

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE CONSTANTINE
INSTITUT DE NUTRITION, ALIMENTATION ET TECHNOLOGIE AGRO-ALIMENTAIRE

N° :
Série :

THESE

PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU
DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES

(Option Physiologie de la Nutrition)

par

Abdel-Nacer AGLI

Ingénieur Agronome (INA)
Magister en Nutrition (INATAA)
Docteur en Physiologie (ULP Strasbourg I)

PARTICIPATION DES ERYTHROCYTES AUX ECHANGES INTERORGANES DES ACIDES AMINES

Soutenue le 09 novembre 1998

Devant le Jury :

Président :	A. ABERKANE	Prof.	INESSM - Constantine
Rapporteur :	B. AZZOUT	Prof.	INA - Alger
Dir. de recherche :	A. SCHAEFER	MCU-PH.	ULP - Strasbourg
Examineurs :	C. BENLATRECHE	Prof.	INESSM - Constantine
	H. MEHDIQUI	Prof.	INESSM - Constantine
	B. CANGUILHEM	Prof.	ULP - Strasbourg

AGL
3152

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE CONSTANTINE
INSTITUT DE NUTRITION, ALIMENTATION ET TECHNOLOGIE AGRO-ALIMENTAIRE

N° :
Série :

THESE

PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU
DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES

(Option Physiologie de la Nutrition)

par

Abdel-Nacer AGLI

Ingénieur Agronome (INA)
Magister en Nutrition (INATAA)
Docteur en Physiologie (ULP Strasbourg II)

**PARTICIPATION DES ERYTHROCYTES AUX ECHANGES
INTERORGANES DES ACIDES AMINES**

Soutenu le

Devant le Jury :

Président :	A. ABERKANE	Prof.	INESSM - Constantine
Rapporteur :	B. AZZOUT	Prof.	INA - Alger
Dir. de recherche :	A. SCHAEFER	MCU-PH.	ULP - Strasbourg
Examineurs :	C. BENLATRECHE	Prof.	INESSM - Constantine
	H. MEHDIOUI	Prof.	INESSM - Constantine
	B. CANGUILHEM	Prof.	ULP - Strasbourg

à mon épouse qui a su patienter

à RIADH et TINHINAN, nos
enfants que cette thèse puisse
être pour vous un exemple de
travail, de rigueur et de
persévérance

à mes parents, en remerciement

à mes maîtres,
Youcef SEBTI
Lavu KRISHNA RAO,
Bernard CANGUILHEM,
Pascal HABEREY,
Bernard METZ

à mes étudiants

AVANT-PROPOS et REMERCIEMENTS

Cette thèse est un des fruits d'une longue collaboration entre l'INATAA et l'institut de Physiologie de la faculté de Médecine de Strasbourg. Il est pour nous l'occasion d'exprimer notre reconnaissance à celles et à ceux qui ont permis sa réalisation et qui ont accepté de la juger.

Monsieur Adrien SCHAEFER, en manifestant une patience sans limites à notre égard, il n'a cessé de nous conseiller avec la plus grande bienveillance tout au long de ce travail, qu'il soit ici très chaleureusement remercié.

Monsieur le Professeur Belkacem AZZOUT, ses vastes connaissances dans le domaine scientifique nous ont guidé. Qu'il veuille trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

Monsieur François PIQUARD qui a été associé directement à toutes les étapes de ce travail, ses précieux conseils nous ont soutenu durant nos travaux. Merci.

Monsieur le Professeur Pascal HABEREY et Monsieur le Professeur Bernard CANGUILHEM nous ont accueilli au sein de l'Institut de Physiologie de la Faculté de médecine de Strasbourg. C'est auprès de vous que ma vocation de chercheur a mûri. Merci.

Monsieur le Professeur ABERKANE Abdelhamid, nous a fait l'honneur de juger cette thèse et d'en présider le jury. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre profonde et respectueuse gratitude.

Nous sommes très sensibles à l'honneur que nous ont fait Mademoiselle le professeur BENLATRECHE Chérifa et Monsieur le Professeur MEHDIOUI Hacène d'avoir bien voulu siéger au jury de cette thèse, qu'ils trouvent ici nos plus vifs remerciements.

Tous les membres de l'INATAA et de l'institut de Physiologie de la faculté de Médecine de Strasbourg qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à l'accomplissement de cette thèse, nous tenons à vous remercier.

SOMMAIRE

	page
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1. REVUE DE LA LITTERATURE SUR LE TRANSPORT ERYTHROCYTAIRE DES ACIDES AMINES	6
1.1. INTRODUCTION	6
1.2. PROBLEMES POSES PAR LA PARTICIPATION DES GLOBULES ROUGES DANS LA DETERMINATION DES DIFFERENCES ARTERIO-VEINEUSES	8
1.3. PARTICIPATION DES ERYTHROCYTES AUX ECHANGES INTER-ORGANES	11
1.4. PERMEABILITE ET TRANSFERT DES ACIDES AMINES AU NIVEAU DE LA MEMBRANE ERYTHROCYTAIRE	15
1.4.1. Rappel Historique	15
1.4.2. Concepts actuels	17
1.4.3. Les systèmes de transport	19
1.4.3.1. Système ASC	19
1.4.3.2. Système A	22
1.4.3.3. Système GLY	22
1.4.3.4. Système L	23
1.4.3.5. Système N	24
1.4.3.6. Système T	24
1.4.3.7. Système pour la proline	25
1.4.3.8. Système γ^+	25
1.4.3.9. Système γ^+L	26
1.4.3.10. Système pour les acides aminés anioniques	27
1.4.3.11. Bande 3	27
1.4.3.12. Canaux	28
1.4.3.13. Transport des oligopeptides	28
CHAPITRE 2. MATERIEL ET METHODES	30
2.1. TECHNIQUES DE DOSAGE DES ACIDES AMINES	30
2.1.1. Principes généraux	30
2.1.1.1. Séparation des acides aminés	30
2.1.1.2. Détection et quantification	32
2.1.2. Préparation des échantillons	33
2.1.2.1. Acides aminés plasmatiques	33
2.1.2.2. Acides aminés totaux sanguins	33
2.1.3. Variabilité de la méthode de dosage des acide aminés	35

2.2. CALCULS DES CONCENTRATIONS	37
2.3. METHODES STATISTIQUES	38
CHAPITRE 3. INTERVENTION DES ERYTHROCYTES DANS LE TRANSPORT SANGUIN DES ACIDES AMINES CHEZ LE RAT	40
3.1. EFFET DE VARIATIONS DES CONCENTRATIONS DES ACIDES AMINES PLASMATIQUES SUR LE CONTENU INTRA- ERYTHROCYTAIRES DANS LE SANG DE RAT <i>IN VITRO</i>	40
3.1.1 Protocole expérimental	40
3.1.1.1. Animaux	41
3.1.1.2. Prélèvement de sang	41
3.1.1.3. Variation des concentrations plasmatiques	41
3.1.1.4. Calculs	42
3.1.2. Résultats	43
3.1.2.1. Comparaison entre les concentrations dans le sang total, le plasma et les érythrocytes	43
3.1.2.2. Distribution des acides aminés entre le plasma et les érythrocytes dans le sang normal et après variation de la concentration plasmatique	45
3.1.2.3. Rapports érythrocytes sur plasma (E/P)	48
3.1.2.4. Comparaison des concentrations globulaires	50
3.1.2.5. Relations entre les concentrations plasmatiques et globulaires ..	51
3.1.2.5.1. Relations globales entre les concentrations plasmatiques et érythrocytaires	51
3.1.2.5.2. Relations pour chaque échantillon suivant la situation (NOR, DIL, CON)	51
3.1.3. Discussion	56
3.1.3.1. Distribution des acides aminés dans le plasma et les globules rouges	57
3.1.3.1.1. Distribution en situation initiale physiologique	58
3.1.3.1.2. Variations des distributions suite aux variations des concentrations plasmatiques	60
3.1.3.2. Variations des teneurs globulaires suite aux variations des teneurs plasmatiques	61
3.1.3.3. Relations plasmatiques et érythrocytaires	64
3.1.3.3.1. Relations plasmatiques et érythrocytaires globales	64
3.1.3.3.2. Relations selon le sens de la variation de la concentration plasmatique	66
3.1.4. Conclusions	68
3.2. PARTICIPATION DES ERYTHROCYTES AUX ECHANGES INTER- ORGANES DES ACIDES AMINES CHEZ LE RAT <i>IN VIVO</i>	70
3.2.1. Protocole expérimental	70
3.2.1.1. Animaux	70
3.2.1.2. Prélèvement de sang	70
3.2.1.3. Calculs	71
3.2.2. Résultats	71

