

Influence du pH sur les transferts des acides gras volatils dans la paroi cœcale isolée du rat

par P. MOTTAZ, J. F. WORBE

Laboratoire de Physiologie Métabolique
Université Claude-Bernard Lyon I
43, boulevard du 11-Novembre-1918
69622 Villeurbanne Cedex, France

Summary. *Influence of pH on volatile fatty acid transfer through the rat caecum wall.*

The influence of pH on the transfer of acetic, propionic and butyric acids was studied *in vitro* using everted sacs of the rat caecum. The sacs were filled with 2 ml of saline medium and then shaken 1 hr at 38 °C in flasks containing the same medium. A Krebs-Ringer phosphate incubation medium was used with O₂ as gas phase. Incubation mediums containing 15 mM acetic, propionic and butyric acids were adjusted to give three different pH values : 7.91, 7.00 and 6.03. After incubation the mucosal and serosal fluids were collected and samples were taken to determine the pH and the volatile fatty acid concentrations. The pH values of mucosal and serosal fluids changed slightly during the course of the experiments. There was net volatile fatty acid influx into caecal tissue from the serosal medium and into the mucosal medium from the caecal tissue. Lowering the pH from 7.00 to 6.03 resulted in a significant decrease of serosal volatile fatty acid influxes. Caecal tissue retained more volatile fatty acids by lowering the pH from 7.91 to 7.00 and 6.03. Acetic acid accumulated in the caecal tissue against its electro-chemical gradient at pH 6.03. Two different mechanisms appeared to favor the transport of ionized and non-ionized forms of volatile fatty acids through the caecal membranes.

Introduction.

Une flore complexe libère dans le cæcum du Rat, à partir des hydrates de carbone, des acides gras volatils qui sont absorbés. Avec le cæcum isolé et éversé de Rat, on ne peut mettre en évidence un transfert des acides gras volatils contre un gradient de concentration du milieu muqueux jusqu'au milieu séreux, comme on peut le faire avec des sacs de jéjunum isolé (Mottaz et Worbe, 1977). Néanmoins, des flux nets d'acides gras volatils se produisent et permettent d'étudier la perméabilité des membranes cellulaires à ces substrats.

En milieu aqueux, les acides gras volatils sont sous forme d'anions et de molécules non dissociées, le taux d'ionisation dépendant du pH. En milieu complexe le coefficient de partage lipide-eau varie donc avec le pH car la forme non dissociée est plus liposoluble. Shore, Brodie et Hogben (1957) ont proposé une théorie « pH

partition » selon laquelle seules les formes non dissociées des acides et des bases faibles sont solubles dans les membranes des cellules épithéliales gastro-intestinales. Hogben *et al.* (1959) ont montré que les électrolytes faibles traversent une membrane lipoïdique jusqu'à ce que la concentration de la forme absorbable soit identique des deux côtés de la paroi du tube digestif. Ces auteurs suggèrent que la répartition des électrolytes faibles depuis la lumière gastro-intestinale jusqu'au plasma est déterminée par la concentration de la forme non dissociée au niveau de l'épithélium absorbant. Ils admettent que le pH, à ce niveau, ne coïncide pas nécessairement avec le pH du contenu luminal. L'existence d'une couche particulière, de « pH virtuel » égal à 5,3, à la surface absorbante des cellules épithéliales a été proposée par Hogben *et al.* (1959). Ceci permet d'expliquer qu'une part importante des acides faibles puisse être transportée à travers la paroi intestinale, sous forme non dissociée, bien qu'au pH déterminé au centre du tube digestif ces molécules soient entièrement ionisées. Cette zone de « pH virtuel » de 5,3 est compatible avec le concept d'une sécrétion d'ions hydrogène par la muqueuse intestinale (Hubel, 1973). On l'appelle « microclimat », et son acidité a été vérifiée au moyen de microélectrodes placées à proximité des cellules épithéliales du jéjunum de Rat (Lucas *et al.*, 1975 ; Lei, Lucas et Blair, 1975). Cependant, aucune mesure directe n'a permis de distinguer cette couche au contact immédiat des membranes épithéliales. La mesure des flux unidirectionnels d'acétate, de propionate et de butyrate dans la bordure en brosse des cellules épithéliales du jéjunum de Rat a permis à Jackson *et al.* (1978) de montrer que le concept d'un « microclimat » à pH acide, différent du milieu d'incubation, n'est pas un facteur déterminant du transfert intestinal de ces molécules.

