fast (and, then, can be described by an isomerization constant $L = N_6/N_3 = k_{36}/k_{63}$) while the phlorizin binding step is slow, so that the microscopic rate constants k_{on} and k_{off} now fully describe the latter.

Two comments should be made regarding schemes I and II in Fig. 2: i) scheme II is more realistic than scheme I over the 400 s time scale of our observations (33) because it has been shown that Na^+ transport through SGLT1 reaches a steady-state in a few hundred ms [35]; and ii) both schemes ignore the fact, as first proposed by Diedrich [13-16] and Alvarado [1] and later by Koepsell et al. [22], that phlorizin binding may involve both the glucose and the aglucone moieties of the phlorizin molecule. Thus, according to these remarks, a more realistic model of phlorizin binding can be depicted as scheme III in Fig. 2 in which a slow isomerization step follows the rapid equilibrium binding of phlorizin, so that the microscopic rate constants k_{on} and k_{off} now describe this isomerization step. From the formal representation of scheme III in Fig. 2, it is clear that the

slow isomerization step consecutive to fast phlorizin binding could be viewed in either of two ways, which are not mutually exclusive: i) phlorizin binds first through its glucose (or aglucone) moiety to the corresponding site on the transporter, and slow subsequent binding of the aglucone (or glucose) part of the molecule "locks" the inhibitor into the glucose site; and/or ii) fast binding of phlorizin to both of the glucose and aglucone sites on the transporter induces a slow conformational change (the same as would be induced by glucose binding itself during transport but with slower k_{on} and k_{off} rates due to steric hindrance or mechanistic constraints), so that the transporter is now locked into what could be called an "occluded", phlorizin bound form.

In any case, any one of these alternatives suggests that the phlorizin bound on the carrier may not be as easily accessible from the outside when loosely or tightly bound under the N_7 or N_8 states, respectively. Accordingly, because phlorizin binding is usually recorded using a rapid filtration technique, as was done in our studies as well [33], one may suspect that the washing process inherent to this technique could lead to a rapid wash out of the N_7 -bound form of phlorizin (and the more so if excess phlorizin is present in the stop solutions), so that the N_8 complex with phlorizin "locked" or "occluded" into the glucose site would be the only one to contribute to binding measurements. Thus, two cases must be considered in the case of Scheme III of Fig. 2 to take these two alternatives into account.

MATERIALS AND METHODS

1) **Materials**

Rabbits were purchased from the "Ferme de Sélection Cunipur" (St-Valérien, Québec). [Phenyl-3,3',5,5'-³H, propanone-3-³H]-phlorizin (specific activity 47.6 Ci/mmol) was supplied by New England Nuclear (NEN), the BCA (bicinchoninic acid) protein assay kit by Pierce, unlabeled D-glucose by Sigma, phlorizin and ultrapure salts by Aldrich, and amiloride hydrochloride and scintillation cocktail (β-blend) by ICN Biomedicals. Cellulose nitrate filters (12.5 mm diameter, 0.65 μm pore size) were obtained from Micro Filtration Systems (MFS). All other chemicals were of the highest purity available.

2) **Preparation of BBMV and uptake studies**

The experimental data regarding the kinetics of phlorizin binding discussed in this paper are the same as those previously presented in Fig. 3 of [33] for pH 8.6 conditions or used to generate Figs. 8-9 in [33] for pH 6.0 conditions.

3) **Efflux (debinding) studies**

The time courses of ³H-phlorizin debinding were determined using the automated fast-sampling, rapid-filtration apparatus (FSRFA, US patent # 5,330,717) developed in our laboratory [5]. BBMV were prepared as described in [32], resuspended in 50 mM Tris-MES buffer (pH 8.6) containing 0.1 mM MgSO₄, 300 mM mannitol, 50 mM KI, and 150 mM NaI, and frozen under aliquots in liquid N₂. For each assay, 40 μl of thawed BBMV were introduced into 900 μl of 50 mM Tris-MES buffer (pH 8.6) containing 0.1 mM MgSO₄, 0.5 mM amiloride, 300 mM Mannitol, 50 mM KI, 150 mM NaI, a fixed tracer concentration of 0.08 μM ³H-phlorizin, and either 0, 3, 12, or 1000 μM cold phlorizin. BBMV were first incubated for 10 min at room temperature (23-24 °C) before being introduced into the incubation chamber of the FSRFA also kept at room temperature. At time 0 of the efflux studies, 60 μl of cold phlorizin or D-glucose was injected into the incubation chamber to get 1 or 200 mM final concentrations of these products, respectively. At each time point, 50 μl of the uptake mixture was injected into 1 ml of ice-cold stop solution composed of 50 mM Tris-MES buffer (8.6), 0.1 mM MgSO₄, 300 mM mannitol, and 200 mM NaCl. The stopped mixture

was then filtered through 0.65 μm cellulose nitrate filters, and the filters were washed three times with 1 ml of ice-cold stop solution [5,8]. The substrate content of the vesicles was then determined by liquid scintillation counting as described previously [8].

It should be noted that: i) these experiments were performed at pH 8.6 only to avoid the contribution to efflux of the low affinity binding sites that are also present at pH 6.0 [33]; ii) phlorizin had to be dissolved into 17% ethanol to reach the critical concentration of 17 mM into the injector pipette which was necessary for these experiments, so that control experiments were run following addition of ethanol alone (since 60 μl were injected into 940 μl of vesicle suspension, 1% ethanol was present during all of the efflux experiments); and iii) in one of the control experiments, 150 mM KCl was substituted for 150 mM NaCl in the stop solution.

4) Data analysis

Refined analysis of the uptake time (t) courses of tracer phlorizin binding (B^* , pmol . mg⁻¹ protein) were performed using Equation (2)

$$B^* = B_0^* + \sum_{j=1}^n B_{e_j}^* (1 - e^{-k_j t}) \quad (2)$$

which states that the steady-state values of each of the n $B_{e_j}^*$ components of phlorizin binding should be reached with specific first-order rate constants k_j (the meaning of B_0^* is similar to that of Equation (1)).

The efflux data relative to tracer phlorizin (E^*) were analyzed using the single exponential decay Equation (3)

$$E^* = E_0^* e^{-k_e t} + E_e^* \quad (3)$$

in which E_0^* stands for the amount of tracer bound at $t = 0$ while k_e represents the first-order rate constant at which tracer binding reaches a new equilibrium (steady-state) level (E_e^*).

The kinetic parameters of phlorizin binding were estimated by nonlinear regression analysis of the respective displacement curves of tracer (T) by cold substrate (S) according to Equation (4),

$$B \cdot = \sum_{j=1}^n \frac{B_{maxj} T}{K_{dj} + S + T} + k_D T \quad (4)$$

the derivation of which has been both justified and given in full in a previous paper from our group [8] and assumes the presence of n Michaelis-Menten components working in parallel with a nonspecific process with apparent rate constant k_D .

Linear and nonlinear regression analyses were performed using a commercial software (Enzfitter, R.J. Leatherbarrow, copyright 1987, Elsevier-Biosoft). Accordingly, the errors associated with the kinetic parameter values reported in this paper represent the standard errors of regression (SER) on these parameters.

RESULTS

1) Time-dependent solutions of phlorizin binding according to schemes I-III in Fig. 2, and criteria allowing model discrimination.

a) Carrier-states distribution before phlorizin addition (N_i^*)

Since BBMV were equilibrated in the Na^+ medium before phlorizin addition [33], the steady-state distribution of the outward-facing (N_3) and inward-facing (N_6) Na^+ -loaded carrier complexes achieved at close to zero-time of uptake assays can be calculated as proposed in [60] from Equations (5-6)

$$N_T = N_3^* + N_6^* \quad (5)$$

$$k_{36}N_3^* = k_{63}N_6^* \quad (6)$$

which apply to all three schemes. The final results of the calculations are given in Table 1.

b) Carrier-states distribution at zero-time (N_i^0)

When phlorizin is added to BBMV at time $t = 0$, there will be fast redistribution of those N_i^* carrier forms which are involved in rapid equilibrium reactions [60], so that the new carrier-states distribution prevailing at zero-time can be calculated for each scheme using Equations (7-9).

$$\text{Scheme I:} \quad N_3^0 + N_7^0 = N_3^* \quad ; \quad N_6^0 = N_6^* \quad (7)$$

$$\text{Scheme II:} \quad N_3^0 + N_6^0 = N_T \quad ; \quad N_7^0 = 0 \quad (8)$$

$$\text{Scheme III:} \quad N_3^0 + N_6^0 + N_7^0 = N_T \quad ; \quad N_8^0 = 0 \quad (9)$$

The final results of the calculations are given in Table 1.

c) Time-dependent solutions of Schemes I-II

The time-dependent solutions of phlorizin binding according to schemes I-II in Fig. 2 can be found as follows [60]. In both schemes, N_7 is the only phlorizin-bound complex and, at any time from the onset of phlorizin addition up to the end of the incubation period where equilibrium

binding of phlorizin is observed, the carrier-states distribution should satisfy conservation Equation (10)

$$N_T = N_3 + N_6 + N_7 \quad (10)$$

in which the carrier forms N_3 and N_7 in scheme I, and N_3 and N_6 in scheme II are linked by rapid equilibrium steps. From the definitions of K_d and L given under Theory, it is quite obvious, then, that Equation (11)

$$N_3 = \frac{K_d}{(PZ)} N_7 \quad (11)$$

in the case of scheme I, and Equation (12)

$$N_6 = L \cdot N_3 \quad (12)$$

in the case of scheme II should also apply at any time during the binding experiments. The quantity dN_7/dt , which expresses the time-dependence of the phlorizin-bound complex in both schemes, can now be found from Equations (13)

$$\frac{d(N_3 + N_7)}{dt} = - \frac{dN_6}{dt} = k_{63}N_6 - k_{36}N_3 \quad (13)$$

for Scheme I, and from Equation (14)

$$\frac{dN_7}{dt} = - \frac{d(N_3 + N_6)}{dt} = k_{on}N_3(PZ) - k_{off}N_7 \quad (14)$$

for Scheme II, in which N_6 (scheme I) and N_3 (schemes I and II) can be expressed relatively to N_7 from Equations (10-12). Further rearrangements lead to Equations (15) and (16)

$$\frac{dN_7}{dt} = \frac{k_{63}N_T(PZ)}{K_d + (PZ)} - N_7 \left[k_{63} + \frac{k_{36}K_d}{K_d + (PZ)} \right] \quad (15)$$

$$\frac{dN_7}{dt} = \frac{k_{on} N_T (Pz)}{1 + L} - N_7 \left[k_{off} + \frac{k_{on} (Pz)}{1 + L} \right] \quad (16)$$

which apply to schemes I and II, respectively, and can be integrated over time to give Equation (17).

$$N_7 = N_7^S - (N_7^S - N_7^0) e^{-\alpha t} \quad (17)$$

In this equation: i) α represents the first-order rate (in s^{-1}) constant describing the approach to the steady-state, and its algebraic expression for schemes I and II, given by the terms under brackets in Equations (15) and (16), respectively, is explicitly shown in Table 2; and ii) the quantities N_7^0 and N_7^S stand for the amount of phlorizin bound at zero-time (see Table 1) and equilibrium, respectively. Indeed, in the case of scheme II for which $N_7^0 = 0$ (Table 1), Equation (17) can be reduced to Equation (18).

$$N_7 = N_7^S (1 - e^{-\alpha t}) \quad (18)$$

The algebraic expressions of N_7^S can be found from Equations (15) (scheme I) and (16) (scheme II) by setting $dN_7/dt=0$. Alternatively, the steady-state distribution of carrier forms can also be determined using a more classical treatment of schemes I-II, and the results of either one of these approaches are given in Table 1 for all carrier forms in these schemes.

d) Criteria allowing discrimination of Schemes I-II

It should be noted that the measurable quantity N_7^S , equivalent to the equilibrium binding quantity noted as B_e in our previous studies [33], can be presented under the Michaelis-Menten form of Equation (19)

$$N_7^S = B_e = \frac{B_{maxe} (Pz)}{K_{de} + (Pz)} \quad (19)$$

in which the parameters B_{maxe} (maximum binding capacity at equilibrium) and K_{de} (apparent dissociation constant at equilibrium) assume the algebraic expressions shown in Table 2. Accordingly, Schemes I and II cannot be distinguished from equilibrium binding studies, and similar

K_{de} values are measured independently of the binding mechanism (in both schemes, $K_{de} = K_d(1 + L)$) when taking into account the definitions of K_d and L given under Theory).

However, as is also apparent from Table 2, the two schemes have characteristic time-dependent approaches to the steady-state: i) in Scheme I, α decreases when the concentration of phlorizin increases (from the value of $k_{36} + k_{63}$ at low inhibitor down to the value of k_{63} when saturation is achieved); but ii) in Scheme II, α increases linearly with phlorizin concentrations (intercept = k_{off} ; gradient = $k_{on}/(1+L)$).

The initial rate of phlorizin binding B_i , a quantity that was also measured in our studies [33], might also prove helpful at model discrimination. Its algebraic expression can be found for schemes I and II from the first derivative of Equations (17) and (18) at $t = 0$, respectively [60]. Subsequent rearrangement using the values of N_7^S and N_7^0 shown in Table 1 thus leads to Equation (20)

$$B_i = \alpha(N_7^S - N_7^0) = \frac{k_{36}k_{63}N_T(PZ)^2}{(k_{36} + k_{63})[K_d + (PZ)]^2} \quad (20)$$

for Scheme I, and to Equation (21)

$$B_i = \alpha N_7^S = \frac{k_{on}N_T(PZ)}{1 + L} \quad (21)$$

for Scheme II. It is thus readily apparent that the initial rate of binding: i) should not saturate in the case of scheme II since increasing linearly with phlorizin concentrations as predicted by Equation (21), and ii) should not demonstrate simple Michaelis-Menten kinetics in the case of scheme I since square terms show up in both the numerator and denominator of Equation (20). In the latter case, Equation (20) can be rearranged according to Cleland to give Equation (22)

$$B_i = \frac{B_{maxi}(PZ)^2}{K_{di1}K_{di2} + K_{di2}(PZ) + (PZ)^2} \quad (22)$$

in which B_{maxi} (maximum rate of initial binding), K_{di1} , and K_{di2} (apparent binding constants at low and high phlorizin concentrations, respectively) assume the algebraic expressions shown in Table 2. It can be noted, then, that the deviation from pure Michaelis-Menten kinetics may be difficult to visualize due to the fact that there is a 4-fold ratio only between the values of K_{di2} and K_{di1} .

e) Time-dependent solution of Schemes III

The time-dependent solution of phlorizin binding expected for scheme III in Fig. 2 can be found in a way similar to that proposed for Schemes I-II using the relevant equations specific to this scheme: i) conservation Equation (23),

$$N_T = N_3 + N_6 + N_7 + N_8 \quad (23)$$

ii) Equations (11-12), and iii) time-dependence of the phlorizin bound complexes N_7 and N_8 given by Equation (24).

$$\frac{dN_8}{dt} = - \frac{d(N_3 + N_6 + N_7)}{dt} = k_{on}N_7 - k_{off}N_8 \quad (24)$$

Algebraic rearrangement of the latter equation to make it homogeneous relative to N_7 or N_8 thus leads to Equations (25-26)

$$\frac{dN_7}{dt} = \frac{k_{off}N_T(Pz)}{K_d(1+L) + (Pz)} - N_7 \left[k_{off} + \frac{k_{on}(Pz)}{K_d(1+L) + (Pz)} \right] \quad (25)$$

$$\frac{dN_8}{dt} = \frac{k_{on}N_T(Pz)}{K_d(1+L) + (Pz)} - N_8 \left[k_{off} + \frac{k_{on}(Pz)}{K_d(1+L) + (Pz)} \right] \quad (26)$$

which can be integrated. The time-dependence of N_7 is given by equation (17) while that of N_8 is similar in form to Equation (18) in which N_8 is substituted for N_7 , and the algebraic expressions of the parameters relevant to scheme III in the latter equations are shown in Tables 1 and 2. It should be noted that, as expected: i) the phlorizin-bound complexes N_7 and N_8 approach a steady-state with the same rate constant α , and ii) α shows a characteristic dependence on phlorizin concentrations as compared to schemes I-II, increasing from the k_{off} value at low inhibitor up to the value of $k_{on} + k_{off}$ at saturation as dictated by the apparent k_{on} value which follows Michaelis-Menten kinetics. However, the quantity $(N_7^s - N_7^0)$ has a negative sign, so that N_7 decreases when N_8 increases.

f) The two situations relevant to Scheme III and criteria for discrimination

As discussed under Theory, the presence in Scheme III of both loosely- (N_7) and tightly- (N_8) bound forms of phlorizin may not allow to detect both forms when using a rapid filtration technique. Accordingly, in a first situation, one may assume that both of the N_7 and N_8 complexes contribute to phlorizin uptake measurements, so that the time course of phlorizin binding would be described by Equation (27)

$$N_7 + N_8 = N_7^S + N_8^S - (N_7^S + N_8^S - N_7^0) e^{-\alpha t} \quad (27)$$

which sums up the time-dependent contributions of the N_7 and N_8 phlorizin-bound forms to total binding. In a second situation, however, one may suspect that the washing process inherent to the rapid filtration technique could lead to a rapid wash out of the N_7 -bound form of phlorizin, so that the N_8 complex would be the only one making significant contribution to binding measurements. In this case, then, the progress curves of phlorizin binding would be described by Equation (18) in which N_8 is substituted for N_7 .

The distinction between the two possibilities above cannot be done by curve fitting of the experimental data to Equations (18) and (27) because it can be easily verified that Equation (28)

$$N_7 + N_8 = N_7^0 + (N_7^S + N_8^S - N_7^0) (1 - e^{-\alpha t}) \quad (28)$$

is identical in form to Equation (27) and, thus, undistinguishable from Equation (18) but for the presence of the N_7^0 term. Accordingly, the two possibilities discussed above may only be differentiated when considering a family of progress curves recorded at different concentrations of phlorizin: i) the data should extrapolate to the origin or converge to the same point on the y axis should there be some nonspecific binding (or adsorption) of phlorizin (in)to the membranes in the case of Equation (18), but ii) should give different y intercept values representing the quantity N_7^0 which assumes a Michaelis-Menten dependence on phlorizin concentrations (see Table 1) in the case of Equations (27-28). This conclusion is obvious when considering the respective equations and setting $t = 0$. Moreover, both the equilibrium (N_8^S) and initial rate data should follow Michaelis-Menten kinetics in the case of Equation (18) (see Equations (29-30))

$$N_8^S = \frac{k_{on} N_T (PZ)}{k_{off} K_d (1 + L) + (k_{on} + k_{off}) (PZ)} = \frac{B_{maxe} (PZ)}{K_{de} + (PZ)} \quad (29)$$

$$B_i = \alpha N_8^S = \frac{k_{on} N_T (Pz)}{K_d (1+L) + (Pz)} = \frac{B_{maxi} (Pz)}{K_{di} + (Pz)} \quad (30)$$

and algebraic expressions of the parameters in Table 2) while they assume more complex dependence on phlorizin concentrations in the case of Equations (27-28) (see Equations (31-32).

$$B_i = \alpha (N_7^S + N_8^S - N_7^0) = \alpha B_e = \frac{k_{on} K_d (1+L) N_T (Pz)}{[K_d (1+L) + (Pz)]^2} \quad (31)$$

$$B_e = \frac{k_{on} K_d (1+L) N_T (Pz)}{k_{off} [K_d (1+L)]^2 + (k_{on} + 2k_{off}) K_d (1+L) (Pz) + (k_{on} + k_{off}) (Pz)^2} \quad (32)$$

Quite interestingly, however, both Equations (31) and (32) predict that plots of B_i and B_e versus phlorizin concentrations should go through a maximum before decreasing down to zero (square terms in phlorizin concentrations are present in the denominator only).

2) Testing the kinetics of phlorizin binding against the predictions of Schemes I-III

a) First screening tests

The most important results relating to the kinetics of phlorizin binding to renal BBMV and reported in the preceding paper [33] can be summarized and compared to the predictions of Schemes I-III detailed in the previous section as follows. At both pH 6.0 and 8.6 where the phlorizin molecule can be considered as fully dissociated under its neutral (HPz) and negatively charged (Pz) forms [33], respectively: i) the uptake time courses of phlorizin binding could be successfully described by Equation (1) with the term B_0^* constant, a result that goes against the predictions of Schemes I and III when both N_7 and N_8 contribute to binding in the latter; ii) the initial rates of binding B_i were compatible with simple Michaelis-Menten kinetics, a result that would argue against Schemes I, II, and III when both N_7 and N_8 contribute to binding in the latter; and iii) the steady-states of phlorizin binding were also compatible with simple Michaelis-Menten kinetics, a result that would satisfy all schemes but Scheme III when both N_7 and N_8 contribute to binding.

Interestingly, only Scheme III in which the phlorizin-bound complex N_8 alone would contribute to binding survives those first screening tests while its counterpart, in which both of the loosely- (N_7) and tightly- (N_8) bound complexes would be measured, failed on all of the tests. The latter is thus eliminated from consideration in the following sections. As to the final acceptability of the former relatively to Schemes I-II, Table 2 clearly indicates that the first-order rate constant α , which has the same meaning as k_{obs} in Equation (1) used to analyze the kinetics of phlorizin binding in the preceding paper [33], is a very important parameter for model discrimination because its dependence on phlorizin concentrations is highly characteristic for each of Schemes I-III. To help the reader in the following up of the forthcoming discussion on the analysis of this key element of our studies, the kinetic parameters of phlorizin binding determined in [33] at pH 6.0 and 8.6 under both initial and equilibrium conditions have been summarized in Table 3.

b) Concentration dependence of the first-order rate constant at pH 8.6

As shown in Fig. 3 for pH 8.6 studies, k_{obs} first increases from the value of 0.0110 ± 0.0004 s^{-1} recorded at the lowest Pz^- concentration of $0.2 \mu M$ up to a maximum value of 0.0219 ± 0.0020 s^{-1} estimated at $100 \mu M$ phlorizin, and then decreases down to its original value at 1 mM phlorizin (0.0110 ± 0.0005 s^{-1}). It should be noted that the transition from an increasing to a decreasing function occurs at some 95% or 77% saturation of the specific binding process as can be calculated from the equilibrium or initial binding parameters, respectively (see Table 3). In any case, the contribution of the specific binding component to total binding can be considered as negligible (i.e. beyond the detection level when compared to the experimental errors) at the phlorizin concentrations of 0.5 and 1 mM , in agreement with the predictions of Equation (4) with $n = 1$ when $S \gg K_{d1} + T$. These results thus clearly indicate that a full description of the binding time courses shown in Fig. 3 of [33] should have used Equation (2) with $n = 2$ rather than Equation (1) to account for both of the specific (B_s^*) and nonspecific (B_n^*) binding components characterized at pH 8.6 (that would thus be reached with the true first-order rate constants k_1 and k_2 , respectively).

This conclusion, which appears quite obvious *a posteriori*, was thus evaluated further by refitting those data as suggested above. Unfortunately, when the 5 parameters of Equation (2) with $n = 2$ were left free to adjust to the experimental data, the results at low and high phlorizin concentrations could not be fitted to this Equation, and the analysis in the midrange of phlorizin concentrations gave inconsistent results. This behavior is not unexpected, however, because: i) k_1

$\approx k_2$ at low phlorizin concentrations as shown in Fig. 3 and [33], so that Equation (2) degenerates to Equation (1) at these concentrations; ii) as discussed in the previous paragraph, $B_{e1}^* \approx 0$ at high phlorizin concentrations, so that Equation (2) also degenerates to Equation (1) at these concentrations; and iii) in the midrange of phlorizin concentrations, the k_1 and k_2 values may not be separated enough to allow a meaningful extraction of the parameters. The latter conclusion is indeed supported by the fact that Equation (1) could satisfactorily describe the data shown in Fig. 3 of [33]. The only way to conduct the analysis was thus to fix some of the parameters at values that can be determined independently. Accordingly, B_0^* was fixed to the value estimated from the initial rate studies ($0.078 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$ [33]), and B_{e2}^* should be well described, as obvious from Equation (4) with $n = 1$, by the $k_D T$ value at equilibrium (with $k_D = 2.39 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ [33]). Finally, the parameter k_2 was fixed at a value of 0.011 s^{-1} which represents the arithmetic mean of the k_{obs} observed at 0.5 and 1 mM phlorizin (Fig. 3). Under these conditions, a consistent set of B_{e1}^* and k_1 parameters could be obtained over the 0.2-100 μM range of phlorizin concentrations.

The validity of this approach is demonstrated in Fig. 4 by showing that the displacement curve constructed from B_{e1}^* (open circles) is compatible with the data previously obtained from B_{e2}^* using Equation (1) (closed triangles, B_{e2}^* values corrected for nonspecific binding) in [33].

As shown in the inset of Fig. 3, the new parameter k_1 can be fitted to the Michaelis-Menten type Equation (33)

$$k_1 = k_{\min} + \frac{k_{\max} (S + T)}{K_m + S + T} \quad (33)$$

with parameters values of K_m (analogous to a Michaelis-Menten constant), k_{\min} (minimum value of k_1 given by the y intercept), and k_{\max} (maximum value of the second term on the right-hand side of the equation reached at saturation of cold, S, and tracer, T, phlorizin) as given in Table 4. When compared to the predictions of Schemes I-III in Fig. 2, it is readily apparent that Equation (33) is similar in form to the algebraic expression of the parameter α characterizing unambiguously a mechanistic model in which fast binding of phlorizin to the carrier is followed by a slow isomerization step (see Table 2). Accordingly, the k_{on} and k_{off} values (the rate constants of the slow

isomerization step in Scheme III of Fig. 2) would correspond, respectively, to the k_{\max} and k_{\min} values determined using Equation (33).

c) Concentration dependence of the first-order rate constant at pH 6.0

As shown in Fig. 5 for pH 6.0 studies, the first-order rate constant k_{obs} of the binding process first increases from the value of $0.0145 \pm 0.0005 \text{ s}^{-1}$ recorded at the lowest HPz concentration of $0.078 \text{ }\mu\text{M}$ up to a maximum value of $0.0257 \pm 0.0014 \text{ s}^{-1}$ estimated at $10 \text{ }\mu\text{M}$ phlorizin, and then decreases down to a value of 0.0117 ± 0.0009 at 1 mM phlorizin. Again, it should be noted that the transition from an increasing to a decreasing function occurs at some 80% saturation of the Na^+ -dependent binding process and that this specific binding component can be considered as fully saturated at phlorizin concentrations over $100 \text{ }\mu\text{M}$ (see kinetic parameters in Table 3). These results thus clearly indicate that a full description of the binding time courses of HPz binding should take into account the fact that binding at pH 6.0 is the sum of three independent processes [33], so that Equation (2) with $n = 3$ should have been used instead of Equation (1) in our former analyses. Still, it should be noted that the k_{obs} value of 0.012 s^{-1} recorded at 1 mM cold HPz (Fig. 5), a concentration at which the specific, Na^+ -insensitive component of binding is less than 50% saturated [33], is within the range previously determined at pH 8.6 (Fig. 3) and in a K^+ medium at pH 6.0 [33] for the nonspecific fraction of phlorizin binding. Accordingly, it can be concluded that the two Na^+ -independent components of HPz binding proceed with similar first-order rates, so that Equation (2) with $n = 2$, $k_2 = 0.012 \text{ s}^{-1}$, and the B_{e2}^* term given by Equation (34)

$$B_{e2}^* = \frac{B_{\text{max}e2} T}{K_{de2} + S + T} + k_D T \quad (34)$$

should be sufficient to fully describe the uptake data at pH 6.0. As was the case at pH 8.6: i) the B_0^* parameter was fixed to a value estimated from initial rate studies ($0.297 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$ [34a]), and ii) the B_{e2}^* parameter was fixed to a value calculated using Equation (34) and the kinetic parameters in Table 3 at each of the phlorizin concentrations used in our studies up to $20 \text{ }\mu\text{M}$ [33].

Under these conditions, a consistent set of B_{e1}^* and k_1 values could be obtained, and this approach is validated by the fact that the kinetic parameters ($B_{\text{max}e1} = 88 \pm 6 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$; $K_{de1} = 2.3 \pm 0.2 \text{ }\mu\text{M}$) estimated from the displacement curve constructed from B_{e1}^* (data not shown) are compatible with those given in Table 3. Also, as shown in the inset of Fig. 5, k_1 could be fitted to

Equation (33) with kinetic parameter values as reported in Table 4. It would thus appear that the mechanism of HPz binding at pH 6.0 is similar to that previously observed for Pz⁻ at pH 8.6 and can be accounted for only by scheme III in Fig. 2 (Table 2).

It should be noted that the apparent (but true) dissociation constant of the rapid equilibrium binding step (K_{di} or K_m in Tables 3 and 4, respectively) is some 3-fold lower, and that both of the k_{on} and k_{off} rates of the slow isomerization step are faster (Table 4) for HPz as compared to Pz⁻ binding. Still, because the value of the equilibrium constant describing the slow isomerization step (defined as the ratio $k_{off}/k_{on} = K_{iso}$) is not affected much by pH ($K_{iso} = 0.186 \pm 0.029$ and 0.230 ± 0.026 at pH 6.0 and 8.6, respectively, as calculated from the k_{on} and k_{off} values in Table 4), it would appear that the higher affinity of HPz as compared to Pz⁻ binding is the main determinant of the kinetics of phlorizin binding at the two pH's. Still, it cannot be resolved whether the affinity change results from the difference in the ionization state of the molecule or in the conformation of the cotransporter associated with (de)protonation of the protein.

d) Consistency tests of Scheme III

The consistency of our experimental results with the predictions of Scheme III in Fig. 2 was assessed at pH 6.0 and 8.6 as follows.

Firstly, as shown for scheme III in Table 2, the apparent (but true) dissociation constant of the rapid equilibrium binding step, $K_{di} = K_d (1 + L)$, should be given by the analysis of the concentration dependence of either of the initial rates of binding or the first-order rate constant describing the progress curves of HPz and Pz⁻ binding. This prediction of scheme III is satisfied in our studies as clearly indicated by the comparison of the K_{di} (Table 3) and K_m (Table 4) values.

Secondly, as also shown in Table 2, scheme III predicts that the apparent K_{de} values of HPz and Pz⁻ binding should be lower than the apparent (but true) K_{di} value of the rapid equilibrium binding step by a factor $k_{off}/(k_{on} + k_{off})$. It is noteworthy, then, that the K_{de} values shown in Table 5 and calculated from the K_{di} (Table 3) or K_m (Table 4) values, and the k_{on} and k_{off} values (Table 4) encompass those determined experimentally and reported in Table 3.

Thirdly, from the quite obvious relationships linking in Scheme III B_{maxe} and B_{maxi} on one hand, and K_{de} and K_{di} on the other hand (see Table 2), it can be demonstrated that Equations (35-37)

$$K_{off} = \frac{B_{maxi}}{K_{di}} \cdot \frac{K_{de}}{B_{maxe}} \quad (35)$$

$$k_{on} = \frac{B_{maxi}}{B_{maxe}} - k_{off} \quad (36)$$

$$k_{on} = k_{off} \left[\frac{K_{di}}{K_{de}} - 1 \right] \quad (37)$$

should hold. Accordingly, it is possible to determine the k_{on} and k_{off} values characterizing the slow isomerization step from the initial and steady-state binding data only. Again, as shown in Tables 4 and 5, respectively, there is a close agreement between the experimental k_{max} and k_{min} , and the calculated k_{on} and k_{off} values. However, it should be noted that the errors associated with k_{on} , as compounded during the calculations from the SER values of the kinetic parameters reported in Table 3, are quite high when this parameter was determined using Equation (37).

e) Determination of the number of carrier sites

As clearly indicated in Table 2, and in contrast to Schemes I-II, neither the initial nor the equilibrium binding studies allow to directly determine N_T (the total number of specific binding sites) in scheme III. However, this important parameter can be calculated from either of the B_{maxe} or B_{maxi} values provided that the k_{on} and k_{off} values are known (Table 2). As shown in Table 5, similar N_T values were indeed estimated when computed from either of the B_{maxe} or B_{maxi} data shown in Table 3. Moreover, the true number of HPz and Pz binding sites is similar (Table 5).

3) Efflux studies

A characteristic feature of the mechanism of phlorizin binding determined in the previous section and represented by scheme III in Fig. 2 is the presence of a tightly-bound carrier-phlorizin complex (N_8) which contributes alone to phlorizin binding measurements when using a rapid filtration technique and appears completely isolated from the transport cycle (represented by the N_3 and N_6 carrier states) because of the presence of a slow isomerization step (dead-end inhibition). Accordingly, tracer phlorizin "locked" or "occluded" into the glucose site (see Theory section) should not be readily displaceable by saturating concentrations of either cold phlorizin or D-glucose

(phlorizin displacement would only be possible through the loosely-bound phlorizin-carrier complex N_7). Similarly, the kinetics of phlorizin debinding (efflux) should be insensitive to the presence or absence of Na^+ in the incubation medium. Indeed, this last prediction falls short from being verified in view of the redundant observation reported in the literature that phlorizin efflux is much faster in the absence than in the presence of Na^+ [2,40,50,57]. This important point was qualitatively confirmed in our studies by showing that there was no phlorizin binding at all to be measured when using a Na^+ -free stop-solution at pH 8.6 (the situation was different at pH 6.0, however, in agreement with the conclusion in [33] that H^+ may substitute for Na^+ as an activator ion of the SGLT system(s)). This major discrepancy relatively to one of the predictions of scheme III as depicted in Fig. 2 will be discussed further later on but does not answer the question as to whether or not cold phlorizin and D-glucose may access directly the tightly-bound phlorizin-carrier complex.

