

CARACTÉRISTIQUES ÉLECTROPHYSIOLOGIQUES DU TRANSPORT MEMBRANAIRE ÉPITHÉLIAL DE LA MÉTHIONINE DANS L'INTESTIN DE LA DAURADE, *SPARUS AURATA*

par

Khédija HAFSIA, Mounir SAHLI & Dalila SAIDANE (1)

RÉSUMÉ. - L'interaction du transport de la méthionine et des mouvements ioniques a été étudiée au niveau des différents segments intestinaux (antérieur, postérieur et côlon) de *Sparus aurata* avec la technique du courant de court-circuit. Cette étude montre que l'addition de la méthionine, à la concentration 10 mM, du côté muqueux en présence de 140 mM de NaCl, provoque une baisse du courant de court-circuit et du potentiel transépithélial des différents segments intestinaux. Ces résultats suggèrent l'interférence du transport intestinal de la méthionine avec des mouvements ioniques de charge négative, le transport de la méthionine a été effectué en présence et en absence de l'ion chlore qui est l'ion majeur de charge négative dans le milieu intérieur de l'animal. Les résultats montrent que, en milieu gluconate (substitué au NaCl), l'addition de la méthionine, à la même concentration (10 mM) et du même côté que précédemment (muqueux), provoque une stimulation du courant de court-circuit et du potentiel transépithélial des trois segments intestinaux. Notre étude indique que, chez la daurade, le transport intestinal de la méthionine interfère avec les mouvements de deux ions : le sodium et le chlore.

ABSTRACT. - Electrical effects of methionine in relation to ion transport in *Sparus aurata* intestine.

The intestinal transport of the amino acids, and in particular the methionine, remains little informed in fishes. The aim of this work is to study the interaction between methionine transport and ionic movements by different intestinal parts in *Sparus aurata*, using the technique of Ussing chambers under short-circuited current conditions. Three rings were used: anterior, posterior and colon. The results of this study showed that the mucosal addition of methionine (10 mM), in presence of 140 mM NaCl, provoked a decrease of short-circuited current and potential (serosa positive) of all intestinal rings. The results suggest the interference of the intestinal methionine transport with ionic movements of negative load. To elucidate this hypothesis, methionine transport was carried out in presence and in absence of chloride ion, which is the major ion of negative load in animal interior medium. The results showed that, in absence of chloride, addition of the methionine, in the same conditions (10 mM, mucous side, gluconate medium), provoked a short-circuited current and potential stimulation of intestinal rings. Our study indicates that methionine transport across intestine of *Sparus aurata* interferes with movements of underlying two ions sodium and chloride.

Key words. - Sparidae - *Sparus aurata* - Intestine - Transport - Methionine - Chlore - Sodium.

Les études du transport des acides aminés par les membranes cellulaires chez les mammifères ont montré que l'absorption de ces derniers, et particulièrement celle des acides aminés neutres, met en jeu plusieurs systèmes de transport (Stevens *et al.*, 1984 ; Christensen, 1985 ; Bertran *et al.*, 1994). Pour les cellules épithéliales, la présence de plusieurs transporteurs des acides aminés dans la bordure en brosse complique beaucoup l'analyse de cinétique de transport. Le développement des études relatives à l'absorption intestinale des acides aminés chez les poissons est récent (Bogé et Rigal, 1981 ; Bogé *et al.*, 1982, 1983, 1985 ; Vilella *et al.*, 1990) et le transport intestinal des acides aminés et en particulier la méthionine reste peu documenté.

Pour mieux élucider les mécanismes de transport de substances organiques à travers la paroi intestinale, certains auteurs se sont intéressés à l'effet d'ions comme le chlore, le sodium et le potassium. La dépendance au chlore du

transport membranaire de certains acides aminés a été constatée depuis longtemps (Vidaver et Sheperd, 1968). Plus tard, certains travaux ont montré l'intervention de l'ion chlore dans le transport des acides aminés par les épithéliums rénaux et intestinaux des poissons (Bogé et Rigal, 1981 ; Bogé *et al.*, 1982 ; Munck, 1993, 1995a). La dépendance au chlore peut refléter un besoin en ion Cl⁻ comme catalyseur du transporteur sodium dépendant ou comme cotransporté avec l'acide aminé et le sodium (Munck, 1995a).

En outre, certaines études ont montré que l'absorption de la méthionine, qui est un acide aminé à longue chaîne, suit un modèle très complexe par lequel les transporteurs sodium-dépendants catalysent le transfert de la méthionine même en absence de Na⁺ (Paterson *et al.*, 1980).