3.2.2.1. Concentrations des acides aminés plasmatiques et sanguins totaux	73
3.2.2.2. Différences artério-veineuses plasmatiques et érythrocytaires . . .	73
3.2.2.3. Relations entre les concentrations plasmatiques et érythrocytaires	76
3.2.3. Discussion	78
3.3. SYNTHÈSE DES OBSERVATIONS CONCERNANT LES ÉCHANGES ÉRYTHROCYTAIRES CHEZ LE RAT	80
CHAPITRE 4. EFFETS D'UN APPORT EXOGENE PAR VOIE ORALE D'UNE CHARGE D'ACIDES AMINÉS SUR LES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES ET GLOBULAIRES AU COURS DE L'ABSORPTION CHEZ L'HOMME	85
4.1. PROTOCOLE EXPERIMENTAL	86
4.1.1. Les sujets	86
4.1.2. Cinétique et prélèvement de sang	87
4.1.3. Caractéristiques de la solution de surcharge en acides	88
4.1.4. Calculs des paramètres	89
4.1.4.1. Hématocrite réel, concentrations en acides aminés plasmatiques, sanguins totaux et globulaires	89
4.1.4.2. Constante de disparition, concentration initiale et volume de distribution corporel des acides aminés	90
4.2. RESULTATS	92
4.2.1. Concentrations de base en acides aminés au repos	92
4.2.1.1. Comparaison des concentrations en acides aminés entre les différents compartiments sanguins	93
4.2.2. Distributions basales des acides aminés plasmatiques et érythrocytaires	94
4.2.3. Cinétique des acides aminés suite à l'ingestion de 125 ml d'Azonutril 25	96
4.2.3.1. Cinétiques plasmatiques, sanguines totales et érythrocytaires . . .	96
4.2.3.2. Rapports de variations maxima des concentrations en acides aminés plasmatiques et érythrocytaires	106
4.2.3.3. Concentration initiale, clairance et volumes de distributions calculés	107
4.2.3.4. Variations des distributions des acides aminés dans les deux phases du sang au cours de l'absorption	108
4.2.3.5. Relations entre les concentrations en acides aminés plasmatiques et érythrocytaires	112
4.3. DISCUSSION	116
4.3.1. Concentrations basales des acides aminés au repos	116
4.3.2. Distributions basales des acides aminés plasmatiques et érythrocytaires	118

4.3.3. Cinétiques et distributions plasmatiques et érythrocytaires des acides aminés	120
4.3.3.1. Cinétiques plasmatiques et érythrocytaires	120
4.3.3.1.1. Métabolisme des acides aminés	123
4.3.3.2. Cinétique des distributions plasmatiques et érythrocytaires des acides aminés	130
4.3.4. Relations entre les concentrations des acides aminés plasmatiques et érythrocytaires	131
4.3.5. Synthèse - conclusions	135
 CONCLUSIONS GENERALES	 137
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	142
RESUMES	154

FIGURES ET TABLEAUX

	page
Figure 1 : Aminogramme obtenu à l'aide de la technique décrite	34
Figure 2 : Distributions moyennes des acides aminés entre le plasma et les érythrocytes, dans le sang normal, dans le sang dilué et dans le sang concentré	47
Figure 3 _{a,b} : Relations entre les concentrations plasmatiques et érythrocytaires	54-55
Figure 4 : Différences artério-veineuses des concentrations d'acides aminés déterminées dans le plasma, le sang total et les érythrocytes	75
Figure 5 : Relations entre les concentrations plasmatiques et érythrocytaires	77
Figure 6 : Exemple de représentation semi-logarithmique de la concentration de la méthionine en fonction du temps	92
Figure 7 : Distribution moyenne basale des acides aminés entre le plasma et les érythrocytes en p. cent du sang total	95
Figure 8 _{a,b,c} : Evolution en fonction du temps des concentrations moyennes des acides plasmatiques	100-102
Figure 9 _{a,b,c} : Evolution simultanée en fonction du temps des concentrations moyennes des acides aminés plasmatiques, sanguins totaux et érythrocytaires	103-105
Figure 10 _{a,b,c} : Evolution en fonction du temps des distributions des concentrations en acides aminés plasmatiques et érythrocytaires	110-112
Figure 11 _{a,b} : Relations entre les concentrations plasmatiques et érythrocytaires	114-115
Figure 12 : Cycles des échanges des acides aminés entre divers organes chez l'homme en état post-absorptif	124

Tableau 1 _a : Principales caractéristiques cinétiques de transport de la membrane érythrocytaire de 6 acides aminés	18
Tableau 1 _b : Systèmes de transports passifs pour les acides aminés dans les érythrocytes humains	18

Tableau 1 _c :	Systèmes de transports secondairement actifs pour les acides aminés dans les érythrocytes humains	19
Tableau 2 :	Rapports moyens entre la surface de chaque acide aminé et celle du standard interne	36
Tableau 3 :	Concentrations moyennes des acides aminés dans le plasma, le sang total et les érythrocytes avant et après concentration ou dilution plasmatique	44
Tableau 4 :	Distributions moyennes des acides aminés entre le plasma et les érythrocytes en pour cent du sang total normal, dilué ou concentré	46
Tableau 5 :	Rapports des contenus érythrocytaires sur les contenus plasmatiques, dans le sang normal, le sang dilué et le sang concentré	49
Tableau 6 :	Paramètres des relations entre les contenus plasmatiques et érythrocytaires d'acides aminés	52
Tableau 7 :	Concentrations moyennes d'acides aminés du plasma, du sang total et des érythrocytes, déterminées dans l'artère et dans la veine porte	72
Tableau 8 :	Moyennes des différences artério-veineuses des concentrations d'acides aminés déterminées dans le plasma, dans le sang total et dans les érythrocytes	74
Tableau 9 :	Paramètres des relations entre les concentrations des acides aminés plasmatiques et érythrocytaires déterminés dans les sang artériels et veineux	76
Tableau 10 :	Caractéristiques de base des sujets	86
Tableau 11 :	Composition de la solution d'AZONUTRIL 25	89
Tableau 12 :	Concentrations basales moyennes plasmatiques, sanguines totales et érythrocytaires	93
Tableau 13 :	Distribution basale moyenne des acides aminés entre le plasma et les érythrocytes	94
Tableau 14 _a :	Evolution en fonction du temps des concentrations moyennes plasmatiques suite à l'ingestion de 125 ml d'Azonutril 25	97
Tableau 14 _b :	Evolution en fonction du temps des concentrations moyennes sanguines totales suite à l'ingestion de 125 ml d'Azonutril 25	98
Tableau 14 _c :	Evolution en fonction du temps des concentrations moyennes érythrocytaires suite à l'ingestion de 125 ml d'Azonutril 25	99