Quand on acidifie les milieux d'incubation baignant la paroi cœcale isolée du Rat, les transferts membranaires du butyrate ionisé diminuent et ceux du butyrate non dissocié augmentent (Mottaz et Worbe, 1979). Nous étudions ici les transferts simultanés de l'acétate, du propionate et du butyrate en fonction de leur degré d'ionisation.

Matériel et méthodes.

Nous avons utilisé des rats mâles de souche Wistar, pesant environ 350 g et se nourrissant *ad libitum* jusqu'au moment de leur sacrifice. Le cæcum est prélevé, lavé avec du sérum physiologique, ligaturé au niveau de la valvule iléo-cœcale, puis retourné selon la technique décrite par Wilson et Wiseman (1954). 2 ml de liquide physiologique sont injectés dans ce sac par l'extrémité aborale sur laquelle une ligature est serrée. Le sac est placé dans 25 ml de liquide physiologique identique à celui qui a été introduit à l'intérieur et agité à 38 °C sous oxygène pur. Les milieux utilisés sont préparés à partir d'une solution de Ringer phosphatée selon Krebs et Henseleit (1932) dépourvue d'ions calcium et modifiée en fonction du pH recherché, compris entre 8 et 6. L'acétate, le propionate et le butyrate sont ajoutés aux concentrations 15 mM. Les milieux sont saturés en oxygène par barbotage de ce gaz pur.

Après une heure, le sac est pesé, vidé de son contenu, pesé de nouveau et broyé dans 3 ml d'eau glacée. Cela permet d'évaluer les variations pondérales des milieux muqueux et séreux ainsi que du tissu au cours de l'expérience. Directement à partir

des milieux muqueux et séreux et du surnageant d'un broyat de paroi cœcale dilué dans 3 ml d'eau et centrifugé à 4 000 g pendant 15 min, les acides gras volatils sont séparés et dosés par chromatographie en phase gazeuse (Erwin, Marco et Emery, 1961). Les analyses permettent de déterminer les concentrations et les quantités de chaque acide gras volatil présent dans les trois milieux : milieu muqueux, milieu séreux et paroi tissulaire, à la fin de l'expérience, et de les comparer aux valeurs fournies initialement. Les modifications rendent compte des flux nets d'acides gras volatils d'un milieu à un autre et de leur catabolisme ou de leur synthèse pendant la durée de l'incubation. La sensibilité du dosage chromatographique des acides gras volatils est de 4,1 p. 100 pour l'acétate, 2,6 p. 100 pour le propionate et 1,9 p. 100 pour le butyrate. Les résultats obtenus sont rapportés au g de tissu frais utilisé. Les pH des milieux muqueux et séreux, ainsi que de milieux témoins traités dans les mêmes conditions en l'absence de cœcum, ont été mesurés à la fin des expériences.

Pour chaque série d'expériences, la moyenne arithmétique est accompagnée de l'erreur standard ($\bar{x} \pm sm$). L'exploitation statistique des résultats est effectuée à l'aide du test de Student et Fisher. Les différences des moyennes sont considérées comme significatives quand $P < 0,05$.

Résultats.

Nous avons réalisé trois séries de 12 ou 13 expériences avec des milieux dont le pH initial est respectivement 6,03, 7,00 et 7,91. Les résultats obtenus sont réunis dans quatre tableaux. Seul le tableau 1 présente les moyennes de valeurs mesurées pour chacune des trois séries d'expériences. Les autres tableaux présentent, séparément pour les trois séries, les flux et les concentrations de chacun des acides gras volatils.

On voit (tabl. 1) que le pH des milieux varie très peu au cours de l'incubation.

TABLEAU 1

*Variations du pH des milieux muqueux et séreux
après une heure d'incubation à 38 °C*

Nombre d'animaux	pH initial des deux milieux	pH final du milieu muqueux	pH final du milieu séreux
12	7,91 \pm 0,00	7,70 \pm 0,01	7,11 \pm 0,04
13	7,00 \pm 0,00	7,02 \pm 0,00	6,72 \pm 0,00
13	6,03 \pm 0,00	6,12 \pm 0,00	6,14 \pm 0,01

Si les milieux initiaux sont acides ou alcalins, la modification est une légère neutralisation qui touche davantage le milieu séreux que le milieu muqueux. Si les milieux initiaux sont à pH 7,00, le milieu muqueux ne varie que très peu, alors que le milieu séreux est légèrement acidifié.