L'objet de ce travail est l'étude de l'interaction entre les mouvements des ions chlore et sodium et le transport de la

(1) Laboratoire d'analyse et de contrôle de polluants chimiques et microbiologiques de l'environnement, Faculté de Pharmacie, Avenue Avicenne, 5000 Monastir, TUNISIE. [Dalila.Saidane@fphm.rnu.tn]

méthionine, à travers les différents segments intestinaux de la daurade *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Animaux d'expérience

Les daurades utilisées au cours de cette expérimentation, pesant entre 200 et 250 g, proviennent de la station d'élevage d'aquaculture tunisienne (Hergla, Tunisie). Les animaux sont transportés vivants et stockés au laboratoire dans un aquarium rempli d'eau de mer. La température du bac est maintenue entre 18 et 20° C.

Trois parties de l'intestin ont été considérées : intestin antérieur, intestin postérieur et côlon. Un segment de un centimètre est découpé dans chaque partie antérieure et postérieure ; le côlon est prélevé en entier.

Technique

La technique utilisée est celle du courant de court-circuit (Ussing et Zerahn, 1951). Elle permet de mesurer les paramètres électriques (courant de court-circuit et potentiel transépithélial) ainsi que les flux d'ions ou de molécules organiques. Cette technique a été largement utilisée pour différents épithéliums chez diverses espèces (White, 1977 ; Gunter-Smith *et al.*, 1982 ; Lahlou et Avella, 1993 ; Saïdane *et al.*, 1999).

Le tissu étudié est monté à plat entre les deux compartiments de la chambre de Ussing en plexiglass, fournie par World Precision Instrument (WPI, USA).

En raison du faible diamètre de l'intestin, l'ouverture des chambres présente un diamètre de 6 mm (Réf : CH4 S). La présence d'un joint torique évite l'effet d'écrasement de bord (edge-damage).

Deux paires d'électrodes impolarisables adaptées à ces chambres ont été utilisées, l'une pour le courant, l'autre pour le potentiel.

L'appareil de courant de court-circuit est un DVC 1000, Dual Voltage/current clamp (WPI, USA) qui permet en outre d'obtenir la résistance (en h Ω /cm 2) du tissu en envoyant régulièrement de courtes impulsions supplémentaires qui font varier le potentiel transmembranaire. Le DVC 1000 est relié à un MacLab qui permet à l'aide d'un logiciel, appelé Chart, d'enregistrer, d'afficher et de représenter les données expérimentales sur ordinateur et de les soumettre à des analyses variées.

Le milieu d'incubation est constitué d'une solution physiologique, ayant la même pression osmotique que le milieu intérieur de l'animal : Ringer à 9‰ de NaCl (140 mM de NaCl).

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur standard. Pour analyser les résultats, le test Anova a été appliqué en utilisant le programme informatique Stat ViewTM 512⁺.

RÉSULTATS

Après stabilisation du tissu, la lecture du courant de court-circuit et du potentiel transépithélial est réalisée. Le tableau 1 regroupe les paramètres électriques des trois segments intestinaux. Tous les segments intestinaux présentent un courant de court-circuit et un potentiel transépithélial séreux positifs.

Les résultats de cette étude montrent que l'addition de la méthionine au milieu d'incubation, à la concentration 10 mM, du côté muqueux, provoque une baisse du courant de court-circuit et du potentiel transépithélial des différents segments intestinaux (Fig. 1). Pour équilibrer la pression osmotique, 10 mM de mannitol sont ajoutés du côté séreux. Au niveau de l'intestin antérieur, l'inhibition est respectivement de 26,4% pour le courant et de 8,77% (n = 9) pour le potentiel. Pour l'intestin postérieur la réduction du courant est de 12,5% alors que celle du potentiel est de 23,5% (n = 10). En ce qui concerne le côlon, une baisse de 35% est enregistrée pour le courant, celle du potentiel est de 22% (n = 8). Cette variation est significative à 5% d'erreur pour les trois segments intestinaux. Ces résultats suggèrent l'interférence du transport intestinal de la méthionine avec des mouvements ioniques de charge négative. Pour tester cette

Tableau 1. - Paramètres électriques des trois parties de l'intestin de *Sparus aurata* après stabilisation (I : courant de court-circuit en microampères par cm 2 ; V : potentiel transépithélial et R : résistance du tissu intestinal en h Ω /cm 2). [Electrical characteristics of the different parts of the intestine of *Sparus aurata* after stabilization.]