Tableau 15 : Rapports moyens des variations maxima des concentrations en acides aminés en p. cent de la concentration initiale et temps correspondants déterminés au cours des cinétiques plasmatiques et érythrocytaires	107
Tableau 16 : Paramètres cinétiques des acides aminés plasmatiques	108
Tableau 17 : Evolution en fonction du temps de la distribution moyenne des concentrations en acides aminés plasmatiques	109
Tableau 18 : Relations entre les concentrations des acides aminés plasmatiques et érythrocytaires	113

INTRODUCTION

Le choix d'un sujet de recherche est souvent lié au contexte du laboratoire ou, comme dans notre cas, à celui de l'institut dans lequel on exerce ses fonctions. C'est ainsi, exerçant les nôtres à l'INATAA, nous avons été amené à nous intéresser aux acides aminés et à leurs implications métaboliques et physiologiques.

Les cellules de l'organisme animal ne sont pas nourries par un simple flux aléatoire de nutriments libérés par le tractus digestif. Après digestion et absorption, les nutriments sont répartis à travers tout l'organisme et sont utilisés par les différents organes. Pour connaître, physiologiquement, le devenir de ces nutriments il importe d'abord de comprendre comment leur répartition est assurée.

Les besoins généraux d'un organisme représentent indubitablement un profil permettant aux flux nécessaires aux divers tissus d'être établis et maintenus. La connaissance de ces besoins ne nous renseigne cependant pas complètement sur les flux et sur les modalités de leur contribution à une nutrition efficiente qui permet à chaque partie un fonctionnement optimal et parfaitement coordonné. Il est donc nécessaire de comprendre comment chaque organe et chaque type de cellule est nourri par des flux à partir d'autres tissus du même organisme. Dans la régulation des échanges inter-organes de nutriments, les systèmes de transports transmembranaires jouent un rôle essentiel.

L'étude des échanges sanguins inter-organes des nutriments se base habituellement sur la connaissance des flux d'approvisionnement et d'utilisation de ces substrats au niveau de chaque organe (loi de Fick). Souvent, par commodité de dosage, on se contente de tenir compte uniquement des différences artérioveineuses plasmatiques. En procédant de cette manière, on considère les éléments figurés du sang comme des particules neutres ne participant aucunement à la fonction de transport. Néanmoins, le développement des techniques d'analyse a permis de préciser que les érythrocytes, à côté du plasma, intervenaient également dans le transport des nutriments tels le glucose et les acides aminés.

Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés aux acides aminés pour les rôles multiples qu'ils jouent dans les processus biologiques. Ils sont à la fois des substrats énergétiques et des constituants de base des protides. Des composés aussi divers que les enzymes, les hormones et les instruments moléculaires, grâce auxquels l'information génétique est organisée, sont fabriqués par l'organisme à partir des acides aminés. Ils sont responsables de plusieurs fonctions dans les systèmes biologiques (structure, métabolisme intermédiaire, neurotransmission,...). Le développement de l'organisme et le maintien de son intégrité sont tributaires d'un approvisionnement équilibré et quantitativement suffisant en certains de ces acides aminés dits "indispensables".

Ainsi, la détermination du profil des acides aminés plasmatiques est devenue de plus en plus importante dans l'évaluation des besoins nutritionnels des patients. Des supplémentations de la nutrition en acides aminés tels la glutamine, l'arginine et les acides aminés à chaînes branchées ont pu alors être envisagées. Les effets bénéfiques de ces pratiques sur l'état nutritionnel des patients ont stimulé les cliniciens et les chercheurs à étudier les acides aminés dans divers états normaux ou pathologiques.

Le métabolisme des acides aminés, impliquant fortement les échanges inter-organes de nutriments, détermine l'état nutritionnel de l'organisme. L'étude du métabolisme des nutriments est indissociable de celui des acides aminés, lesquels sont dominants dans les échanges inter-organes. De nombreuses fonctions peuvent, jusqu'à un certain point, être définies par les acides aminés circulants, ce qui nécessite l'examen de leur concentration dans les différents compartiments du sang.

Pour les échanges inter-organes des acides aminés, les données de la littérature semblent encore très controversées. Ainsi, non seulement les modalités de transport dépendent de la nature de l'acide aminé considéré, mais encore les différences interspécifiques et la diversité des procédures expérimentales utilisées introduisent une complexité supplémentaire.

Les calculs des échanges avec seulement les différences artério-veineuses plasmatiques et non sanguines totales, pourraient être erronés. En réalité, les érythrocytes contiennent la plupart des acides aminés à des concentrations comparables ou supérieures à celle du plasma, et des échanges ont lieu entre le plasma et les érythrocytes dans les tissus ou les organes.

Les premiers travaux sur la perméabilité de la membrane érythrocytaire aux acides aminés *in vitro* (WINTER et CHRISTENSEN 1964) ont montré que les échanges plasma-globules sont assez lents et diffèrent selon l'acide aminé considéré. Ainsi, durant le temps où le sang est en contact avec l'organe, il y aurait semble-t-il peu de chances que les échanges aient lieu.

D'autres travaux par contre, menés sur l'homme et les animaux, utilisant des prélèvements artério-veineux de divers organes, montrent l'évidence d'une participation active des érythrocytes aux échanges des acides aminés entre le sang et les tissus. Cela implique que la capture ou la libération des acides aminés par les érythrocytes est plus rapide *in vivo* que *in vitro*.

Ces travaux montrent que certains acides aminés sont transportés par les globules rouges, tandis que d'autres ne le sont pas. Par exemple, des contradictions existent quant au transport de l'alanine chez l'homme, lequel est négligeable pour WINTER et CHRISTENSEN (1964), mais actif pour FELIG et coll. (1973). Les érythrocytes participeraient aux transports inter-organes d'acides aminés anioniques chez l'humain, le chien et la brebis (AOKI et coll. 1972 ; ELWYN et coll. 1972 ; HEITMANN et BERGMAN 1980a), alors que la présence du système de transport spécifique des acides aminés anioniques n'est pas démontrée dans les érythrocytes d'autres mammifères.

Le problème du transfert érythrocytaire des acides aminés doit être placé dans le contexte beaucoup plus large de celui de la participation des éléments figurés du sang au transfert des substrats. Si pour l'O₂ et le CO₂, la fonction de transport des globules rouges est bien définie, elle l'est bien moins pour les autres substances que l'on peut trouver dans le sang.

La prise en compte ou non du contenu érythrocytaire en acides aminés est fonction du but recherché par le dosage.

Pour un usage clinique de routine, en vue de déceler une éventuelle perturbation métabolique, on compare les valeurs obtenues avec celles de références déterminées dans les mêmes conditions. Le dosage dans le plasma semble alors suffisant.

Par contre, si on est amené à déterminer des échanges d'acides aminés à partir de différences artério-veineuses au niveau d'un organe, ou à établir des bilans précis de flux pour des investigations nutritionnelles ou autres, le problème est plus complexe. Il est alors indispensable de tenir compte de cette hétérogénéité que présente le sang d'être composé de deux phases distinctes, cellulaire et plasmatique.