The following series of experiments were thus performed to answer this critical issue and the results are presented in Fig. 6 from which it can be appreciated that: i) the kinetics of phlorizin efflux could be satisfactorily accounted for by the single exponential decay Equation (3) under all of the experimental conditions; ii) the addition of ethanol (Figs. 6A and 6B, open circles) to the BBMV suspension led to a slow efflux of tracer-bound phlorizin (mean k_e value = $0.0175 \pm 0.0014 \text{ s}^{-1}$) down to a new steady-state value compatible with tracer dilution alone; and iii) the addition of either 1 mM cold phlorizin (Fig. 6A, mean $k_e = 0.0151 \pm 0.0014 \text{ s}^{-1}$) or 200 mM D-glucose (Fig. 6B, closed squares, $k_e = 0.0163 \pm 0.0010 \text{ s}^{-1}$) also led to slow efflux processes. The fact that cold phlorizin and glucose are both equally inaccessible to the tightly-bound tracer phlorizin is quite apparent from Fig. 6B in which tracer displacement by 1 mM cold phlorizin (closed circles) was also used as an internal control in the glucose displacement studies.

The above results thus conform to the mechanistic features of scheme III in Fig. 2 which predict: i) insensitivity of k_e to the amount of phlorizin previously bound to the carrier and to the process used to trigger debinding; ii) k_e values in the range of those estimated for k_{off} during uptake studies at pH 8.6 (see Table 4, but note that the comparison should take into account the temperature difference between the two sets of experiments); and iii) kinetic parameters ($B_{\text{maxe}} = 85 \pm 15 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$; $K_{d_e} = 4.2 \pm 0.8 \text{ } \mu\text{M}$) similar to those reported in Table 3 at pH 8.6 when analyzing the displacement curve (data not shown) constructed from the E_0^* values (amplitude of tracer efflux in Equation (3) which should also measure the steady-state amount of tracer bound during uptake).

DISCUSSION

1) **Homogeneity of (Na⁺-dependent, D-glucose-sensitive) HAP binding in BBMV isolated from the rabbit kidney cortex.**

The point was made earlier that the kinetic approach used in our glucose transport studies should have allowed to resolve a 2- to 3- fold difference in the K_i of phlorizin inhibition of the HAG and LAG transport pathways [32]. It was suggested later, however, that a similar conclusion would not apply when considering the apparent homogeneity of the HAP binding sites observed in initial (dissociation constant K_{di}) and equilibrium (dissociation constant K_{de}) phlorizin binding studies [33], and the more so since different K_d values were determined under the two experimental conditions [33]. The present studies now answer unambiguously the latter issue by showing that Scheme III in Fig. 2 is fully compatible with the uptake kinetics of HPz (pH 6.0) and Pz⁻ (pH 8.6) binding, and consistently accounts for the close to 6-fold difference noted in the K_{di} and K_{de} values at both pH's [33]. Indeed, this demonstration appears as a necessary and sufficient condition to conclude that the HAP sites characterized in rabbit BBMV isolated from the whole kidney cortex are homogeneous and identify the expression of a single transport protein in the proximal tubule. It can be provisionally proposed, then, that rSGLT1 is likely to represent this unique cotransport protein on the following grounds: i) a SGLT1 gene has been isolated from the rabbit kidney that shows > 99% homology with its intestinal rSGLT1 counterpart [10,30-31]; ii) the rSGLT1 protein has been localized unambiguously to proximal tubule cells [11,25,48] although it is not quite clear yet whether its expression occurs in all of the S1-S3 segments or is restricted to the S3 segment [25,34,44,62]; and iii) the HAG/HAP transport system characterized in our studies has a number of kinetic properties clearly demonstrated for rSGLT1 whether artificially expressed in *Xenopus* oocytes [61] or naturally found in rabbit intestinal BBMV [8] (handling of both glucose and galactose, K_i of SGLT inhibition, K_d of phlorizin binding, Na⁺/H⁺ dependence of HAP binding, and involvement of two Na⁺ ions as discussed in section 4 below).

It must be emphasized that the conclusion above does not question the heterogeneity of renal SGLT which is indeed strongly supported by the consideration of the clinical findings associated with intestinal glucose/galactose malabsorption and renal glycosuria [12,41]. It does question, however, the concept of molecular heterogeneity of SGLT proteins in the proximal tubule, and the

following two alternatives must be considered: i) a cotransport protein distinct and independent of rSGLT1 (putative rSGLT2) is present in cortical BBMV preparations as currently assumed [20,28,52-54,62], but phlorizin binding to such a second cotransporter would fall within the range of the experimental errors because of its characteristic B_{\max} and K_d values (in which case the number of LAP sites should be small relatively to the HAP sites because similar K_d values would be expected from the identical K_i values of glucose transport through LAG and HAG [32]) or, as suggested when discussing some of the mechanistic features associated with the binding model proposed in the present studies, would be washed out when using a rapid filtration technique (we rate as very unlikely, however, that two independent transporters conforming to Scheme III in Fig. 2 would do so with identical parameter values under all experimental conditions of our studies); or ii) the putative SGLT2 protein is localized somewhere else along the nephron as could be argued from the following pieces of evidence. Firstly, while both Hu14/hSGLT2 [20] and rat SGLT2 [62] mRNA were localized to early proximal tubule cells (S1 segment), it was also suggested that this clone might represent a nucleoside carrier because of its close relationship to Na^+ -dependent nucleoside cotransporters [28,39] and of its substantial evolutionary distance from the established SGLTs [39]. Secondly, the expression of SAAT1-pSGLT2 mRNA was reported to be strong in intestine, spleen, liver, and muscle but low in kidney [24], and, to our knowledge, the localization of the SAAT1-pSGLT2 protein along the nephron has yet to be established. Lastly, SAAT1-pSGLT2 was cloned from the pig kidney cell line LLC-PK₁ [24] showing functional differentiation patterns of proximal tubule cells [27,38] but hormonal sensitivity which resembles to some extent that of the medullary thick ascending limb of Henle's loop [19], and this ambiguity as to the tissular origin of LLC-PK₁ cells is underscored by the recent demonstration of SGLT activity in dog distal thick ascending limbs [59].

Indeed, the issue raised in the previous paragraph does not resolve the nature of the LAG pathway. One is thus left with the following problem to solve: how can homogeneous phlorizin binding be reconciled with heterogeneous glucose transport? A number of critical points may need to be considered first before trying to answer this question.

2) Phlorizin binding mechanism and implications for the modelization of SGLT

The mechanistic model that best-described the uptake kinetics of phlorizin binding is characterized by a slow isomerization step which follows rapid equilibrium binding of the inhibitor to the transporter (see Scheme III in Fig. 2). Moreover, because the tightly bound carrier-phlorizin complex is the only one to contribute significantly to binding measurements using a rapid filtration technique, this model fully accounts for both the instantaneous inhibition of SGLT activity upon phlorizin addition to the transport medium and the (apparent) slow rate of phlorizin binding to the transporter. The arguments leading to those conclusions have been discussed quite lengthy under Results and will not be repeated here. One may rather like to emphasize the fact that the presence of a slow isomerization step consecutive to phlorizin binding, which appears to isolate a phlorizin-bound complex out of the main transport cycle (see Fig. 1A), has a number of kinetic implications for the modelization of SGLT worth to be stated explicitly.

Firstly, the kinetic parameters of phlorizin binding estimated at equilibrium (B_{maxe} and K_{de}) measure directly neither the number of binding sites (N_T) nor the true dissociation constant of phlorizin binding to the transport protein because their algebraic expressions include the microscopic rate constants k_{on} and k_{off} characterizing the slow isomerization step (see Table 2). The true (although apparent) dissociation constant (K_{di}) can only be found from the analysis of the initial binding rates (giving also B_{maxi}) and/or the first-order rate constants describing the progress curves of phlorizin uptake (giving also k_{on} and k_{off}), and N_T can only be calculated following the previous determination of k_{on} and k_{off} . However, in the absence of progress curves, k_{on} and k_{off} can also be estimated from the comparison of the initial and steady-state binding data.

Secondly, and similarly to the parameters V_{max} and K_m characterizing glucose transport which do not give any indication as to the number of transport sites or the value of the true dissociation constant of glucose binding to the transporter, respectively, B_{maxe} , K_{de} , and B_{maxi} should be considered as kinetic constants and treated accordingly.

Thirdly, it should be stressed that the mathematical derivations of the binding kinetics of nontransported competitive inhibitors proposed by Turner and Silverman [56] may not be valid in the specific case of phlorizin and SGLT, even when applied under initial binding conditions, because the main hypothesis supporting those derivations assumed that the rate-limiting step in the binding process is the movement of the transporter binding sites from one membrane surface to the

other (the transporters are in equilibrium with the ligands at the membrane faces). This same hypothesis was used to generate Scheme I in Fig. 2 which had to be rejected during our analyses (according to that scheme and as shown in Table 2, the first-order rate constant describing the progress curves of phlorizin binding should have decreased with increasing phlorizin concentrations).

Lastly, and contrarily to Schemes I-II in Fig. 2 which have been used in the past (whether implicitly or explicitly) by Toggenburger et al. [49-50], Aronson [2], Turner and Silverman [56-57], Lever [26], and Restrepo and Kimmich [40] to analyze their binding data, the rate constant k_{on} cannot be related to rate-limiting steps in the transport cycle (for reasons discussed in the previous paragraph) or to the onset of phlorizin binding (as could be done from Scheme II in Fig. 2). Moreover, because a steady-state distribution of the different carrier forms involved in the transport cycle (including the rapidly bound phlorizin-carrier complex) must have been reached at the time of initial binding measurements, the initial rates of phlorizin binding should be treated with the same caution as is usually done for their glucose transport counterpart. The importance of these two remarks can be illustrated by the following example. It may indeed be correct to state that the initial rate of phlorizin binding is sensitive to the presence of a membrane potential because Scheme III in Fig. 2 would predict that the initial rate of phlorizin binding is directly proportional to the carrier species onto which phlorizin binding occurs (N_7^0 in Table 2), as seems consistent with the change in the apparent B_{max} of initial binding that was noted in some of the studies where this parameter was measured [26,49]. However, similar results would be expected whether the membrane potential increases the rate of free-carrier recycling [2,26,50], the affinity of Na^+ binding to the cotransporter [21], or both [36]. Moreover, this scheme would also suggest a new possibility, namely that the rate constant k_{on} itself may be modulated by membrane potential should the loosely-bound carrier-phlorizin complex be charged. Similarly, under debinding conditions where the membrane potential was shown to have no effect on the rate of phlorizin release [2,40,50], the consideration of Scheme III in Fig. 2 would suggest that k_{off} is membrane potential independent but would not allow to draw any conclusion as to whether or not Na^+ debinding itself senses the electric field.

3) Meaning of the slow isomerization step

Since the importance of the slow isomerization step which characterizes Scheme III in Fig. 2 has now been established with regards to a correct interpretation of the kinetics of phlorizin binding to SGLT, one may question the significance of this step to get insights as to how phlorizin binding studies might help in understanding glucose transport.

The early studies of Diedrich [14,15] and Alvarado [1] suggested that phlorizin binding to SGLT involves both the glucose and aglucone moieties of the molecule, a characteristic feature that would explain the close to two orders of magnitude difference between the K_d of phlorizin binding and the K_m of glucose transport. Moreover, comparatively to phlorizin, phloretin was shown to inhibit SGLT with low affinity [1,14] and in a partially noncompetitive manner [1]. Because both of the glucose and phloretin binding sites present on the transporter should be directly accessible to glucose and phloretin for noncompetitive inhibition to occur, it would appear that the secondary attachment of phlorizin to the carrier protein through its aglucone moiety should either precede or itself represent the slow isomerization step consecutive to rapid equilibrium phlorizin binding. As discussed under Theory, either one of these two alternatives leads to the same formal representation illustrated by Scheme III in Fig. 2. Still, we believe that the former alternative is more likely on the following grounds.

It should be clearly understood from the start that the parameter K_{di} (Table 3) is an apparent dissociation constant characterizing the initial, rapid equilibrium binding step ($K_{di} = K_d [1+L]$, see Table 2), so that its numerical value is linked to the carrier-states distribution in the transport cycle at the time of phlorizin addition (accounted for by the equilibrium constant L in Scheme III of Fig. 2). Accordingly, it can be assumed that the K_i value of 15 μM determined for phlorizin inhibition of SGLT in our transport studies [32] also estimates the K_{di} of phlorizin binding under the conditions of those experiments. Because the K_m of glucose transport (100-120 μM) under the same experimental conditions [32] is some 6- to 8-fold higher than the above K_{di} figure, it would appear that the interaction of phlorizin with the carrier already involved both of its glucose and aglucone moieties. It can thus be postulated that the rigidity so imposed to the glucose binding site would impair (but not preclude) its reorientation towards the intra vesicular space, so that the phlorizin molecule would now be occluded because the nontransported inhibitor cannot leave the glucose site. A different situation would occur when free glucose and free phloretin are both bound on the

respective glucose and aglucone sites of the transport protein because the rigidity imposed by phlorizin binding to both sites would be lost. Slower transport might be the result, however, hence the partial noncompetitive nature of phloretin inhibition [1].

From this discussion, it would also appear that the effect of the aglucone site in increasing the binding affinity of phlorizin relatively to glucose has somehow been overestimated in the past because most studies compared the K_m of glucose transport estimated under initial rate conditions to K_{de} (characterizing equilibrium binding) rather than K_{di} . As shown above, the aglucone binding site may account for some 6- to 8-fold increase only in phlorizin affinity. However, a 40- to 50-fold figure would be obtained if one takes into account the \approx 6-fold difference in the K_{de} and K_{di} values (Table 3) which is entirely due to the presence of the slow isomerization step consecutive to phlorizin binding.

4) Strengths and weaknesses of scheme III.

Because both of the most simple schemes of phlorizin binding (see schemes I and II in Fig. 2) failed to describe the progress curves of phlorizin uptake, and because the binding data at pH 6.0 and 8.6 were fully consistent with the basic predictions of scheme III in Fig. 2, it must be provisionally accepted that the latter mechanistic model, in its simplest form, has basic features that should prove characteristic of more complex, and likely more realistic models. One such key element appears to be, as discussed in the previous section, a slow isomerization step that somehow traps the inhibitor within an occluded, phlorizin-bound carrier complex, so that phlorizin binding could be viewed as a "slow-motion movie" of Na^+ and glucose cotransport but for the fact that the inhibitor is not released inside BBMV's. The latter concept is illustrated in Fig. 7 which makes the parallel to glucose transport quite obvious when compared to Fig. 1A.

In any case, it can be predicted that the occluded phlorizin molecule should not freely exchange with the external medium and, as expected, slow debinding of phlorizin was observed whether triggered by tracer dilution alone or following BBMV injection into efflux media containing either 1 mM cold phlorizin or 200 mM D-glucose (Fig. 6). In contrast, however, Na^+ removal from the stop solution led to rapid phlorizin debinding (data not shown but see Results), in agreement with the previously reported observation that efflux is much faster in the absence than in the presence of the activator ion [2,40,50,57]. We thus think that these findings should be highly

relevant to both phlorizin binding and glucose transport mechanisms because they strongly suggest that the experiments reported in Fig. 6 can hardly be explained as a whole should there be a single class only of Na^+ binding sites on the carrier protein.

The latter conclusion follows in a logical way from the following considerations: i) Na^+ binding has to be involved at a step prior to the isomerization step because Na^+ appears as an essential activator of phlorizin binding [33]; and ii) Na^+ binding also has to be involved at a step posterior to the occlusion step to explain the Na^+ -dependence of phlorizin debinding. As an alternative to point (ii), further Na^+ binding could itself trigger (and, then, be part of) the slow isomerization step leading to phlorizin occlusion. This second possibility appears less likely, however, because the last Na^+ to bind needs to exchange rapidly with the external medium if one wants to explain fast phlorizin debinding in the absence of external Na^+ . In any case, both alternatives point to: i) a minimum requirement of two Na^+ ions to give a consistent picture of the kinetics of phlorizin binding and debinding, a conclusion that would eventually eliminate a SGLT2 protein from consideration; ii) a mechanism of phlorizin binding in which substrate addition to the carrier is ordered and follows the sequence $\text{Na}^+ : \text{phlorizin} : \text{Na}^+$, thus more complex than depicted by Scheme III in Figs. 2 and 7; and iii) a possible role of internal Na^+ in modulating the rate of phlorizin deocclusion. Both alternatives also leave unanswered the question as to whether one or two Na^+ ions are involved at each of the rapid equilibrium and slow isomerization steps of phlorizin binding. Accordingly, the above picture: i) does not necessarily conflict with the 1 $\text{Na}^+ : 1$ phlorizin stoichiometry determined by Toggenburger et al. [50] under initial rate conditions of phlorizin binding although it rules out the associated proposal that the Na^+ -phlorizin-carrier complex may be nonfunctional for the very reason of not binding a second Na^+ [42,50]; and ii) is fully compatible with the 2 $\text{Na}^+ : 1$ phlorizin stoichiometry estimated by Moran et al. [29] and Restrepo and Kimmich [40] under equilibrium binding conditions. Studies are now in progress in our laboratory to investigate whether or not this difference in coupling ratios reflects the fact that initial and equilibrium binding studies each describe one of the two different phases of phlorizin binding according to Scheme III in Fig. 2.

5) **Heterogeneity of glucose transport versus homogeneity of phlorizin binding: evidence for two transport modes through an oligomeric protein ?**

Our experimental [33] and theoretical (this paper) studies of phlorizin binding demonstrate that HAP binding in rabbit cortical BBMV_s is homogeneous and reveals, at least within the experimental limits and relevant reserves discussed under Section 1 above, a single transport protein likely to represent rSGLT1. In contrast, glucose transport in the same preparation appears heterogeneous [32] although the substrate specificity (glucose and galactose transport), temperature dependence, and inhibition by phlorizin of HAG and LAG transport suggest that the two pathways may not be as fully independent as would have been expected from the coexpression of rSGLT1 and rSGLT2 proteins. In agreement with the concept of kinetic rather than molecular heterogeneity of transport, it now appears from Section 4 above that the existence of a minimum of two Na⁺ binding sites needs to be postulated to consistently account for the kinetics of phlorizin binding and debinding. If one takes into account the data of Peerce and Wright [37] suggesting the presence of single Na⁺ and glucose binding sites per polypeptide chain of the intestinal carrier (rSGLT1), the minimum requirement that may satisfy the latter hypothesis is a dimeric structure of the cotransporter. Indeed, the concept of a polymeric structure of SGLT1 is also supported by inactivation radiation [4,45,47,51] as well as other studies [6,8,17,22-23,32,58], and a dimeric model of cotransport might be well suited to answer the question as to how homogeneous phlorizin binding could be reconciled with heterogeneous glucose transport.

For example, in the allosteric (dimeric) mechanism of cotransport described by Chenu and Berteloot [8], it is postulated that glucose binding to the first subunit would induce a conformational change in the neighboring subunit such as to decrease its affinity for binding of a second glucose molecule. Accordingly, the HAG and LAG transport pathways would result from the negative cooperativity between subunits, and the two transport routes would show predictable kinetic properties like high and low affinity for glucose, and 2 Na⁺ : 1 glucose and 2 Na⁺ : 2 glucose (equivalent experimentally to 1 Na⁺ : 1 glucose) stoichiometries at low and high substrate concentrations, respectively [8]. This situation would thus be equivalent, both on theoretical and physiological points of view, to that proposed by Turner and Moran [52-54] within the hypothesis of two independent transporters [8]. In such a model, however, one may now have to postulate that the homogeneity of HAP binding noted in our studies is the consequence of an absence of

cooperativity during binding of the nontransported inhibitor, as seems supported by the observations of Koepsell et al. [22].

The presence of a slow isomerization step consecutive to phlorizin binding that would mimic at a slower rate the outward to inward reorientation of the fully-loaded Na^+ -glucose-carrier complex (see Fig. 1A and Fig. 7) suggests, however, that the results of the phlorizin debinding experiments would also fit nicely within the concept of the half-of-the-sites reactivity mechanism of cotransport that was introduced by our group from a completely different perspective [8]. According to this model, Na^+ and phlorizin binding to the transport protein would induce a slow outward to inward reorientation of the bound carrier sites that would in turn drive in a outward configuration the previously inward-facing Na^+ and glucose sites. Na^+ (and phlorizin or glucose) binding to these new sites would just be able to stabilize this new carrier configuration (or allow for slow phlorizin-phlorizin or glucose-phlorizin exchange). In a dimer model, the heterogeneity of glucose transport would be purely kinetic in nature (different combinations of Na^+ or Na^+ plus glucose binding and release could lead to different transport modes proceeding at different transport rates without any change in substrate affinities). In a tetramer model, both kinetic and cooperative effects could be observed (the properties of the cooperative dimer and those of the half-of-the-sites reactivity dimer would be cumulated) [8].

Clearly, more studies will be needed to resolve the exact nature of the LAG pathway within the concept of a polymeric cotransporter. Quite relevant in this context, it should not be forgotten that the rapid filtration technique allowed us to reveal one part only of the phlorizin binding sites, and studies are now in progress in our laboratory to reveal the other class of binding sites.

FOOTNOTES

1. The abbreviations used are: AMG: BBMV: brush border membrane vesicles; BCA: bicinchoninic acid; FSRFA: fast-sampling, rapid-filtration apparatus; HAG: high affinity glucose; HAP: high affinity phlorizin; HPz: neutral form of phlorizin; LAG: low affinity glucose; LAP: low affinity phlorizin; MES: 2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid; Pz⁻: ionized form of phlorizin; SER: standard error of regression; SGLT: Na⁺/D-glucose cotransport; Tris: tris[hydroxymethyl]aminomethane.
2. It could be argued that the introduction of a rapid N₇ to N₈ transition into schemes I and II of Fig. 2 could have generated two extra schemes worth being considered in our theoretical studies. This was done indeed, but the mathematics involved in those extra schemes are not given in the present paper because time-dependent characteristic solutions similar to those reported in Table 2 for schemes I and II were found.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by grant MT-7607 from the Medical Research Council of Canada. N.O. was supported by a fellowship from the GRTM. The technical assistance of Mrs. C. Leroy has been greatly appreciated.

REFERENCES

1. Alvarado, F. 1967. Hypothesis for the interaction of the phlorizin and phloretin with membrane carriers for sugars. *Biochim. Biophys. Acta* **135**: 483-495
2. Aronson, P. 1978. Energy-dependence of phlorizin binding to isolated renal microvillus membranes. *J. Membrane Biol.* **42**: 81-98
3. Barfuss, D.W., and Schafer, J. 1981. Differences in active and passive glucose transport along the proximal nephron. *Am. J. Physiol.* **240**: F322-F332
4. Béliveau, R., Demeule, M., Ibnoul, K.H., Bergeron, M., Beauregard, G., and Potier, M. 1988. Radiation-inactivation studies on brush-border-membrane vesicles. General considerations and application to the glucose and phosphate carriers. *Biochem. J.* **252**: 807-813
5. Berteloot, A., Malo, C., Breton, S., and Brunette, M. 1991. A fast sampling, rapid filtration apparatus: principal characteristics and validation from studies of D-glucose transport in human jejunal brush-border membrane vesicles. *J. Membrane Biol.* **122**: 111-125
6. Blank, M.E., Bode, F., Baumann, K., and Diedrich, D.F. 1989. Computer analysis reveals changes in renal Na⁺-glucose cotransporter in diabetic rats. *Am. J. Physiol.* **257**: C385-C396
7. Bode, F., Baumann, K., Diedrich, D.F. 1972. Inhibition of [³H]phlorizin binding to isolated kidney brush border membranes by phlorizin-like compounds. *Biochim. Biophys. Acta* **290**: 134-149
8. Chenu, C., and Berteloot, A. 1993. Allosterism and Na⁺-D-glucose cotransport kinetics in rabbit jejunal vesicles: compatibility with mixed positive and negative cooperativities in a homo-dimeric or tetrameric structure and experimental evidence for only one transport protein involved. *J. Membrane Biol.* **132**: 95-113
9. Chesney, R., Sacktor, B., Kleinzeller, A. 1974. The binding of phlorizin to the isolated luminal membrane of the renal proximal tubule. *Biochim. Biophys. Acta* **332**: 263-277
10. Coady, M.J., Pajor, A.M., Wright, E.M. 1990. Sequence homologies among intestinal and renal Na⁺/glucose cotransporters. *Am. J. Physiol.* **259**: C605-C610
11. Cramer, S.C., Partridge, W.M., Hirayama, B.A., and Wright, E.M. 1992. Colocalization of GLUT2 glucose transporter, sodium/glucose cotransporter, and γ -glutamyl transpeptidase in rat kidney with double-peroxidase immunocytochemistry. *Diabetes* **41**: 766-770

12. Desjeux, J.-F. 1995. Congenital selective Na⁺, D-glucose cotransport defect leading to renal glucosuria and congenital selective intestinal malabsorption of glucose and galactose. *In: The Metabolic Basis of Inherited Diseases*. C.R. Scriver, editor. pp. 3563-3580. McGraw-Hill, New York
13. Diedrich, D.F. 1963. The comparative effects of some phlorizin analogs on the renal reabsorption of glucose. *Biochim. Biophys. Acta* **71**: 688-700
14. Diedrich, D.F. 1966. Competitive inhibition of intestinal glucose transport by phlorizin analogs. *Arch. Biochem. Biophys.* **117**: 248-256
15. Diedrich, D.F. 1968. Is phloretin the sugar transport inhibitor in intestine? *Arch. Biochem. Biophys.* **127**: 803-812
16. Evans, James O. and Diedrich, Donald F. 1980. The affinity of phlorizin-like compounds for a β -glucosidase in intestinal brush borders: comparison with the glucose transport system. *Arch. Biochem. Biophys.* **199**: 342-348
17. Gerardi-Laffin, C., Delque-Bayer, P., Sudaka, P., and Poirée, J.C. 1993. Oligomeric structure of the sodium-dependent phlorizin binding protein from kidney brush-border membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1151**: 99-104
18. Glossmann, H., Neville, D.M. Jr. 1972. Phlorizin receptors in isolated kidney brush border membranes. *J. Biol. Chem.* **247**: 7779-7789
19. Horster, M.F., and Stopp, M. 1986. Transport and metabolic functions in cultured renal tubule cells. *Kidney Int.* **29**: 46-53
20. Kanai, Y., Lee, W.S., You, G., Brown, D., and Hediger, M.A. 1994. The human kidney low affinity Na⁺/glucose cotransporter SGLT2. *J. Clin. Invest.* **93**: 397-404
21. Kimmich, G.A. 1990. Membrane potentials and the mechanism of intestinal Na⁺-dependent sugar transport. *J. Membrane Biol.* **114**: 1-27
22. Koepsell, H., Fritsch, G., Korn, K., and Madrala, A. 1990. Two substrate sites in the renal Na⁺-D-glucose cotransporter studied by model analysis of phlorizin binding and D-glucose transport measurements. *J. Membrane Biol.* **114**: 113-132
23. Koepsell, H., and Spangenberg, J. 1994. Function and presumed molecular structure of Na⁺-D-glucose cotransport systems. *J. Membrane Biol.* **138**: 1-11

24. Kong, C-T., Yet, S-F., and Lever, J.E. 1993. Cloning and expression of a mammalian Na⁺/amino acid cotransporter with sequence similarity to Na⁺/glucose cotransporters. *J. Biol. Chem.* **268**: 1509-1512
25. Lee, W.-S., Kanai, Y., Wells, R.G., and Hediger, M.A. 1994. The high affinity Na⁺/glucose cotransporter. Re-evaluation of function and distribution of expression. *J. Biol. Chem.* **269**: 12032-12039
26. Lever, J.E. 1984. A two sodium ion/D-glucose symport mechanism: Membrane potential effects on phlorizin binding. *Biochemistry* **23**: 4697-4701
27. Lever, J.E. 1986. Expression of differentiated functions in kidney epithelial cell lines. *Miner. Electrol. Metab.* **12**: 14-19
28. Mackenzie, B., Panayotova-Heiermann, M., Loo, D.D.F., Lever, J.E., and Wright, E. 1994. SAAT1 is a low affinity Na⁺/glucose cotransporter and not an amino acid transporter. *J. Biol. Chem.* **269**: 22488-22491
29. Moran, A., Davis, L.J., and Turner, R.J. 1988. High affinity phlorizin binding to the LLC-PK₁ cells exhibits a sodium : phlorizin stoichiometry of 2:1. *J. Biol. Chem.* **263**: 187-192
30. Morrison, A.I., Panayotova-Heiermann, M., Feigl, G., Schlölermann, B., Kinne R.K.H. 1991. Sequence comparison of the sodium-D-glucose cotransport systems in rabbit renal and intestinal epithelia. *Biochim. Biophys. Acta* **1089**: 121-123
31. Ohta, T., Isselbacher, K.J., and Rhoads, D.B. 1990. Regulation of glucose transporters in LLC-PK₁ cells: effect of D-glucose and monosaccharides. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 6491-6499
32. Oulianova, N., and Berteloot, A. 1996. Sugar transport heterogeneity in the kidney: two independent transporters or different transport modes through an oligomeric protein? 1. glucose transport studies. *J. Membrane Biol.*, under revision
33. Oulianova, N., and Berteloot, A. 1996. Sugar transport heterogeneity in the kidney: two independent transporters or different transport modes through an oligomeric protein? 2. Phlorizin binding studies. *J. Membrane Biol.*, submitted
34. Pajor, A.M., Hirayama, B.A., and Wright E.M. 1992. Molecular evidence for two renal Na⁺/glucose cotransporters. *Biochim. Biophys. Acta* **1106**: 216-220

35. Parent, L., Supplisson, S., Loo, D.D.F., and Wright, E.M. 1992. Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter: I. Voltage-clamp studies. *J. Membrane Biol.* **125**: 49-62
36. Parent, L., Supplisson, S., Loo, D.D.F., and Wright, E.M. 1992. Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter: II. A transport model under nonrapid equilibrium conditions. *J. Membrane Biol.* **125**: 63-79
37. Pearce, B.E., and Wright, E.M. 1986. Distance between substrate sites on the Na-glucose cotransporter by fluorescence energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 8092-8096
38. Rabito, C.A. 1986. Sodium cotransport processes in renal epithelial cell lines. *Miner. Electrol. Metab.* **12**: 32-41
39. Reizer, J., Reizer, A., and Saier, M.H.Jr. 1994. A functional superfamily of sodium/solute symporters. *Biochim. Biophys. Acta* **1197**: 133-166
40. Restrepo, D., Kimmich, G.A. 1986. Phlorizin binding to isolated enterocytes: Membrane potential and sodium dependence. *J. Membrane Biol.* **89**: 269-280
41. Sriver, S.R., Chesney, R.W., and McInnes, R.R. 1976. Genetic aspects of renal tubular transport: Diversity and topology of carriers. *Kidney Int.* **9**: 149-171
42. Semenza, G., Kessler, M., Hosang, M., Weber, J., and Schmidt, U. 1984. Biochemistry of the Na⁺-D-glucose cotransporter of the small intestine brush-border membranes: the state of the art in 1984. *Biochim. Biophys. Acta* **779**: 343-379
43. Silverman, M., Black, J. 1975. High affinity phlorizin receptor sites and their relation to the glucose transport mechanism in the proximal tubule of dog kidney. *Biochim. Biophys. Acta* **394**: 10-30
44. Silverman, M., Speight, P., and Ho, L. 1993. Identification of two unique polypeptides from dog kidney outer cortex and outer medulla that exhibit different Na⁺/D-glucose cotransport functional properties. *Biochim. Biophys. Acta* **1153**: 43-52
45. Stevens, B.R., Fernandez, A., Hirayama, B., Wright, E.M., and Kempner, E.S. 1990. Intestinal brush border membrane Na⁺/glucose cotransporter functions in situ as a homotetramer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 1456-1460
46. Stirling, C.E. 1967. High-resolution radioautography of phlorizin-³H in rings of hamster intestine. *J. Cell Biol.* **35**: 605-618

47. Takahashi, M., Malathi, P., Preiser, H., and Jung, C.Y. 1985. Radiation inactivation studies on the rabbit kidney sodium-dependent glucose transporter. *J. Biol. Chem.* **260**: 10551-10556
48. Takata, K., Kasahara, T., Kasahara, M., Ezaki, O., and Hirano, H. 1991. Localization of Na⁺-dependent active type and erythrocyte/HepG2-type glucose transporters in rat kidney: immunofluorescence and immunogold study. *J. Histochem. Cytochem.* **39**: 287-298
49. Toggenburger, G., Kessler, M., Rothstein, A., Semenza, G., Tannenbaum, C. 1978. Similarity in effect of Na⁺ gradient and membrane potentials on D-glucose transport by, and phlorizin binding to, vesicles derived from brush borders of rabbit intestinal mucosal cells. *J. Membrane Biol.* **40**: 269-290
50. Toggenburger, G., Kessler, M., and Semenza, G. 1982. Phlorizin as a probe of the small intestinal Na⁺, D-glucose cotransporter. A model. *Biochim. Biophys. Acta* **688**: 557-571
51. Turner, R.J., and Kempner, E.S. 1982. Radiation inactivation studies of the renal brush-border membrane phlorizin-binding protein. *J. Biol. Chem.* **257**: 10794-10797
52. Turner, R.J., and Moran, A. 1982. Heterogeneity of sodium-dependent D-glucose transport sites along the proximal tubule: evidence from vesicle studies. *Am. J. Physiol.* **242**: F406-F414
53. Turner, R.J., and Moran, A. 1982. Stoichiometric studies of the renal outer cortical brush border membrane D-glucose transporter. *J. Membrane Biol.* **67**: 73-80
54. Turner, R.J., and Moran, A. 1982. Further studies of proximal tubular brush border membrane D-glucose transport heterogeneity. *J. Membrane Biol.* **70**: 37-45
55. Turner, R.J., and Moran, A. 1985. Solution of carrier-type transport models: general solution for an arbitrarily complex rapid equilibrium model. *J. Membrane Biol.* **88**: 77-83
56. Turner, R.J., Silverman, M. 1980. Testing carrier models of cotransport using the binding kinetics of non-transported competitive inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* **596**: 272-291
57. Turner, R.J., and Silverman, M. 1981. Interaction of phlorizin and sodium with the renal brush-border membrane D-glucose transporter: stoichiometry and order of binding. *J. Membrane Biol.* **58**: 43-55

58. Veyhl, M., Spangenberg, J., Puschel, B., Poppe, R., Dekel, C., Fritzsich, G., Haase, W., and Koepsell, H. 1993. Cloning of a membrane-associated protein which modifies activity and properties of the Na⁺-D-glucose cotransporter. *J. Biol. Chem.* **268**: 25041-25053
59. Vinay, P., Senecal, J., Noël, J., Chirinian, C., Vinay, M.C., Ammann, H., Boulanger, Y., Gougoux, A., and Berteloot, A. 1991. Basolateral glucose transport in distal segments of the dog nephron. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **69**: 964-977
60. Wierzbicki, W., Berteloot, A., Roy, G. 1990. Pre-steady-state kinetics and carrier mediated transport: a theoretical analysis. *J. Membrane Biol.* **117**: 11-27
61. Wright, E.M. 1993. The intestinal Na⁺/glucose cotransporter. *Annu. Rev. Physiol.* **55**: 575-589
62. You, G., Lee, W-S., Barros, E.J.G., Kanai, Y., Huo, T-L., Khawaja, S., Wells, R.G., Nigam, S.K., Hediger, M.A. 1995. Molecular characteristics of Na⁺-coupled glucose transporters in adult and embryonic rat kidney. *J. Biol. Chem.* **270**: 29365-29371

LEGENDS TO TABLES

- Table 1:** Carrier-states distribution relevant to Schemes I-III in Fig. 2 in BBMV resuspended in the Na^+ medium (N_i^*), at time $t = 0$ of phlorizin addition (N_i^0), and at the steady-state (equilibrium) of phlorizin binding (N_i^s). Details of calculations are given in text.
- Table 2:** Algebraic expressions of the kinetic parameters of phlorizin binding relevant to Schemes I-III in Fig. 2. Meaning of kinetic parameters and details of calculations are given in the text.
- Table 3:** Summary of the kinetic parameters of phlorizin binding determined in [33] at 20°C under conditions of pH 6.0 and 8.6.
- Table 4:** Kinetic parameters of phlorizin binding determined from the analysis of the first-order rate constant describing the progress curves of phlorizin uptake at 20°C . The corresponding data is shown in Figs. 3 and 5 for pH 8.6 and pH 6.0 conditions, respectively.
- Table 5:** Consistency tests of Scheme III in Fig. 2. Details of calculations are given in text.