	I en μ A/cm 2	V en mV	R en h Ω /cm 2
Intestin antérieur (n = 11)	5,95 \pm 0,64	0,93 \pm 0,17	128,7 \pm 6,6
Intestin postérieur (n = 11)	5,92 \pm 0,67	0,91 \pm 0,13	118 \pm 10,6
Côlon (n = 9)	12,24 \pm 1,98	1,87 \pm 0,17	134,1 \pm 11,2

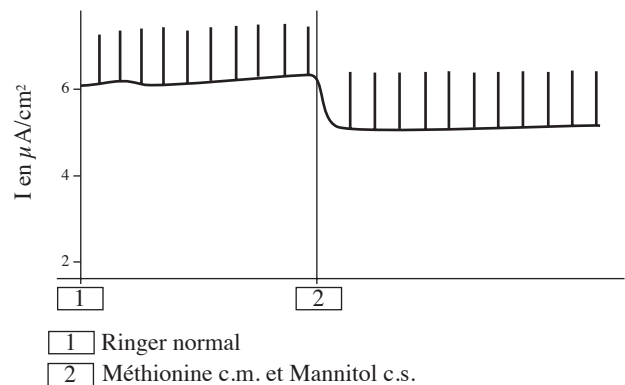


Figure 1. - Exemple d'enregistrement du courant de court-circuit en microampères par cm 2 de tissu, avant et après l'addition de la méthionine à la concentration 10 mM, du côté apical, au milieu d'incubation de l'intestin postérieur de *Sparus aurata*. [Typical recording of short-circuit current in μ A/cm 2 , before and after addition of 10 mM methionine at the mucous side of posterior segment of *Sparus aurata* intestine.]

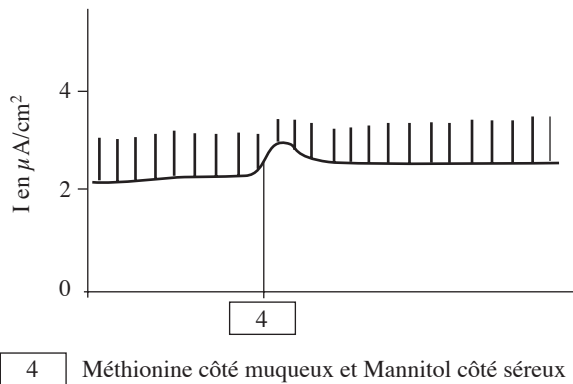


Figure 2. - Effet de l'addition de la méthionine à la concentration 10 mM, du côté apical, au milieu d'incubation de l'intestin postérieur de *Sparus aurata*, dans du Ringer sans chlore (gluconate). Exemple d'enregistrement du courant de court-circuit en microampères par cm² de tissu. [Effects of Cl⁻ substitution by gluconate on both sides of *Sparus aurata* posterior intestine. Typical recording of short-circuit current in µA/cm², before and after mucosus addition of 10 mM methionine in normal and chloride-free Ringer.]

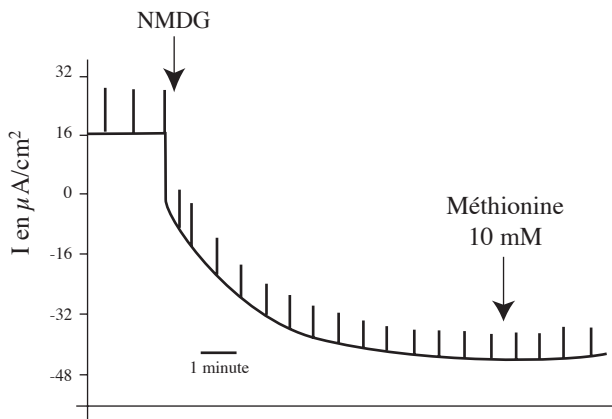


Figure 3. - Effet de l'addition de la méthionine à la concentration 10 mM, du côté apical, au milieu d'incubation de l'intestin postérieur de *Sparus aurata*, dans du Ringer sans sodium (NMDG). Exemple d'enregistrement du courant de court-circuit en microampères par cm² de tissu. [Effects of Na⁺ substitution by NMDG on both sides of *Sparus aurata* posterior intestine. Typical recording of short-circuit current in µA/cm², before and after mucosus addition of 10 mM methionine in normal and sodium-free Ringer.]

hypothèse, l'étude du transport de la méthionine a été effectuée en présence et en absence de l'ion chlore qui est l'ion majeur de charge négative dans le milieu intérieur de l'animal.