Ainsi, négliger la fraction éventuellement transportée par les érythrocytes, si elle n'est pas nulle, sous-estimera alors les échanges. Cette sous-estimation peut atteindre 50 p. cent si la capacité de transport des érythrocytes est équivalente à celle du plasma ou beaucoup plus si la capacité de transport est supérieure. Il semble donc qu'il soit indispensable de tenir compte des globules rouges dans les études d'échanges inter-organes.

Les divergences relevées à propos du transport érythrocytaire des acides aminés, imputables notamment aux différences méthodologiques et interspécifiques, nécessitent davantage d'études critiques.

Le but de notre travail est de préciser la participation des érythrocytes aux échanges inter-organes d'acides aminés, autant du point de vue quantitatif que qualitatif. Trois expériences ont été entreprises où la détermination simultanée des concentrations plasmatiques et sanguines totales a permis de calculer les

concentrations érythrocytaires. En expérimentation animale deux expériences ont été menées chez le rat pour confronter entre elles les méthodes *in vitro* à celles *in vivo*. Une troisième expérience, menée chez l'homme, avait pour but de préciser l'importance et les modalités du transport érythrocytaire ainsi que de mettre en évidence d'éventuelles différences interspécifiques en comparant les résultats obtenus avec ceux observés précédemment chez le rat.

Dans la première expérience, *in vitro* chez le rat, nous avons cherché à simuler les échanges d'acides aminés lorsque le sang traverse un organe et que des acides aminés y sont relâchés ou prélevés.

Dans la deuxième expérience, *in vivo* chez le rat, les différences de concentrations entre le sang artériel et celui de la veine porte reflètent les échanges se produisant au niveau de l'intestin. La comparaison entre le sang provenant d'une artère à celui de la veine porte a été mise à profit pour préciser la participation du plasma et des érythrocytes aux échanges d'acides aminés lors de l'enrichissement sanguin en acides aminés dans l'intestin durant l'état post prandial.

Dans la troisième expérience, réalisée *in vivo* chez l'homme, nous avons étudié les cinétiques ainsi que les relations plasmatiques et érythrocytaires des acides aminés au cours de l'absorption intestinale suite à une surcharge par voie entérale.

CHAPITRE 1

REVUE DE LA LITTÉRATURE SUR LE TRANSPORT ERYTHROCYTAIRE DES ACIDES AMINES

1.1. INTRODUCTION

Une importante littérature est disponible sur la pompe à sodium, le système de transport du glucose, la capnophorine (transporteur des anions Bande 3) et même sur les transporteurs de nucléosides et de la choline. Il est par conséquent surprenant que jusqu'à présent, relativement peu d'attention soit accordée à la participation des globules rouges au transport circulatoire des acides aminés. Cela a été longtemps un sujet de controverse. Deux questions insuffisamment considérées semblent à l'origine de cette désaffection : de quels acides aminés et de quelles espèces s'agit-il ?

Les premières études considéraient seulement les acides aminés plasmatiques comme représentatifs des teneurs en acides aminés sanguins. Actuellement, il est admis que les érythrocytes, ensemble avec le plasma, véhiculent les acides aminés lors des échanges entre les tissus (ELWYN 1966 ; ELWYN et coll 1972 ; AOKI et coll. 1972 ; FELIG et coll. 1973 ; ELLORY 1987 ; PICÓ et coll. 1994_a).

Il est peut être à-propos de considérer pourquoi les globules rouges transportent des acides aminés. Il y a plusieurs raisons évidentes. La biosynthèse du glutathion, active dans les globules rouges, exige une fourniture adéquate en trois acides aminés précurseurs, cystéine, glycine et glutamate. Cela suggère immédiatement des systèmes de transports ayant des spécificités aux substrats très différentes. D'autres possibilités incluent :

I - La présence des systèmes de transport des acides aminés dans la membrane globulaire, reliquat fonctionnel des besoins du réticulocyte, précurseur de l'érythrocyte quant à la synthèse protéique.

II - L'idée controversée de ELWYN (1966) et ELWYN et coll. (1972) d'un transfert direct érythrocytes-tissus des acides aminés, notion encore critiquée par plusieurs auteurs.

III - Les acides aminés peuvent être des substrats "accidentels" pour d'autres systèmes de transport, comme pour le transport de la glycine par la Bande 3 (YOUNG et coll. 1981 ; ELLORY 1987), mais il peut y avoir d'autres cas tel le transporteur de la choline.

Une autre controverse est la définition récente d'un transport de peptide dans la membrane de l'érythrocyte (BANKS et KASTIN 1990 ; LOCHS et coll. 1990 ; BACKWELL et coll. 1994). Ceci conduit à la notion radicale du transport des acides aminés dans les érythrocytes pour l'exportation des produits de digestion des peptides.

Les acides aminés, groupe de solutés organiques (acides aminés, polyols, méthylamines), sont utilisés par les cellules animales pour élever la pression osmotique interne sans perturber les fonctions cellulaires normales (YANCEY et coll. 1982). Le transport de la glycine, du glutamate et de la taurine est important dans la régulation du volume des érythrocytes nucléés chez le poisson (GILLES 1975 ; HAYNES et GOLDSTEIN 1993 ; GOLDSTEIN et MUSH 1994) et les oiseaux (SHIHABI et coll. 1989). Egalement, les acides aminés interviennent dans la régulation cellulaire au niveau du cerveau et de la médulla surrénale des mammifères (CHAMBERLAIN et STRANGE 1989). Actuellement, il est prouvé que les acides aminés servent cette même fonction d'osmolytes cellulaires chez les animaux terrestres comme le chien (HORIO et coll. 1997).

Diverses fonctions des acides aminés (composants protéiques, métabolisme intermédiaire, précurseurs de neurotransmetteurs et neurotransmetteurs), peuvent être dans une grande mesure déterminés par les acides aminés circulant, impliquant différents compartiments biologiques. Des situations physiologiques et pathologiques, telles que le jeûne (PICÓ et coll. 1994_a, 1995), la gestation (CETIN et coll. 1991) ou l'obésité (GIANOTTI et coll. 1990 ; PICÓ et coll. 1994_b), interviennent dans la modification des acides aminés globulaires et les gradients des acides aminés érythrocytes-plasma.

Plus encore, il a été récemment démontré que deux compartiments des acides aminés peuvent être distingués dans les globules rouges : aminoacides

intracellulaires et ceux attachés ou adsorbés à la membranes cellulaire (PICÓ et coll. 1991 ; PROENZA et coll. 1994).

Pour un usage clinique, les acides aminés sont généralement déterminés dans le plasma ou le sérum, mais certains auteurs suspectant un transport au niveau des globules rouges, préconisent le dosage dans le sang complet. Dans les déterminations de bilans nutritionnels entre autres, la seule considération des modifications de concentrations plasmatiques, entacherait ces déterminations.

1.2. PROBLEMES POSES PAR LA PARTICIPATION DES GLOBULES ROUGES DANS LA DETERMINATION DES DIFFERENCES ARTERIO-VEINEUSES

La question est de savoir dans quelle mesure le compartiment intra-érythrocytaire participe au transport des acides aminés d'un organe à un autre : s'il n'y participe pas, alors les différences artério-veineuses des concentrations plasmatiques expriment le prélèvement ou la fourniture d'acides aminés par l'organe considéré et, leur étant proportionnelles, en sont une sorte de mesure.