Les flux nets d'acides gras volatils sont groupés dans le tableau 2. On voit que les trois acides utilisés pénètrent dans le tissu cæcal. On sait que ce tissu ne contient pratiquement pas d'acides acétique, propionique et butyrique au moment du prélèvement, donc au début de notre étude *in vitro* (Mottaz, 1976). L'influx tissulaire d'acétate est toujours plus important que celui de propionate ou de butyrate. Il provient en grande partie du milieu séreux, mais la quantité d'acétate et de propionate contenue dans le milieu muqueux est aussi augmentée. Seule, la quantité de butyrate peut, à certains pH, y diminuer. Nos résultats mettent donc en évidence un influx du milieu séreux vers le tissu accompagné d'un efflux du tissu vers le milieu muqueux des trois acides gras volatils, sauf pour le butyrate à pH 7,00 au cours de l'incubation. A la fin de l'expérience, les quantités totales d'acétate et de propionate retrouvées dans les trois milieux ont augmenté (acides gras volatils apparus), mais ce n'est pratiquement pas le cas du butyrate. Le pH des milieux d'incubation influence très nettement les transferts d'acides gras volatils : la rétention tissulaire est significativement plus importante lorsque le pH est abaissé de 7,91 à 7,00 et à 6,03. Cependant l'abaissement du pH diminue l'efflux tissu-milieu muqueux et diminue l'influx milieu séreux-tissu.

TABLEAU 2

Influence du pH sur les transferts des acides gras volatils après une heure d'incubation à 38 °C d'un cæcum de Rat isolé entre un milieu muqueux et un milieu séreux

AGV étudié	pH initial des milieux muqueux et séreux	Influx muqueux $\mu\text{mol p. g.}$	Influx séreux $\mu\text{mol p. g.}$	Influx tissulaire $\mu\text{mol p. g.}$	AGV apparus $\mu\text{mol p. g.}$
Acétate	7,91	18,0 \pm 2,3	- 6,6 \pm 0,4	5,6 \pm 0,4 *	17,1 \pm 2,1
	7,00	14,1 \pm 3,5	- 6,7 \pm 0,5	9,7 \pm 0,7	17,1 \pm 3,6
	6,03	9,0 \pm 2,9	- 4,2 \pm 0,4 *	11,8 \pm 0,8	16,6 \pm 3,0
Propionate	7,91	17,9 \pm 2,4	- 5,8 \pm 0,3	4,6 \pm 0,3 *	16,7 \pm 2,3
	7,00	11,7 \pm 2,7	- 5,6 \pm 0,4	8,7 \pm 0,5	14,8 \pm 2,7
	6,03	4,0 \pm 2,5 *	- 3,8 \pm 0,4 *	10,2 \pm 0,6	10,4 \pm 2,5
Butyrate	7,91	4,3 \pm 1,9 *	- 6,3 \pm 0,3	3,7 \pm 0,2 *	1,7 \pm 1,8
	7,00	- 6,2 \pm 2,0	- 5,4 \pm 0,4	9,0 \pm 0,5	- 2,6 \pm 2,0
	6,03	2,0 \pm 2,2	- 4,0 \pm 0,4 *	9,8 \pm 0,6	3,8 \pm 2,4

Chaque flux est la différence entre les quantités présentes initialement et à la fin de l'incubation dans les différents milieux. Les acides gras volatils apparus sont la différence entre la quantité totale ajoutée dans les milieux d'incubation au temps zéro et la quantité totale (somme des valeurs déterminées dans les milieux muqueux, séreux et tissulaire) après une heure.

* Différence avec la valeur obtenue quand le pH initial est 7,00 statistiquement significative ($P < 0,05$).