LEGENDS TO FIGURES

- Figure 1:** Kinetic mechanism of glucose (G) transport through rSGLT1 and inhibition by phlorizin (Pz). A. General model as proposed by Parent et al. [36]; B. Reduced model describing phlorizin binding in the absence of glucose and in the presence of saturating Na^+ concentrations in both the intra vesicular space (i) and the incubation medium (o). $N_{1,2}$: free carriers; $N_{3,6}$: Na^+ -carrier complexes; $N_{4,5}$: Na^+ -glucose-carrier complexes; N_7 : Na^+ -phlorizin-carrier complex. More details are given in the text.
- Figure 2:** The three most simple schemes of phlorizin (Pz) binding derived from the general model shown in Fig. 1B. K_d and L are dissociation constants defined in the text. k_{on} and k_{off} are microscopic rate constants characterizing reaction steps directly relevant to phlorizin binding. $k_{3,6,63}$ are the microscopic rate constant describing the reorientation of Na^+ -carrier complexes. The specific hypotheses pertinent to each scheme are discussed in the text.
- Figure 3:** Concentration dependence of the apparent rate constant (k_{obs}) of phlorizin binding at pH 8.6. Experimental conditions were as described in the legend to Fig. 3 in [33]. Uptake time courses shown in that figure were fitted to Equation (1) in text. Inset: Uptake time courses were reanalyzed according to Equation (2) as justified in the text to extract the first-order rate constant k_1 (data shown \pm SER) specific to the Na^+ -dependent, D-glucose sensitive phlorizin binding sites. Line shown in the main graph was drawn by eye. Curve shown in the inset is the best-fit line to the Michaelis-Menten type Equation (33) in text and kinetic parameters as given in Table 4. When not shown, the error bars were smaller than the symbol sizes. S + T on the x axis stand for the total concentration of cold + tracer phlorizin.
- Figure 4:** Displacement curve of equilibrium phlorizin binding at pH 8.6. Uptake time courses shown in Fig. 3 of [33] were reanalyzed according to Equation (2) as justified in the

text to extract the steady-state value B_{ei}^* specific to the Na^+ -dependent, D-glucose sensitive phlorizin binding sites. The B_e^* data is the same as that shown in Fig. 4 of [33] after correction for the nonspecific component of phlorizin binding determined in those experiments. Curve shown is the best-fit line to Equation (4) with $n = 1$ and kinetic parameters given in the text. Note that in both cases, error bars were smaller than the symbol size.

Figure 5: Concentration dependence of the apparent rate constant (k_{obs}) of phlorizin binding at pH 6.0. Experimental conditions were as described in the legend to Fig. 8 in [33]. Uptake time courses at pH 6.0 were fitted to Equation (1) in text. Inset: Uptake time courses were reanalyzed according to Equation (2) as justified in the text to extract the first-order rate constant k_1 (data shown \pm SER) specific to the Na^+ -dependent, D-glucose sensitive phlorizin binding sites. Line shown in the main graph was drawn by eye. Curve shown in the inset is the best-fit line to the Michaelis-Menten type Equation (33) in text and kinetic parameters as given in Table 4. When not shown, the error bars were smaller than the symbol sizes. S + T on the x axis stand for the total concentration of cold + tracer phlorizin.

Figure 6: Time courses of phlorizin debinding (efflux) at pH 8.6 and room temperature (23-25 °C). Detailed experimental conditions were as described in text. In A, BBMV were preincubated in the presence of 0.08 μM ^3H -phlorizin and either 0 (\circ, \bullet), 3 (\blacktriangle), 12 (Δ), or 1000 μM (\diamond) cold phlorizin. Efflux were triggered by the addition of either 17% ethanol (\circ) or 1 mM cold phlorizin (all other conditions). In B, BBMV were preincubated in the presence of 0.08 μM ^3H -phlorizin, and efflux were triggered by the addition of either 17% ethanol (\circ), 200 mM D-glucose (\square), or 1 mM cold phlorizin (\bullet). Data shown are the mean \pm SD of 3 (B) or 5 (A) experiments performed under each condition. When not shown, error bars were smaller than the symbol sizes. Curves shown are the best-fit lines to Equation (3) with parameters discussed in text.

Figure 7: Kinetic mechanism of phlorizin binding illustrating the concept that phlorizin binding can be viewed as a "slow motion movie" of Na⁺/D-glucose cotransport. Notations are the same as in the legend to Fig. 1. The parallelism to glucose transport is quite obvious when compared to Fig. 1A, but note that the inhibitor is not transported.

TABLE 1

CARRIER-STATES DISTRIBUTION	SCHEME I	SCHEME II	SCHEME III
N_3^{\cdot}	$k_{83} N_T / (k_{38} + k_{83})$	$N_T / (1 + L)$	$N_T / (1 + L)$
N_6^{\cdot}	$k_{38} N_T / (k_{38} + k_{83})$	$LN_T / (1 + L)$	$LN_T / (1 + L)$
N_3^0	$k_{83} K_d N_T / d_1$	Same as N_3^{\cdot}	$K_d N_T / d_1$
N_6^0	same as N_6^{\cdot}	Same as N_6^{\cdot}	$K_d LN_T / d_1$
N_7^0	$k_{83} (Pz) N_T / d_1$	0	$N_T (Pz) / d_1$
N_8^0	---	---	0
N_3°	$k_{83} K_d N_T / d_2$	$k_{off} N_T / d_2$	$k_{off} K_d N_T / d_2$
N_6°	$k_{38} K_d N_T / d_2$	$k_{off} LN_T / d_2$	$k_{off} K_d LN_T / d_2$
N_7°	$k_{83} N_T (Pz) / d_2$	$k_{on} N_T (Pz) / d_2$	$k_{off} N_T (Pz) / d_2$
N_8°	---	---	$k_{on} N_T (Pz) / d_2$
d_1	$(k_{38} + k_{83}) [K_d + (Pz)]$	---	$K_d (1 + L) + (Pz)$
d_2	$(k_{38} + k_{83}) K_d + k_{83} (Pz)$	$k_{off} (1 + L) + k_{on} (Pz)$	$k_{off} K_d (1 + L) + (k_{on} + k_{off}) (Pz)$

TABLE 2

KINETIC PARAMETERS	SCHEME I	SCHEME II	SCHEME III
B_{maxe}	N_T	N_T	$k_{on} N_T / (k_{on} + k_{off})$
K_{de}	$[(k_{36} + k_{63})K_d] / k_{63}$	$[k_{off}(1+L)] / k_{on}$	$k_{off} K_d (1+L) / (k_{on} + k_{off})$
B_{maxi}	$k_{36} k_{63} N_T / (k_{36} + k_{63})$	-	$k_{on} N_T$
K_{di1}	$K_d / 2$	-	$K_d (1+L)$
K_{di2}	$2K_d$	-	-
$\alpha \cdot$	$k_{63} + \frac{k_{36} K_d}{K_d + (Pz)}$	$k_{off} + \frac{k_{on} (Pz)}{1+L}$	$k_{off} + \frac{k_{on} (Pz)}{K_d (1+L) + (Pz)}$

TABLE 3

KINETIC PARAMETERS	pH 8.6	pH 6.0
B_{maxd} ($\text{pmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{protein}$)	4.0 ± 0.6	7.6 ± 0.7
K_{di} (μM)	30 ± 5	12.1 ± 1.4
B_{maxe} ($\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{protein}$)	62 ± 4	86 ± 7
K_{de} (μM)	5.2 ± 0.4	2.2 ± 0.2

TABLE 4

KINETIC PARAMETERS	pH 8.6	pH 6.0
$k_{\min} = k_{\text{off}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	0.0106 ± 0.0005	0.0149 ± 0.0003
$k_{\max} = k_{\text{on}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	0.046 ± 0.003	0.080 ± 0.011
$K_m \text{ (}\mu\text{M)}$	26 ± 5	9.0 ± 1.9

TABLE 5

CALCULATED PARAMETERS	pH 8.6	pH 6.0
K_{de} (from K_{dl})	5.6 ± 1.6	1.9 ± 0.5
K_{de} (from K_m)	4.9 ± 1.5	1.4 ± 0.5
k_{off} {(from Eq. (35))}	0.0112 ± 0.0063	0.0161 ± 0.0061
k_{on} {(from Eq. (36))}	0.0533 ± 0.0201	0.0723 ± 0.0214
k_{on} {(from Eq. (37))}	0.0506 ± 0.0458	0.0671 ± 0.0457
N_T (from B_{maxd})	87 ± 19	95 ± 22
N_T (from B_{maxe})	76 ± 15	102 ± 35

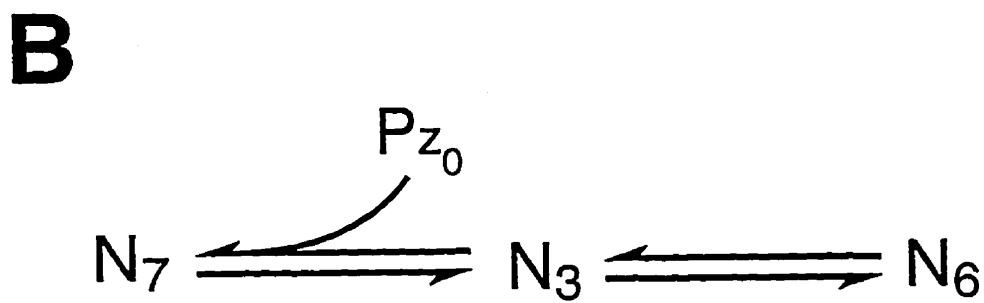
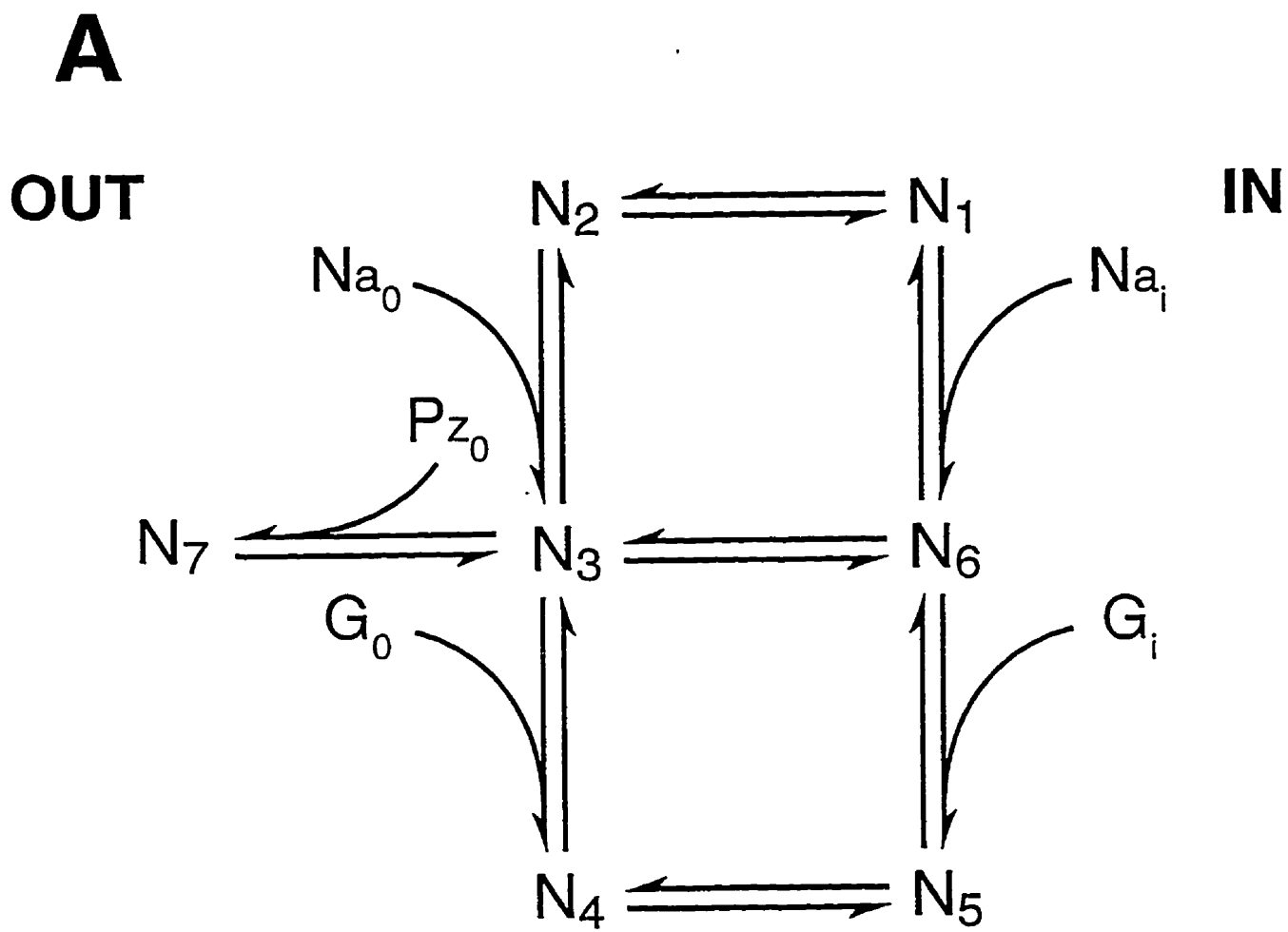
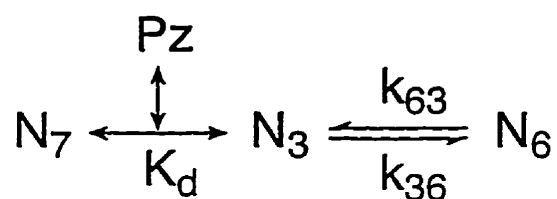
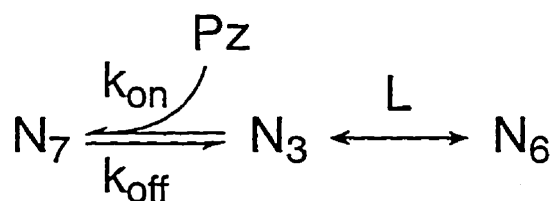


Figure 1.

SCHEME I: One-step, fast-binding of phlorizin



SCHEME II: One-step, slow-binding of phlorizin



SCHEME III: Two-steps, fast-binding of phlorizin with slow isomerization

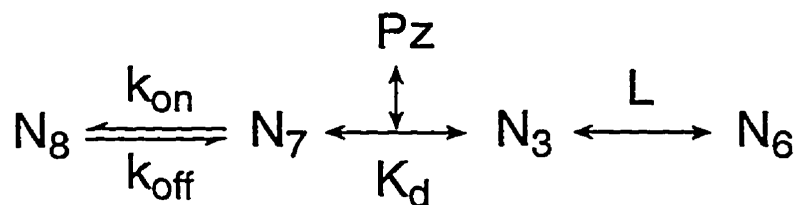


Figure 2.

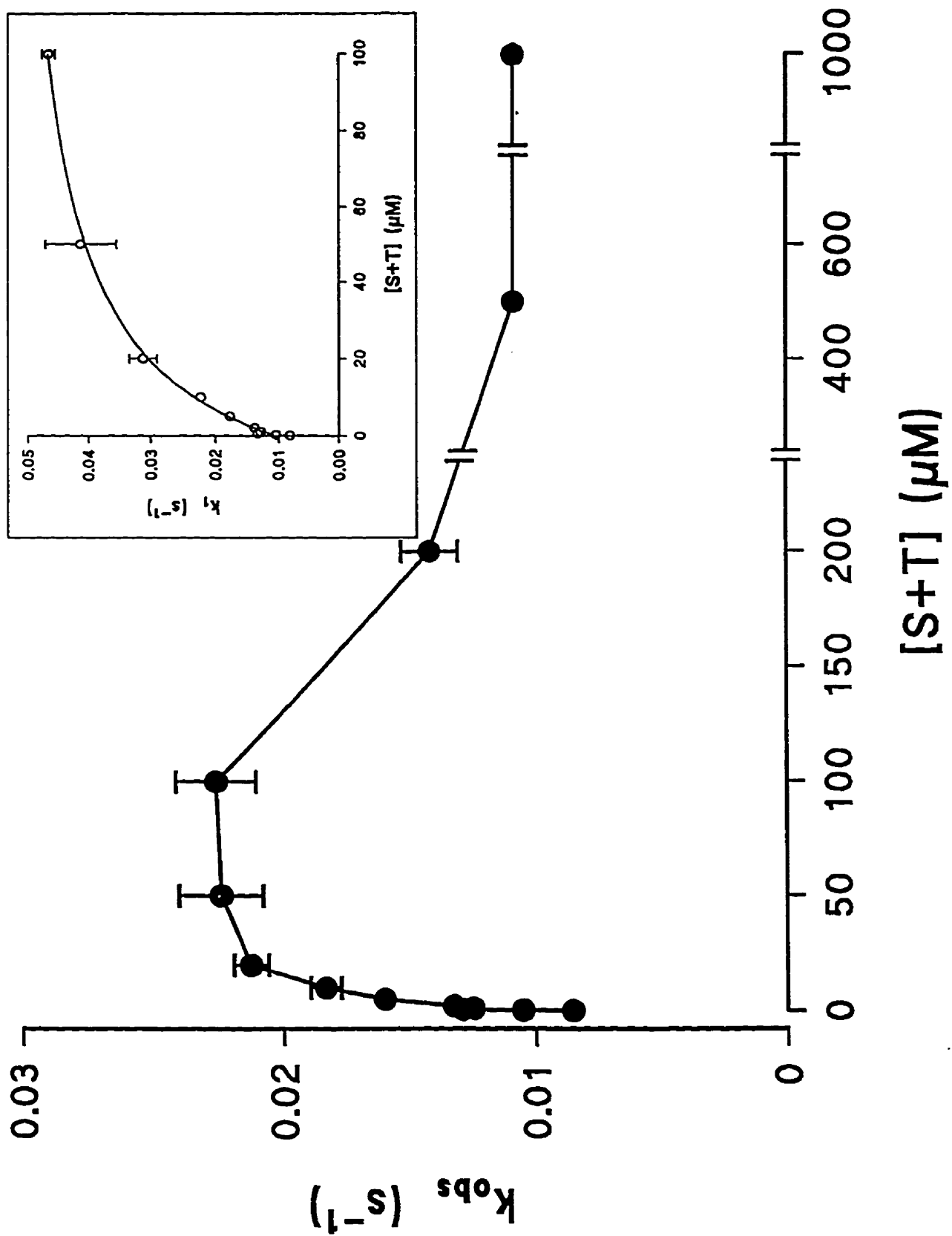


Figure 3.

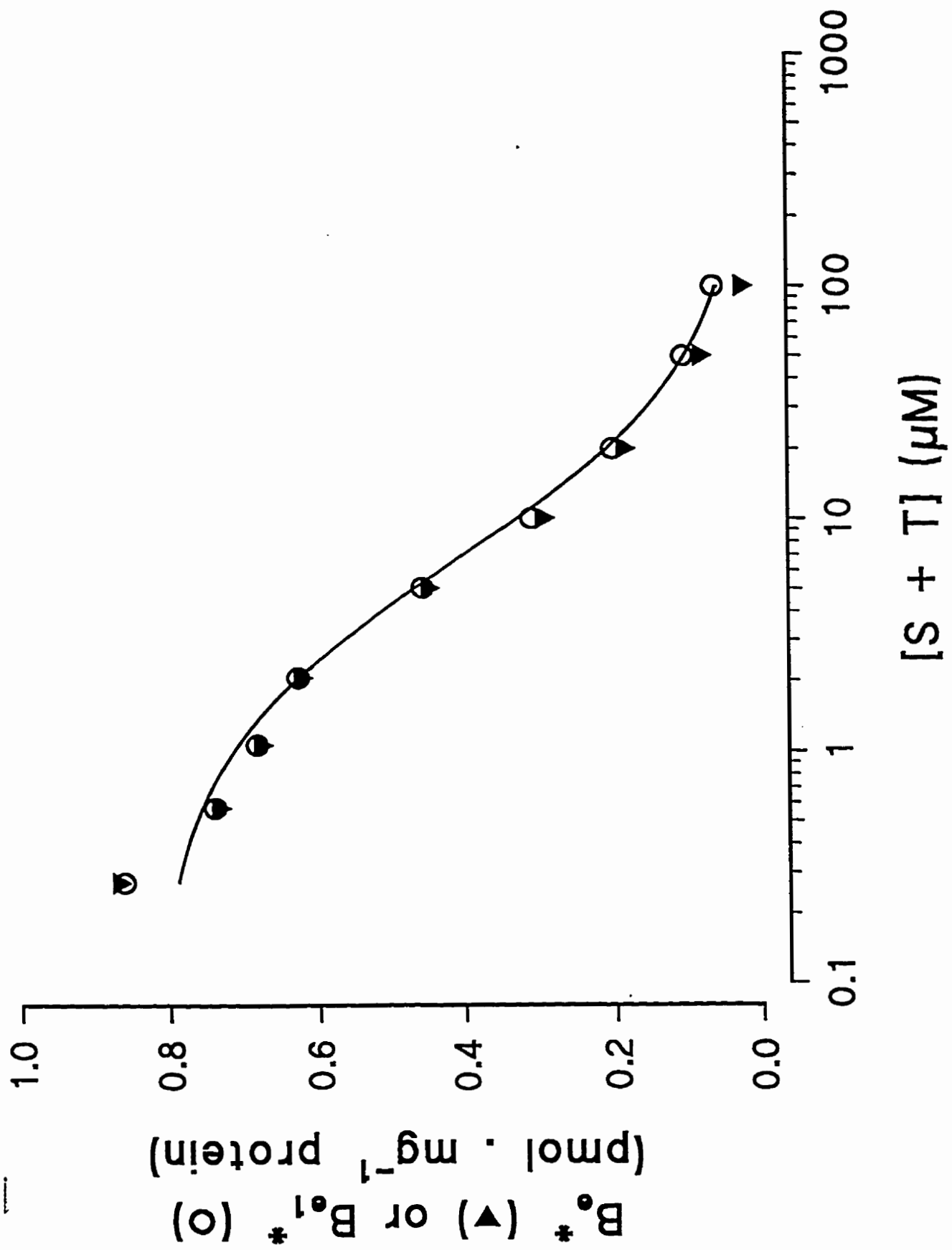


Figure 4.

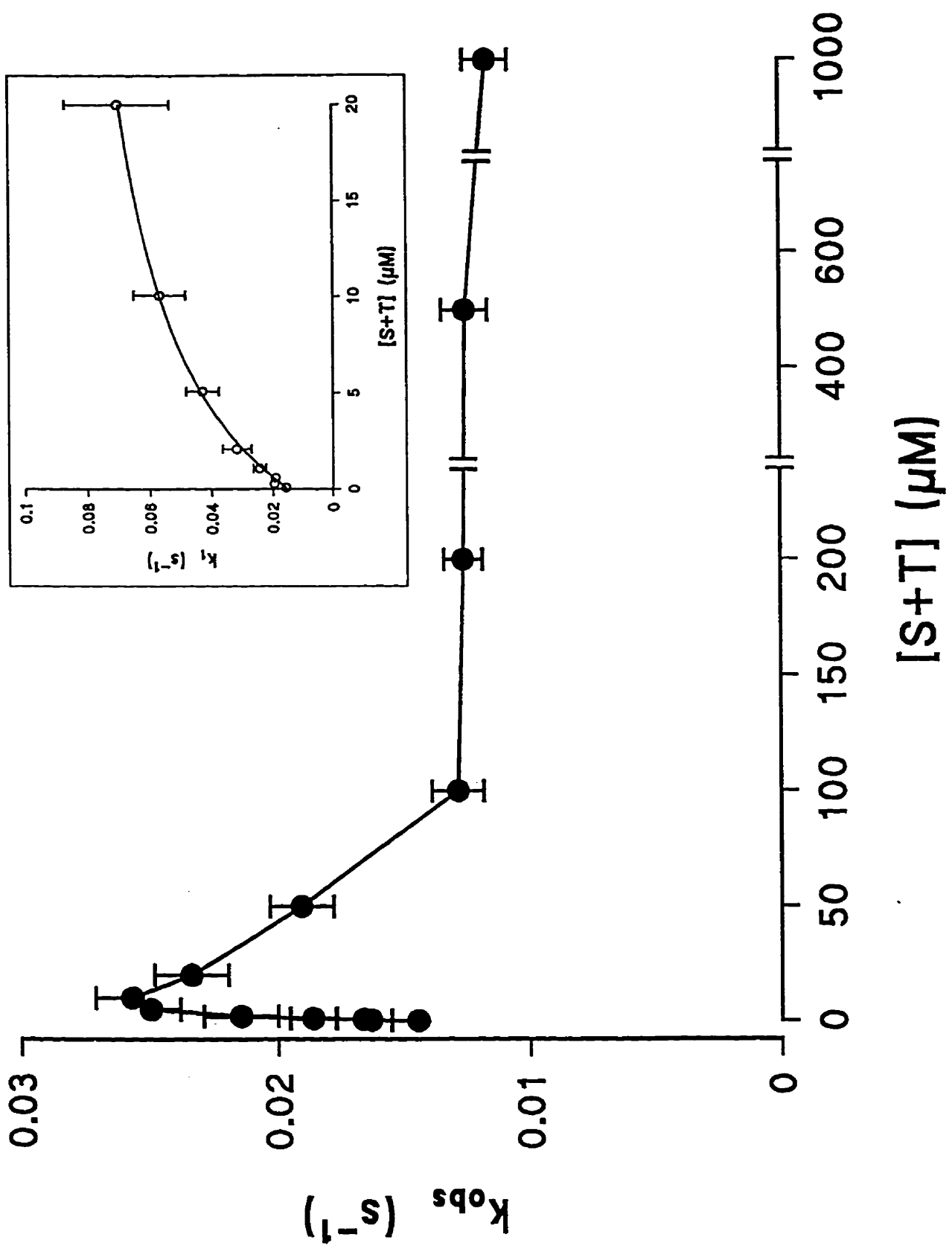


Figure 5.

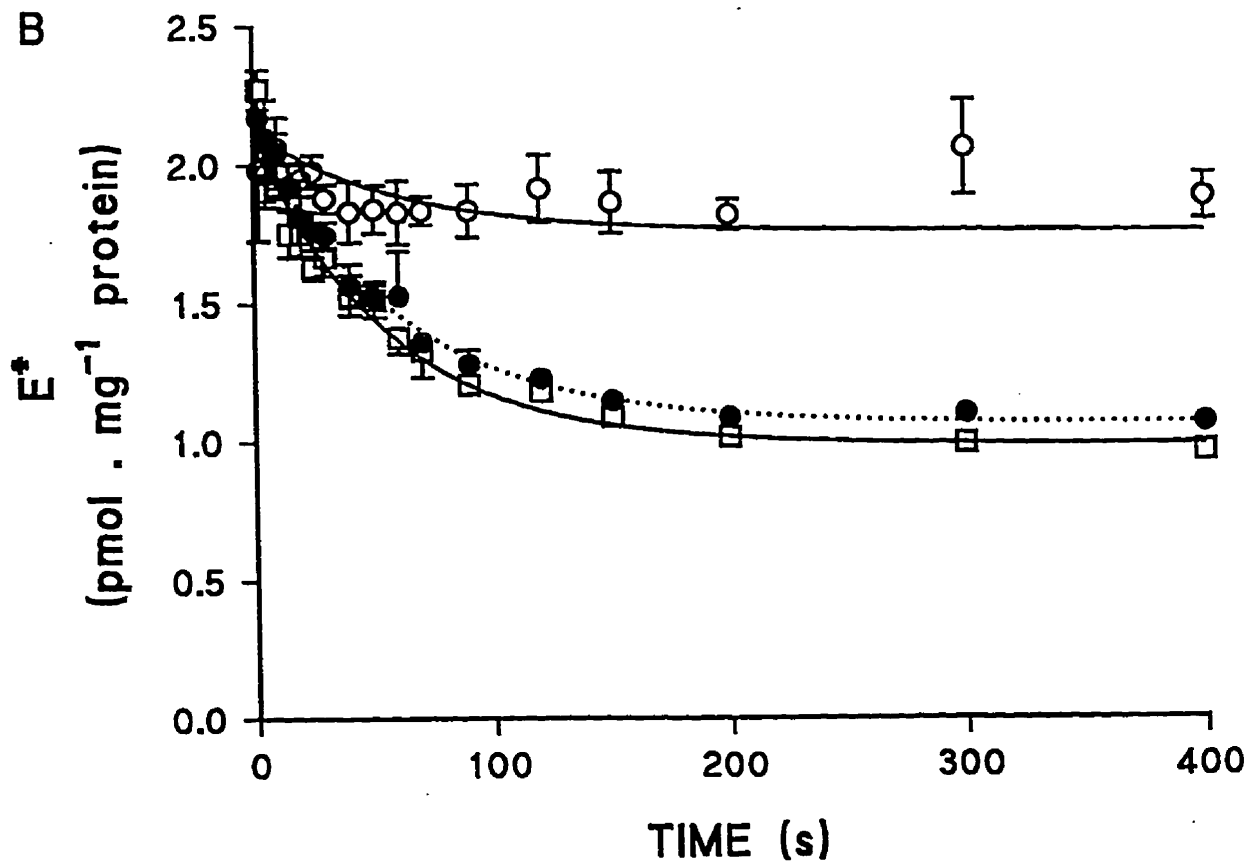
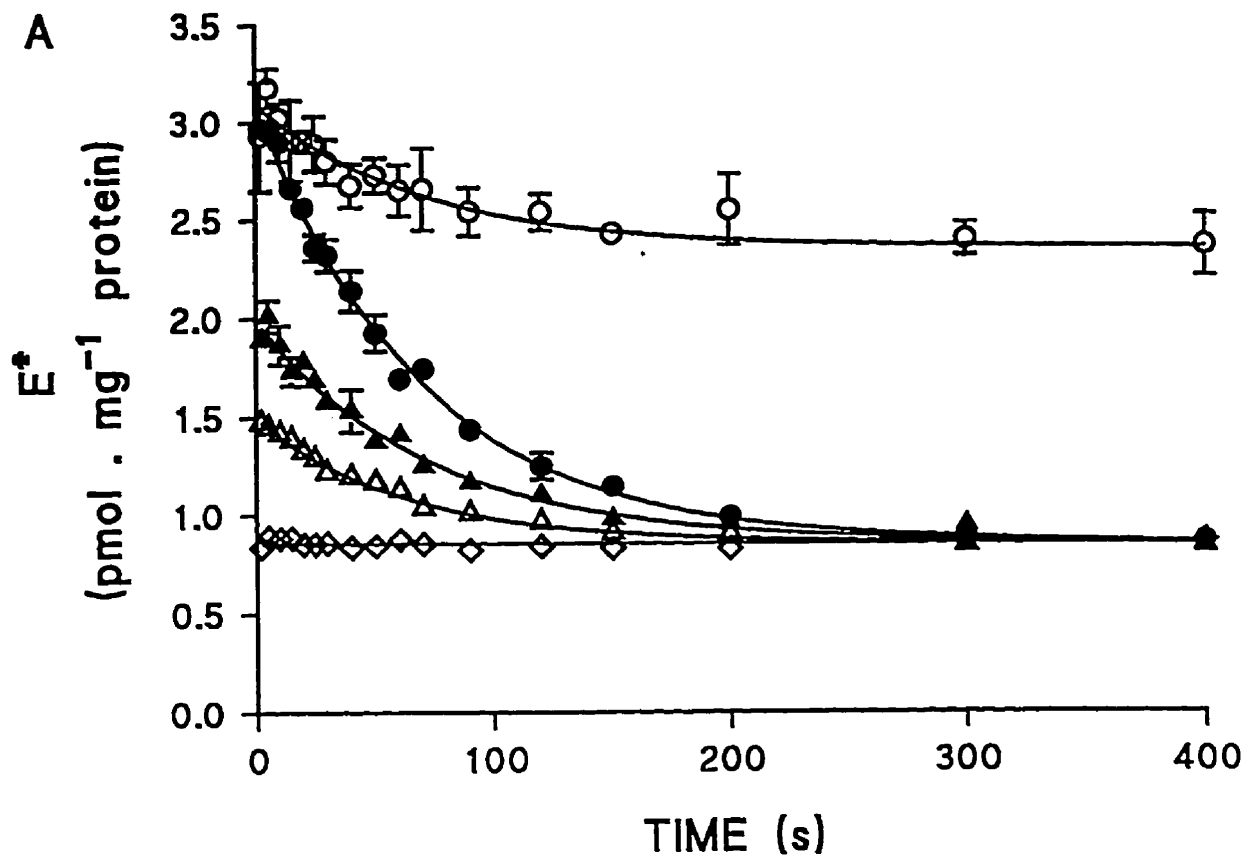


Figure 6.