Les échanges d'acides aminés entre un organe et le sang total, englobant donc les érythrocytes, la seule procédure théoriquement correcte est de déterminer les différences artério-veineuses de concentrations dans le sang total après rupture des membranes érythrocytaires par hémolyse. Dans ce cas la quantité d'un acide aminé x (M_x) prélevée ou relâchée par l'organe par unité de temps est calculée à partir du produit de la différence artério-veineuse ($C_{sa_x} - C_{sv_x}$) et du débit du fluide vecteur (Q_s) (équation de Fick) :

$$M_x = Q_s.(C_{sa_x} - C_{sv_x})$$

où C_{sa_x} et C_{sv_x} sont les concentrations artérielles et veineuses de l'acide aminé déterminé dans le sang total hémolysé.

Mais la plupart des concentrations d'acides aminés sont généralement déterminées dans le plasma. La quantité d'un acide aminé x (M_x) échangée entre le sang et l'organe pendant l'unité de temps est souvent calculée à partir de la différence de concentration artério-veineuse plasmatique ($C_{pa_x} - C_{pv_x}$) :

$$M_x = Q.(C_{pa_x} - C_{pv_x})$$

Dans ce cas deux situations peuvent se présenter :

- Si Q est le débit sanguin (Qs), le sang est considéré comme un liquide homogène où les globules rouges se comportent comme le plasma qui a servi pour faire la mesure.
- Si Q est le débit plasmatique (Qp), celui-ci est calculé à partir du débit sanguin et de l'hématocrite (Ht) par l'équation :

$$Qp = Qs.(1 - Ht)$$

et la quantité (M_x) d'acide aminé échangée :

$$M_x = Qs.(1 - Ht).(C_{pa_x} - C_{pv_x})$$

sera uniquement celle qui correspond à la différence des concentrations plasmatiques en considérant que les érythrocytes n'interviennent pas dans les échanges.

Dans le premier cas, les globules rouges sont assimilés à du plasma. Dans le second ils sont considérés comme une substance inerte n'intervenant pas dans le transport des acides aminés. Ces situations ne constituent pas des extrêmes de sur- et sous-estimation des échanges. En effet une capacité de transport pour les érythrocytes supérieure à celle du plasma peut également être envisagée : les deux méthodes sous-estimeront alors les échanges.

Ainsi l'ignorance de la capacité de transport globulaire pour les acides aminés rend suspects d'erreur tous les calculs d'échanges inter-organes réalisés à partir des seules concentrations plasmatiques.

Mais si du point de vue théorique la détermination dans le sang total après hémolyse, est amplement justifiée car elle permet de mesurer l'ensemble des échanges plasmatiques et globulaires, elle présente du point de vue pratique quelques inconvénients. L'hémolyse des globules rouges libère certes les acides aminés intracellulaires, mais également de nombreuses autres substances telles que l'hémoglobine, d'autres protéines, des fragments cellulaires et des enzymes susceptibles de perturber l'analyse ou d'agir directement sur les acides aminés plasmatiques. Ainsi, après hémolyse, il n'est plus possible de doser la cystine ; cet

acide aminé se fixe sur les protéines cellulaires et forme des liaisons covalentes par ponts disulfures. Il disparaît ainsi du milieu. Dans la cellule, la présence de glutathion, agent fortement réducteur, prévient cette réaction. De même l'hémolyse libère de l'arginase (PERRY et HANSEN 1969) qui provoque par hydrolyse une diminution incontrôlable de la concentration d'arginine.

A ces inconvénients s'ajoutent ceux dûs à la méthode utilisée pour pratiquer l'hémolyse. En comparant les trois principales méthodes d'hémolyse, ultrasonication, laquage, congélation-décongélation du sang, WOLFROM et ASPLUND (1976) ont montré qu'à ces trois traitements de fractions aliquotes d'un même échantillon de sang correspondaient, après des mesures chromatographiques en tous points identiques, des concentrations d'acides aminés différentes.

Enfin, les pics de fluorescence produits par le plasma après traitement à l'OPA sont pour l'essentiel dûs aux acides aminés. Le profil d'un aminogramme plasmatique diffère peu de celui d'une solution étalon qui ne contient que des acides aminés. Ceci n'est pas le cas de l'aminogramme sanguin : après hémolyse, malgré tout le soin apporté au cours de la préparation, de nombreuses substances réagissent avec l'OPA ce qui fait apparaître sur l'aminogramme des artefacts qui rendent l'estimation de la surface des pics beaucoup moins précise. Ainsi la dispersion des mesures augmente et avec elle les coefficients de variation. Cette dispersion rend beaucoup plus difficile la mise en évidence et encore plus l'estimation quantitative d'une différence artério-veineuse.

Ce sont toutes ces considérations techniques qui retentissent sur la précision des mesures qui ont conduit PITTS et coll. (1963) et de nombreux autres auteurs à préférer néanmoins le plasma au sang pour la détermination des acides aminés sanguins comme pour de nombreux autres substrats. En effet, il arrive que la dispersion plus importante des mesures effectuées avec du sang total masque un effet dont l'amplitude est comparable ou inférieure à la précision de la mesure. Cependant, se contenter de dosages plasmatiques à la manière de PITTS demeure possible, sous réserve d'estimer auparavant l'importance de la participation des érythrocytes au transport sanguin des acides aminés permettant d'évaluer la grandeur et le sens d'une éventuelle correction.

1.3. PARTICIPATION DES ERYTHROCYTES AUX ECHANGES INTER-ORGANES

Pour aborder l'étude de la participation des érythrocytes au transport sanguin des acides aminés, il est utile d'examiner en premier lieu comment ce problème a été considéré par d'autres auteurs.

L'étude des transports inter-organes des acides aminés qui a été développée dans les années soixante grâce à l'apparition des analyseurs automatiques permettant de doser simultanément presque tous les acides aminés, a surtout été réalisée sur le plasma. En effet la lenteur du passage des acides aminés du plasma vers les érythrocytes (WINTER et CHRISTENSEN 1964) comparé à la vitesse de la circulation sanguine dans un organe semblait rendre peu probable l'intervention des érythrocytes dans les échanges inter-organes. De plus le plasma, directement en contact avec les parois des capillaires, apparaissait être un point de passage obligé pour les acides aminés échangés entre les tissus et le sang. Du point de vue technique, le plasma qui sert déjà de support à la détermination de nombreux autres substrats présente également l'avantage d'être plus facile à manipuler et de nécessiter moins de traitements avant l'analyse que le sang total.

Les résultats de travaux de McMENAMY et Coll. (1960) et de WINTER et CHRISTENSEN (1964) laissaient supposer que les globules rouges jouaient un rôle relativement passif dans le métabolisme des acides aminés et que la constante temps de diffusion excluait tout rôle important pouvant être joué par les globules rouges dans le transport des acides aminés de l'intestin vers la périphérie et vice-versa. Le lent temps d'équilibre du transport des acides aminés à travers la membrane érythrocytaire, comme montré par ces études *in vitro* a conduit à la notion, largement soutenue, que les érythrocytes jouent un faible rôle, s'ils en jouent un, dans le transfert inter-organe des acides aminés. En conséquence, les études sur le métabolisme des acides aminés en conditions physiologiques aussi bien que pathologiques ont été généralement restreintes aux mesures des concentrations des acides aminés dans le plasma plutôt que dans le sang total.