En appliquant l'équation d'Henderson-Hasselbach aux concentrations initiales et finales d'acides gras volatils et aux pH initiaux et finaux des milieux muqueux et séreux, nous avons pu évaluer les flux nets de la forme ionisée et de la forme non

dissociée de chaque substrat. Les résultats sont groupés dans le tableau 3. La rétention tissulaire n'a pas été déterminée car le pH intracellulaire des différents tissus constituant la paroi cœcale n'est pas connu. On voit que la forme non dissociée ne se comporte pas toujours de la même manière que la forme ionisée. Il est donc évident que les forces qui orientent les transferts diffèrent suivant la forme des acides gras volatils. Cependant, le pH a une influence sur la forme ionisée comme sur la forme non dissociée.

TABLEAU 3

Influence du pH sur les transferts des acides gras volatils ionisés et non dissociés après une heure d'incubation à 38 °C d'un cœcum de Rat isolé entre un milieu muqueux et un milieu séreux

AGV étudié	pH initial	Influx muqueux μEq.p.g		Influx séreux μEq.p.g	
		Ionisé	Non dissocié	Ionisé	Non dissocié
Acétate	7,91	17,9 ± 2,3	0,2 ± 0,00 *	-6,6 ± 0,4	0,04 ± 0,00
	7,00	14,1 ± 3,4	0,02 ± 0,02	-6,7 ± 0,5	0,02 ± 0,00
	6,03	10,7 ± 2,8	-1,7 ± 0,1 *	-3,8 ± 0,4 *	-0,4 ± 0,02 *
Propionate	7,91	17,7 ± 2,3	0,2 ± 0,00 *	-5,8 ± 0,3	0,07 ± 0,00
	7,00	11,7 ± 2,7	0,01 ± 0,03	-5,6 ± 0,4	0,04 ± 0,00
	6,03	6,4 ± 2,4	-2,4 ± 0,1 *	-3,4 ± 0,4 *	-0,4 ± 0,03 *
Butyrate	7,91	4,1 ± 1,9 *	0,14 ± 0,04 *	-6,3 ± 0,3	0,05 ± 0,00
	7,00	-6,1 ± 2,0	-0,08 ± 0,02	-5,4 ± 0,4	0,04 ± 0,00
	6,03	0,2 ± 2,1 *	-2,3 ± 0,09 *	-3,6 ± 0,4 *	-0,4 ± 0,02 *

* Différence avec la valeur obtenue quand le pH initial est 7,00 statistiquement significative (P < 0,05).

TABLEAU 4

Concentration des acides acétique, propionique et butyrique dans la paroi et les milieux d'incubation

AGV étudié	pH initial des milieux muqueux et séreux	Milieux muqueux et séreux initiaux	Milieu muqueux final	Paroi finale	Milieu séreux final
		μmol.p.ml	μmol.p.ml	μmol.p.ml	μmol.p.ml
Acétate	7,91	15,7 ± 0,2	17,0 ± 0,3	6,9 ± 0,4	9,9 ± 0,2 *
	7,00	15,6 ± 0,3	17,3 ± 0,4	7,8 ± 0,7	8,5 ± 0,1
	6,03	15,7 ± 0,3	16,6 ± 0,3	12,4 ± 0,7 *	10,8 ± 0,3 *
Propionate	7,91	15,3 ± 0,1	16,5 ± 0,2	5,6 ± 0,3 *	10,0 ± 0,2 *
	7,00	15,2 ± 0,1	16,7 ± 0,3	6,8 ± 0,4	9,0 ± 0,1
	6,03	15,3 ± 0,1	15,8 ± 0,2 *	10,8 ± 0,6 *	10,6 ± 0,3 *
Butyrate	7,91	15,0 ± 0,08	15,3 ± 0,2	4,5 ± 0,2 *	9,4 ± 0,2 *
	7,00	14,9 ± 0,08	15,2 ± 0,2	7,0 ± 0,3	8,9 ± 0,1
	6,03	14,9 ± 0,06	15,03 ± 0,2	10,3 ± 0,5 *	10,3 ± 0,2 *

Pour déterminer la nature des forces qui entraînent les flux observés, nous avons réuni dans le tableau 4 les concentrations de chaque acide gras volatil dans les trois milieux à la fin de l'expérience. En rapportant ces valeurs à celles du tableau 2, on voit que l'efflux tissu-milieu muqueux a toujours lieu contre le gradient de concentration pour les trois substrats, alors que l'influx milieu séreux-tissu ne s'effectue contre un gradient de concentration qu'à pH 6,03 et seulement pour l'acétate et le propionate.