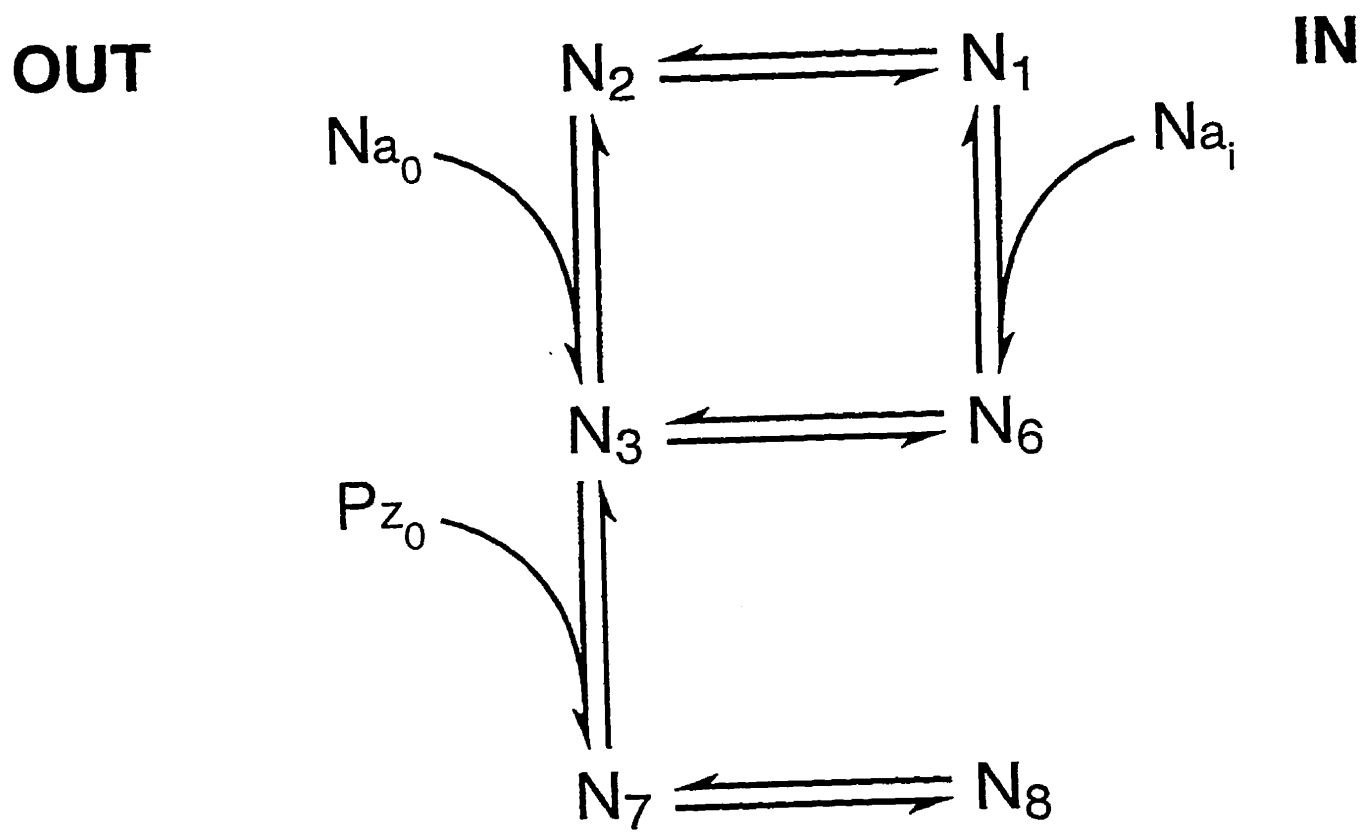


Figure 7.

CHAPITRE V: Article quatre: "Comparative studies of pH-effects on intestinal and renal SGLT1 activities in rabbit brush-border membrane vesicles"

Article en préparation

**COMPARATIVE STUDIES OF PH-EFFECTS ON INTESTINAL AND RENAL SGLT1
ACTIVITIES IN RABBIT BRUSH-BORDER MEMBRANE VESICLES**

by

Nathalie OULIANOVA and Alfred BERTELOOT*

Address: Membrane Transport Research Group
Department of Physiology
Faculty of Medicine
Université de Montreal
CP 6128, succursale "Centre-Ville"
Montreal (Québec) Canada H3C 3J7

Phone: (514)-343-5634

Fax: (514)-343-2111

(*): To whom correspondance and reprint requests should be addressed

RUNNING TITLE: SUGAR TRANSPORT HETEROGENEITY IN THE KIDNEY

KEY WORDS: Na⁺-dependent sugar transport; pH responsiveness; membrane vesicles (rabbit kidney and intestine)

ABSTRACT

The kinetics of intestinal and renal SGLT1 were compared in rabbit brush border membrane vesicles (BBMV) while keeping H^+ equilibrium or varying H^+ inward gradient. The BBMV were isolated either from jejunum or the whole kidney cortex. The uptake measurements were performed using a fast-sampling, rapid-filtration apparatus (FSRFA, US patent # 5,330,717). The pH-response of the low affinity glucose (LAG) transport pathway was also evaluated. We have demonstrated that: i) the intestinal transporter showed a high pH-sensitivity of kinetic parameters at both pH conditions while the renal SGLT1 (HAG transport pathway) was only sensitive in H^+ -gradient; ii) the pH-dependence of the K_m of intestinal and renal SGLT1 followed different patterns; iii) the biphasic aspect of the V_{max}/K_m curves suggested the presence of at least two H^+ binding sites with different affinities on the transport protein; iv) the pH-response of the HAG and LAG transport pathways were similar in both the H^+ -gradient and H^+ -equilibrium conditions.

These results unambiguously demonstrate a major difference between intestinal and renal transport functions of SGLT1 according to pH. This leads us to suggest different expressions of the same protein in the two tissues that may result from a different post-transcriptional modification of SGLT1 or a heteroassociation of SGLT1 with other (membrane) proteins.

INTRODUCTION

As it was discussed in our previous paper (21,22), at this time, it is not yet conclusively and definitively resolved that Na^+ -D-glucose cotransport in the kidney cortex results from the expression of two independent transporters (according to the hypothesis of Turner and Moran [32-34]) or from the allosteric functioning of a unique transporter SGLT1 (according to the hypothesis of Chenu and Berteloot [6]). First hypothesis is supported by the clinical finding that patients with glucose-galactose malabsorption, in which a single point mutation in the SGLT1 cDNA fully accounts for the intestinal defect, do not show glucosuria [30,37]. In this issue, three clones were recently isolated from human (Hu14-hSGLT2), [11], pig (SAAT1-pSGLT2, [16], and rat rSGLT2 [38] kidney cDNA libraries and may in fact represent renal SGLT2 activity (see discussion in 16,25,38,21).

However, glucose transport, glucose inhibition and phlorizin binding studies, carried out in our laboratory led us to conclude that transport heterogeneity most likely reflects different transport properties of SGLT1 according to allosteric hypothesis rather than the presence of two transporters. This assumption was also supported by inactivation radiation studies which showed that the intestinal and renal SGLT proteins may form an oligomeric complex [1,27,28,31]; in addition, a number of reports appeared [5,8,12,13] that challenge the interpretation of Turner and Moran's results [32-34].

It is important to emphasize that the common point of these two alternative hypothesis is the assumption that a unique intestinal transport system and a renal HAG transport pathway represent a functional expression of the same protein SGLT1. This protein was showed to be identical in both tissues (20). Our recent demonstration of similar K_i values for phlorizin inhibition of glucose transport through HAG and LAG in rabbit intestinal BBMV strongly supports this last assumption. These K_i values lie within the range of K_i reported by Toggenburger et al. [29]. Our results are also in agreement with the recent hypothesis [13] that different post-transcriptional modifications of a unique protein may occur in the S_1/S_2 segment of the renal proximal tubule as compared to the S_3 segment, thus accounting for kinetic heterogeneity and apparent separation of the LAG and HAG pathways as it was shown in the experiments of Turner and Moran [32-34]. This assumption is supported by a recent cloning of the regulatory RS1 subunit [36] which is able to induce kinetic heterogeneity of SGLT1

expression in the *Xenopus laevis* oocyte.

However, no attention was paid to the observed heterogeneity between the functional expression of intestinal and renal SGLT1 carriers. As it was mentioned previously [21], the total transport capacity measured under our standard conditions (20 °C, 0 mV, and 150 mM Na⁺ gradient) is comparable in rabbit renal and intestinal BBMV while the K_m value for HAG transport is 2.3 fold lower in the kidney as compared to the jejunum. It can be argued that such difference may be due to a diverse lipid composition and/or the physical state of the brush-border membrane in two tissues. However, K_m value of 139 μM found in the rabbit jejunal BBMV and values of 100-200 [24] or 117-126 [36] reported for rabbit SGLT1 cRNA-injected oocytes strongly suggest that the K_m difference between renal and intestinal BBMV reflects how rabbit SGLT1 is expressed functionally in both tissues rather than how SGLT1 activity is modulated by the lipid composition and/or the physical state of the two membranes. In agreement with this view, similar K_m values of 0.6-0.9 mM [19] and 0.8 mM [15] were estimated for hSGLT1 in human jejunal BBMV [19] and cRNA-injected oocytes [15] while a K_m of 0.3 mM (2-3 fold lower) was reported for human kidney HAG transport [35].

Finally, the coinjection of ARNm of pig-RS1 subunit with rabbit-SGLT1 in the *Xenopus laevis* oocyte [36] induced, similarly to the observed difference in the BBMV, a decrease of the K_m for HAG pathway as compared to the K_m obtained when ARNm-SGLT1 alone was injected. However, it must be kept in mind that the presence of RS1 subunit was never demonstrated in the rabbit, and that rabbit RS1 (if it does exist) may not induce a similar change on rabbit SGLT1 functional expression in the *Xenopus* oocyte.

It has been reported for cloned SGLT1 [9] and in rabbit jejunal BBMV [10] that H⁺ can drive sugar transport through the Na⁺-D-glucose cotransporter. On the other hand, in the renal BBMV [22] phlorizin is able to bind to the Na⁺-D-glucose cotransporter in the absence of Na⁺ by lowering pH to 6.0. However, in the BBMV of rat renal cortex, the Na⁺-D-glucose cotransport was insensitive to the changes in pH [18]. It is unclear, from available data, if these controversial results are due to the difference between the: i) species, ii) tissues, or iii) the presence [18] or absence [9,10] of Na⁺. Thus, the comparison of intestinal and renal SGLT1 response to the varying H⁺ inward gradient or to varying iso-pH in the presence of constant or saturated Na⁺ inward gradient (Na⁺_{out} = 150 mM) may provide an important information about proper functioning of SGLT1 in both tissues.

We, first, present the comparative study of the pH-effect on the intestinal and renal SGLT1 functional expression in the rabbit BBMV. This study was performed in the rabbit renal and intestinal brush-border membrane vesicles (BBMV) isolated from the whole kidney cortex and jejunum, using a fast-sampling, rapid-filtration apparatus (FSRFA [3], US patent # 5,330,717) for uptake measurement. No attempt was made in our studies to separate the HAG and LAG transport pathways according to regional differences along the proximal tubule on the rationale that: i) a full separation may not be easily achieved by dissection alone [32,23]; ii) kinetic separation may only be apparent in the case of different post-transcriptional modifications [12,13]; iii) it is possible to analyze simultaneously the kinetic characteristics of the two transport pathways.

In this paper we demonstrate the major differences between the intestinal and renal SGLT1 functional expressions. We show that H^+ gradient in the presence of Na^+ gradient has a different effect on the kinetic parameters of both transporters while the renal LAG transport pathway is affected in similar manner to HAG pathway. The simultaneous variation of H^+ concentrations on both sides of a membrane further show a different pH-responsiveness for intestinal and renal SGLT1 activities. The comparison of the pH-dependent curves of the kinetic parameters with the V_{max}/K_m curves strongly suggests that at least two different H^+ target sites can be implicated from the outside and also from the inside of the BBMV to explain the observed change of kinetic parameters for intestinal SGLT1 and renal HAG and LAG pathways.

MATERIALS AND METHODS

1) Materials

Rabbits were purchased from the "Ferme de Sélection Cunipur" (St-Valérien, Québec). D-[1-³H(N)]-glucose (specific activity 10-15 Ci/mmol) was supplied by New England Nuclear (NEN), the BCA (bicinchoninic acid) protein assay kit by Pierce, unlabeled D-glucose by Sigma, phlorizin and ultrapure salts by Aldrich, and amiloride hydrochloride by Sigma and scintillation cocktail (β-blend) by ICN Biomedicals. Cellulose nitrate filters (12.5 mm diameter, 0.65 μm pore size) were obtained from Micro Filtration Systems (MFS). All other chemicals were of the highest purity available.

2) Preparation of Brush Border Membrane Vesicles (BBMV)

Large batches of renal BBMV were prepared from the whole kidney cortex of male, 2.0-2.5 kg New-Zealand white rabbits essentially as described previously for the rabbit jejunum [2,6,17]. Briefly, cortex slices were introduced into the homogenate media (18 mM Tris-HEPES buffer pH 7.0 containing 1 mM EDTA and 250 mM sucrose) at a 1:20 ratio (w:v), and homogenized at 4 °C in a Waring blender for 1 min at full speed. BBM were precipitated by addition of 10 mM MgCl₂ [6,17], purified in a P₂ fraction [2], and resuspended in a minimal volume of 50 mM HEPES-Tris buffer (pH 7.0) containing 300 mM mannitol and 0.1 mM MgSO₄ [6]. The P₂ fractions were divided into 500 μl aliquots and frozen in liquid N₂ [6,17]. On the day of use, a suitable number of aliquots of frozen P₂ were thawed and diluted at a 1:10 ratio (w:v) in the resuspension buffer (50 mM HEPES-Tris buffer (pH 7.0-7.5) or MES-Tris (pH 6.0-6.5) and Tris-MES (pH 8.5) containing 0.1 mM MgSO₄, 300 mM mannitol, and 200 mM KI) to which was added 3 μM valinomycin to ensure full equilibration of the cation [6,17]. BBMV were prepared as a final P₄ pellet [2] and resuspended in the valinomycin-free resuspension buffer of appropriate pH at a protein concentration of 28-35 mg/ml [6]. To insure stability of the preparation over the course of the experiment, 25 μl aliquots of BBMV were frozen in liquid N₂ until the time of assay [6,17].

3) Uptake Assays

Initial rates of Na⁺-dependent, ³H-D-glucose uptake were determined under zero-trans

gradient conditions of both ion and substrate using the automated FSRFA developed in our laboratory [3]. For each assay, 20 μl of BBMV were thawed, prewarmed, and loaded into the apparatus. Uptake was initiated by injecting the vesicles into 480 μl of 50 mM HEPES-Tris buffer (pH 7.0-7.5) or MES-Tris (pH 6.0-6.5) and Tris-MES (pH 8.5)) containing 0.1 mM MgSO_4 , 0.5 mM amiloride, 300 mM Mannitol, 50 mM KI, 150 mM NaI and 4 μM tracer D-glucose. For kinetic parameter determinations, cold D-glucose concentrations were varied from 0 to 200 mM; osmolarity was kept constant by varying mannitol concentrations to satisfy a total concentration of cold substrate + mannitol of 300 mM. Uptakes were performed in the thermostated chamber of the FSRFA [3] and determined by a 9-point automatic sequential sampling of the uptake mixture at 1 s intervals [6]. At each time point, 50 μl of the uptake mixture was injected into 1 ml of ice-cold stop solution (50 mM HEPES-Tris buffer (pH 7.0-7.5) or MES-Tris (pH 6.0-6.5) and Tris-MES (pH 8.5)) containing 0.1 mM MgSO_4 , 300 mM mannitol, 1 mM phlorizin, and 200 mM of either NaCl or Choline chloride for Na^+ -gradient or Na^+ -free conditions, respectively). The stopped mixture was then filtered through 0.65 μm cellulose nitrate filters, and the filters were washed three times with 1 ml of ice-cold stop solution [3,6]. The substrate content of the vesicles was then determined by liquid scintillation counting as described previously [6].

Under the conditions of our uptake assays, the initial rates of 50 μM D-glucose uptake were linear with protein concentrations over the range 1-35 mg protein/ml [6]. Protein was measured with the BCA assay kit using bovine serum albumin as a standard.

4) Data analysis

Four uptake time courses were run at each of the substrate concentrations used in the respective experiments. Initial rates of tracer transport ($\text{pmol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein) were determined over the 1-7 s time course of the assays by linear regression analysis as justified previously [6]. The kinetic parameters of glucose transport were estimated by nonlinear regression analysis of the initial rate data, thus assuming that the added cold substrate acts as an ideal competitive inhibitor of tracer transport [4,6,19]. The equations used corresponded to either one or two Michaelis-Menten components working in parallel with passive diffusion (referred to, in the following, as the one-site or the two-site models, respectively) and have been both justified and given in full in a previous paper from our group [6]. Linear and nonlinear regression analysis

were performed using a commercial software (Enzfitter, R.J. Leatherbarrow, copyright 1987, Elsevier-Biosoft). Since both of the robust and explicit weighting routines of this software were used for data analysis, the errors associated with the kinetic parameter values reported in this paper represent the standard errors of regression (SER) on these parameters. The figures were performed using the commercial software "P.Fit" (copyright 1990 Fig.P Software Corp., Biosoft).

RESULTS

1) pH-gradient conditions.

In Fig. 1(A) and (B), we compare the effect of pH gradient on the kinetic parameters of intestinal SGLT1 and renal HAG pathway. The vesicles were resuspended in the buffer of pH 8.5 and incubated at 25° in the media of variable pHs as indicated in Materials and Methods. In the range of alkaline pH, as it can be seen from Fig.1(A), the K_m^{Glc} of the renal HAG pathway was sensitive to the presence of H^+ gradient while intestinal SGLT1 kept the same substrate affinity. At the same range of pH-gradient, the V_{max} of both transporters changes in a similar fashion (Fig.1(B)). In contrast, in the range of acidic pH, the K_m^{Glc} of the renal HAG pathway does not change anymore, while the K_m of intestinal SGLT1 becomes highly sensitive to the H^+ gradient (Fig.1 (A)). At the same acidic pH-gradients, a slight decrease of V_{max} of the intestinal carrier contrasts with a greater decrease of V_{max} for renal transport pathway. Moreover, a zone of the maximal pH-sensitivity for two V_{max} s is different for intestinal SGLT1 and renal HAG pathway.

2). iso-pH conditions.

In the varying iso-pH experiments, the vesicles were resuspended at the same pH as the incubating media and pH values were taken in the same range as in the experiments of pH-gradient conditions. The shape of iso-pH-dependent curves of kinetic parameters (Fig.2 (A) and (B)) is quite different from those shown in Fig.1 (A) and (B). As it can be seen from the Fig. 2(A), the substrate affinity of the renal HAG pathway becomes insensitive to different concentration of H^+ on both sides of a membrane, over the entire pH range. In contrast, the K_m of intestinal SGLT1 becomes highly sensitive to changes in pH and increases progressively with the lowering of pH. Fig.2(B) shows the pH-responsiveness of the V_{max} which differs not only with pH-gradient conditions but also between intestinal and renal SGLT1. The V_{max} of intestinal SGLT1 is highly sensitive to H^+ ; it increases at alkaline pH and decreases in acidic pH range, while the V_{max} for renal HAG pathway decreases only with pH below 7.0.

3). Analysis of the V_{max}/K_m curves.

Analysis of the V_{max}/K_m curves clearly demonstrates a major difference not only between the pH response of both intestinal and renal SGLT1, (Fig.3(A) and (B)), but also a different behaviour of the same transporter according to experimental conditions.

In the intestinal BBMV, variation of the V_{\max} with constant K_m in the range of alkaline pH-gradient (Fig.1A and B) results in the ascending of V_{\max}/K_m curve at alkaline pH (Fig.3A). The relative stability of the V_{\max} with simultaneous increase of K_m at acidic pH gradient (Fig.1A and B) is illustrated by a descending V_{\max}/K_m curve in the same range of pH (Fig.3A).

In the renal BBMV, the simultaneous increase of the V_{\max} and K_m at alkaline pH-gradient (Fig.1A and B) explains the steadiness of V_{\max}/K_m curves (Fig.3A). In contrast, constant K_m at acidic pH-gradient with simultaneously decreasing V_{\max} results in slightly descending V_{\max}/K_m curves (Fig.3A).

At iso-pH conditions, in the range of alkaline pH, the relative stability of both intestinal and renal V_{\max}/K_m curves (Fig.3B) has, however, a different origin: in the intestinal BBMV, it is due to the simultaneous increase of the V_{\max} and K_m , while for renal SGLT1, it results from pH-insensitivity of both parameters (Fig.2A and B). Similarly, at acidic pH the descending of the V_{\max}/K_m curves for both transporters results from a decrease of their V_{\max} s. The K_m , however, increases for intestinal SGLT1 or does not change for renal HAG pathway.

4). The pH responsiveness of the LAG transport pathway.

The pH responsiveness of the LAG transport pathway in the renal BBMV was also estimated (Fig.4A and B). At both pH gradient and pH equilibrium conditions the K_{m2} values could not be determined so accurately as for K_{m1} values due to the high ratio HAG/LAG and thus low contribution of LAG pathway in the total uptake measurements. As it can be seen, only at pH-gradient conditions, the kinetic parameters of LAG transport pathway were slightly affected. This effect of pH-gradient was less pronounced than that for HAG pathway but the pH-dependent curves for $V_{\max2}$ and K_{m2} show a similar pattern with those for HAG pathway. The simultaneous change of both parameters at pH-gradient resulted in a steady $V_{\max2}/K_{m2}$ curve (Fig.5). The same curve was also obtained at iso-pH conditions; such pattern resulted from the insensitivity of the kinetic parameters. As can be seen (Fig.5.) the ratio $V_{\max2}/K_{m2}$ (contribution of LAG pathway) is much lower than that for HAG pathway (Fig. 3.A and B.)

DISCUSSION

It has been reported for cloned SGLT1 (9) and in rabbit jejunal BBMV (10) that H^+ can drive sugar transport through the Na^+ -D-glucose cotransporter in the total absence of Na^+ , by imposition of a pH-gradient. We have demonstrated previously in the renal BBMV (22) the ability of phlorizin to bind to the Na^+ -D-glucose cotransporter in the absence of Na^+ and thus lower pH to 6.0. Overall, this result suggests that H^+ is able to produce the effect of Na^+ to allow glucose accumulation or phlorizin binding. Considering a specific effect of H^+ on the SGLT1, we first present a comparative study of the pH effect on the intestinal and renal functional expression of SGLT1 in the rabbit BBMV.

The major difference in the functional expression between the SGLT1 of the intestine and the kidney can be seen from the change in the apparent K_m of both carriers relative to each other despite of a similar change in the V_{max} of both transporters at the pH-gradient conditions (Fig. 1A and B). The comparison of biphasic V_{max}/K_m curves (Fig. 3A) with the pH-dependent curves of the kinetic parameters suggests that, at least two H^+ target sites with different affinities, may be involved in the observed change of the Na^+ -D-glucose cotransport. One of the sites is more sensitive than the other since it is activated at alkaline pH. It modifies the SGLT1 activity in non-competitive manner in the intestine and in uncompetitive manner in the kidney. The activation of the other site at acidic pH which is thus less sensitive to H^+ , modifies the SGLT activity in almost competitive manner in the intestine, while in the kidney this effect becomes non-competitive. At first sight, this conclusion is consistent with those of Hirayama et al. [9] who suggested that H^+ and Na^+ activate a carrier by the same mechanism. However, this assumption was based on the study at pH-gradient conditions, only, in the total absence of Na^+ and thus does not allow to compare the curves of Na^+ - with H^+ -activated glucose transport in order to conclude that both ion activations of the transport use the same mechanism. On the other hand, the non-competitive effect of H^+ gradient on glucose transport at alkaline pH in the intestine and uncompetitive effect in the kidney may be difficult to reconcile with the Na^+ -like activation mechanism. So, only one particular condition (in the intestine, at acidic pH) may be consistent with the assumption of Hirayama et al. [9], presuming that only one class of H^+ target site (with pK_a value lower than 7.0) is involved in pH-gradient conditions. In contrast, Hoshi et al. [10] compared the Na^+ - with H^+ -activated transport (at low Na^+ concentration) in the toad's intestine

and suggested a competitive inhibition of Na^+ binding by the H^+ . Their conclusion was based on the observation that in the presence of high Na^+ concentration (100 mM) the lowering of pH below 7.0 does not affect the D-glucose transport contrary to the situation at low Na^+ concentration. Our present result shows that in both intestinal and renal BBMV the D-glucose transport was modified in the presence of high Na^+ concentration (150 mM) when pH was lowered below 7.0. This discrepancy may be due to the species differences and unfortunately it was not tested for cloned rabbit SGLT1.

In our recent paper (22), we discussed pH-effect on phlorizin binding and the possibility of substitution of Na^+ by H^+ to allow phlorizin binding in the absence of Na^+ at pH 6.0. We also evoked the possibility of the protonation of the substrate site itself in agreement with the suggestion of Vayro and Simmons [35a] that external acidic media are likely to titrate key amino-acids of the carrier involved in substrate recognition. Our present study shows an increase of K_m at higher H^+ gradient which is consistent with an increased K_m value for H^+ -dependent glucose transport through SGLT1 expressed in *Xenopus* oocyte [9] and for H^+ -dependent phlorizin binding in the renal BBMV [22]. However, the simultaneous presence of Na^+ gradient used in this work was not considered in studies of Hirayama et al. for cloned SGLT1 [9] and Hochi et al. for rabbit intestinal BBMV [10]. On the other hand, phlorizin binding was measured at Na^+ and H^+ equilibrium conditions thus precluding any comparison of these kinetic parameters with previously reported data. This point of view may be justified by the comparison of K_d^{Pz} at pH 6.0 in the presence or absence of Na^+ [22]. It led us to suggest that carrier- H^+ complex assumes a conformation which is different from the carrier- Na^+ - H^+ complex. However, this hypothesis may only be true in binding studies where the translocation step (which might also be H^+ -sensitive) is absent. This last assumption is consistent with the observation that, at iso-pH, in the presence of translocation step, the Glc affinity of the transporter almost did not change (Fig.2A, open circles) while, at iso-pH and at Na^+ equilibrium, the affinity of the carrier for phlorizin changed dramatically [22].

In our present work we can assume that Na^+ concentration was sufficiently high to saturate Na^+ binding site and that H^+ target site may be located elsewhere. For example, the change of pH may involve the protonation or deprotonation of certain amino acid residues which also may be involved in the formation of the hydrogen bond during substrate binding, as was suggested by Diedrich for phlorizin (7); it can also lead to the formation of salt linkages at low

pH which may contribute to the stability of a particular conformation of the carrier. Such a change should lower the affinity of the carrier simultaneously with the acceleration of the transition step. This explanation is in agreement with an increase in the K_m and V_{max} for glucose transport observed at alkaline pH gradient in the kidney (Fig.1A and B). Further increase of H^+ concentration at pH lower than 7.0 should involve another mechanism to explain the observed change of kinetic parameters. It must be emphasized that despite of the presence of pH effect on both systems over the entire range of pH, the mechanism involved in the pH response is never the same for intestinal and renal SGLT1.

On the other hand, we demonstrate that addition of internal H^+ induces a dramatic change in pH-responsiveness of kinetic parameters of SGLT1 compare to pH-gradient conditions. Still, this effect of internal H^+ is quite different for intestinal and renal SGLT1 activity, and it may be consistent with the earliest observations of transinhibition of glucose transport by internal Na^+ (7a,26). The presence of H^+ inside the jejunal BBMV improves the pH sensitivity of SGLT1: at alkaline pH K_m and V_{max} increase simultaneously whereas K_m increases and V_{max} decreases at pH lower than 7.0 (Fig.2A and B). In contrast, in the renal BBMV it appears that internal H^+ abolishes the effect of external H^+ , (shown in Fig.1) resulting in the absence of effect on K_m of renal SGLT1 over the entire pH range, while V_{max} slightly decreases at acidic pH, only. This result is in agreement with previous observations by Maegawa et al. [18] that Na^+ -D-glucose uptake by rat renal cortex BBMV was constant at iso-pH 6.0, 7.0 and 8.0.

In the intestine, H^+ effect appears to be uncompetitive for glucose transport; it simultaneously increases both parameters at alkaline pH and reduces the maximal velocity and affinity of the transporter at acidic pH.

A slight descent of the renal V_{max}/K_m curve at acidic pH reflects a change of V_{max} only. This is compatible with the non-competitive inhibition of glucose transport and the K_m at iso-pH is stabilized at the lower level compare to the pH-gradient conditions. This last observation shows that, at least for the kidney, no evidence exists to assume that internal Na^+ may be replaced by H^+ since H^+ effect on K_m is not compatible with the phenomenon of the transinhibition of glucose transport by internal Na^+ [7a,26].

From the study based on one glucose concentration uptake measurements, which usually corresponds to V/K ratio, Maegawa et al. [18] concluded that renal D-glucose transport system is insensitive to pH. In this study, both iso-pH and pH gradient V_{max}/K_m curves from renal BBMV

(Fig.3A and B) also showed only a slight pH-sensitivity. However, this insensitivity may result, (as in a case of iso-pH condition), from the steadiness of both kinetic parameters in agreement with the results of Maegawa et al. and, as in a case of pH-gradient condition, from a simultaneous increase of both parameters. This result demonstrates: i) a high pH sensitivity of the renal Glc cotransport and ii) that a correct interpretation of the pH-dependence of Glc uptake in the kidney requires a measurement of the kinetic parameters at each pH value. As it can be also seen from Fig.3A and B the pH-dependent V_{\max}/K_m curves for intestinal and renal SGLT1 are not only different in shape but they do not superpose, thus demonstrating that the total transport capacity of both transporters is not the same. It should be noted, that the contribution for this difference comes essentially from the different V_{\max} s at iso-pH conditions. At pH-gradient, when both K_m s are similar (at extreme pH values) their V_{\max} s become different and vice versa at pH around 7.0 (Fig.3A and B). This observation is in agreement with our previous observations at pH 7.0 [21].

Finally, the V_{\max}/K_m curves of LAG pathway for both pH-gradient and iso-pH conditions (Fig.5) were steady. However, the origin of this stability is different since at pH-gradient both parameters change simultaneously, whereas, at iso-pH the LAG pathway is pH insensitive. The slight similarity can be observed in pH-responsiveness between HAG and LAG pathway and rejects the suggestion of Hoshi et al. [10] concerning the possibility of the presence of two separate carriers for D-glucose which are different in cation selectivity but equally sensitive to Pz. Henceforth, we can argue, at least for rabbit renal BBMV, that two transport pathways are equally sensitive to phlorizin [21] and also sensitive to external and internal H^+ concentration. Our results are in agreement with the studies of H^+ -dependent glucose transport [35a] in the BBMV from rat renal outer cortex where, according to Turner and Moran studies [32], predominate LAG pathway. It has been suggested [35a] that increased D-glucose transport rates observed in Na^+ -free acidic media may represent diffusive D-glucose flux via SGLT2 which undergoes allosteric modification by H^+ . This suggestion was based on the lack of potential dependence of the glucose transport in Na^+ -free acidic media or the low suppression of this non accumulative H^+ /glucose transport by addition of FCCP [35a]. To our knowledge, our work is a first report of the pH effect on kinetic parameters of Na^+ -dependent glucose transport by LAG pathway and further studies are required to explain a mechanism of the pH responses of HAG and LAG transport pathways.