Ainsi, beaucoup de travaux sur les échanges d'acides aminés entre tissus ont été réalisés en supposant que, soit le plasma, soit le sang était le compartiment permettant ces échanges. De nombreux auteurs considèrent que le compartiment des acides aminés libres plasmatiques est représentatif de celui des acides aminés libres circulants et que l'étude de leurs teneurs peut permettre d'apprécier l'état

nutritionnel (MUNRO 1972). Toutefois pour certains, il est préférable de réaliser l'étude sur le sang total (PION 1976). Les résultats des travaux comparatifs par rapport aux teneurs ont montré la complexité des phénomènes.

Entre temps, d'autres équipes de chercheurs ont montré le rôle des érythrocytes dans le transport des acides aminés. Des observations sur le flux de glutamate chez l'homme suggèrent un rôle dynamique des érythrocytes dans le transport de cet acide aminé à travers le tissu musculaire (AOKI et coll. 1972). Une évidence existe concernant l'effet du pool des acides aminés érythrocytaires sur l'ensemble des acides aminés circulants sanguins. Les acides aminés des érythrocytes sont activement échangés avec les pools des tissus, donc contribuent à la relation inter-organes des acides aminés (ELWYN et coll. 1972 ; FELIG et coll. 1973 ; HAGENFELDT et ARVIDSSON 1980).

Pour HOULIER et coll. (1991) les échanges d'acides aminés entre le plasma et les globules rouges sont peu actifs. Cependant les globules rouges joueraient un rôle spécifique au niveau des tissus ou organes. Ils participeraient principalement à l'approvisionnement des tissus digestifs en acides aminés, en revanche, ils recueilleraient les acides aminés libérés par le foie.

Mais ELWYN (1966) et ELWYN et coll. (1972) font état chez le chien éveillé d'un transport inter-organes d'acides aminés impliquant fortement les globules rouges, et donc, estiment-ils, d'échanges globulaires rapides, vingt fois supérieurs à ceux décrits *in vitro*. Ils postulent l'existence d'échanges directs par contact entre les érythrocytes et d'éventuelles cellules endothéliales spécialisées dans cette fonction au sein des tissus. Chez la même espèce, DREWES et coll. (1977) en analysant les différences artério-veineuses dans le plasma et le sang total lors d'expériences de perfusion d'encéphales, ont également montré que la prise en compte des seules valeurs plasmatiques entraînait une sous-estimation non négligeable des échanges qu'elle pourrait même masquer. Mais l'utilisation de sang dilué et des préparations d'organes isolés hypothèquent fortement les résultats de ces auteurs.

Chez les ovins, HEITMANN et BERGMAN (1980a,b), à partir de déterminations de différences artério-veineuses plasmatiques et de sang total pour divers organes ou territoires, ont corrélé la quantité échangée par le plasma avec celle du sang total. Les relations presque linéaires et les pentes ainsi obtenues leur permettent de conclure que la quantité d'acides aminés transportée par unité de

volume globulaire est très semblable à celle transportée par le plasma sauf pour la glutamine, le glutamate et la taurine pour lesquels elle est supérieure.

Enfin chez l'humain, FELIG et coll. (1973), en déterminant séparément des différences artério-veineuses d'acides aminés dans le plasma et le sang total obtenues au cours d'interventions chirurgicales, constatent également que les variations de concentrations plasmatiques ne suffisent pas pour rendre compte des différences déterminées avec le sang total pour ALA, THR, SER, MET, LEU, ILE, TYR et CIT. En général les différences artério-veineuses vont dans le même sens sauf pour la glutamine où celle déterminée entre l'artère et la veine porte est positive dans le plasma et négative pour les globules. Tout se passe comme si seuls les globules pouvaient transporter cet acide aminé. Les variations totales d'alanine qui représentent de 35 à 40 p. cent des échanges totaux semblent être dues pour 22 à 32 p. cent à des changements de concentration intra-érythrocytaires.

AOKI et coll. (1972, 1973) ont montré que dans le muscle humain, l'insuline augmentait sélectivement la prise en charge du glutamate par les érythrocytes et non par le plasma. De plus l'ingestion d'un repas protidique après un jeûne total de 6 semaines, augmente non seulement les acides aminés plasmatiques mais également, de manière plus lente, certains d'entre eux contenus dans les érythrocytes. Sont concernés THR, PRO, CIT, α AB, VAL, ILE, LEU, TYR, PHE, ORN et de manière moins marquée GLY, ALA et LYS. Néanmoins, ces auteurs attirent l'attention sur le rôle mineur joué par l'érythrocyte dans le transport car une augmentation totale de concentration de 1.2 mmoles/l dans le compartiment plasmatique ne se traduit que par une augmentation de 0.6 mmoles/l dans le compartiment globulaire et ceci au bout de 4 heures.

Malgré de grandes différences entre les espèces en regard de la prise de certains acides aminés par l'érythrocytes (YOUNG et ELLORY 1977), il est frappant de constater que l'entrée dans les érythrocyte de L-ALA est uniforme et que si le flux stéréospécifique de l'alanine (différence entre D- et L-ALA) est pris en compte le taux de prélèvement est presque le même pour toutes les espèces. Cela est conciliable avec la présence du système cystéine dans tous les globules rouges, mais avec des composants additionnels (ex. système pour longs acides aminés neutres) présents chez quelques espèces.

Des auteurs estiment que les globules rouges peuvent jouer un rôle hautement significatif dans le transport inter-organes de divers acides aminés,

particulièrement L-ALA, qui est un important substrat de la gluconéogenèse hépatique et qui peut aussi participer dans le transfert de l'ammoniac des tissus périphériques au foie (AOKI et coll. 1972 ; ELWYN et coll. 1972 ; FELIG et coll. 1973). La difficulté avec cette proposition est que la perméabilité des globules rouges aux acides aminés telle qu'elle est déterminée *in vitro* apparaît être trop lente pour permettre aux érythrocytes de fonctionner de cette façon (FELIG et coll. 1973). Aussi, les résultats des analyses cinétiques du prélèvement de L-ALA par les érythrocytes de l'homme sont également en défaveur de cette interprétation (WINTER et CHRISTENSEN 1964).

Devant ces contradictions, il s'avère qu'une réinvestigation de la cinétique de transport de L-ALA dans les érythrocytes (humains) est clairement souhaitable.

Ces travaux montrent clairement que les globules rouges sont impliqués dans le transport des acides aminés de plusieurs mammifères. Il faut donc considérer le fait que les mesures plasmatiques sous-estiment les taux réels de transport par un facteur au moins égal à l'hématocrite. Cependant, une controverse persiste concernant les aspects qualitatifs et quantitatifs du transport érythrocytaire des acides aminés. Certaines de ces controverses peuvent provenir des différences spécifiques et, au sein de la même espèce, des différences des sites explorés (région splanchnique, muscles,...). Mais des erreurs dues aux diverses méthodes utilisées pour analyser le sang total ne doivent pas être sous-estimées.

Les objections de PITTS et coll. (1963) à l'utilisation du sang total restent valides. Par exemple quelques acides aminés sont perdus dans les préparations analytiques. Les différences artério-veineuses sont plus basses et les flux sanguins sont plus élevés conduisant à une plus grande dispersion autour de la moyenne. Cependant, avec le sang total, l'avantage est de prélever moins de sang, permettant ainsi l'obtention de plus d'échantillons et donc plus faible est la variation intra-individuelle. D'ailleurs, le sang total est plus proche de l'état physiologique réel. Pour la détermination des acides aminés érythrocytaires, le plasma et le sang total doivent être analysés. Le traitement de l'échantillon et sa conservation avant l'analyse constituent une autre source d'erreurs (SCHAEFER et coll. 1987 ; VAN EIJK et coll. 1994).