Dans le milieu dépourvu de chlore le NaCl est remplacé par du gluconate de sodium. La méthionine et le mannitol sont préparés dans ce milieu. Les résultats montrent que, en milieu gluconate, l'addition de la méthionine, à la même concentration (10 mM) et du même côté que précédemment (muqueux), provoque une stimulation du courant de court-circuit et du potentiel transépithélial des segments intesti-

naux antérieur et postérieur (Fig. 2). En effet, les variations des paramètres électriques de l'intestin antérieur sont respectivement 11,4% pour le courant et 31,6% (n = 9) pour le potentiel ; au niveau de l'intestin postérieur : 8,77% pour le courant et 19% (n = 9) pour le potentiel. En ce qui concerne le côlon, une légère augmentation est enregistrée pour le potentiel (5,4%), le courant n'est pas modifié (n = 8). Cette variation est significative à 5% d'erreur pour les segments antérieur et postérieur ; elle est non significative pour le côlon.

Pour vérifier le rôle de l'ion sodium dans l'absorption intestinale de cet acide aminé, le transport de la méthionine a été effectué en absence de cet électrolyte. Dans le milieu dépourvu de sodium, le NaCl est remplacé par du NMDG (N-méthyl D-glucamine). La méthionine et le mannitol sont préparés dans ce milieu. L'addition de la méthionine dans du Ringer sans sodium, et dans les mêmes conditions que précédemment, ne provoque aucune modification des paramètres électriques des différentes parties de l'intestin (Fig. 3), ce qui indique que la réponse électrique à la méthionine est fortement inhibée dans ces conditions.

DISCUSSION

Les paramètres électriques des différents segments intestinaux montrent qu'ils sont séreux positifs, ce qui indique un transfert d'ions de charge positive du côté séreux (Lahlou et Avella, 1993).

Les trois parties de l'intestin présentent une résistance inférieure à 200 en Ωcm², donc l'intestin de la daurade peut être considéré comme un tissu lâche (Lahlou et Avella, 1993).

Par ailleurs, l'addition de la méthionine en milieu dépourvu de l'ion chlore est suivie d'une augmentation du courant et du potentiel des portions antérieure et postérieure de l'intestin. L'ensemble des résultats de cette étude montre que l'absence de l'un des deux ions Na⁺ et Cl⁻ perturbe les paramètres électriques des trois portions intestinales enregistrés suite à l'addition de la méthionine au milieu d'incubation du côté apical. En effet, en Ringer NaCl, une diminution du courant de court-circuit et du potentiel transépithélial est obtenue. En Ringer-Gluconate, le phénomène inverse est observé. L'addition de la méthionine est accompagnée d'une augmentation légère des deux paramètres électriques des portions antérieure et postérieure de l'intestin. En fait, l'inhibition du courant et du potentiel, qui suit d'habitude l'application de la méthionine, disparaît et une dépolarisation d'amplitude variable selon les segments intestinaux est obtenue. En Ringer-NMDG, l'ajout de l'acide aminé n'a plus d'effet sur le courant de court-circuit et le potentiel transépithélial ; par conséquent il est permis de penser que ce trans-

port comprend une composante sodium-dépendante (White et Hinton, 1988).