Discussion.

In vitro, les acides gras volatils sont absorbés par le jéjunum de Rat contre un gradient de concentration, du milieu muqueux jusqu'au milieu séreux (Smyth et Taylor, 1958 ; Barry et Smyth, 1960). Les différentes étapes du transfert sont les suivantes : la substance est d'abord absorbée par la muqueuse et accumulée à l'intérieur des cellules épithéliales d'où une partie seulement est libérée au pôle basal de ces cellules et parvient dans le milieu séreux après avoir traversé la musculuse et la séreuse. Placé dans les mêmes conditions, le cæcum n'entraîne pas des transferts comparables. Les flux nets d'acides gras volatils se font à partir du milieu séreux vers le tissu et, dans certains cas, du tissu vers le milieu muqueux. *In vivo*, la molécule absorbée parvient dans les vaisseaux capillaires, donc franchit des tissus différents.

Après une heure d'incubation, la quantité de chacun des acides gras présent dans le milieu séreux a diminué d'environ 30 p. 100, quantité que la sensibilité des dosages permet d'apprécier parfaitement. Cette diminution, donc l'influx milieu séreux-tissu, est favorisée par l'acidification à pH 6,03. A ce pH, l'influx s'effectue contre le gradient de concentration pour l'acétate. Stevens et Stettler (1967) obtiennent des résultats très comparables avec l'épithélium de rumen de Bœuf et proposent de les attribuer à un gradient de pH entre le contenu tissulaire et le milieu séreux ou à un transfert actif. Des informations concernant le pH intracellulaire seraient nécessaires. Pour pouvoir les analyser, il faudrait aussi connaître la concentration intracellulaire des acides gras volatils qui permettrait de déterminer les taux d'ionisation de part et d'autre de la membrane cytoplasmique. Pour Hogben *et al.* (1959) le transfert des électrolytes faibles à travers les membranes intestinales nécessite l'existence d'un compartiment intermédiaire ayant un pH inférieur à ceux des milieux d'incubation. Jackson et Morgan (1975) admettent l'existence de ce modèle à trois compartiments, mais ils pensent que le pH du compartiment cellulaire est supérieur à celui des milieux muqueux et séreux.

Les mesures d'acides gras volatils retenus par le tissu sont effectuées à partir du surnageant d'un broyat. Elles intègrent les acides gras en solution dans les liquides interstitiels et dans le cytoplasme des différents types de cellules constituant le tissu. Elles n'indiquent donc pas la concentration dans le cytoplasme des cellules épithéliales. Il est néanmoins permis de penser que les liquides interstitiels sont équilibrés avec les milieux muqueux et séreux et que, si la concentration globale mesurée est supérieure à celle de ces milieux, cela provient des cytoplasmes cellulaires. On apprécie donc le sens du gradient de concentration entre les milieux intra- et extra-cellulaires, bien qu'on ne dispose pas de sa valeur réelle.

Dans toutes les expériences, l'incubation entraîne une augmentation de la concentration des acides gras volatils dans le milieu muqueux. Cette augmentation est au moins de 0,03 p. 100 de la quantité présente initialement, et au plus de 0,39 p. 100. Il est bien évident que ces légères variations sont inférieures à la sensibilité de nos méthodes de dosage car on peut estimer que l'ensemble des manipulations subies par le tissu et les milieux entraîne des erreurs qui peuvent affecter de ± 10 p. 100 les résultats. Néanmoins, elles ont toujours le même sens et, dans 5 cas sur 9, elles sont statistiquement significatives. C'est la raison pour laquelle nous considérons qu'un efflux tissu-milieu muqueux se produit contre le gradient de concentration. Il apparaît que le pH, donc le taux d'ionisation, modifie ce transfert.

A part le butyrate à pH 7,00, les acides gras volatils ne sont pas utilisés durant l'incubation, il en apparaît au contraire une petite quantité qui s'ajoute à celle fournie initialement de 385 μ moles pour chaque acide. Les quantités apparues sont très petites et n'atteignent jamais plus de 7 p. 100 de ce qui a été fourni. Elles sont donc à la limite de la sensibilité des méthodes de détermination. Cependant, il nous paraît difficile de rejeter la possibilité d'une synthèse intracellulaire car la quantité trouvée dans la paroi tissulaire dépasse toujours l'efflux séreux.