L'ensemble de ces travaux brièvement résumés qui concluent tous à l'intervention des érythrocytes dans le transport sanguin des acides aminés, demeure néanmoins très imprécis et souvent contradictoire. Même en écartant ceux

qui ont été réalisés chez d'autres espèces que l'homme, pour éviter d'éventuelles différences interspécifiques, le transport globulaire de l'alanine, par exemple, est important pour certains auteurs (FELIG et coll. 1973) et beaucoup moins important pour les autres (AOKI et coll. 1972). Les échanges lents observés par AOKI et coll. (1973) sont en accord avec ceux décrits *in vitro* par WINTER et CHRISTENSEN (1964). Mais si l'on détermine des différences artério-veineuses d'un organe, il faut tenir compte du fait que le sang n'y séjourne que très peu de temps ; la question que l'on peut se poser est celle de la possibilité qu'ont, dans ce court laps de temps, les acides aminés de parvenir et de pénétrer dans les cellules sanguines. A part le mécanisme proposé par ELWYN et coll. (1972) chez le chien qui n'a pas été confirmé à ce jour ou envisagé pour une autre espèce, seul un passage très rapide entre le plasma et les érythrocytes à travers la membrane érythrocytaire pourrait expliquer une participation importante des globules rouges aux échanges inter-organes

1.4. PERMEABILITE ET TRANSFERT DES ACIDES AMINES AU NIVEAU DE LA MEMBRANE ERYTHROCYTAIRE

L'étude des mécanismes membranaires impliqués dans ces transferts semble importante pour le présent travail. Une synthèse des travaux antérieurs sur les systèmes de transport érythrocytaires des acides aminés est présentée.

1.4.1. Rappel historique

En 1897 déjà, HEDIN a fait allusion à une éventuelle perméabilité de la membrane érythrocytaire aux acides aminés. Mais avant les travaux de CONSTANTINO (1913a,b), les membranes des érythrocytes étaient considérées comme imperméables aux acides aminés. En dosant les acides aminés en présence de formaldéhyde, cet auteur a pu détecter des concentrations intracellulaires supérieures à celle du sérum et, en incubant les érythrocytes dans un hydrolysate de caséine, une entrée de glycine et d'asparagine dans ces cellules.

DANIELSON (1933), constatant qu'une fraction d'azote aminé estimée par la méthode de FOLIN pouvait être extraite des globules rouges par lavage, a conclu à une perméabilité totale de la membrane érythrocytaire pour les acides aminés.

USSING (1943), comparant entre elles pour quelques acides aminés les quantités pénétrant dans les érythrocytes par incubation, a constaté que les acides aminés aspartique et glutamique passaient beaucoup plus difficilement que la leucine.

Par des méthodes de dosage spécifiques à certains acides aminés, CHRISTENSEN et coll. (1947) ont montré que la pénétration de la glycine et de l'alanine dans les globules rouges était indépendante d'une privation d'oxygène ou d'inhibiteurs de la respiration. Les résultats de USSING (1943) et ceux de RIESER (1962) ont mis en évidence une relation entre le passage des acides aminés dans les érythrocytes et leur structure. Par la suite, l'utilisation d'acides aminés marqués par des isotopes radioactifs (WINTER et CHRISTENSEN 1964), a permis de déterminer les caractéristiques cinétiques du passage à travers le membrane érythrocytaire pour de nombreux acides aminés. Ainsi la structure de la chaîne hydrocarbonnée influe directement sur la pénétration des acides aminés à condition que celle-ci ne soit porteuse d'un groupement polarisé. Trois systèmes de transport ont pour la première fois été décrits :

- le premier système saturable concerne presque tous les acides aminés neutres. Les chaînes hydrocarbonnées longues y sont favorisées,
- pour la glycine et l'alanine un second système spécifique de faible capacité et saturable,
- un troisième non saturable concernant les acides aminés porteurs d'une longue chaîne hydrocarbonnée.

Tous ces échanges décrits *in vitro* se font de manière assez lente, le nouvel équilibre entre les concentrations intra et extracellulaires n'étant atteint qu'au bout de quelques minutes à quelques heures.

Après ces premiers travaux de WINTER et CHRISTENSEN (1964) auxquels il y a lieu d'ajouter ceux de YUNIS et ARIMURA (1965), GARDNER et LEVY (1972), HOARE (1972_{a,b}), il était admis que le passage transmembranaire ne se faisait pas par simple diffusion passive. Divers "systèmes" de transfert ou transporteurs d'acides aminés, spécifiques de leur nature, coexistaient dans la membrane érythrocytaire.

1.4.2. Concepts actuels

HAGENFELDT et ARVIDSON (1980), en comparant le contenu globulaire calculé à partir des concentrations d'acides aminés du plasma et du sang total avec celui déterminé dans les érythrocytes lavés, postulent l'existence de trois systèmes de transport. Les mouvements des acides aminés seraient dûs à : 1) un système pour les acides aminés anioniques ASP et GLU concentrant ceux-ci dans la cellule pour aboutir à des rapports de concentrations globules/plasma très élevés ; 2) un système appelé A transportant SER, GLY et ALA qui concentre ces acides aminés et les retient dans la cellule pendant le lavage ; 3) un système L plus actif que les deux autres qui intéresse les acides aminés VAL, LEU, ILE, MET, PHE, LYS et GLN. Ce système ne concentre pas les acides aminés et ne les retient pas dans la cellule pendant le lavage. Seules la thréonine et la tyrosine semblent être transportées indifféremment par les deux systèmes A et L.

Des études *in vitro* de cinétiques des mouvements des acides aminés à travers la membrane érythrocytaire en tenant compte de la spécificité des molécules de transport et du couplage possible avec les ions sodium (CRANE 1977), ont conduit à la description de nombreux systèmes de transport saturables. Ceux-ci sont souvent définis en fonction des paramètres cinétiques, de la dépendance à l'égard du sodium ou des possibilités d'inhibition compétitive (ELLORY et YOUNG 1978 ; WHEELER 1982). Ainsi un système L serait actif pour la leucine, la phénylalanine, la méthionine et la valine (ROSENBERG et RAFAELSEN 1979 ; YOUNG et coll. 1980), un système Ly (actuellement appelé y^+) transporterait les acides aminés portant deux fonctions amines lysine et arginine (GARDNER et LEVY 1972), un système T interviendrait pour le tryptophane (ROSENBERG et coll. 1980), un système ASC servirait à transporter l'alanine et la cystéine (YOUNG et coll. 1979) et enfin pour la glycine et la sarcosine un autre système serait actif (ELLORY et coll. 1981).

Toute cette classification des systèmes de transport dérive de celle initiée par CHRISTENSEN (1969). Mais devant les divergences des résultats des analyses des différentes équipes notamment en ce qui concerne la leucine, ROSENBERG (1982), en appliquant au transport à travers la membrane érythrocytaire le modèle théorique proposé par LIEB et STEIN (1974), en arrive à postuler l'existence d'un nombre limité de transporteurs pouvant rendre compte des phénomènes d'inhibition compétitive ou de trans-accélération (stimulation par des acides aminés situés de l'autre côté de la membrane cellulaire), pour la plupart des acides aminés neutres.