Nos résultats suggèrent l'interférence du transport intestinal de la méthionine avec des mouvements ioniques de charge négative. Certains auteurs pensent que l'ion Cl^- stimule le transport sodium-dépendant (Nelson et Rudnick, 1982 ; Bogé *et al.*, 1983). Nos résultats sont en accord avec certains travaux antérieurs, qui ont été réalisés dans le même axe, en vue de mettre en évidence une éventuelle dépendance du transport des acides aminés vis-à-vis de l'ion chlorure. C'est ainsi que Bogé *et al.* (1983) ont étudié le transport de D-glucose, l'acide 2-aminoisobutyrique et la glycine par les vésicules de bordure en brosse membranaire de l'intestin de *Boops salpa*. En effet, ils ont montré que le transport de ces trois substances est stimulé par le gradient électrochimique de Na^+ ($C_{\text{ext}} > C_{\text{int}}$). Pour le glucose, une élévation du potentiel électrique membranaire augmente le transport Na^+ -dépendant. En revanche, le transport de la glycine et de l'AIB exige en plus de gradient Na^+ la présence de Cl^- du côté externe des vésicules. Ces auteurs ont souligné également que dans le cas où le gradient de sodium est altéré ou quand le Na^+ est négligeable ou absent du milieu d'incubation, la présence de Cl^- du côté externe des vésicules n'est pas suffisante pour stimuler le transport de la glycine ou de l'AIB. En outre, Balocco *et al.* (1993) ont démontré que le transport de la méthionine par l'intestin du poisson *Dicentrarchus labrax* nécessite la présence de l'ion chlorure dans le milieu. Par ailleurs, la dépendance au chlore peut refléter un besoin en ion Cl^- comme catalyseur du transporteur sodium-dépendant (Munck, 1993). En ce qui concerne le transport de la méthionine par l'intestin de la daurade, il est permis de penser que ce transport est sodium-dépendant puisque l'absence de sodium annule toute variation des paramètres électriques enregistrés à la suite de l'addition de cet acide aminé. Aussi, il est probable que le transport de la méthionine est chlore-dépendant mais avec une stœchiométrie où les ions chlorure seront en nombre plus important que le sodium, ce qui expliquerait la baisse du courant qui suit immédiatement l'application de la méthionine au côté muqueux de l'intestin.

La dépendance du transport des acides aminés a été analysée par Munck et ses collaborateurs chez différentes espèces de mammifères telles que le rat (Munck et Munck, 1994a ; Munck, 1995a), le porc (Munck et Munck, 1994a ; Munck, 1995a ; Munck *et al.*, 1995), le lapin (Munck et Munck, 1990, 1992a, 1992b, 1992a, 1997 ; Munck, 1993) et l'homme (Munck, 1995b). Les auteurs ont mis en évidence la présence de transporteurs sodium-chlore dépendants tel que l'imino acide transporteur, le β amino acid transporteur et le β alanine transporteur appelé aussi $\text{B}^{\text{o,+}}$ chez le lapin (Munck et Munck, 1994b, 1994c), l'imino acide transporteur, le β amino acid transporteur chez le porc (Munck et Munck, 1994b ; Munck, 1995a) et chez l'homme (Munck, 1995b).

Les auteurs ont analysé la stœchiométrie de ces transporteurs. Elle est en général de $2\text{Cl}^- - 1\text{Na}^+ - 1$ acide aminé chez le rat, le porc et le lapin (Munck et Munck, 1994a ; Munck, 1995a) et chez l'homme (Munck, 1995b). Il est probable que l'intestin de *Sparus aurata* possède un transporteur sodium-chlore dépendant avec une stœchiométrie identique à celle qui est mise en évidence chez le lapin et l'homme. En tenant compte de la nature de l'acide aminé en question le plus probable sera le β amino acid transporteur.

RÉFÉRENCES

- BALOCCO C., BOGÉ G. & H. ROCHE, 1993. - Neutral amino acid transport by marine fish intestine. Role of the side chain. *J. Comp. Physiol.*, 163B: 340-347.
- BERTRAN J., TESTAR X., ZORZANO A. & M. PALACIN, 1994. - A new age for mammalian plasma membranes amino acid transport. *Cell Physiol. Biochem.*, 4: 217-214.
- BOGÉ G. & A. RIGAL, 1981. - A chloride requirement for Na^+ -dependent amino-acid transport by brush border membrane vesicles isolated from the intestine of a Mediterranean teleost (*Boops salpa*). *Biochim. Biophys. Acta*, 649: 455-461.
- BOGÉ G., RIGAL A. & G. PÉRÈS, 1982. - A study of energized transport mechanisms of glycine absorption by the rainbow trout (*Salmo gairdnerii* R.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 64A: 537-541.
- BOGÉ G., RIGAL A. & G. PÉRÈS, 1983. - Analysis of two chloride requirements for sodium-dependent amino acid and glucose transport by intestinal brush-border membrane vesicles of fish. *Biochim. Biophys. Acta*, 729: 209-218.
- BOGÉ G., ROCHE H. & G. PÉRÈS, 1985. - Role of chloride ions in glycine transport in a sea fish, the bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biochim. Biophys. Acta*, 820: 122-130.
- CHRISTENSEN H.N., 1985. - On the strategy of kinetic discrimination of amino acid transport systems. *J. Membr. Biol.*, 84: 97-103.
- GUNTER-SMITH P.J., GRASSET E. & S.G. SCHULTZ, 1982. - Sodium-coupled amino acid and sugar transport by *Necturus* small intestine: An equivalent electrical circuit analysis of a rheogenic co-transport system. *J. Membr. Biol.*, 66: 25-39.
- LAHLOU B. & M. AVELLA, 1993. - Electrolyte transport mechanisms in fish intestine. *In: Advances in comparative and environmental Physiology*, 16: 1-25. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- MUNCK L.K., 1993. - Cotransport of 2-methyl-aminoisobutyric acid and chloride in rabbit small intestine. *Am. J. Physiol.*, 265: G979-G986.
- MUNCK L.K., 1995a. - Chloride-dependent amino acid transport in the small intestine, occurrence and significance. *Biochim. Biophys. Acta*, 1241: 195-214.
- MUNCK L.K., 1995b. - Chloride-dependent amino acid transport in the human small intestine. *Gut*, 36: 215-219.
- MUNCK L.K., GRØNDAHL M.L. & E. SKADHAUGE, 1995. - Beta-amino acid transport in pig small intestine in vitro by a high-affinity, chloride-dependent carrier. *Biochim. Biophys. Acta*, 1238: 49-56.
- MUNCK L.K. & B.G. MUNCK, 1990. Chloride-dependence of amino acid transport in rabbit ileum. *Biochim. Biophys. Acta*, 1027: 17-20.