In conclusion, the results presented in this paper unambiguously demonstrate the difference between intestinal and renal SGLT1 transport activities as a function of H^+ concentration (Fig.3.A and B). We suggest that this different functional expression of the same protein may be due to a different post-transcriptional modification of SGLT1 in jejunal and renal proximal tubule brush-border membranes or to a heteroassociation of SGLT1 with other membrane proteins. These results strongly support our hypothesis that kinetic heterogeneity does not necessary corresponds to the functioning of different molecules but also may represent a different state of molecular aggregation [21].

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by grant MT-7607 from the Medical Research Council of Canada. N.O. was supported by a fellowship from the GRTM. The technical assistance of Mrs. C. Leroy has been greatly appreciated.

REFERENCES

1. Béliveau, R., Demeule, M., Ibnoul, K.H., Bergeron, M., Beaugard, G., and Potier, M. 1988. Radiation-inactivation studies on brush-border-membrane vesicles. General considerations and application to the glucose and phosphate carriers. *Biochem. J.* **252**: 807-813
2. Berteloot, A. 1984. Characteristics of glutamic acid transport by rabbit intestinal brush-border membrane vesicles. Effect of Na⁺-, K⁺-, and H⁺-gradients. *Biochim. Biophys. Acta* **775**: 129-140
3. Berteloot, A., Malo, C., Breton, S., and Brunette, M. 1991. A fast sampling, rapid filtration apparatus: principal characteristics and validation from studies of D-glucose transport in human jejunal brush-border membrane vesicles. *J. Membrane Biol.* **122**: 111-125
4. Berteloot, A., and Semenza, G. 1990. Advantages and limitations of vesicles for the characterization and kinetic analysis of transport systems. *Meth. Enzymol.* **192**: 409-437
5. Blank, M.E., Bode, F., Baumann, K., and Diedrich, D.F. 1989. Computer analysis reveals changes in renal Na⁺-glucose cotransporter in diabetic rats. *Am. J. Physiol.* **257**: C385-C396
6. Chenu, C., and Berteloot, A. 1993. Allosterism and Na⁺-D-glucose cotransport kinetics in rabbit jejunal vesicles: compatibility with mixed positive and negative cooperativities in a homo-dimeric or tetrameric structure and experimental evidence for only one transport protein involved. *J. Membrane Biol.* **132**: 95-113
7. Diedrich, D.F. 1963. The comparative effects of some phlorizin analogs on the renal reabsorption of glucose. *Biochim. Biophys. Acta* **71**: 688-700
- 7a. Dorando, F.C., Crane, R.K. 1984. Studies of the kinetics of Na⁺ gradient-coupled glucose transport as found in brush-border membrane vesicles from rabbit jejunum. *Biochim. Biophys. Acta* **772**, 273-287
8. Gerardi-Laffin, C., Delque-Bayer, P., Sudaka, P., and Poirée, J.C. 1993. Oligomeric structure of the sodium-dependent phlorizin binding protein from kidney brush-border membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1151**: 99-104
9. Hirayama, B.A., Loo, D.D.F., Wright, E.M. (1994). Protons drive sugar transport through

- the Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1). *J. Biol. Chem.* **269**: 21407-21410
10. Hoshi, T., Takuwa, N., Abe, M., Tajima, A. 1986. Hydrogen ion-coupled transport of D-glucose by phlorizin sensitive sugar carrier in intestinal brush-border membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **861**: 483-488
 11. Kanai, Y., Lee, W.S., You, G., Brown, D., and Hediger, M.A. 1994. The human kidney low affinity Na⁺/glucose cotransporter SGLT2. *J.Clin. Invest.* **93**: 397-404
 12. Koepsell, H., Fritzsche, G., Korn, K., and Madrala, A. 1990. Two substrate sites in the renal Na⁺-D-glucose cotransporter studied by model analysis of phlorizin binding and D-glucose transport measurements. *J. Membrane Biol.* **114**: 113-132
 13. Koepsell, H., and Spangenberg, J. 1994. Function and presumed molecular structure of Na⁺-D-glucose cotransport systems. *J. Membrane Biol.* **138**: 1-11
 14. Le Grimellec, C., Friedlander, G., Yandouzi, H., Zlatkin, P., Diocondi M.C. 1992. Membrane fluidity and transport properties in epithelia. *Kidney International* **42**: 825-836
 15. Loo, D.D.F., Hazama, A., Supplisson, S., Turk, E., and Wright, E.M. 1993. Relaxation kinetics of the Na⁺/glucose cotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 5767-5771
 16. Mackenzie, B., Panayotova-Heiermann, M., Loo, D.D.F., Lever, J.E., and Wright, E. 1994. SAAT1 is a low affinity Na⁺/glucose cotransporter and not an amino acid transporter. *J. Biol. Chem.* **269**: 22488-22491
 17. Maenz, D.D., Chenu, C., Bellemare, F., and Berteloot, A. 1991. Improved stability of rabbit and rat intestinal brush border membrane vesicles using phospholipase inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* **1069**: 250-258
 18. Maegawa, H., Kato, M., Inui, K., Hori, R. 1988. PH sensitivity of H⁺/organic cation antiport system in rat renal brush border membranes. *J. Biol. Chem.* **263**: 11150-11154
 19. Malo, C., and Berteloot, A. 1991. Analysis of kinetic data in transport studies: new insights from kinetic studies of Na⁺-D-glucose cotransport in human brush-border membrane vesicles using a fast sampling, rapid filtration apparatus. *J. Membrane Biol.* **122**: 127-141
 20. Morrison, A.I., Panayotova-Heiermann, M., Feigl, G., Schlölermann, B., Kinne R.K.H. (1991). Sequence comparison of the sodium-D-glucose cotransport systems in rabbit renal and intestinal epithelia. *Biochim. Biophys. Acta* **1089**: 121-123
 21. Oulianova, N., and Berteloot, A. 1996. Sugar transport heterogeneity in the kidney: two

- independent transporters or different transport modes through an oligomeric protein? 1. glucose transport studies. *J.Membrane Biol.*, under revision
22. Oulianova, N., and Berteloot, A. 1996. Sugar transport heterogeneity in the kidney: two independent transporters or different transport modes through an oligomeric protein? 2. phlorizin binding studies. *J.Membrane Biol.*, to be submitted
 23. Pajor, A.M., Hirayama, B.A., and Wright E.M. 1992. Molecular evidence for two renal Na⁺/glucose cotransporters. *Biochim. Biophys. Acta* **1106**: 216-220
 24. Parent, L., Supplisson, S., Loo, D.D.F., and Wright, E.M. 1992. Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter: I. Voltage-clamp studies. *J.Membrane Biol.* **125**: 49-62
 25. Reizer, J., Reizer, A., and Saier, M.H.Jr. 1994. A functional superfamily of sodium/solute symporters. *Biochim. Biophys. Acta* **1197**: 133-166
 26. Semenza, G., Kessler, M., Hosang, M., Weber, J., and Schmidt, U. 1984. Biochemistry of the Na⁺-D-glucose cotransporter of the small intestine brush-border membranes: the state of the art in 1984. *Biochim. Biophys. Acta* **779**: 343-379
 27. Stevens, B.R., Fernandez, A., Hirayama, B., Wright, E.M., and Kempner, E.S. 1990. Intestinal brush border membrane Na⁺/glucose cotransporter functions in situ as a homotetramer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 1456-1460
 28. Takahashi, M., Malathi, P., Preiser, H., and Jung, C.Y. 1985. Radiation inactivation studies on the rabbit kidney sodium-dependent glucose transporter. *J. Biol. Chem.* **260**: 10551-10556
 29. Toggenburger, G., Kessler, M., and Semenza, G. 1982. Phlorizin as a probe of the small intestinal Na⁺, D-glucose cotransporter. A model. *Biochim. Biophys. Acta* **688**: 557-571
 30. Turk, E., Zabel, B., Mundlos, S., Dyer, J., and Wright, E.M. 1991. Glucose/galactose malabsorption caused by a defect in the Na⁺/D-glucose cotransporter. *Nature* **350**: 354-356
 31. Turner, R.J., and Kempner, E.S. 1982. Radiation inactivation studies of the renal brush-border membrane phlorizin-binding protein. *J. Biol. Chem.* **257**: 10794-10797
 32. Turner, R.J., and Moran, A. 1982. Heterogeneity of sodium-dependent D-glucose transport sites along the proximal tubule: evidence from vesicle studies. *Am. J. Physiol.* **242**: F406-F414
 33. Turner, R.J., and Moran, A. 1982. Stoichiometric studies of the renal outer cortical brush

- border membrane D-glucose transporter. *J. Membrane Biol.* **67**: 73-80
34. Turner, R.J., and Moran, A. 1982. Further studies of proximal tubular brush border membrane D-glucose transport heterogeneity. *J. Membrane Biol.* **70**: 37-45
35. Turner, R.J., and Silverman, M. 1977. Sugar uptake into brush border vesicles from normal human kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 2825-2829
- 35a. Vayro, S., Simmons, N.L. 1996. Proton/solute cotransport in rat kidney brush-border membrane vesicles: relative importance to both D-glucose and peptide transport. *Biochim. Biophys. Acta* **1279**: 111-117
36. Veyhl, M., Spangenberg, J., Puschel, B., Poppe, R., Dekel, C., Fritzsche, G., Haase, W., and Koepsell, H. 1993. Cloning of a membrane-associated protein which modifies activity and properties of the Na⁺-D-glucose cotransporter. *J. Biol. Chem.* **268**: 25041-25053
37. Wright, E.M. 1993. The intestinal Na⁺/glucose cotransporter. *Annu. Rev. Physiol.* **55**: 575-589
38. You, G., Lee, W-S., Barros, E.J.G., Kanai, Y., Huo, T-L., Khawaja, S., Wells, R.G., Nigam, S.K., Hediger, M.A. 1995. Molecular characteristics of Na⁺-coupled glucose transporters in adult and embryonic rat kidney. *J. Biol. Chem.* **270**: 29365-29371

LEGENDS TO FIGURES

Fig.1(A) and (B). Gradient-pH dependence of kinetic parameters of intestinal and renal HAG pathway. Vesicles were resuspended in buffer pH 8.5. The pH of incubating media only was changed. The compositions of resuspension buffer and incubating media was as described in Materials and Methods. Each point represents the kinetic parameter (K_m or V_{max}) determined from non-linear regression analysis as described in Data analysis.

Fig.2(A) and (B). Iso-pH dependence of kinetic parameters of intestinal and renal HAG pathway. The compositions of resuspension buffer and incubating media was as described in Materials and Methods. The pH of both resuspension buffer and incubating media were changed simultaneously to keep pH equal on each membrane side. Each point represents one of the kinetic parameters (K_m or V_{max}) estimated from non linear regression analysis as was described in Data analysis.

Fig.3(A) and (B). V_{max}/K_m curves at gradient-pH and iso-pH conditions for intestinal and renal HAG pathways. Each point represents V_{max}/K_m ratio where V_{max} and K_m values are provided from the experiments shown in Fig.1 and Fig.2 (A and B).

Fig.4 (A) and (B). Kinetic parameters of renal LAG pathway as a function of gradient-pH and iso-pH conditions. Each point represents the kinetic parameter (K_m or V_{max}) determined from nonlinear regression analysis simultaneously with the estimation of HAG kinetic parameters as described in Data analysis.

Fig.5. V_{max}/K_m curves at gradient-pH and iso-pH conditions for renal LAG pathway. Each point represents V_{max2}/K_{m2} ratio where V_{max2} and K_{m2} values are provided from the experiments shown in Fig.4(A and B).

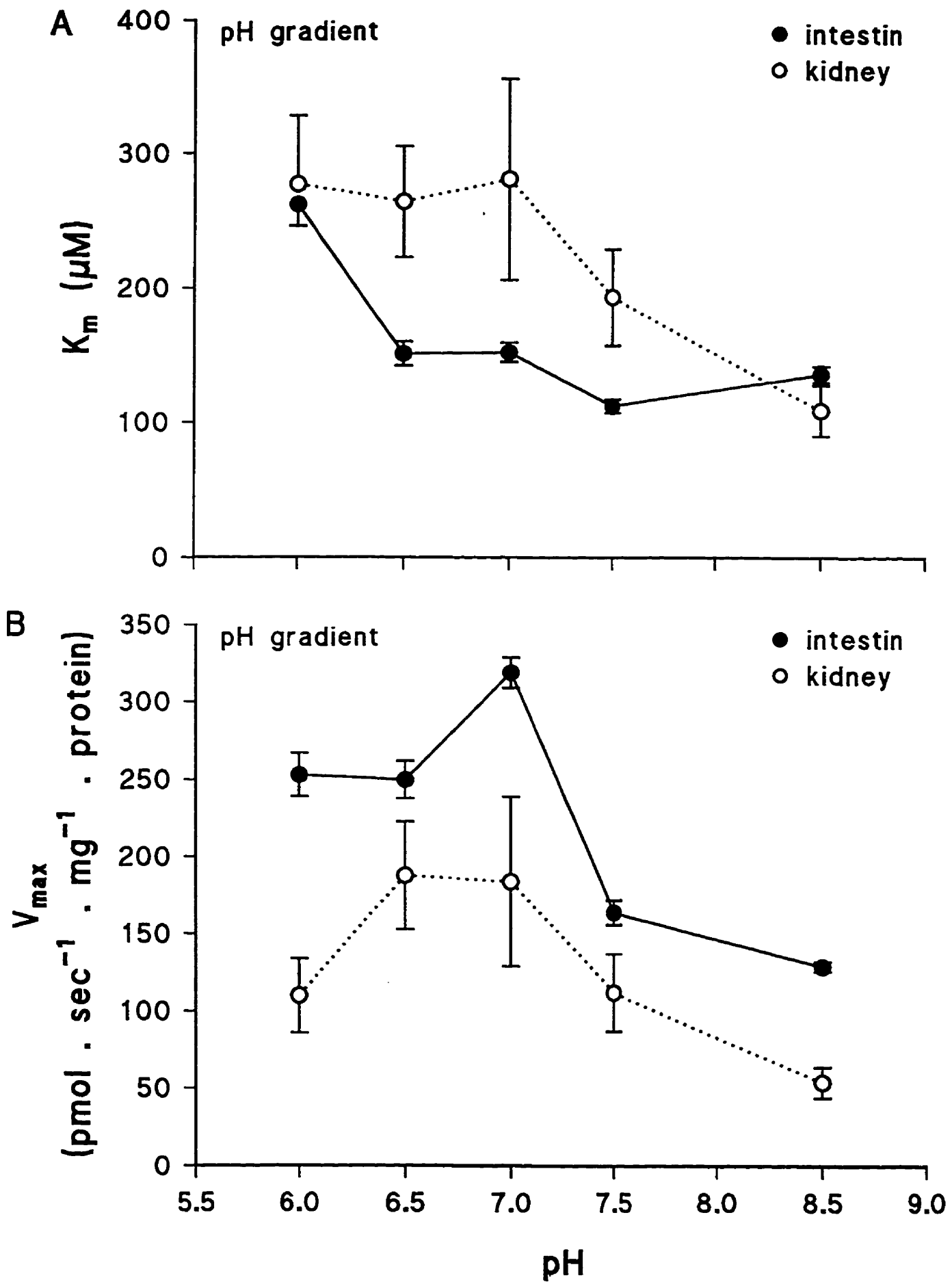


Figure 1.

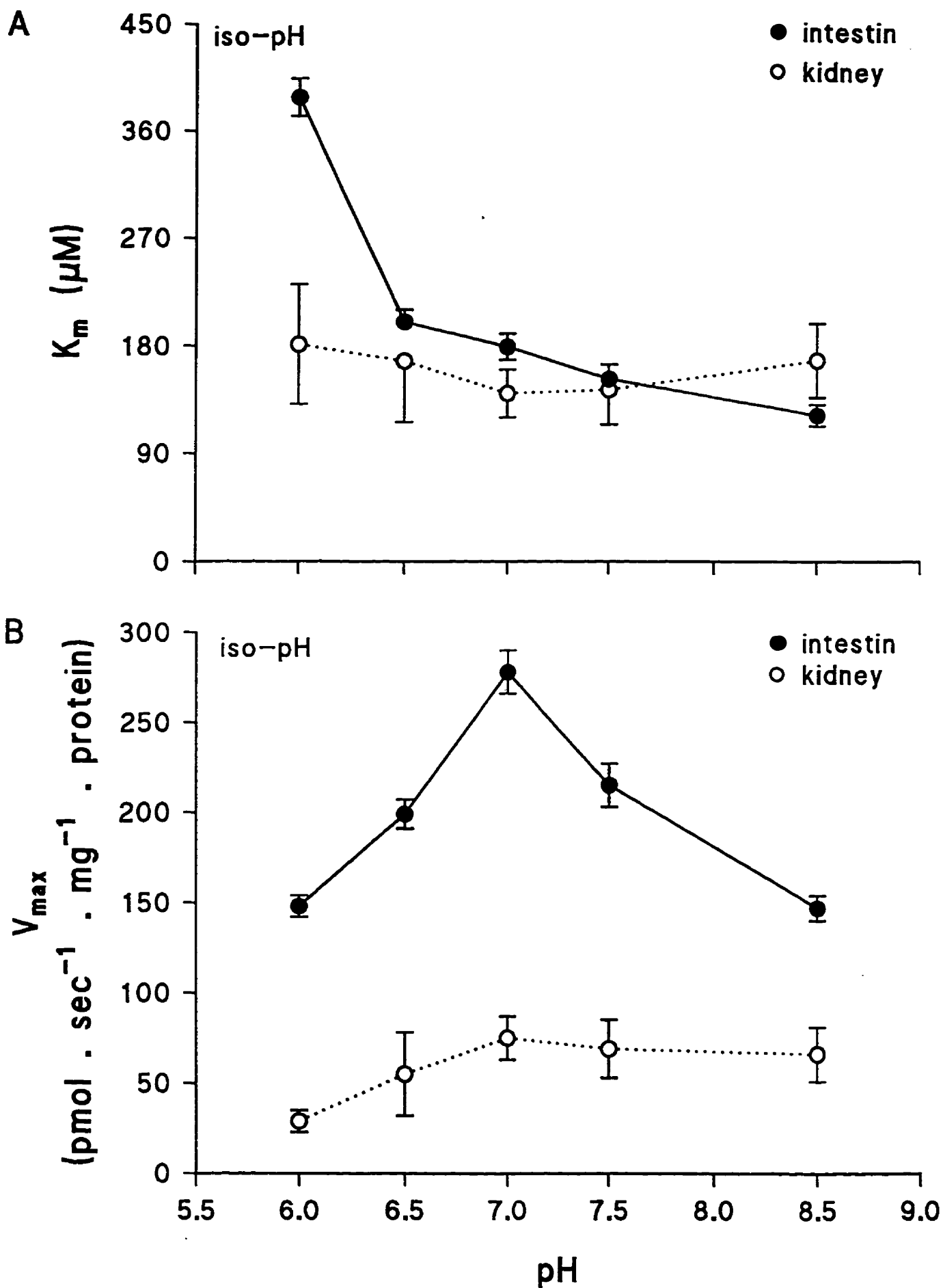


Figure 2.

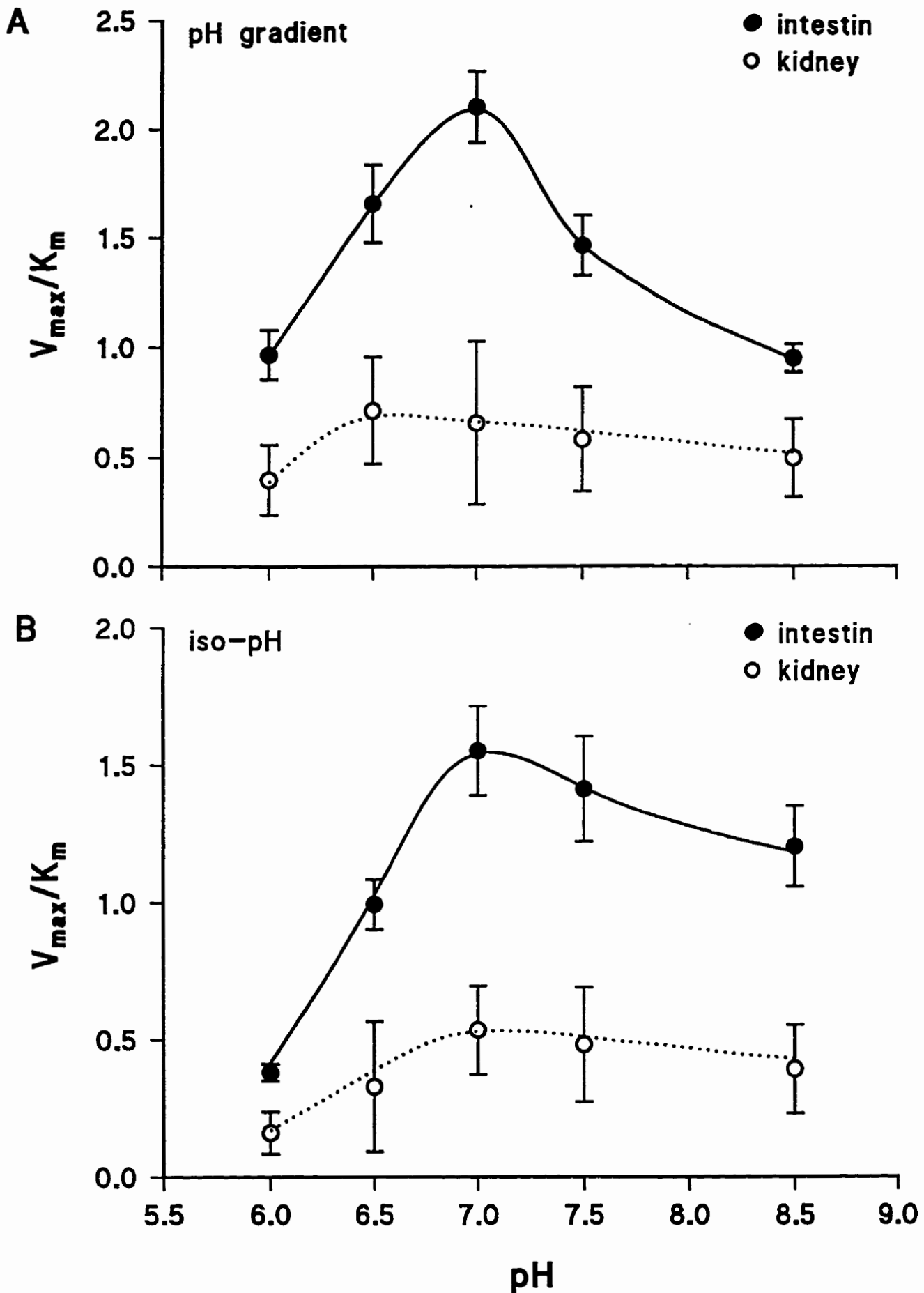


Figure 3.

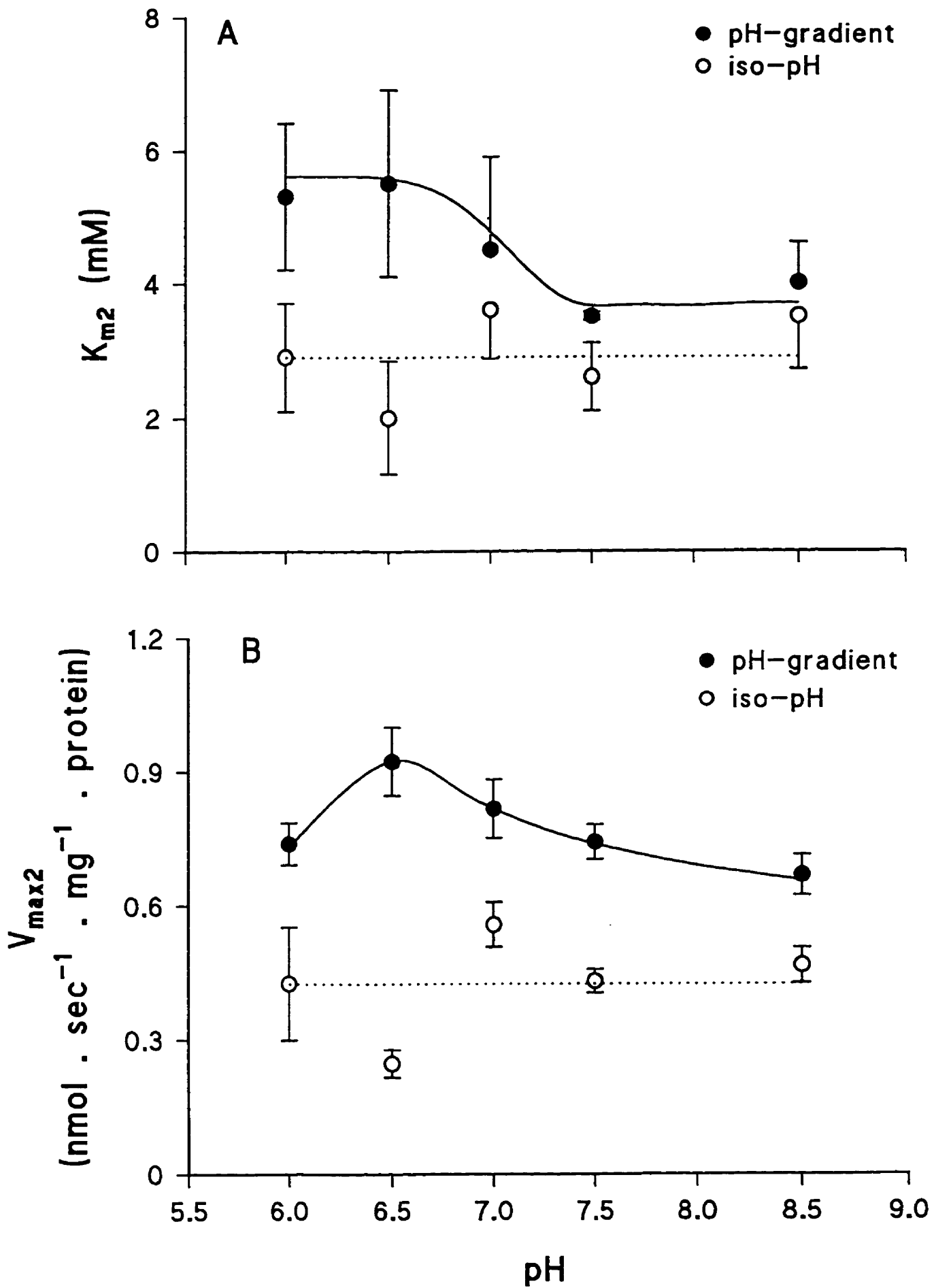


Figure 4.

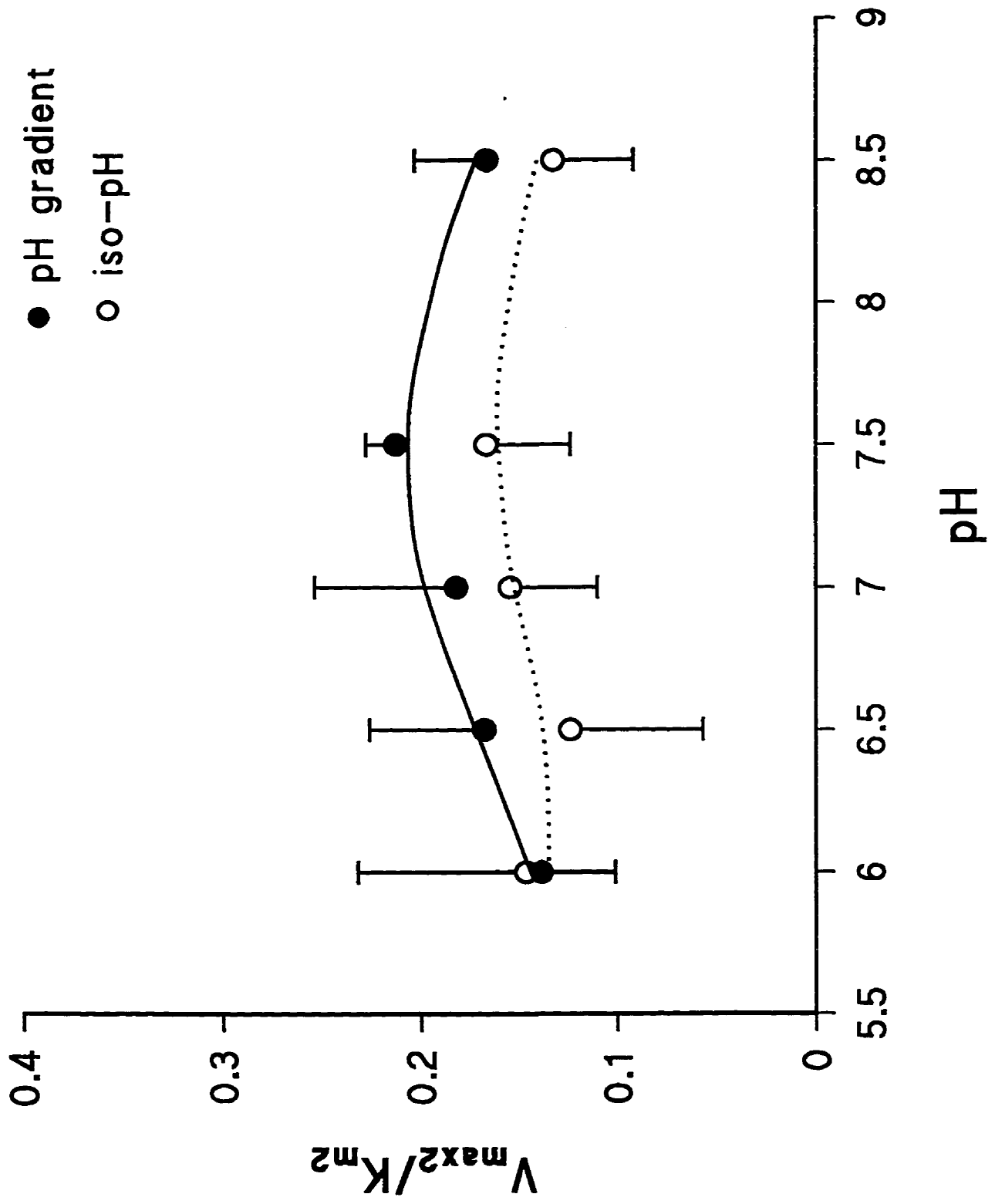


Figure 5.

CHAPITRE VI: DISCUSSION

Commentaires généraux

Les observations cliniques relatives à la malabsorption intestinale du Glc et du Gal et à la glycosurie rénale ont établi (Scriver et al., 1976) l'hétérogénéité moléculaire du cotransport Na^+ -glucose rénal. Celle-ci a ensuite été associée à l'hétérogénéité cinétique du transport du Glc dans le tubule contourné proximal suggérée par Barfuss et Schafer (1981) et démontrée par Turner et Moran sur vésicules de MBB isolées du cortex entier ou de régions plus spécifiques correspondant au cortex externe (cellules du type S_1) et à la médulla externe (cellules du type S_3) (Turner et Moran, 1982a,b,c). Toutefois, cette équation entre hétérogénéité moléculaire rénale et hétérogénéité cinétique dans le tubule proximal reste un sujet controversé puisqu'elle repose sur un certain nombre d'hypothèses dont la validité reste à établir. C'est donc ce qui a constitué l'objectif principal de cette thèse dans laquelle nous concluons que l'hétérogénéité cinétique du transport de Glc dans le tubule proximal refléterait l'expression d'un système unique de cotransport à structure oligomérique plutôt que l'expression de deux systèmes indépendants.

Selon l'hypothèse proposée par Turner et Moran (1982a,b,c), l'hétérogénéité serait due à l'expression fonctionnelle de deux transporteurs distincts: la voie HAG, assurée par la protéine SGLT1, tel que suggéré par plusieurs auteurs (Kanai et al., 1994; Koepsell et Spangenberg, 1994; Mackenzie et al., 1994; Pajor et al., 1992; Silverman et al., 1993; You et al., 1995), et la voie LAG, assurée par un second transporteur. Selon des études récentes, cette dernière fonction pourrait être attribuée à un transporteur de type SGLT2 dont trois molécules, Hu14, ratSGLT2 ou SAAT1 ont été respectivement clonées à partir du rein humain (Kanai et al., 1994; Wells et al., 1992b), du rein de rat (You et al., 1995) et des cellules LLC-PK₁ (Mackenzie et al., 1994).

Selon notre hypothèse, l'hétérogénéité serait due au fonctionnement allostérique d'une protéine unique capable de s'exprimer selon deux modes de transport cinétiquement séparables (Chenu et Berteloot, 1993; Koepsell et Spangenberg, 1994). Les voies HAG et LAG seraient l'expression fonctionnelle de SGLT1, susceptible d'être modulée par des facteurs différents tels que la présence d'une sous-unité régulatrice RS1 (Veyhl et al., 1993), ou l'existence d'une coopérativité négative pour la liaison d'une seconde molécule du substrat sur un transporteur de structure dimérique (Chenu et Berteloot, 1993). Les arguments justifiant cette conclusion seront donc discutés dans les pages qui suivent.