Seule l'utilisation de molécules marquées peut permettre de mesurer la pénétration des acides gras volatils dans l'épithélium cœcal, comme l'ont fait Jackson *et al.* (1978) avec le jéjunum de Rat, et de la comparer avec les acides gras volatils susceptibles d'être formés au cours de l'incubation.

Conclusion.

In vitro, les transferts des acides gras volatils à travers la paroi cœcale se font dans un sens différent de l'absorption *in vivo*. Des transferts dans le sens tissu-milieu muqueux et milieu séreux-tissu sont mis en évidence. Ils peuvent être influencés activement par les membranes cellulaires. Le pH modifie les transferts membranaires des acides gras volatils. Les formes ionisées et non dissociées ne sont donc pas transportées par les mêmes mécanismes.

*Journées Ingestion-Digestion-Absorption
de l'Association française de Nutrition,
Paris, 15-16 novembre 1979.*

Références

- BARRY R. J. C., SMYTH D. H., 1960. Transfer of short-chain fatty acids by the intestine. *J. Physiol. (London)*, **152**, 48-66.
- ERWIN S. E., MARCO G. J., EMERY E. M., 1961. Volatile fatty acids analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.*, **44**, 1768-1771.
- HOGBEN C. A. M., TOCCO D. J., BRODIE B. B., SHANKER L. S., 1959. On the mechanism of intestinal absorption of drugs. *J. Pharmacol. exper. Therap.*, **125**, 275-282.
- HUBEL K. A., 1973. Effect of luminal sodium concentration on bicarbonate absorption in rat jejunum. *J. clin. Invest.*, **52**, 3172-3179.
- JACKSON M. J., MORGAN B. N., 1975. Relation of weak-electrolyte transport and acide-base metabolism in rat small intestine *in vitro*. *Am. J. Physiol.*, **228**, 482-486.

- JACKSON M. J., WILLIAMSON A. M., DOMBROWSKI W. A., GARNER D. E., 1978. Intestinal transport of weak electrolytes. Determinants of influx at the luminal surface. *J. gen. Physiol.*, **71**, 301-327.
- KREBS H. A., HENSELEIT K., 1932. Untersuchungen über die Harstoffbildung im Tierkörper. *Z. Physiol. Chem.*, **210**, 33-66.
- LEI F. H., LUCAS M. L., BLAIR J. A., 1977. The influence of pH, low sodium ion concentration and methotrexate on the jejunal-surface pH : A model for folic acid transfer. *Biochem. Soc. Trans.*, **5**, 149-152.
- LUCAS M. L., SCHNEIDER W., HABERICH F. J., BLAIR J. A., 1975. Direct measurement by pH-microelectrode of the pH microclimate in rat proximal jejunum. *Proc. roy. Soc. London B*, **192**, 39-48.
- MOTTAZ P., 1976. *Absorption des acides gras volatils par le cæcum de rat*. Doct. Spécial. Lyon, 162 pp.
- MOTTAZ P., WORBE J. F., 1977. Transferts des acides gras volatils dans la paroi du cæcum isolé de rat. *C. R. Soc. Biol.*, **171**, 375-380.
- MOTTAZ P., WORBE J. F., 1979. Influence du pH sur le transfert du butyrate dans la paroi cæcale isolée du rat. *J. Physiol. (Paris)* (sous presse).
- SHORE P. A., BRODIE B. B., HOGBEN C. A. M., 1957. The gastric secretion of drugs : A pH partition hypothesis. *J. Pharmacol. exper. Therap.*, **119**, 361-369.
- SMYTH D. H., TAYLOR C. B., 1958. Intestinal transfer of short-chain fatty acids *in vitro*. *J. Physiol. (London)*, **141**, 73-80.
- STEVENS C. E., STETTLER B. K., 1967. Evidence for active transport of acetate across bovine rumen epithelium. *Am. J. Physiol.*, **213**, 1335-1339.
- WILSON T. H., WISEMAN G., 1954. The use of everted small intestine for the study of transference of substances from the mucosal to the serosal surface. *J. Physiol. (London)*, **123**, 116-125.
-