- MUNCK L.K. & B.G. MUNCK, 1992a. - The rabbit jejunal imino carrier and the ileal imino acid carrier describe the same epithelial function. *Biochim. Biophys. Acta*, 1116: 91-96.
- MUNCK L.K. & B.G. MUNCK, 1992b. - Distinction between chloride-dependent transport systems for taurine and β -alanine in rabbit ileum. *Am. J. Physiol.*, 262: G609-G615.
- MUNCK L.K. & B.G. MUNCK, 1994a. - Chloride-dependent intestinal transport of imino and β -amino acids in the guinea pig and rat. *Am. J. Physiol.*, 266: R997-R1007.
- MUNCK L.K. & B.G. MUNCK, 1994b. - Amino acid transport in the small intestine. *Physiol. Res.*, 43: 335-346.
- MUNCK L.K. & B.G. MUNCK, 1994c. - Transport of glycine and lysine on the chloride-dependent β -alanine (B^{0+}) carrier in rabbit small intestine. *Biochim. Biophys. Acta*, 1235: 93-99.
- MUNCK L.K. & B.G. MUNCK, 1997. - Na^+ -independent transport of bipolar and cationic amino across the luminal membrane of the small intestine. *Am. J. Physiol.*, 272: R1060-R1068
- NELSON H. & G. RUDNICK, 1982. - The role of chloride ion in platelet serotonin transport. *J. Biol. Chem.*, 257: 6151-6155.
- PATERSON J.V.F., SEPULVEDA F.V. & M.W. SMITH, 1980. - A sodium independent low affinity transport system for neutral amino acids in rabbit ileal mucosa. *J. Physiol.*, 298: 333-346.
- SAIDANE D., TRITAR B. & B. LAHLOU, 1999. - Caractéristiques électrophysiologiques du transport des acides aminés par l'intestin isolé de *Rana esculenta*. *Ichthyophysiol. Acta*, 22 : 117-135.
- STEVENS B.R., KAUNITZ J.D. & E.M. WRIGHT, 1984. - Intestinal transport of amino acids and sugars: Advances using membrane vesicles. *Annu. Rev. Physiol.*, 46: 417-433.
- USSING H.H. & K. ZERAHN, 1951. - Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol. Scand.* 23: 110-127.
- VIDAVER G.A. & S.L. SHEPHERD, 1968. - Transport of glycine by hemolysed and restored pigeon red blood cells. *J. Biol. Chem.*, 243: 6140-50.
- VILELLA S., AHEARN G.A., CASSANO G., MAFFIA M. & C. STORELLI, 1990. - Lysine transport by brush border membrane vesicles of eel intestine: Interaction with neutral amino acids. *Am. J. Physiol.* 259 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 28): R1181-R1188.
- WHITE J.F., 1977. - Activity of chloride in absorptive cells of *Amphiuma* small intestine. *Am. J. Physiol.* 232: E553 - E559.
- WHITE J.F. & C.F. HINTON, 1988. - Norepinephrine induces Na^+H^+ and $Cl^-HCO_3^-$ -exchange in *Amphiuma* intestine: Locus and response to amiloride. *Am. J. Physiol.* 255 (Gastrointes. Liver Physiol. 18): G18 - G22.