I VALIDATION DE L'APPROCHE EXPÉRIMENTALE

Selon Turner et Moran (1982a,b,c), la localisation préférentielle des voies de transport HAG et LAG aux segments du tubule proximal originant respectivement de la médulla (S_3) et du cortex (S_1) externes constituerait en soi une preuve de l'existence de deux transporteurs indépendants. Ces mêmes auteurs reconnaissaient cependant qu'une telle séparation anatomique n'était pas parfaite, ce qu'ont confirmé depuis plusieurs laboratoires (Blank et al., 1989; Pajor et al., 1992; Koepsell et al., 1990). C'est la raison principale pour laquelle aucune tentative n'a été faite dans nos études cinétiques de séparer spatialement les voies de transport HAG et LAG et que nous avons opté pour une préparation de VMBB issue du cortex rénal entier. De plus, sur le plan pratique, une telle préparation a l'avantage de produire une plus grande quantité de matériel et, donc, de permettre un plus grand nombre d'études susceptibles de mener à des résultats statistiques fiables. Il est également évident qu'une telle préparation permettrait de tester de façon directe les hypothèses à l'effet que les voies de transport HAG et LAG représentent l'expression de deux systèmes de transport indépendants ou, au contraire, l'expression d'une protéine unique pouvant fonctionner selon différents modes.

Le second aspect sur lequel nous avons porté notre attention était l'utilisation de préparations stables de vésicules (Maenz et al., 1991) et un contrôle rigoureux des conditions expérimentales comme la température, le pH, l'osmolarité, la force ionique et le potentiel membranaire. Ce dernier a été clampé à 0 mV par l'utilisation des iodures qui diffusent très rapidement à travers les membranes comparativement aux autres ions comme le Na^+ , le K^+ et la choline (Berteloot, 1986).

Enfin, pour assurer une analyse fiable des résultats, nous avons mesuré les vitesses de transport du Glc et de liaison de la Pz en utilisant une approche dynamique (Berteloot et Semenza, 1990; Dorando et Crane, 1984) dans laquelle des prélèvements multiples d'échantillons sont effectués à partir d'un même mélange réactionnel, ce qui a été rendu possible grâce à l'utilisation de l'AFER (Berteloot et al., 1990; Malo et Berteloot, 1991; Chenu et Berteloot, 1993). De plus, les paramètres cinétiques ont été estimés par une analyse en régression non linéaire des vitesses initiales de transport du Glc et de liaison de la Pz, ainsi que de la liaison de Pz à l'équilibre, selon le principe de l'inhibition compétitive où le traceur radioactif est déplacé

des sites spécifiques par le substrat froid (Malo et Berteloot, 1991). Cette technique a l'avantage d'éviter toute transformation des données expérimentales qui serait susceptible d'introduire des déviations artéfactuelles de la linéarité des graphes d'Eadie-Hofstee (Berteloot et al., 1991,1990; Chenu et Berteloot, 1993; Malo et Berteloot, 1991). Dans ces conditions, la préparation de VMBB à partir d'un très large échantillon de P_2 issu du cortex entier permet de minimiser les variations animales et d'assurer une grande reproductibilité des résultats. Le faible écart entre les points expérimentaux de deux expériences différentes effectuées sur les VMBB issues du même large échantillon de P_2 (Chapitre 2, Figure 1; Chapitre 3, Tableau 1.) démontre la validité d'une telle procédure expérimentale.

L'analyse des vitesses initiales du transport rénal (Chapitre 2, Figure 1.) confirme les résultats de Turner et Moran (1982a,b,c) à l'effet que les cinétiques de transport du Glc dans le cortex entier de lapin sont compatibles avec la présence de deux voies de transport HAG et LAG, telle qu'illustrée par la non linéarité du graphe d'Eadie-Hofstee (encadré de Figure 1.). D'autre part, nous confirmons les résultats d'études précédentes (Alvarado, 1967; Bode et al., 1972; Chesney et al., 1974; Diedrich, 1966; Glossman et Neville, 1972; Silverman et Black, 1975; Turner et Moran, 1982a,c) en démontrant la présence de deux classes de sites de liaison de la Pz (Chapitre 3, Tableau 2.).

Il est important de souligner que des préparations équivalentes de VMBB d'origine intestinale chez l'homme (Malo et Berteloot, 1991) et le lapin (Chenu et Berteloot, 1993) ont démontré des cinétiques de transport du Glc parfaitement michaéliennes, donc compatibles avec la présence d'une seule classe de sites de transport.

On peut donc conclure que notre approche expérimentale et analytique est applicable aux cinétiques simples ou plus complexes et qu'il est donc possible de comparer les cinétiques de transport du Glc dans le rein et l'intestin, d'une part, et entre les voies de transport HAG et LAG, d'autre part.

Finalement, la même technique permet d'estimer directement la fraction diffusionnelle du transport par la mesure de captation du traceur à concentration saturante de Glc (200 mM) puisque la fraction médiée du transport est complètement déplacée dans ces conditions (Malo et al., 1991). Ceci est confirmé par la comparaison de l'accumulation de Glc en présence simultanée

de Na⁺ et de 200 mM de Glc avec celle obtenue en absence complète de Na⁺ (Chapitre 2, Figure 2.).

On peut donc conclure que nos préparations de VMBB sont dépourvues de voie de transport du Glc Na⁺-indépendantes et donc que: i) il n'y a pas de contamination significative par des MBL qui pourrait contribuer à l'hétérogénéité cinétique observée; ii) les voies HAG et LAG sont toutes deux Na⁺-dépendantes et le Na⁺ est un activateur essentiel du cotransport Na⁺-D-glucose rénal. Cette dernière caractéristique a été démontrée pour SGLT1 (rev. Wright, 1993) et SGLT2 (Kanai et al., 1994; Mackenzie et al., 1994; You et al., 1995) clonés de même que pour SGLT1 intestinal chez le lapin (Chenu et Berteloot, 1993) et l'homme (Malo et Berteloot, 1991).

II HÉTÉROGÉNÉITÉ DU COTRANSPORT Na⁺-D-GLUCOSE DANS LES VMBB RÉNALES DE LAPIN

II.1. Paramètres cinétiques

II.1.a) SGLT1 intestinal et voie HAG rénale

Il faut souligner que le point commun des deux hypothèses sur l'origine de l'hétérogénéité cinétique du transport rénal est le postulat que le système de transport intestinal et la voie HAG rénale sont le résultat de l'expression fonctionnelle de la protéine SGLT1 (Hediger et al., 1987; Coady et al., 1990) démontrée commune aux deux tissus (Morrison et al, 1991). Cependant, en comparant les paramètres cinétiques du SGLT1 intestinal estimés lors des études cinétiques dans les VMBB de lapin (Chenu et Berteloot, 1993) avec ceux mesurés pour la voie HAG rénale (Chapitre 2. Tableau 1.), on peut constater qu'il existe une différence de 2.3 fois entre les affinités des deux transporteurs. Cette différence ne peut être considérée comme une simple coïncidence puisqu'on observe la même différence de 2.3 fois entre le K_m du transport dans le jéjunum humain (0.6-0.9 mM) (Malo, 1991) et le K_m de la voie HAG dans le rein humain (0.3 mM) (Turner et Silverman, 1977). On pourrait argumenter que l'affinité plus élevée du SGLT1 rénal serait due à une différence de composition lipidique ou de fluidité membranaire entre les

deux tissus (Le Grimellec et al., 1992). Cependant, en comparant les valeurs des K_m de rSGLT1 exprimé dans les ovocytes (100-200 μ M (Parent et al., 1992) ou 117-126 μ M (Veyhl et al., 1993)), dans les cellules COS-7 (150 μ M (Birnie et al., 1990)) qui sont dépourvues de transport Na^+ -D-glucose endogène, ou dans les VMBB intestinales de lapin (139 μ M (Chenu et Berteloot, 1993)), on peut constater que, malgré des compositions lipidiques membranaires différentes, l'affinité du transporteur SGLT1 n'est pas affectée. De même, l'affinité du SGLT1 humain cloné et exprimé dans l'ovocyte de *Xenopus* (0.8 mM) (Loo et al., 1993b) est du même ordre de grandeur que celle estimée dans le jéjunum humain (0.6-0.9 mM) (Malo et Berteloot, 1991).

Ainsi, l'ensemble des résultats indique que la différence observée entre les K_m des deux tissus reflète une différence dans l'expression fonctionnelle sans rapport avec la composition membranaire.

II.1.b) nature possible de la voie LAG

La nature de la voie LAG reste, jusqu'à présent, un problème irrésolu. De nombreuses études (Blank et al., 1989; Gerardi-Laffin et al., 1993; Koepsell et al., 1990, 1994; Veyhl et al., 1993) montrent que l'interprétation proposée par Turner et Moran (1982 a,b,c) devrait être considérée comme une vision incomplète du phénomène de l'hétérogénéité.

Trois molécules récemment clonées présentent les caractéristiques généralement attribuables à la voie LAG: une faible affinité pour le substrat et une stoechiométrie $1\text{Na}^+ : 1\text{Glc}$. Les clones Hu14-hSGLT2 (1.6 mM, Wells et al., 1992; Kanai et al., 1994) isolé du tissu rénal humain, ratSGLT2 du rein de rat (3 mM, You et al., 1995) et SAAT1-pSGLT2 (1.7-4 mM, Kong et al., 1993; Mackenzie et al., 1994) isolé à partir d'ADN complet des cellules LLC-PK₁ présentent tous ces caractéristiques. À présent, il est difficile de déterminer lequel des trois clones peut être responsable de la voie LAG dans le rein, en admettant que l'hétérogénéité cinétique observée soit le résultat de la diversité moléculaire. Il faut souligner que, même si SAAT1-pSGLT2 est un bon candidat pour représenter un second système de transport Na^+ -dépendant du Glc, il n'existe actuellement aucune preuve expérimentale directe démontrant qu'il assure le transport par la voie LAG. En plus, il a été démontré que la distribution tissulaire de SAAT1 n'est pas exclusive au rein (Kong et al., 1993).

Nous avons donc analysé les caractéristiques cinétiques de la voie LAG dans le but de les comparer avec celles de la voie HAG et du SGLT1 cloné, d'une part, et avec celles déterminées pour les trois clones cités plus haut, d'autre part.

II.2. Études du transport de galactose

Nous démontrons l'hétérogénéité du transport de Gal dans le rein de lapin (Chapitre 2, Figure 3.), confirmant ainsi les résultats de Turner et Moran (1982a) et de Roigaard-Petersen et al. (1986) dans les VMBB rénales de lapin. Selon la première étude, basée sur l'inhibition du transport de Glc par le Gal, les valeurs de K_i pour les voies HAG et LAG diffèrent de 27 à 30 fois. Dans la seconde étude, malheureusement pas effectuée en condition de vitesses initiales, la détermination des K_m^{Gal} des voies HAG et LAG montre une différence de 100 fois. Ces données sont donc comparables au rapport de 55 fois pour les K_m^{Gal} déterminés dans nos études (Chapitre 2, Tableau 2.). En plus, les V_{max} du transport de Gal par les voies HAG et LAG sont similaires aux V_{max} du transport de Glc (Chapitre 2, Tableau 2.), démontrant ainsi que le Glc et le Gal partagent le même transporteur et ce, pour les deux voies de transport. Il faut noter que des V_{max} identiques ont été observés pour le Glc et le Gal dans les VMBB intestinales de lapin où seule l'expression fonctionnelle de SGLT1 a été observée (Chenu et Berteloot, 1993).

En comparant les K_m des deux voies de transport pour le Glc et le Gal dans les études de Roigaard-Petersen et al. sur VMBB rénales de lapin (1986), de Mackenzie et al. sur SAAT1-pSGLT2 (1994) et de Birnir et al. sur le SGLT1 de lapin (1991), on peut constater que seule la voie LAG présente une discrimination marquée entre les deux substrats. Au contraire, dans nos études au niveau rénal de même que dans celles de Chenu et Berteloot au niveau intestinal (1993), le Glc est le substrat préférentiel pour les voies HAG et LAG rénales et pour le rSGLT1 intestinal. Cependant, le pouvoir discriminatoire des deux voies de transport n'est pas le même (4 fois pour HAG et 8 fois pour LAG (Chapitre 2, Tableau 2.), ce qui est compatible avec les résultats de Turner et Moran (1982a).

Ceci pourrait bien sûr être utilisé comme preuve de l'existence de deux transporteurs indépendants dans le rein. Cependant, ni Hu14-hSGLT2 (Kanai et al., 1994), ni SGLT2 de rat (You et al., 1995) ne transportent le Gal de façon significative, alors que SAAT1-pSGLT2 aurait un K_m^{Gal} supérieur à 20 mM (Mackenzie et al., 1994). En réalité, lorsqu'il est recalculé à partir

des valeurs relatives du courant induit par le transport du Gal et du Glc et des paramètres cinétiques tels que publiés par ces auteurs, le K_m^{Gal} atteint une valeur de 385 mM. Par conséquent, on est en droit de considérer qu'aucun des trois clones actuels ne saurait correspondre à la voie LAG observée dans notre préparation de VMBB. Par contre, la capacité de transporter le Gal est un fait reconnu pour SGLT1, si bien que nos résultats sont compatibles avec le concept d'un fonctionnement allostérique de SGLT1 (Chenu et Berteloot, 1993) si on admet que la structure moléculaire du substrat détermine le type de changement conformationnel induit lors de sa liaison. Ainsi, tant l'affinité intrinsèque du transporteur que la coopérativité négative entre sous-unités pourraient être modifiées en fonction de la nature du substrat transporté, d'où un pouvoir discriminatoire différent entre Glc et Gal des voies HAG et LAG.

II.3. Effet de la température

Nos études concernant l'effet de la température sur le cotransport rénal (Chapitre 2.) se différencient des études précédentes (Brasitus et al., 1979; De Smedt et Kinne, 1981; Kinne et al., 1975; Kippen et al., 1979) par le fait que, pour la première fois, nous avons estimé la dépendance en température des paramètres cinétiques (V_{max} et K_m pour les deux voies de transport) alors que les études précédentes se sont basées sur la mesure des vitesses initiales à une seule concentration du substrat. Dans ces conditions, en mesurant le transport total, sans extraire les valeurs des paramètres cinétiques susceptibles d'être changés différemment en fonction de la température, l'interprétation des courbes d'Arrhénius ne peut être que partielle, même dans le cas d'un transporteur unique. L'avantage de notre approche réside donc dans la possibilité d'évaluer simultanément l'effet de la température sur les paramètres cinétiques de chacune des deux voies de transport dans la même préparation de VMBB.

II.3.a) HAG versus SGLT1 intestinal et SGLT1 cloné

Nous démontrons que les courbes d'Arrhénius construites à partir des valeurs de V_{max} de HAG et LAG sont parallèles (Chapitre 2, Figure 7A.) et montrent donc une dépendance en température identique pour les voies HAG et LAG. De plus, l'énergie d'activation (E_a) calculée est comparable à celle estimée pour SGLT1 exprimé dans les VMBB intestinales de lapin en assumant que la dépendance en température est linéaire entre 20° et 35 °C (Chenu et Berteloot,

1993). Cette valeur de E_a , par contre, est de 3 à 4 fois plus élevée que celle déterminée à partir des V_{max} de rSGLT1 exprimé dans l'ovocyte de *Xenopus* (Parent et Wright, 1993). En outre, les K_m du SGLT1 intestinal et de la voie HAG rénale augmentent avec la température tandis que le K_m du clone exprimé dans l'ovocyte de *Xenopus* y est insensible. On peut donc remarquer que seules les E_a des SGLT1 exprimés dans les membranes naturelles des VMBB sont comparables.

Pour le moment, il est difficile de conclure si cette différence de sensibilité à la température pour une même protéine exprimée dans des MBB ou des ovocytes est liée: i) à la différence des modèles expérimentaux puisque les vésicules membranaires sont probablement moins affectées par les variations de température qu'un ovocyte; ou ii) à la présence de certaines composantes (par exemple, une sous-unité régulatrice) qui sont naturellement absentes de la membrane de l'ovocyte. Ainsi, la co-injection de SGLT1 avec la sous-unité RS1 (Veyhl et al., 1993) dans l'ovocyte de *Xenopus* est capable d'induire non seulement une hétérogénéité de transport mais aussi une diminution concomitante du K_m pour la voie HAG. Toutefois, cette observation doit être extrapolée avec certaines réserves aux membranes naturelles comme celle des VMBB, SGLT1 ayant été cloné chez le lapin et RS1 étant d'origine porcine. D'autre part, des études récentes montrent que la régulation de l'activité de SGLT1 est corrélée avec sa concentration membranaire (Shirazi-Beechey et al., 1991), indépendamment du niveau d'abondance d'ARNm (Lescale-Matys et al., 1993), indiquant ainsi la possibilité de modifications post-transcriptionnelles. Quoiqu'il en soit, la similitude entre les K_m mesurés pour rSGLT1 intestinal ou exprimé dans les ovocytes de *Xenopus* suggère fortement que la différence de K_m observée entre SGLT1 intestinal et la voie HAG rénale de lapin ne réside pas dans la composition lipidique ou l'état physique membranaire. De plus, nos études de la dépendance en température permettent de proposer l'hypothèse que des modifications post-transcriptionnelles pourraient être la cause principale de cette différence.

II.3.b) HAG versus LAG

Si on admet que la voie LAG représente l'expression fonctionnelle d'une molécule autre que SGLT1, il faut alors supposer que ce second transporteur présente une énergie d'activation comparable à celle de SGLT1 pour un cycle catalytique complet. Cependant, des molécules comme le SGLT1 du lapin et de l'homme, pour lesquelles il existe 84% d'identité et 98% de

similitude dans les séquences en acides aminés (Wright, 1993), montrent une dépendance en température très différente. Ainsi, si on suppose que la dépendance en température de ces deux transporteurs est linéaire entre 20° et 35 °C, l'énergie d'activation calculée pour hSGLT1 (Malo et Berteloot, 1991) est environ 3 fois plus petite que celle de rSGLT1 (Chenu et Berteloot, 1993). De plus, l'affinité de hSGLT1 est insensible à la température, contrairement à celle de rSGLT1, et il a été démontré que les valeurs des constantes de vitesse décrivant le transport via hSGLT1 (Loo et al., 1993) et rSGLT1 (Parent et al., 1992a,b) sont différentes malgré un mécanisme cinétique similaire. Il apparaît donc difficile d'admettre que des molécules aussi divergentes que Hu14-hSGLT2 (59% d'identité avec hSGLT1 (Kanai et al., 1994; Wells et al., 1992)) ou SAAT1-pSGLT2 (76% d'identité avec SGLT1 de lapin (Mackenzie et al., 1994)) puissent présenter une dépendance en température identique.

Il faut souligner toutefois que le K_m de la voie LAG est insensible à la température, phénomène que nous avons observé pour la dépendance en pH également. Jusqu'à présent, la cause de cette insensibilité à la température et au pH reste inconnue, mais demeure compatible avec le modèle allostérique, en admettant un effet de la température sur les interactions entre les sous-unités, et par conséquent, sur la coopérativité.

II.4. Effet du pH

À notre connaissance, nos études sont les premières du genre visant à étudier l'effet du pH sur l'expression fonctionnelle de rSGLT1 dans les tissus rénal et intestinal. Cette comparaison a été effectuée dans des conditions de gradient (Chapitre 5, Figure 1.) et d'équilibre (Chapitre 5, Figure 2.) de pH, et ce en présence d'un gradient constant de Na^+ .

II.4.a) HAG versus SGLT1 intestinal et SGLT1 cloné

On peut constater que les V_{\max} et les K_m du transporteur intestinal et de la voie de transport HAG rénale sont sensibles aux H^+ dans les deux conditions de pH. Cependant, la réponse au pH est différente dans les deux tissus et l'origine de cette différence pourrait s'expliquer par une action spécifique des H^+ sur le transporteur lui-même, ce qui a été démontré auparavant (Hirayama et al., 1994; Hoshi et al., 1986; Maegawa et al., 1988; Toggenburger et al., 1982), et non par un effet non-spécifique des H^+ sur l'état physique de la membrane. Les courbes

V_{\max}/K_m en fonction du pH (Chapitre 5, Figure 3.) illustrent bien la différence, non seulement entre SGLT1 rénal et intestinal, mais également dans leur réponse spécifique aux conditions de gradient et d'équilibre des H^+ . Ainsi, on peut constater une relative insensibilité de la courbe V_{\max}/K_m à tous les pH (à l'exception de pH 6.0) pour la voie HAG rénale, contrairement au SGLT1 intestinal.

Actuellement, le mécanisme d'action des H^+ demeure obscur, bien qu'il ait été démontré qu'une substitution du Na^+ par le H^+ est possible (Hirayama et al., 1994; Hoshi et al., 1986; Chapitre 3, Tableau 2. et 3.). Cependant, la compétition directe entre Na^+ et H^+ pour l'activation du transport n'a jamais été vérifiée expérimentalement. Des effets additionnels à une simple substitution pourraient être envisagés: i) la protonation ou la déprotonation de certains résidus des acides aminés seraient susceptibles de modifier la conformation de la protéine et, ainsi, d'affecter les paramètres cinétiques du transport; ii) les ponts hydrogènes impliqués lors de la liaison du substrat (Diedrich, 1963; Silverman, 1991) pourraient également être la cible d'un excès ou d'un manque de H^+ dans le milieu d'incubation, modifiant ainsi le K_m sans nécessairement influencer le V_{\max} .

Il est important de noter que la forme en cloche des courbes V_{\max}/K_m indique la présence de deux sites d'action des H^+ dont les affinités aux H^+ sont différentes. Puisque les courbes V_{\max}/K_m en condition d'iso-pH sont toujours en forme de cloche mais la courbure est toutefois différente de celle obtenue dans les conditions du gradient de pH (Chapitre 5, Figure 3), il est possible d'envisager la présence de deux sites d'action des H^+ sur la surface interne du transporteur par analogie avec les conditions du gradient de pH. La nature de ces sites d'actions des H^+ reste, cependant, à déterminer afin de rendre l'interprétation des résultats plus fiable. Toutefois, le mécanisme d'action des H^+ paraît très complexe puisque Vayro et Simmons (1996) n'ont pas réussi à démontrer la dépendance en gradient de H^+ du transport de Glc Pz-sensible en présence de FCCP ou du potentiel membranaire dans les VMBB issues du cortex externe du rein de rat. Selon les auteurs, l'acidité du milieu externe suffit à stimuler le transport de caractère non-accumulatif ce qui est compatible avec nos observations (non publiées). Néanmoins, indépendamment du mécanisme d'action des H^+ il est évident que le pH n'affecte pas le cotransport intestinal et la voie HAG rénale de la même façon.

II.4.b) HAG versus LAG

Pour la première fois à notre connaissance, nos études établissent la dépendance en pH des paramètres cinétiques de la voie de transport LAG (Chapitre 5, Figure 4.). Il faut admettre que la détermination des paramètres cinétiques de LAG n'est pas suffisamment précise puisque la contribution de la voie de transport HAG varie aux différents pH (Chapitre 5, Figure 1 et 2.) en modifiant le rapport des contributions HAG/LAG dans le transport total mesuré. Avec ces réserves, en comparant les courbes de la dépendance en pH des paramètres cinétiques caractérisant les voies LAG et HAG (Chapitre 5, Figures 2 et 4.), on peut constater une certaine similitude dans la réponse des deux voies de transport au gradient de pH. De même, en conditions iso-pH, la voie LAG perd sa sensibilité aux H^+ en même temps que la voie HAG. Cette réponse similaire des deux voies de transport aux changements de pH réfute la suggestion de Hoshi et al. (1986), suite à l'observation d'une homogénéité du transport H^+ -dépendant mais Pz-sensible dans les VMBB intestinales de lapin, quant à l'existence de deux transporteurs de Glc présentant une sélectivité cationique (H^+/Na^+) différente malgré une sensibilité identique à la Pz. En plus, Vayro et Simmons (1996) ont démontré une sensibilité aux H^+ du transport de Glc Pz-sensible dans les VMBB issues du cortex externe du rein de rat. On admettant que la voie LAG est la seule à être présente dans le cortex externe il faut conclure à la sensibilité de LAG au H^+ . En démontrant que le transport de Glc H^+ -dépendant est stimulé par l'acidité du milieu externe indépendamment de la présence du gradient de pH et le caractère non-accumulatif de ce transport les auteurs ont conclu que les H^+ induisent des modifications allostériques du système de transport LAG. Cette conclusion est donc en accord avec le modèle allostérique qui prévoit que la voie LAG est induite grâce à la coopérativité négative entre les sous-unités. L'effet allostérique des H^+ permettrait également expliquer la faible précision des paramètres cinétiques de la voie LAG.

Il n'en reste pas moins que les observations cliniques relatives à la malabsorption intestinale du Glc et du Gal et à la glycosurie rénale suggèrent l'existence dans le rein d'un second transporteur de Glc Na^+ -dépendant puisque la disparition du transport intestinal n'est accompagnée que d'une glycosurie partielle (Scriver et al., 1976).

Une glycosurie massive (près de 900 fois par rapport au contrôle) a été démontrée chez les souris homozygotes déficientes en HNF1 (Pontoglio et al., 1996) et présentant le syndrome

de Fanconi caractérisé par un dysfonctionnement général dans le TCP (Bergeron et al., 1995). Ce résultat indique que la réabsorption du Glc est restreinte au TCP. Pontoglio et al., (1996) démontrent qu'une telle glycosurie chez les souris déficientes en HNF1 est accompagnée par la réduction de 2 fois du nombre de sites de liaison pour la Pz. Les études comparatives des cinétiques du transport de Glc et de la liaison de Pz dans les VMBB issues du rein des souris normales et déficientes en HNF1 seront susceptibles d'apporter les nouvelles réponses à l'effet de l'hypothèse de deux transporteurs distincts.

En conclusion, nous apportons la preuve expérimentale que l'expression fonctionnelle de SGLT1 dans l'intestin est différente de la voie HAG rénale, ce qui est dû probablement à des modifications post-transcriptionnelles différentes dans ces deux tissus, et que les voies HAG et LAG semble d'être affectées par le pH de façon similaire.

II.5. Études d'inhibition par la phlorizine

L'originalité de notre étude sur l'inhibition du transport par la Pz réside dans son analyse simultanée sur HAG et LAG dans une même préparation de BBMV (Chapitre 2, Figure 4.). Nous confirmons un mécanisme d'inhibition compétitive du transport de Glc par la Pz quelle que soit la voie de transport (Chapitre 2, Figure 5.). Par contre nous démontrons pour la première fois que le pouvoir inhibiteur de la Pz est absolument équivalent pour les voies HAG et LAG (Chapitre 2, Figure 6.). En apparence, ce dernier résultat semble contredire les observations de Turner et Moran (1982a,c) qui les ont amenés à conclure que la Pz inhibe mieux le transport dans les VMBB du cortex externe (LAG) que de la médulla externe (HAG). Toutefois, cette conclusion est basée sur: i) la présence du site LAP exclusivement dans les VMBB de la médulla externe et ii) les différents K_i d'inhibition du transport de Glc par la Pz estimés dans les conditions d'échange de 1 mM de Glc à l'équilibre, ce qui contraste avec des K_i d'inhibition de la liaison de Pz par le Glc identiques dans les deux populations de VMBB. En plus, dans leurs études plus récentes sur cellules LLC-PK₁ (Moran et al., 1988) qui, apparemment, n'expriment que SGLT1 (Ohta et al., 1990), le K_d de liaison de la Pz est similaire à celui déterminé dans les VMBB du cortex externe (1982c). Il faut souligner que dans des conditions de gradient de Na⁺ mais à une seule concentration de Glc, les K_i pour le transport dans les deux populations de vésicules

(Turner et Moran, 1982c) sont comparables aux valeurs déterminées dans notre étude (Chapitre 2, Figure 6.). Il faut noter que des K_i identiques ont été observés dans les deux populations de VMBB de chien (Silverman et Speight, 1993).

En comparant les valeurs de K_i déterminées dans nos études (15-16 μM) avec celles estimées pour rSGLT1 intestinal (5-30 μM) (Toggenburger et al., 1982) ou cloné (5-15 μM) (Wright, 1993), on peut constater qu'ils sont inclus dans le même ordre de grandeur. Par contre, nos valeurs de K_i sont différentes de celles observées pour SAAT1-pSGLT2 (37 μM en absence de potentiel membranaire) (Mackenzie et al., 1994) et pour Hu14-hSGLT2 (0.4 μM) (Kanai et al., 1994). Ainsi, nous pouvons conclure qu'en dépit de la présence de deux voies de transport de Glc présentant des affinités apparentes différentes, l'inhibiteur spécifique qu'est la Pz affecte les voies HAG et LAG avec un pouvoir identique et des valeurs de K_i comparables au K_i mesuré pour SGLT1. L'homogénéité du phénomène d'inhibition reste compatible avec le modèle allostérique (Chenu et Berteloot, 1993) en admettant que la structure moléculaire détermine le type de changement conformationnel qui affecte le degré de la coopérativité entre les sous-unités. Dans le cas de la Pz, sa liaison conduirait à une perte de cette coopérativité.

III HOMOGENÉITÉ DE LA LIAISON HAP DANS LES VMBB RÉNALES

III.1. Hétérogénéité de la liaison de Pz dans le rein

En comparant nos valeurs d'inhibition du transport de Glc par la Pz (K_i) avec celles de K_d pour la liaison de Pz telles que déterminées dans les VMBB rénales de lapin (Turner et Moran, 1982c) ou de chien (Turner et Silverman, 1981) et dans les cellules LLC-PK₁ (Moran et al., 1988), nous avons constaté qu'elles sont environ 10 fois plus grandes. De plus, malgré l'hétérogénéité du transport de Glc, l'inhibition par la Pz est très homogène. Cette différence pourrait être due aux conditions expérimentales dans lesquelles s'effectuent ces mesures puisque les K_i sont déterminés en conditions de vitesse initiale tandis que les K_d sont estimés en condition d'équilibre (Chesney et al., 1974; Glossman et Neville, 1972).

Si on suppose que les conditions expérimentales influent sur la mesure des constantes de dissociation, il devient primordial de déterminer les facteurs responsables d'un tel phénomène.

On pourrait ainsi suggérer que le transporteur existe sous des états conformationnels différents dans ces deux conditions expérimentales ou que les valeurs différentes des K_d sont la conséquence d'un mécanisme cinétique particulier. Par exemple, Toggenburger et al., (1982) ont démontré une diminution des K_i de plus de 6 fois lorsqu'elles ont été déterminées dans un intervalle de moins de 2 sec de la réaction d'inhibition sur VMBB intestinales de lapin. Puisque les conditions de gradient de Na^+ et de substrat ne sont pas changées de façon importante pendant cet intervalle de temps, ce résultat semble favoriser la seconde alternative qu'il s'agit d'un mécanisme particulier.

Afin d'assurer une interprétation correcte des études de la liaison de Pz, il est nécessaire de choisir des conditions expérimentales appropriées. Premièrement, de nombreuses études témoignent de la présence de sites à haute et faible affinité pour la liaison de Pz (HAP et LAP) dans les BBMV intestinales et rénales (Alvarado, 1967; Bode et al., 1972; Chesney et al., 1974; Diedrich, 1966; Glossman et Neville, 1972; Silverman et Black, 1975). Deuxièmement, la Pz est un acide faible de pK_a 7.2 (Evans et al., 1980; Toggenburger et al., 1978), ce qui implique que la molécule est présente sous formes neutre (HPz) et chargée négativement (Pz) à pH physiologique. Puisque la plupart des études précédentes ont été faites à pH physiologique, on pourrait supposer que la coexistence de deux formes différentes de Pz puisse contribuer à l'hétérogénéité du phénomène de liaison.

En estimant un pK_a de 7.3 pour la Pz (Chapitre 3, Figure 1B.), nous avons déterminé les conditions de pH auxquelles chacune des formes serait présente à 95%. Toutes les études sur le mécanisme de liaison de Pz ont donc été effectuées à pH 6.0 et 8.6.

III.1.a) effet du pH sur LAP

En analysant la liaison de Pz à l'équilibre, nous confirmons les études précédentes (Alvarado, 1967; Bode et al., 1972; Chesney et al., 1974; Diedrich, 1966; Glossman et Neville, 1972; Silverman et Black, 1975; Turner et Moran, 1982a,c) qui démontraient la présence de deux classes de sites de liaison HAP et LAP (Chapitre 3, Tableau 2.). L'originalité de notre étude réside toutefois dans la démonstration que les sites HAP et LAP coexistent seulement à pH 6.0.

Nous confirmons également les caractéristiques cinétiques du site LAP (Chapitre 3, Tableau 2.) démontré être Na^+ -indépendant et Glc-insensible (Bode et al., 1972; Chesney et al.,

1974; Glossman et Neville, 1972). Nous ajoutons la preuve expérimentale que la mise en évidence de ce site dépend du pH et est donc reliée soit à l'état d'ionisation de la Pz, soit à la protonation du site LAP lui-même. La nature de ce site reste inconnue mais, en raison de son indépendance vis-a-vis du Na⁺ et du Glc (Chapitre 3, Tableau 2.), notre attention a été focalisée sur le site HAP appartenant de toute évidence au transporteur de Glc Na⁺-dépendant.

III.1.b) effet du pH sur HAP

Nous démontrons que les deux formes de Pz se lient sur le transporteur de Glc Na⁺-dépendant, quoiqu'avec des affinités différentes (Chapitre 3, Tableau 1. et 3.), et ce contrairement à la conclusion de Toggenburger et al. (1978) à l'effet que seule la forme acide de Pz (HPz) se lie au transporteur SGLT1 dans les VMBB intestinales de lapin. Toutefois, les mêmes auteurs démontrent qu'avec une alcalinisation du milieu, le K_i d'inhibition du transport par la Pz ainsi que le K_d de liaison augmentent. Notre démonstration que les deux formes de Pz se lient sur un nombre similaire de sites de transport est en accord avec des études antérieures qui démontrent, d'une part, que la position 4' dans l'anneau phénolique A de l'aglucone de la Pz n'est pas critique pour la liaison (Diedrich, 1963) et, d'autre part, que les spectres d'absorption des dérivés 4'-déoxyphlorizine et *para*-phlorizine (4'-glucoside de Pz) ne montrent pas de changements conformationnels en fonction du pH.

III.1.c) implications pour la modélisation cinétique

Nos observations sur la dépendance en pH des K_d de liaison de la Pz sont compatibles avec les résultats rapportant une diminution du K_i d'inhibition du transport de Glc dans les VMBB de lapin (Toggenburger et al., 1978) ou d'intestin de crapaud (Hoshi et al., 1986) et du K_d de liaison de la Pz (Toggenburger et al., 1978) lors de l'acidification du milieu. Ce changement de K_d de liaison de la Pz en fonction du pH peut être dû à l'une des deux causes suivantes: i) le site de liaison présente une conformation plus favorable à la forme neutre (HPz) qu'à la forme ionisée (Pz); ii) la liaison de la partie aglucone de la Pz est plus favorable lorsque le site correspondant sur le transporteur est lui-même protoné. La première hypothèse semble être en contradiction avec les observations à l'effet que le transport H⁺-dépendant de Glc se produit avec une affinité moindre qu'en présence de Na⁺ (Hirayama et al., 1994), de même qu'en présence simultanée de gradients de Na⁺ et de H⁺ (Chapitre 5, Figure 1A.). Puisque nous avons

observé le même phénomène pour la liaison H^+ -dépendante *versus* Na^+ -dépendante de la forme HPz (Chapitre 3, Tableaux 2 et 3.), nous proposons donc que la formation du complexe transporteur- H^+ est moins favorable au substrat que celle du complexe transporteur- Na^+ . Ceci est compatible avec la liaison ordonnée des substrats lorsque l'ion activateur Na^+ se lie en premier. Nous confirmons cette conclusion par la démonstration d'une absence de liaison de la forme Pz en absence complète de Na^+ .

La seconde hypothèse est en accord avec les études antérieures suggérant une liaison de Pz par deux points d'attachement (Chapitre 1, Figure 6.) (Alvarado, 1967; Diedrich, 1966, 1968), l'un des H^+ du site pour l'aglucone formant un pont hydrogène lors de la liaison (Diedrich, 1963). Par conséquent, la déprotonation de ce site à pH basique serait en mesure d'affecter l'amarrage de la Pz par sa partie aglucone et ainsi déstabiliser la liaison.

Ainsi, nous pouvons conclure qu'en dépit de la présence de deux voies de transport du Glc, une seule classe de sites Na^+ -dépendants de liaison de Pz (HAP) est observée à l'équilibre, ce qui est compatible avec les K_i identiques déterminés pour les deux voies de transport.

III.2. Mécanisme de liaison de la Pz

III.2.a) caractéristiques principales

La liaison de Pz dans le rein est un processus lent (Chesney et al., 1974; Glossman et Neville, 1972) contrairement au "turnover" du transporteur de Glc lors du transport (Kimmich, 1990; Parent et Wright, 1993). D'autre part, la différence entre le K_i d'inhibition de transport du Glc par la Pz et le K_d de liaison de la Pz à l'équilibre suggère un mécanisme plus complexe que celui d'une liaison en une seule étape (Chapitre 4, schémas 1 et 2, Figure 2.). De plus, la constante de dissociation de la Pz correspondant aux vitesses initiales (K_{di} ou K_m^{Pz}) est environ 6 fois plus grande (10-30 μM) que le K_d mesuré à l'équilibre ($K_{de} = 2-5 \mu M$) (Tableaux 3 et 5). Par contre, elle est similaire au K_i d'inhibition du transport de Glc (15-16 μM). Toutefois, le fait que les constantes K_{di} et K_i soient plus petites que le K_m du transport de Glc suggère un attachement de la Pz en deux points (Alvarado, 1967; Diedrich, 1966, 1968) dès le début de la réaction (Chapitre 1, Figure 6.). Dans ces conditions, la réorientation du transporteur vers l'espace intravésiculaire pourrait être amorcée sans pourtant être achevée à cause de la rigidité imposée

par la Pz liée en deux points. À l'opposé de la Pz, si le Glc et la Pt se lient simultanément, l'absence de rigidité permettra une réorientation complète et donc le transport du Glc. Dans ces conditions, la Pt inhiberait le transport de façon non compétitive, ce qui a été démontré par Alvarado (1967).

L'effet stabilisateur de la liaison de la moitié aglucone de la Pz pourrait expliquer la baisse du K_i et du K_{di} par rapport au K_m de transport du Glc. Cependant, puisque le K_{de} est encore plus petit (Chapitre 4, Tableau 3.) que le K_{di} , ceci indique la présence d'une étape consécutive à la liaison de Pz (Chapitre 4, schéma 3, Figure 2.) conduisant à une plus grande rétention de l'inhibiteur (occlusion de la Pz).

III.2.b) implications de l'étape d'isomérisation lente

III.2.b.1) implications pour la caractérisation cinétique

En considérant la présence de l'étape d'isomérisation lente conduisant à une forme occluse (Chapitre 4, schéma 3, Figure 2.), de nouvelles implications cinétiques apparaissent. Par exemple, les paramètres B_{maxe} et K_{de} ne correspondent ni au nombre de sites (N_T) à l'équilibre, ni à l'affinité réelle de liaison sur le site puisque leurs expressions algébriques incluent les micro-constantes k_{on} et k_{off} caractérisant l'étape d'isomérisation lente (Chapitre 4, Tableau 2.). Par conséquent, seul K_{di} peut être considéré comme une vraie constante de dissociation. Ainsi, B_{maxe} , K_{de} et B_{maxi} doivent être considérés comme des constantes cinétiques au même titre que les V_{max} et K_m du transport. Il serait donc possible d'expliquer les variations d'un paramètre comme B_{maxi} , généralement attribuées à un changement du nombre de sites de liaison, par le potentiel membranaire ou le gradient de Na^+ en conditions initiales (Lever et al., 1984; Toggenburger et al., 1978). D'autre part, l'hétérogénéité apparente du phénomène de liaison entre les conditions initiales et d'équilibre peut être résolue par l'analyse des constantes de temps (k_{obs} incluant les k_{on} et k_{off}) pour lesquelles l'équilibre est atteint. Puisque la dépendance des constantes de temps en fonction de la concentration de Pz est de type michaélien (Chapitre 4, Figures 3 et 5.), cette analyse confirme l'homogénéité de la liaison de Pz dans le temps et souligne que la différence entre les paramètres cinétiques estimés dans les deux conditions expérimentales (initiale et à l'équilibre) reflète le changement conformationnel de sites de liaison appartenant à une même

classe. Ainsi, pour la première fois nous proposons une explication pour un phénomène qui jusqu'à présent a été ignoré par tous ceux qui ont étudié la liaison de la Pz et donc demeuré sans réponse, à savoir la différence entre une inhibition instantanée du transport de Glc par la Pz et une liaison lente de la Pz avec un équilibre atteint après plusieurs minutes.

III.2.b.2) implications pour la modélisation cinétique

En considérant la présence de l'étape d'isomérisation lente, il est possible d'expliquer la lenteur des cinétiques de relâchement de la Pz, considérablement accélérées cependant en absence de Na^+ dans la solution d'arrêt. On pourrait prévoir, en accord avec l'inhibition instantanée du transport de Glc ou de la liaison de la Pz (Chapitre 3, Figure 2.) qu'en absence de forme occluse, une concentration saturante de Pz ou de Glc devrait déplacer le traceur instantanément, contrairement à ce qui est observé (Chapitre 4, Figure 6.). Le fait que l'absence de Na^+ dans la solution d'arrêt permet d'accélérer la déocclusion du site de liaison de Pz indique qu'un ion Na^+ se lie postérieurement à l'étape d'isomérisation lente. Par conséquent, il serait justifiable d'inclure la forme occluse dans un cycle plus complexe, selon le concept de demi-réactivité des sites introduit précédemment par Chenu et Berteloot (1993), au lieu de considérer l'occlusion comme une étape finale et sans issue (Chapitre 4, schéma 3, Figure 2.). En faveur de ce concept, on peut évoquer les considérations suivantes: l'accélération du relâchement de la Pz dans les conditions où le Na^+ est absent a été observée dans des études antérieures (Aronson, 1978; Restrepo et Kimmich, 1986; Toggenburger et al., 1982; Turner et Silverman, 1981), ce qui a conduit Bennett et Kimmich (1992) à proposer un modèle de liaison ordonnée $\text{Na}^+ : \text{Pz} : \text{Na}^+$ tout à fait compatible avec les observations d'Aronson (1978). En accord avec ce modèle, nos résultats permettent de préciser que le second Na^+ impliqué dans l'accélération du relâchement de Pz doit se lier sur un site Na^+ situé à l'extérieur du site occlus, puisque accessible, tandis que le premier Na^+ précède la liaison et donc l'occlusion de la Pz.

Considérant la présence de sites uniques, un pour le Na^+ et l'autre pour le Glc par chaîne polypeptidique de SGLT1 (Peerce et Wright, 1985, 1986), nous suggérons donc que le transporteur de Glc Na^+ -dépendant est au minimum un dimère fonctionnel. Selon le concept de demi-réactivité des sites, la liaison de Na^+ et de Pz induirait un changement conformationnel similaire à celui induit par le Glc et conduirait à: i) une occlusion de Na^+ et de Pz et, ii) une

réorientation simultanée vers l'extérieur des sites Na^+ et Glc, précédemment orientés vers l'intérieur. La liaison de Na^+ et Pz sur ces nouveaux sites aurait alors un effet stabilisateur sur cette nouvelle conformation ou permettrait un échange lent Pz-Pz entre les deux type de sites.

Ainsi, nous pouvons conclure que la liaison de Pz Na^+ -dépendante (HAP) est un phénomène homogène dans les VMBB rénales, le Na^+ et le H^+ étant susceptibles d'activer la liaison du substrat, propriété démontrée pour le SGLT1 (Hirayama et al., 1994). Les résultats sur la liaison ou le relâchement de Pz peuvent être expliqués en impliquant un minimum de deux sites pour le Na^+ , ce qui est compatible avec la structure dimérique du transporteur. Considérant l'existence de l'étape d'isomérisation lente, le modèle allostérique avec demi-réactivité des sites est le plus compatible avec l'ensemble des résultats. Une observation corollaire suite à des études de dissociation de la Pz met en relief le fait que la technique de filtration rapide "classique" ne permet de mesurer que la forme occluse de Pz.

IV CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

IV.1. Conclusions

L'hypothèse selon laquelle l'hétérogénéité cinétique du cotransport Na^+ -D-glucose rénal repose sur le fonctionnement de deux transporteurs distincts disposés en série le long du tubule contourné proximal est basée sur des études antérieures (Turner et Moran, 1982a,b,c). Cependant, cette hypothèse ne tient pas compte de complexités supplémentaires apparues au cours des dernières années qui suggèrent une nature tant homooligomérique de la protéine SGLT1 fonctionnelle qu'hétérooligomérique par association probable avec des protéines régulatrices dont la protéine RS1 pourrait représenter le premier membre d'une nouvelle famille de protéines. Notre réévaluation des cinétiques du transport de Glc et de la liaison de Pz dans les VMBB rénales de lapin a visé essentiellement à tester si l'hétérogénéité cinétique observée est plus compatible avec la présence de deux transporteurs indépendants (SGLT1 et SGLT2) ou à des modes fonctionnels différents d'un système unique plus complexe (SGLT1 oligomérique). Pris

dans leur ensemble, nos résultats sur VMBB rénales mettent en évidence des phénomènes difficilement compatibles avec l'hypothèse de deux transporteurs distincts.

1). Deux transporteurs différents versus deux modes de fonctionnement d'un transporteur unique:

i) le transport du Glc par les deux voies HAG et LAG est inhibé de façon compétitive par la Pz avec des K_i identiques, contrairement aux systèmes SGLT1 (Wright, 1993) et SGLT2 (Kanai et al., 1994; Mackenzie et al., 1994; You et al., 1995) clonés qui démontrent des affinités différentes pour l'inhibiteur.

ii) en absence de transport, une seule classe de sites Na^+ -dépendants et Glc-sensibles est mise en évidence lors d'études de la liaison de Pz et ce, en conditions d'équilibre ou de vitesses initiales.

iii) les deux voies de transport HAG et LAG démontrent également une dépendance en température et en pH similaire, ce qui suggère un lien fonctionnel étroit entre les deux voies d'absorption.

iv) la compatibilité entre les valeurs de K_i et de K_{di} d'une part, et la différence entre K_{di} et K_{de} d'autre part, suggèrent un mécanisme particulier de liaison pour lequel nous proposons un modèle de liaison en deux étapes où la liaison rapide de Pz est suivie par une isomérisation lente du transporteur conduisant à l'occlusion de la Pz. Ce phénomène peut donc être vue comme un cotransport de Pz Na^+ -dépendant avec une translocation inachevée du substrat vers le milieu intravésiculaire. La vitesse à laquelle l'équilibre de liaison est atteint (étape d'isomérisation) démontre une dépendance michaélienne en fonction de la concentration de la Pz en dépit des vitesses de cotransport par des voies HAG et LAG différentes de plus de 15 fois.

2). SGLT1 versus HAG rénale:

i) le K_m de transport par la voie HAG rénale est plus petit que celui estimé pour rSGLT1 intestinal et les variations de K_m en fonction du pH, tant en conditions d'équilibre que de gradient de H^+ , sont également très différents dans les deux tissus

ii) la similitude entre les paramètres cinétiques de SGLT1 intestinal et SGLT1 exprimé dans les ovocytes de *Xenopus* exclut la différence dans la composition lipidique membranaire autant qu'un facteur déterminant

Ces résultats suggèrent fortement la possibilité d'une expression différentielle de la même protéine SGLT1 dans le rein et l'intestin. La voie HAG n'est donc pas une expression exclusive de SGLT1.

3). SGLT2 versus LAG rénale.

Le Gal est transporté via les deux voies de transport HAG et LAG avec des V_{max} identiques à ceux du transport de Glc; ces résultats démontrent que les deux substrats partagent les deux voies de transport, contrairement à la conclusion que le Gal n'est pratiquement pas transporté par SGLT2 (Kanai et al., 1994; Mackenzie et al., 1994; You et al., 1995). La voie LAG n'est donc pas une expression exclusive de SGLT2.

4). Compatibilité avec une structure dimérique du cotransporteur.

Nos observations de la dissociation lente de la Pz en conditions de concentration saturante de Pz ou de Glc, mais accélérée par l'absence de Na^+ dans la solution d'arrêt, suggèrent l'implication d'un second ion Na^+ à une étape postérieure à l'occlusion d'une molécule de Pz. Ce résultat est donc compatible avec une structure dimérique du cotransporteur dans laquelle deux classes de sites fonctionnent en opposition de phase selon le modèle allostérique à demi-réactivité des sites (Chenu et Berteloot, 1993).

Ainsi, l'ensemble de nos résultats suggère que l'hétérogénéité observée pour le transport du Glc dans les VMBB du cortex rénal de lapin est de nature purement cinétique et par conséquent, qu'elle ne reflète pas la diversité moléculaire, attendue de la présence des systèmes SGLT1 et SGLT2. Nos résultats, tant sur le transport du Glc et son inhibition par la Pz que sur la liaison de Pz elle-même, sont entièrement compatibles avec le modèle allostérique à demi-réactivité des sites.

Il faut admettre que cette conclusion est basée sur les études de transport de Glc dans les vésicules de MBB. Ce modèle expérimental est loin de reproduire la situation *in vivo* pour extrapoler ces conclusions à des observations cliniques de la réabsorption rénale chez les patients atteints de syndrome de malabsorption de Glc et de Gal. Malheureusement, à l'heure actuelle on ne dispose pas suffisamment d'information sur le fonctionnement et la localisation de pSGLT2 dans le rein. Toutefois, certaines hypothèses peuvent être proposées.

SGLT2(p) a été cloné à partir d'ARNm des cellules LLC-PK₁ où seul SGLT1 s'exprime au niveau de MBB. On peut argumenter que la quantité d'ARNm ou le taux d'expression de SGLT2 à la membrane est faible et par conséquent sa contribution au transport serait insuffisante pour être détectée expérimentalement. La même situation se produit, probablement, dans les ovocytes de *Xenopus* puisque la stimulation du transport de Glc suite à l'injection d'ARNm-pSGLT2 est seulement équivalente à celle observée pour SGLT1. Cependant, puisqu'il devrait s'agir du transporteur à haute capacité on s'attendrait à une stimulation plus forte, à moins que le taux d'expression d'ARNm-pSGLT2 dans un ovocyte soit très faible. On peut également s'interroger sur le taux d'expression d'ARNm-pSGLT2 *in vivo* et sa localisation dans les tissus. Ainsi, il est possible que SGLT2 seul ne soit pas en mesure d'assurer le cotransport de Glc de haute capacité, ce qu'on peut déduire de son expression dans des ovocytes. Par contre, la formation des différents complexes oligomériques (SGLT1/SGLT1) ou hétéromériques (SGLT1/SGLT2 et/ou RS1) serait susceptible d'augmenter ou de moduler la capacité du transport de Glc dans le PCT. Chez les patients atteints de syndrome de malabsorption de Glc et de Gal la poursuite de la réabsorption rénale de Glc pourrait être assurée par l'association de SGLT1 muté avec RS1 ou SGLT2 en rétablissant ainsi l'activité du cotransport.

Il faut souligner que le modèle allostérique de cotransport Na⁺-dépendant de Glc est compatible avec l'hétérogénéité de la réabsorption de Glc le long du TCP en admettant que les associations de SGLT1 avec d'autres molécules ne soient pas les mêmes dans le *pars convoluta* et le *pars recta*. Ce modèle n'exclut pas, non plus, l'existence d'une hétérogénéité moléculaire des transporteurs SGLT dans le néphron. Il favorise plutôt un concept du fonctionnement d'un système moléculaire complexe où l'unité principale de base serait SGLT1 dont l'expression fonctionnelle doit être prédominante pour rester compatible avec les caractéristiques cinétiques observées pour les voies HAG et LAG et les cinétiques michaéliennes de la liaison de Pz. En attendant une information supplémentaire sur la caractérisation fonctionnelle de SGLT2 et sa localisation tissulaire nous proposons un modèle de cotransport Na⁺-dépendant par un complexe allostérique en accord avec les données expérimentales. La structure de base de ce complexe représente un homo- ou hétérodimère dont les sous-unités fonctionnent en opposition de phase (Chenu et Berteloot, 1993) (Fig.19).

Modèle allostérique

255

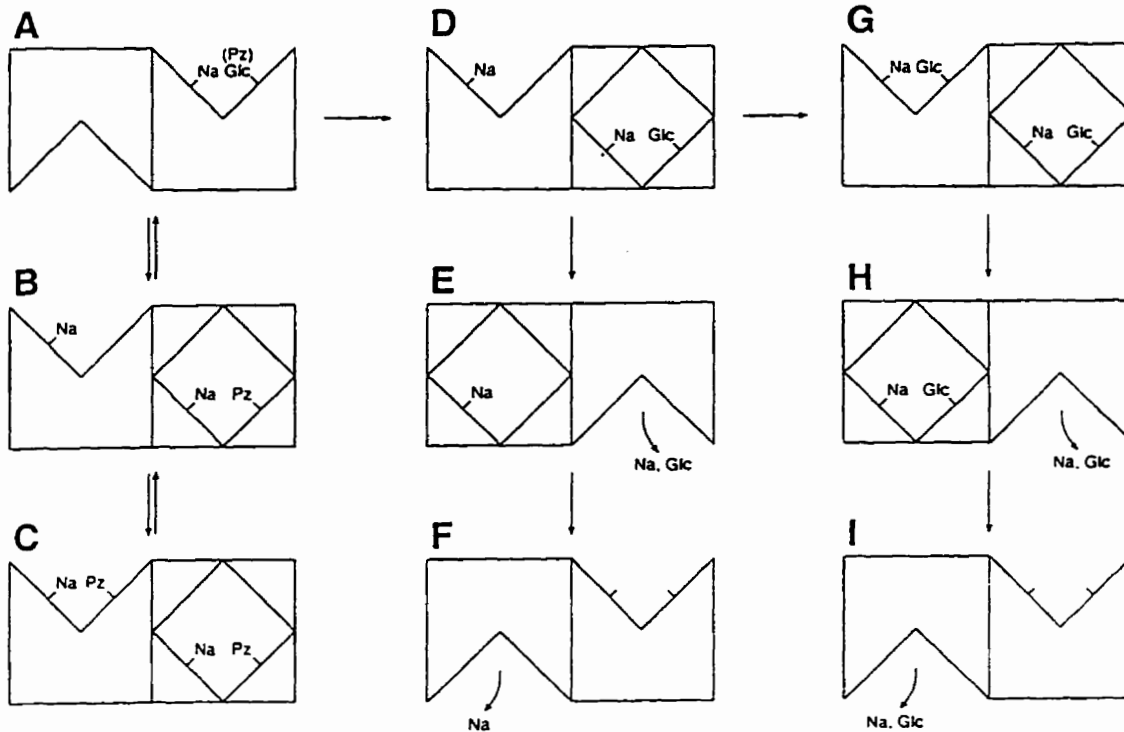


Figure 19. Modèle allostérique de cotransport Na^+ -D-glucose dans le rein. Le système de cotransport représente un homo- ou hétérodimère dont les sous-unités fonctionnent en opposition de phase. (A) Une des sous-unités est orientée vers l'extérieur en permettant à une molécule de Na^+ puis de substrat (Glc, Pz) de se lier sur leur sites respectifs; (B) et (D) La liaison du substrat est suivie par une isomérisation conduisant à une occlusion du substrat et du Na^+ . Cette isomérisation est accompagnée par une réorientation de l'intérieur vers l'extérieur de la sous-unité voisine. Une seconde molécule de Na^+ peut alors se fixer; (B) La liaison de second Na^+ induirait une stabilisation de la nouvelle conformation imposée par la rigidité de la molécule de Pz; (E) En absence de telle rigidité la translocation de Na^+ et de Glc est achevée accompagnée par l'occlusion de second Na^+ ; (F) Le départ de Na^+ et de Glc du côté interne induirait la dissociation et la libération interne de second Na^+ . Ce départ sera suivie par une réorientation de la première sous-unité vers l'extérieur. La stoechiométrie du transport via cette voie est de $2\text{Na}^+ : 1\text{Glc}$; (G) et (C) Si la concentration de substrat est élevée ou s'il existe une possibilité d'hétéroassociation de SGLT1 avec d'autres protéines membranaires, la seconde molécule de Pz (C) ou de Glc (G) pourrait se fixer après le second Na^+ ; (H) et (I) Ces deux étapes sont similaires aux (E) et (F). La stoechiométrie du cotransport via cette voie est de $2\text{Na}^+ : 2\text{Glc}$. Une faible affinité pour le substrat pourrait être induite soit grâce à la coopérativité négative entre les sous-unités, soit par une hétéroassociation de SGLT1 avec d'autres protéines membranaires.

IV.2. Perspectives

Afin de valider le modèle allostérique il faudrait compléter nos résultats actuels par des études comparatives des propriétés cinétiques du transport de Glc et de la liaison de Pz dans les VMBB rénales et intestinales, ces dernières pouvant être considérées comme un contrôle interne quant au comportement attendu de SGLT1. Cependant, pour assurer les études fiables sur la liaison de la Pz dans l'intestin en raison de la présence de la Pz-hydrolase il faudrait synthétiser les analogues de la Pz reconnus exclusivement soit par la Pz-hydrolase comme *para*-Pz (Evans et al., 1980) soit, par le transporteur lui-même.

Considérant le modèle à demi-réactivité des sites, il est clair que la technique de filtration rapide "classique" ne permet de mesurer que la forme occluse de Pz liée au site Glc du transporteur. Dans ce cas, l'incubation des vésicules en présence de la Pz et de radiotracteur directement dans les puits suivie d'une simple filtration au temps déterminé afin d'éviter les lavages consécutifs à la liaison de la Pz permettrait de mettre en évidence et de caractériser les sites Glc accessibles à la surface, si tel est le cas.

Selon nos études, un minimum d'un ion Na^+ est impliqué lors de la liaison de Pz et au moins un autre ion Na^+ intervient postérieurement à l'occlusion de Pz en accord avec le modèle proposé par Bennett et Kimmich (1992, 1996). Cependant, l'emplacement et le rôle du second site Na^+ sont différents dans notre modèle. Pour valider ce dernier, il devient donc nécessaire de déterminer la dépendance en Na^+ de la liaison de Pz et la stoechiométrie du couplage. Bien entendu, ces études devraient se faire à pH 8.6 avec estimation des paramètres cinétiques (B_{max} , B_{maxe} , K_{di} , K_{de} , k_{on} et k_{off}) en condition de gradient et d'équilibre de Na^+ , en présence et en absence de potentiel membranaire. Cette analyse complète permettra de vérifier si la vitesse d'isomérisation dépend de ces paramètres.

Les expériences proposées ci-dessus visent directement à valider le modèle de demi-réactivité des sites par les études cinétiques. D'autres approches combinant biologie moléculaire et expression dans les ovocytes de *Xenopus* sont susceptibles d'apporter des solutions quant à la validité du modèle allostérique. Par exemple, en injectant dans l'ovocyte les formes sauvage et mutée de SGLT1 dont la dernière est inactive, il serait possible de moduler le transport par perturbation des associations naturelles entre sous-unités. Enfin, les animaux transgéniques déficients en SGLT1 ou SGLT2 ou en SGLT1/SGLT2 ensemble peuvent fournir une réponse sans

ambiguïté sur le rôle de SGLT1 et SGLT2 dans l'hétérogénéité du cotransport de Glc dans le rein.

RÉFÉRENCES

- Alvarado, F.** (1967). *Hypothesis for the interaction of the phlorizin and phloretin with membrane carriers for sugars.* Biochim. Biophys. Acta 135, 483-495
- Amsler, K., Cook, J.S.** (1982). *Developmental Na⁺-dependent hexose transport in a cultured cell line of porcine kidney cells.* Am. J. Physiol. 242, C94-C101
- Aronson, P.** (1978). *Energy-dependence of phlorizin binding to isolated renal microvillus membranes.* J. Membrane Biol. 42, 81-98
- Barfuss, D.W., Schafer, J.** (1981). *Differences in active and passive glucose transport along the proximal néphron.* Am. J. Physiol. 240, F322-F332
- Beck, J.C., Sacktor, B.** (1975). *Energetics of the Na⁺-dependent transport of D-glucose in renal brush border membrane vesicles.* J. Biol. Chem. 250, 8674-8680
- Beliveau, R.** (1987). *Vésicules membranaires purifiées: un outil d'étude de la réabsorption rénale.* Med. Sci. 3, 589-598
- Beliveau, R., Demeule, M., Ibnoul, K.H., Bergeron, M., Beauregard, G., Potier, M.** (1988). *Radiation-inactivation studies on brush-border-membrane vesicles. General considerations and application to the glucose and phosphate carriers.* Biochem. J. 252, 807-813
- Bell, C.L., Tenenhouse, H.S., Scriver, C.R.** (1988). *Initiation and characterization of primary mouse kidney epithelial cultures.* In Vitro Cell. Dev. Biol. 24, 683-695
- Bennett, E., Kimmich, G.A.** (1992). *Na⁺ binding to the Na⁺-glucose cotransporter is potential dependent.* Am. J. Physiol. 262, C510-C516
- Bennett, E., Kimmich, G.A.** (1996). *The molecular mechanism and potential dependence of the Na⁺/Glucose cotransporter.* Biophys. J. 70, 1676-1688
- Berger, S., Sacktor, B.** (1970). *Isolation and biochemical characterization of brush borders from rabbit kidney.* J. Cell Biol. 47, 637-645
- Bergeron, M., Gougoux, A., Vinay, P.** (1995). *The renal Fanconi syndrome.* In: The Metabolic Basis of Inherited Diseases, edited by C.R. Scriver. New York: McGraw-Hill, pp. 3691-3704
- Berteloot, A.** (1986). *Highly permeant anions and glucose uptake as an alternative for quantitative generation and estimation of membrane potential differences in brush-border membrane vesicles.* Biochim. Biophys. Acta 857, 180-188

- Berteloot, A., Chenu, C., Malo, C. (1992).** *Mécanismes moléculaires de cotransport: aspects cinétiques et physiologiques.* Méd. Sci. 3-7
- Berteloot, A., Malo, C., Breton, S., Brunette, M. (1991).** *A fast sampling, rapid filtration apparatus: principal characteristics and validation from studies of D-glucose transport in human jejunal brush-border membrane vesicles.* J. Membrane Biol. 122, 111-125
- Berteloot, A., Semenza, G. (1990).** *Advantages and limitations of vesicles for characterisation and the kinetic analysis of transport systems.* Meth. Enzymol. 192, 409-437
- Birnir, B., Lee, H.-S., Hediger, M.A., Wright, E.M. (1990).** *Expression and characterization of the intestinal Na⁺/glucose cotransporter in COS-7 cells.* Biochim. Biophys. Acta 1048, 100-104
- Blank, M.E., Bode, F., Baumann, K., Diedrich, D.F. (1989).** *Computer analysis reveals changes in renal Na⁺-glucose cotransporter in diabetic rats.* Am. J. Physiol. 257, C385-C396
- Blank, M.E., Bode, F., Huland, E., Diedrich, D.F., Baumann, K. (1985).** *Kinetic studies of D-glucose transport in renal brush-border membrane vesicles of streptozotocin-induced diabetic rats.* Biochim. Biophys. Acta 844, 314-319
- Bode, F., Baumann, K., Diedrich, D.F. (1972).** *Inhibition of [³H]phlorizin binding to isolated kidney brush border membranes by phlorizin-like compounds.* Biochim. Biophys. Acta 290, 134-149
- Brasitus, T.A., Schachter, D., and Mamouneas, T.G. (1979).** *Functional interactions of lipids and proteins in rat intestinal microvillus membranes.* Biochemistry 18: 4136-4144
- Brazy, P.C., Dennis, V.W. (1978).** *Characteristics of glucose-phlorizin interactions in isolated proximal tubules.* Am. J. Physiol. 234, F279-F286
- Brot-Laroche, E., Serrano, M., Delhomme, B., Alvarado, F. (1986).** *Temperature sensitivity substrate specificity of two distinct Na⁺-activated D-glucose transport systems in guinea pig jejunal brush border membrane vesicles.* J. Biol. Chem. 261, 6168-6176
- Burant, C.F., Flink, S., Depaoli, A.M., Chen, J., Lee, W.-S., Hediger, M.A., Buse, J.B., Chang, E.B. (1994).** *Small intestine hexose transport in experimental diabetes: increased transporter mRNA and protein expression in enterocytes.* J. Clin. Invest. 93, 578-585
- Carney, S.L., Wong, N.L.M., Dirks, J.H. (1979).** *Acute effects of streptozotocin on rat renal function.* J. Lab. Clin. Med. 93, 950-962
- Carrière, B., Le Grimellec, C. (1986).** *Effects of benzyl alcohol on enzyme activities and D-glucose transport in kidney brush-border membranes.* Biochim. Biophys. Acta 857, 131-138

Chen, X.-Z., Coady, M.J., Jackson, F., Berteloot, A., Lapointe, J.-Y. (1995). *Thermodynamic determination of the Na⁺ : glucose coupling ratio for the human SGLT1 cotransporter*. *Biophys J.* 69, 2405-2414

Chenu, C. (1992). *Mécanisme moléculaire du cotransport Na⁺/D-glucose: études cinétiques sur vésicules de membrane en bordure en brosse du jéjunum de lapin*. Thèse de doctorat de l'université Paris VI.

Chenu, C., Berteloot, A. (1993). *Allosterism and Na⁺-D-glucose cotransport kinetics in rabbit jejunal vesicles: compatibility with mixed positive and negative cooperativities in a homo-dimeric or tetrameric structure and experimental evidence for only one transport protein involved*. *J. Membrane Biol.* 132, 95-113

Chesney, R., Sacktor, B., Kleinzeller, A. (1974). *The binding of phlorizin to the isolated luminal membrane of the renal proximal tubule*. *Biochim. Biophys. Acta* 332, 263-277

Chung, S.D., Alavi, N., Livingston, D., Hiller, S., Taub, M. (1982). *Characterization of primary rabbit kidney cultures that express proximal tubule functions in a hormonally defined medium*. *J. Cell Biol.* 95, 118-126

Coady, M.J., Pajor, A.M., Wright, E.M. (1990). *Sequence homologies among intestinal and renal Na⁺/glucose cotransporters*. *Am. J. Physiol.* 259, C605-C610

Costa, A.C.S., Patrick, J.W., Dani, J.A. (1994). *Improved technique for studying ion channels expressed in *Xenopus* oocytes, including fast superfusion*. *Biophys. J.* 67, 395-401

Cramer, S.C., Pardridge, W.M., Hirayama, B.A., Wright, E.M. (1992). *Colocalization of GLUT2 glucose transporter, sodium/glucose cotransporter, and γ -glutamyl transpeptidase in rat kidney with double-peroxidase immunocytochemistry*. *Diabetes* 41, 766-770

Crane, R.K. (1960). *Intestinal absorption of sugars*. *Physiol. Rev.* 40, 789-825

Crane, R.K. (1977). *The gradient hypothesis and other model of carrier-mediated active transport*. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 78, 99-159

Crane, R.K. (1985). *Comments and experiments on the kinetics of Na⁺ gradient-coupled glucose transport as found in rabbit jejunal brush-border membrane vesicles*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 456, 36-46

De Smedt, H., Kinne, R. (1981). *Temperature dependence of solute transport and enzyme activities in hog renal brush border membrane vesicles*. *Biochim. Biophys. Acta* 648: 247-253

Desjeux, J.-F. (1995). *Congenital selective Na⁺, D-glucose cotransport defect leading to renal glucosuria and congenital selective intestinal malabsorption of glucose and galactose*. In: *The*

Metabolic Basis of Inherited Diseases, edited by C.R. Scriver. New York: McGraw-Hill, pp. 3563-3580

Diedrich, D.F. (1963). *The comparative effects of some phlorizin analogs on the renal reabsorption of glucose.* Biochim. Biophys. Acta 71, 688-700

Diedrich, D.F. (1966). *Competitive inhibition of intestinal glucose transport by phlorizin analogs.* Arch. Biochem. Biophys. 117: 248-256

Diedrich, D.F. (1968). *Is phloretin the sugar transport inhibitor in intestine?* Arch. Biochem. Biophys. 127, 803-812

Dorando, F.C., Crane, R.K. (1980). *The effect of membrane potential on the apparent mechanism of Na⁺-dependent glucose transport.* Fed. Proc. 39, 2159

Dorando, F.C., Crane, R.K. (1984). *Studies of the kinetics of Na⁺ gradient-coupled glucose transport as found in brush-border membrane vesicles from rabbit jejunum.* Biochim. Biophys. Acta 772, 273-287

Evans, J.O. and Diedrich, D.F. (1980). *The affinity of phlorizin-like compounds for a β -glucosidase in intestinal brush borders: comparison with the glucose transport system.* Arch. Biochem. Biophys. 199, 342-348

Fuhrmann, G.F., Dervede, S., Frenking, G. (1992). *Phloretin keto-enol tautomerism and inhibition of glucose transport in human erythrocytes (including effects of phloretin on anion transport).* Biochim. Biophys. Acta 1110, 105-111

Fedorak, R.N., Chang, E.B., Madara, J.L., Field, M. (1987). *Intestinal adaptation to diabetes. Altered Na-dependent nutrient absorption in streptozotocin-treated chronically diabetic rats.* J. Clin. Invest. 79, 1571-1578

Fedorak R.N., Gerchon, M.D., Field, M. (1989). *Induction of intestinal glucose carriers in streptozotocin-treated chronically diabetic rats.* Gastroenterology 96, 37-44

Ferraris, R.P., Casirola, D.M., Vinnakota, R.R. (1993). *Dietary carbohydrate enhances intestinal sugar transport in diabetic mice.* Diabetes 42, 1579-1587

Ferraris, R.P., Diamond, J.M. (1986). *A method for measuring apical glucose transporter site density in intact intestinal mucosa by means of phlorizin binding.* J. Membrane Biol. 94, 65-75

Ferraris, R.P., Villenas, S.A., Hirayama, B.A., Diamond, J. (1992). *Effect of diet on glucose transporter site density along the intestinal crypt-villus axis.* Am. J. Physiol. 262, G1060-G1068

Freeman, T.C., Heavens, R.P., Dyer, J., Sirinathsingji, D.J.S., Shirazi-Beechey S.P. (1992). *The expression of the Na⁺/glucose cotransporter in the lamb small intestine.* Biochem. Soc. Trans. 20, 1868

Gerardi-Laffin, C., Delque-Bayer, P., Sudaka, P., Poiree, J.C. (1993). *Oligomeric structure of the sodium-dependent phlorizin binding protein from kidney brush-border membranes.* Biochim. Biophys. Acta 1151, 99-104

Glossmann, H., Neville, D.M. Jr. (1972). *Phlorizin receptors in isolated kidney brush border membranes.* J. Biol. Chem. 247 (23), 7779-7789

Harris, R.C., Brenner, B.M., Seifter, J.L. (1986). *Sodium-hydrogen exchange and glucose transport in renal microvillus membrane vesicles from rats with diabetes mellitus.* J. Clin. Invest. 77, 724-733

Hediger, M.A., Budarf, M.L., Emanuel, B.S., Mohandas, T.K., Wright, E.M. (1989b). *Assignment of the human intestinal Na⁺/glucose cotransporter gene (SGLT1) to the q11.2 → qter region of chromosome 22.* Genomics 4, 297-300

Hediger, M.A., Coady, M.J., Ikeda, T.S., Wright, E.M. (1987a). *Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose cotransporter.* Nature (london) 330, 379-381

Hediger, M.A., Ikeda, T., Coady, M., Gundersen, C.B., Wright, E.M. (1987b). *Expression of size-selected mRNA encoding the intestinal Na⁺/glucose cotransporter in Xenopus laevis oocytes.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 2634-2637

Hediger, M.A., Mendlein, J., Lee, H.S., Wright, E.M. (1991). *Biosynthesis of the cloned Na⁺/glucose cotransporter.* Biochim. Biophys. Acta 1064, 360-364

Hediger, M.A., Rhoads, D.B. (1994). *Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters.* Physiol. Rev. 74(4), 993-1026

Hediger, M.A., Turk, E., Wright, E.M. (1989a). *Homology of the human intestinal Na⁺/glucose and Escherichia coli Na⁺/proline cotransporters.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 5748-5752

Hirayama, B.A., Loo, D.D.F., Wright, E.M. (1994). *Protons drive sugar transport through the Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1).* J. Biol. Chem. 269, 21407-21410

Hirayama, B., Wright, E.M. (1992). *Glycosilation of the rabbit intestinal brush border Na⁺/glucose cotransporter.* Biochim. Biophys. Acta 1103, 37-44

Hopfer, U., Groseclose, R. (1980). *The mechanism of Na⁺-dependent D-glucose transport.* J. Biol. Chem. 255, 4453-4462

- Hopfer, U., Nelson, K., Perroto, J., Isselbacher, K.J. (1973). *Glucose transport in isolated brush border membran from rat intestine*. J. Biol. Chem. 248, 25-32
- Horio, M., Fukuhara, Y., Orita, Y., Nakanishi, T., Nakahama, H., Moriyama, T., Kamada, T. (1986). *Gentamicin inhibits Na⁺-dependent D-glucose transport in rabbit kidney brush-border membrane vesicles*. Biochim. Biophys. Acta 858, 153-160
- Hoshi, T., Takuwa, N., Abe, M., Tajima, A. (1986). *Hydrogen ion-coupled transport of D-glucose by phlorizin sensitive sugar carrier in intestinal brush-border membranes*. Biochim. Biophys. Acta 861, 483-488
- Hwang, F.-S., Hirayama, B.A., Wright, E.M. (1991). *Distribution of the SGLT1 Na⁺/glucose cotransporter and mRNA along the crypt-villus axis of rabbit small intestine*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 181, 1208-1217
- Imai, Y., Scoble, J.E., McIntyre, N., Owen, J.S. (1992). *Increased Na⁺-dependent D-glucose transport and altered lipid composition in renal cortical brush-border membrane vesicles from bile duct-ligated rats*. J. Lipid Res. 33, 473-483
- Kahn, B.B. (1992). *Facilitative glucose transporters: regulatory mechanisme and dysregulation in diabetes*. J. Clin. Invest. 89, 1367-1324
- Kaissling, B., Kriz, W. (1979). *Structural analysis of the rabbit kidney*. Berlin: Springer-Verlag, pp. 42-59
- Kanai, Y., Lee, W.S., You, G., Brown, D., Hediger, M.A. (1994). *The human kidney low affinity Na⁺/glucose cotransporter SGLT2*. J. Clin. Invest. 93, 397-404
- Kaunitz, J.D., Gunther, R., Wright, E.M. (1982). *Involvement of multiple sodium ions in intestinal D-glucose transport*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 2315-2318
- Kaunitz, J.D., Wright, E.M. (1984). *Kinetics of sodium D-glucose cotransport in bovine intestinal brush border vesicles*. J. Membrane Biol. 79, 41-51
- Kemp, P.J. Boyd C.A.R. (1992). *Pathways for glucose transport in type II pneumocytes freshly isolated from adult guinea pig lung*. Am. J. Physiol. 263, L612-L616
- Kessler, M., Semenza, G. (1983). *The small-intestinal Na⁺, D-glucose cotransporter: An assymetric gated channel (or pore) responsive to $\Delta \psi$* . J. Membrane Biol. 76, 27-56
- Kimmich, G.A. (1990). *Membrane potentials and the mechanism of intestinal Na⁺-dependent sugar transport*. J. Membrane Biol. 114, 1-27

- Kimmich, G.A., Randles, J.** (1986). *Na⁺-coupled sugar transport: membrane potential-dependent K_m and K_i for Na⁺*. Am. J. Physiol. 255, C486-C494
- Kinne, R., Murer, H., Kinne-Saffran, E., Thees, M., and Sachs, G.** (1975). *Sugar transport by renal plasma membrane vesicles*. J. Membr. Biol. 21: 375-396
- Kippen, N., Hirayama, B., Klinenberg, J.R., and Wright, E.M.** (1979). *Transport of p-aminohippuric acid, uric acid and glucose in highly purified rabbit renal brush border membranes*. Biochim. Biophys. Acta 556: 161-174
- Koepsell, H.** (1986). *Methodological aspects of purification and reconstitution of transport proteins from mammalian plasma membranes*. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 104, 65-137
- Koepsell, H., Fritsch, G., Korn, K., Madrala, A.** (1990). *Two substrate sites in the renal Na⁺-D-glucose cotransporter studied by model analysis of phlorizin binding and D-glucose transport measurements*. J. Membrane Biol. 114, 113-132
- Koepsell, H., Korn, K., Raszeja-Specht, A., Bernotat-Danielowski, S., Ollig, D.** (1988). *Monoclonal antibodies against the renal Na⁺-D-glucose cotransporter. Identification of antigenic polypeptides and demonstration of functional coupling of different Na⁺-cotransport systems*. J. Biol. Chem. 263, 18419-18429
- Koepsell, H., Spangenberg, J.** (1994). *Function and presumed molecular structure of Na⁺-D-glucose cotransport systems*. J. Membrane Biol. 138, 1-11
- Kong, C-T., Yet, S-F., Lever, J.E.** (1993). *Cloning and expression of a mammalian Na⁺/amino acid cotransporter with sequence similarity to Na⁺/glucose cotransporters*. J. Biol. Chem. 268, 1509-1512
- Kumar, A.M., Gupta, R.K., Spitzer, A.** (1988). *Intracellular sodium in proximal tubules of diabetic rats. Role of glucose*. Kidney Int. 33, 792-797
- Le Grimellec, C., Friedlander, G., Yandouzi, H., Zlatkin, P., Diocondi M.C.** (1992). *Membrane fluidity and transport properties in epithelia*. Kidney Int. 42, 825-836
- Lee, W.-S., Kanai, Y., Wells, R.G., Hediger, M.A.** (1994). *The high affinity Na⁺/glucose cotransporter: re-evaluation of function and distribution of expression*. J. Biol. Chem. 269, 12032-12039
- Lescale-Matys, L., Dyer, J., Scott, D., Freeman, T.C., Wright, E.M., Shirazy-Beechey, S.P.** (1993). *Regulation of the ovine intestinal Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) is dissociated from mRNA abundance*. Biochem. J. 291, 435-440

- Lever, J.E. (1982). *Expression of a differentiated transport function in apical membrane vesicles isolated from an established kidney epithelial cell line. Sodium electrochemical potential-mediated active sugar transport.* J. Biol. Chem. 257, 8680-8686
- Lever, J.E. (1984). *A two sodium ion/D-glucose symport mechanism: Membrane potential effects on phlorizin binding.* Biochemistry 23, 4697-4701
- Levi, M., Cronin, R.E. (1990). *Early selective effects of gentamicin on renal brush-border membrane Na-P_i cotransport and Na-H exchange.* Am. J. Physiol. 258, F1379-F1387
- Lin, J.-T., Szwarc, K., Kinne, R., Jung, C.Y. (1984). *Structural state of the Na⁺/D-glucose cotransporter in calf kidney brush-border membranes. Target size analysis of Na⁺-dependent phlorizin binding and Na⁺-dependent D-glucose transport.* Biochim. Biophys. Acta 777, 201-208
- Loo, D.D.F., Hasama, A., Supplisson, S., Turk, E., Wright, E.M. (1993a). *Charge translocation associated with conformational transitions of the Na⁺/glucose cotransporter.* J. Gen. Physiol. 100, 38.
- Loo, D.D.F., Hazama, A., Supplisson, S., Turk, E., Wright, E.M. (1993b). *Relaxation kinetics of the Na⁺/glucose cotransporter.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5767-5771
- Lostao, M.P., Berjon, A., Barber, A., Ponz, F. (1992). *On the multiplicity of sugar transport systems in guinea pig jejunum.* Rev. esp. Fisiol., 48(1), 45-50
- Mackenzie, B., Panayotova-Heiermann, M., Loo, D.D.F., Lever, J.E., Wright, E. (1994). *SAATI is a low affinity Na⁺/glucose cotransporter and not an amino acid transporter.* J. Biol. Chem. 269 (36), 22488-22491
- Maddox, D.A., Gennari, J.F. (1987). *The early proximal tubule; a high-capacity delivery-response reabsorptive site.* Am. J. Physiol. 252, F573-F584
- Maegawa, H., Kato, M., Inui, K., Hori, R. (1988). *pH sensitivity of H⁺/organic cation antiport system in rat renal brush border membranes.* J. Biol. Chem. 263, 11150-11154
- Maenz, D.D., Chenu, C., Bellmare, F., Berteloot, A. (1991). *Improved stability of rabbit and rat intestinal brush border membrane vesicles using phospholipase inhibitors.* Biochim. Biophys. Acta 1069, 250-258
- Malathi, P., Crane, R.K. (1969). *Phlorizin hydrolase: a β-glucosidase of hamster intestinal brush border membrane.* Biochim. Biophys. Acta. 173, 245-256
- Malathi, P., Preiser, H., Mallet, P., Crane, R.K. (1979). *A rapid method for the isolation of kidney brush border membranes.* Biochim. Biophys. Acta 554, 259-263

- Malo, C.** (1988). *Kinetic evidence for heterogeneity in Na⁺-D-glucose cotransport systems in the normal human fetal small intestine.* Biochim. Biophys. Acta 938, 181-188
- Malo, C.** (1990). *Separation of two distinct Na⁺/D-glucose cotransport systems in the human fetal jejunum by means of their differential specificity for 3-O-methylglucose.* Biochim. Biophys. Acta 1022, 8-16
- Malo, C.** (1993). *Ontogeny of Na⁺/D-glucose cotransport in guinea-pig jejunal vesicles: only one system is involved at both 20°C and 35°C.* Biochim. Biophys. Acta 1153, 299-307
- Malo, C., Berteloot, A.** (1991). *Analysis of kinetic data in transport studies: new insights from kinetic studies of Na⁺-D-glucose cotransport in human brush-border membrane vesicles using a fast sampling, rapid filtration apparatus.* J. Membrane Biol. 122, 127-141
- Martin G.M., Turk, E., Lostao, M.P., Kerner, C., Wright, E.M.** (1996). *Defects in Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) trafficking and function cause glucose-galactose malabsorption.* Nature Genetics 12, 216-220
- Minami, H., Kim, J.R., Tada, K., Takahashi, F., Miyamoto, L., Nakabou, Y., Sakai, K., Hagihira, H.** (1993). *Inhibition of glucose absorption by phlorizin affects intestinal function in rats.* Gastroenterology 105, 692-697
- Misfeldt, D.S., Sanders, M.J.** (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.* J. Membrane Biol. 70, 191-198
- Mitchell, P.** (1961). *Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism.* Nature 191, 144-148
- Miyamoto, K.-I., Hase, K., Taketani, Y., Minami, H., Oka, T., Nakabou, Y., Hagihira, H.** (1991). *Diabetes and glucose transporter gene expression in rat small intestine.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 181, 1110-1117
- Molitoris, B., Linne, R.** (1987). *Ischemia induces membrane dysfunction. Mechanism of altered Na⁺-dependent glucose transport.* J. Clin. Invest. 80, 647-654
- Moran, A., Davis, L.J., Turner, R.J.** (1988). *High affinity phlorizin binding to the LLC-PK₁ cells exhibits a sodium : phlorizin stoichiometry of 2 : 1.* J. Biol. Chem. 263, 187-192
- Moran, A., Handler, J.S., Turner, R.J.** (1982). *Na⁺-dependent hexose transport in vesicles from cultured renal epithelial cell line.* Am. J. Physiol. 243, C293-C298

- Moriyama, T., Nakahama, H., Fukuhara, Y., Horio, M., Yanase, M., Orita, Y., Kamada, T., Kanashiro, M., Miyake, Y. (1989). *Decrease in the fluidity of brush-border membrane vesicles induced by gentamicin. A spin-labeling study.* Biochim. Biophys. Acta 38, 1169-1174
- Morrison, A.I., Panayotova-Heiermann, M., Feigl, G., Schlölermann, B., Kinne R.K.H. (1991). *Sequence comparison of the sodium-D-glucose cotransport systems in rabbit renal and intestinal epithelia.* Biochim. Biophys. Acta 1089, 121-123
- Mueckler, M. (1994). *Facilitative glucose transporters.* Eur. J. Biochem. 219, 713-725
- Murer, H., Biber, J., Gmaj, P., Steiger, B. (1984). *Cellular mechanisms in epithelial transport: advantages and disadvantages of studies with vesicles.* Molec. Physiol. 6, 55-82
- Murer, H., Hoyer, U. (1974). *Demonstration of electrogenic Na⁺-dependent D-glucose transport in intestinal brush-border membranes.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 484-488
- Nakhooda, A.F., Like, A.A., Chappel, C.I., Murray, F.T., Marliss, E.B. (1977). *The spontaneously diabetic Wistar rat. Metabolic and morphologic studies.* Diabetes 26, 100-112
- Neeb, M., Fasold, H., Koepsell, H. (1985). *Identification of the D-glucose binding polypeptide of the renal Na⁺-D-glucose cotransporter with a covalently binding D-glucose analog.* FEBS Lett. 182, 139-144
- Neeb, M., Kunz, U., Koepsell, H. (1987). *Identification of D-glucose-binding polypeptides which are components of the renal Na⁺-D-glucose cotransporter.* J. Biol. Chem. 262, 10718-10727
- Oelberg, DG., Xu, F., Shabarek, F. (1994). *Sodium-coupled transport of glucose by plasma membranes of type II pneumocytes.* Biochim. Biophys. Acta 1194, 92-98
- Ohta, T., Isselbacher, K.J., Rhoads, D.B. (1990). *Regulation of glucose transporters in LLC-PK₁ cells: effects of D-glucose and monosaccharides.* Mol. Cell. Biol. 10, 6491-6499
- Pajor, A., Hirayama, B.A., Wright, E.M. (1992). *Molecular evidence for two renal Na⁺/glucose transporters.* Biochim. Biophys. Acta 1106, 216-220
- Pajor, A.M., Wright, E.M. (1992a). *Cloning and functional expression of a mammalian Na⁺/nucleoside cotransporter.* J. Biol. Chem. 267, 3557-3560
- Parent, L., Supplisson, S., Loo, D.D.F., Wright, E.M. (1992a). *Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter: I. Voltage-clamp studies.* J. Membrane Biol. 125, 49-62
- Parent, L., Supplisson, S., Loo, D.D.F., Wright, E.M. (1992b). *Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter: II. A transport model under nonrapid equilibrium conditions.* J. Membrane Biol. 125, 63-79

- Parent, L., Wright, E.** (1993). *Electrophysiology of the Na⁺/glucose cotransporter*. Soc. Gen. Physiol. Ser. 48, 263-281
- Peerce, B.E., Wright, E.M.** (1985). *Evidence for hydroxyl residues at the Na⁺ site on the intestinal Na⁺-glucose cotransporter*. J. Biol. Chem. 260, 6026-6031
- Peerce, B., Wright, E.M.** (1986). *Distance between substrate sites on the Na⁺-glucose cotransporter by fluorescence energy transfer*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8092-8096
- Peerce, B., Wright, E.M.** (1987). *Examination of the Na⁺-induced conformational change of the intestinal brush border sodium/glucose symporter using fluorescent probes*. Biochemistry 26, 4272-4279
- Pontoglio, M., Barra, J., Hadchouel, M., Doyen, A., Kress, C., Bach, J.P., Babinet, C., Yaniv, M.** (1996). *Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal fanconi syndrome*. Cell. 84, 575-585
- Rabito, C.A., Ausiello, D.A.** (1980). *Na⁺-dependent sugar transport in a cultured epithelial cell line from pig kidney*. J. Membrane Biol. 54, 31-38
- Reizer, J., Reizer, A., Saier, M.H. Jr.** (1994). *A functional superfamily of sodium/solute symporters*. Biochim. Biophys. Acta 1197, 133-166
- Restrepo, D., Kimmich, G.A.** (1985). *The mechanistic nature of the membrane potential dependence of sodium-sugar cotransport in small intestine*. J. Membrane Biol. 87, 159-172
- Restrepo, D., Kimmich, G.A.** (1986). *Phlorizin binding to isolated enterocytes: Membrane potential and sodium dependence*. J. Membrane Biol. 89, 269-280
- Roigaard-Petersen, H., Jacobsen, C., Iqbal Sheikh, M.** (1986). *Characteristics of D-galactose transport systems by luminal membrane vesicles from rabbit kidney*. Biochim. Biophys. Acta 856, 578-584
- Rossi, M., Maiuri, L., Russomanno, C., Auricchio, S.** (1992). *In vitro biosynthesis of lactase in preweaning and adult rabbit*. FEBS Lett. 313, 260-264
- Sakhrani, L.M., Badie-Dezfooly, B., Trizna, M.N., Lowe, A.G., Taub, M., Fine, L.G.** (1984). *Transport and metabolism of glucose by renal proximal tubular cells in primary culture*. Am. J. Physiol. 246, F757-F764
- Sanders, D.** (1986). *Generalized kinetic analysis of ion-driven cotransport systems: II. Random ligand binding as a simple explanation for non-Michaelian kinetics*. J. Membrane Biol. 90, 67-87

- Schultz, S., Zalusky, R.** (1965). *Interactions between active sodium transport and active amino acids transport in isolated rabbit ileum.* Nature, 205, 292-294
- Scriber, C.R., Chesney, R.W., McInnes, R.R.** (1976). *Genetic aspects of renal tubular transport: Diversity and topology of carriers.* Kidney Int. 9, 149-171
- Semenza, G., Kessler, M., Hosang, M., Weber, J., Schmidt, U.** (1984). *Biochemistry of the Na⁺-D-glucose cotransporter of the small intestine brush-border membranes: the state of the art in 1984.* Biochim. Biophys. Acta 779, 343-379
- Shioda, T., Ohta, T., Isselbacher, K.J., Rhoads, D.B.** (1994). *Differentiation-dependent expression of the Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) in LLC-PK₁ cells: Role of protein kinase C activation and ongoing transcription.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 11919-11923
- Shirazi-Beechey, S.P., Hirayama, B.A., Wang, Y., Scott, D., Smith, M.W., and Wright, E.M.** (1991). *Ontogenetic development of lamb intestinal sodium-glucose co-transporter is regulated by diet.* J. Physiol. London 437, 699-708
- Silverman, M.** (1974). *The in vivo localization of high-affinity phlorizin receptors to the brush border surface of the proximal tubule in dog kidney.* Biochim. Biophys. Acta 339, 92-102
- Silverman, M.** (1991). *Structure and fonction of hexose transporters.* Annu. Rev. Biochem. 60, 757-794
- Silverman, M., Black, J.** (1975). *High affinity phlorizin receptor sites and their relation to the glucose transport mechanism in the proximal tubule of dog kidney.* Biochim. Biophys. Acta 394, 10-30
- Silverman, M., Speight, P.** (1986). *Isolation and partial purification of a Na⁺-dependent phlorizin receptor from dog kidney proximal tubule.* J. Biol. Chem. 261, 13820-13826
- Silverman, M., Speight, P., Ho, L.** (1993). *Identification of two unique polypeptides from dog kidney outer cortex and outer medulla that exhibit different Na⁺/D-glucose cotransport functional properties.* Biochim. Biophys. Acta 1153, 43-52
- Smith, D.C., Hirayama, B.A., Wright, E.M.** (1992). *Baculovirus-mediated expression of the Na⁺/glucose cotransporter in Sf9 cells.* Biochim. Biophys. Acta 104, 151-159
- Smith, M.W., Turvey, A., Freeman, T.C.** (1992). *Appearance of phloridzin-sensitive glucose transport is not controlled at mRNA level in rabbit jejunal enterocytes.* Exp. Physiol. 77, 525-528
- Stevens, B.R., Fernandez, A., Hirayama, B., Wright, E.M., Kempner, E.S.** (1990). *Intestinal brush border membrane Na⁺/glucose cotransporter functions in situ as a homotetramer.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1456-1460

- Stirling, C.E.** (1967). *High-resolution radioautography of phlorizin-³H in rings of hamster intestine*. J. Cell Biol. 35, 605-618
- Strang, L.B.** (1991). *Fetal lung liquids: secretion and reabsorption*. Physiol. Rev. 71, 991-1016
- Taglialatela, M., Toro, L., Stefani, E.** (1992). *Novel voltage clamp to record small, fast currents from ion channels expressed in Xenopus oocytes*. Biophys. J. 61, 78-82
- Takahashi, M., Malathi, P., Preiser, H., Jung, C.Y.** (1985). *Radiation inactivation studies on the rabbit kidney sodium-dependent glucose transporter*. J. Biol. Chem. 260 (19), 10551-10556
- Takata, K., Kasahara, T., Kasahara, M., Ezaki, O., Hirano, H.** (1991). *Localization of Na⁺-dependent active-type and erythrocyte/HepG2-type glucose transporters in rat kidney: immunofluorescence and immunogold study*. J. Histochem. Cytochem. 39, 287-298
- Tisher, C.C., Madsen, K.M.** (1986). *Anatomy of the kidney*. In: *The kidney*, Third Edition, by Brenner, B.M. and Rector, F.C. by W.B. Saunders Company.
- Thorens, B., Cheng, Z.-Q., Brown, D., Lodish, H.F.** (1990). *Liver glucose transporter: a basolateral protein in hepatocytes and intestine and kidney cells*. Am. J. Physiol. 259, C279-C285
- Toggenburger, G., Kessler, M., Rothstein, A., Semenza, G., Tannenbaum, C.** (1978). *Similarity in effect of Na⁺ gradient and membrane potentials on D-glucose transport by, and phlorizin binding to, vesicles derived from brush borders of rabbit intestinal mucosal cells*. J. Membrane Biol. 40, 269-290
- Toggenburger, G., Kessler, M., Semenza, G.** (1982). *Phlorizin as a probe of the small intestinal Na⁺, D-glucose cotransporter. A model*. Biochim. Biophys. Acta 688, 557-571
- Turk, E., Kerner, C.J., Lostao, P.M., Wright, E.M.** (1996). *Membrane topology of the human Na⁺/glucose cotransporter SGLT1*. J. Biol. Chem. 271, 1925-1934
- Turk, E., Martin, M., Wright, E.** (1994). *Structure of the human Na⁺/glucose cotransporter gene SGLT1*. J. Biol. Chem. 269, 15204-15209
- Turk, E., Zabel, B., Mundlos, S., Dyer, J., Wright, E.M.** (1991). *Glucose/galactose malabsorption caused by a defect in the Na⁺/D-glucose cotransporter*. Nature 350, 354-356
- Turner, R.J.** (1983). *Quantitative studies of co-transport systems: Models and vesicles*. J. Membrane Biol. 76, 1-15
- Turner, R.J., Kempner, E.S.** (1982). *Radiation inactivation studies of the renal brush-border membrane phlorizin-binding protein*. J. Biol. Chem. 257 (18), 10794-10797

- Turner, R.J., Moran, A. (1982a). *Heterogeneity of sodium-dependent D-glucose transport sites along the proximal tubule: evidence from vesicle studies*. Am. J. Physiol. 242, F406-F414
- Turner, R.J., Moran, A. (1982b). *Stoichiometric studies of the renal outer cortical brush border membrane D-glucose transporter*. J. Membrane Biol. 67, 73-80
- Turner, R.J., Moran, A. (1982c). *Further studies of proximal tubular brush border membrane D-glucose transport heterogeneity*. J. Membrane Biol. 70, 37-45
- Turner, R.J., Moran, A. (1985). *Solution of carrier-type transport models: general solution for an arbitrarily complex rapid equilibrium model*. J. Membrane Biol. 88, 77-83
- Turner, R.G., Silverman, M. (1977). *Sugar uptake into brush border vesicles from normal human kidney*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 2825-2829
- Turner, R.G., Silverman, M. (1978). *Sugar uptake into brush border vesicles from dog kidney. II. Kinetics*. Biochim. Biophys. Acta 511, 470-486
- Turner, R.J., Silverman, M. (1981). *Interaction of phlorizin and sodium with the renal brush-border membrane D-glucose transporter: stoichiometry and order of binding*. J. Membrane Biol. 58, 43-55
- Ulrich, K.J. (1976). *Renal tubular mechanisms of organic solute transport*. Kidney Int. 9, 134-148
- Umbach, J.A., Coady, M.J., Wright, E. (1990). *Intestinal Na⁺/glucose cotransporter expressed in Xenopus oocytes is electrogenic*. Biophys. J. 57, 1217-1224
- Vayro, S., Simmons, N.L. (1996). *Proton/solute cotransport in rat kidney brush-border membrane vesicles: relative importance to both D-glucose and peptide transport*. Biochim. Biophys. Acta 1279, 111-117
- Veyhl, M., Spangenberg, J., Puschel, B., Poppe, R., Dekel, C., Fritsch, G., Haase, W., Koepsell, H. (1993). *Cloning of a membrane-associated protein which modifies activity and properties of the Na⁺-D-glucose cotransporter*. J. Biol. Chem. 268, 25041-25053
- Wakisaka, M., He, Q., Spiro, M.J., Spiro, R.G. (1995). *Glucose entry into rat mesangial cells is mediated by both Na⁺-coupled and facilitative transporters*. Diabetologia 38, 291-297
- Wells, R.G., Hediger, M.A. (1992a). *Cloning of a rat kidney cDNA that stimulates dibasic and neutral amino acid transport and has sequence similarity to glucosidases*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5596-5600

- Wells, R.G., Pajor, A.M., Kanai, Y., Turk, E., Wright, E.M., Hediger, M.A. (1992b). *Cloning of a human kidney cDNA with similarity to the sodium-glucose cotransporter*. *Am. J. Physiol.* 263, F459-F465
- Wright, E.M. (1993). *The intestinal Na⁺/glucose cotransporter*. *Annu. Rev. Physiol.* 55, 575-589
- Wu, J.-S.R., Lever, J.E. (1987a). *Monoclonal antibodies that bind the renal Na⁺/glucose symport system. I. Identification*. *Biochemistry* 26, 5783-5790
- Wu, J.-S.R., Lever, J.E. (1987b). *Purification and reconstitution of a 75-kilodalton protein identified as a component of the renal Na⁺/glucose symporter*. *Biochemistry* 26, 5958-5962
- Wu, J.-S.R., Lever, J.E. (1989). *Developmentally regulated 75-kilodalton protein expressed in LLC-PK₁ cultures is a component of the renal Na⁺/glucose cotransport system*. *J. Cell. Biochem.* 40, 83-89
- Wu, J.-S.R., Lever, J.E. (1994). *N-linked glycosylation is not required for Na⁺/glucose symport activity in LLC-PK₁ cells*. *Biochim. Biophys. Acta* 1192, 289-292
- Yasuda, H., Kurokawa T., Fujii, Y., Yamachita, A., Ishibashi, S. (1990). *Decreased D-glucose transport across renal brush-border membrane vesicles from streptozotocin-induced diabetic rats*. *Biochim. Biophys. Acta* 1021, 114-118
- Yet, S.-F., Kong, C.-T., Peng, H., Lever, J.E. (1994). *Regulation of Na⁺/Glucose cotransporter (SGLT1) mRNA in LLC-PK₁ cells*. *J. Cell. Biol.* 158, 506-512
- Yoneyama, Y., Lever, J.E. (1988). *Increased trehalase expression after glucose limitation of LLC-PK₁ cells*. *Am. J. Physiol.* 255, C816-C821
- You, G., Lee, W.-S., Barros, E.J.G., Kanai, Y., Huo, T.-L., Khawaja, S., Wells, R.G., Nigam, S.K., Hediger, M.A. (1995). *Molecular characteristics of Na⁺-coupled glucose transporters in adult and embryonic rat kidney*. *J. Biol. Chem.* 270, 29365-29371
- Ziegler, K., Frimmer, M., Fritzsich, G., Koepsell, H. (1990). *Cyclosporin binding to a protein component of the renal Na⁺-D-glucose cotransporter*. *J. Biol. Chem.* 265, 3270-3277