Ainsi un système de grande capacité mais de faible affinité désigné couramment par la lettre L, indépendant du sodium, concernerait les acides aminés LEU, ILE, PHE, VAL et MET. Deux autres systèmes dépendant du sodium, de grande affinité mais de faible capacité (environ 20 à 30 fois plus faible que le système L), comparables aux systèmes ASC et GLY définis par CHRISTENSEN (1969, 1982), interviendraient respectivement pour les acides aminés neutres ALA, SER, CYS et GLY.

En même temps, les travaux d'une autre équipe (AL-SALEH et WHEELER 1982) précisent les paramètres cinétiques de passage de la membrane érythrocytaire des acides aminés neutres ainsi que l'influence des autres acides aminés et de divers ions y compris le sodium sur leur passage transmembranaire. Dans une revue bibliographique, TUNNICLIFF (1994) fait une synthèse des systèmes de transports érythrocytaires des acides aminés. Les tableaux 1a,b,c ci-dessous empruntés à ces travaux résument les constantes cinétiques déterminées pour quelques acides aminés représentatifs de 7 systèmes de transport.

Tableau 1a. Principales caractéristiques cinétiques de transport de la membrane érythrocytaire de 6 acides aminés. Km = constante de Michaëlis, Vmax = vitesse maximale (AL-SALEH et WHEELER 1982).

Acides aminé	Km (mM)	Vmax (nM.ml ⁻¹ H ₂ O.min ⁻¹)	Système
Glycine	0.06	0.9	Gly
Alanine	0.4	7.0	ASC
Sérine	0.3	8.3	ASC
Thréonine	0.09	3.5	ASC
Valine	7.1	560	L
Phénylalanine	2.9	690	L

Tableau 1b. Systèmes de transports passifs pour les acides aminés dans les érythrocytes humains (TUNNICLIFF 1994).

Système	Substrat préféré	Km (M)	Vmax (mmol.hr ⁻¹ l ⁻¹ cells)
L	LEU	5 x 10 ⁻³	119
y ⁺	Acides aminés dibasiques	6.3 x 10 ⁻⁵ (LYS)	0.47
y ⁺ L	Acides aminés dibasiques et LEU	1.4 x 10 ⁻⁵ (LYS)	0.06
T	Tryptophane	1.5 x 10 ⁻³	12

Tableau 1c. Systèmes de transports secondairement actifs pour les acides aminés dans les érythrocytes humains (TUNNICLIFF 1994).

Système	Substrat préféré	Km (M)	Vmax (mmol.hr ⁻¹ l ⁻¹ cells)
ASC	ALA, SER et CYS	1,4 x 10 ⁻⁵ (CYS)	0.13
GLY	GLY	2,5 x 10 ⁻⁵	19
N	GLN	9-16 x 10 ⁻⁵	12

On constate que pour les acides aminés GLY, ALA, SER, THR, GLN dont le passage couplé avec un ion Na⁺ a été montré, les valeurs de la constante de Michaëlis (concentration du substrat pour avoir 1/2 de la vitesse maximale) et la vitesse maximale de pénétration de substrat (Vmax), sont beaucoup plus faibles que celles de la valine, la phénylalanine et la leucine, dont le transport membranaire est indépendant du Na⁺. L'interprétation de l'ensemble de ces résultats qui rejoint et confirme celle de ROSENBERG (1982) peut être considérée comme une synthèse des connaissances actuelles en matière de systèmes de transport des acides aminés décrits pour la membrane érythrocytaire.

1.4.3. Les systèmes de transport

Dans ce qui suit, nous présentons une synthèse sur les systèmes de transport et leurs principales caractéristiques définissant la perméabilité membranaire des érythrocytes pour les acides aminés :

1.4.3.1. Système ASC

Il transporte les acides aminés tels que ALA, SER, THR et CYS (WINTER et CHRISTENSEN 1965 ; AL-SALEH et WHEELER 1982). Il est caractérisé par :

- son exigence absolue pour Na⁺ et son insensibilité à la nature de l'anion qui l'accompagne.

- sa préférence pour les isomères L et son inaptitude à transporter les acides aminés N-méthylés.
- son aptitude à opérer uniquement par trans-accélération.

La différence entre ce système ASC chez l'homme et celui des érythrocytes de pigeon et des réticulocytes des mammifères est principalement quantitative plutôt que qualitative, mais la différence majeure est celle de l'échange par trans-accélération (AL-SALEH et WHEELER 1982). La diffusion par échange accélératif via l'érythrocyte humain est si limitée, qu'elle peut être de peu ou pas d'importance ; par contre, ce type d'échange caractérise le système ASC des réticulocytes et des érythrocytes de pigeon (EAVENSON et CHRISTENSEN 1967 ; WHEELER et CHRISTENSEN 1967).

Dans les érythrocytes humains, la capacité de transport du système ASC, comparée à celle du système L, est très faible. Par ailleurs, l'aptitude de la valine à produire une petite stimulation de l'efflux de la sérine suggère que la valine peut interagir avec le système ASC.

Il est aussi notable qu'il n'y a pas de transport de PRO, VAL, LEU ou PHE via le système ASC pouvant être décelé dans les érythrocytes humains, malgré l'inhibition de chacun de ces acides aminés sur le transport Na^+ dépendant de la sérine. Ceci contraste avec les cellules de pigeon, où quelque prélèvement Na^+ dépendant en ces acides aminés a été observée (EAVENSON et CHRISTENSEN 1967).

Chez le rat, la forte inhibition par L-SER sur le transport de L-ALA suppose l'existence d'un système de type ASC comme dans les autres espèces (FELIPE et coll. 1990). Les érythrocytes matures sont capables de concentrer légèrement L-ALA, cependant ils ont perdu toute aptitude à concentrer L-GLN. Les réticulocytes de rat ont une aptitude plus élevée que les érythrocytes à concentrer L-ALA et L-GLN de façon Na^+ dépendante. Durant la maturation des érythrocytes chez ce mammifère, il y a une perte de capacité et d'affinité du système ASC pour le

transport de L-ALA. La spécificité de ce système dans les érythrocytes matures de rat est modifiée et GLN entre la cellule par une voie non facilitée de type diffusion (FELIPE et coll. 1992).

Chez le mouton et le cheval dont les érythrocytes perdent le transport Na^+ dépendant de L-ALA présent chez les réticulocytes, il a été décrit que le passage Na^+ indépendant se fait par le système asc (FINCHAM et coll. 1985 ; VADGAMA et CHRISTENSEN 1985).

Le système ASC a des sites spécifiques qui reconnaissent le groupe terminal des acides aminés dibasiques. Il reconnaît les chaînes latérales amino et guanido. Les ions Na^+ se lieraient à ces sites. Le ratio Na^+/ALA est égal à 1. Le système est non électrogénique, car la dépolarisation des cellules n'a pas d'effet sur le transport de ALA (ELLORY 1987 ; TUNNICLIFF 1994).

En fait trois systèmes apparentés ASC, asc et c existent. Ces systèmes montrent une grande homologie dans leur spécificité mais ils ont de grandes différences d'affinité et de dépendance du cation. Dans les cellules humaines le système ASC Na^+ dépendant est la principale route pour l'entrée de la cystéine à concentration plasmatique physiologique (K_m apparent 15 μM). Il y a une affinité significative pour ALA et SER mais pas pour GLY ou pour des acides aminés neutres plus larges (ELLORY 1987). Le système est opérant en mode net et en mode échange accélérateur. AL-SALEH et WHEELER (1982) soutiennent que l'échange est prédominant dans les érythrocytes humains. Le système ASC a un intervalle plus étroit que le système A, en rapport avec la longueur de la chaîne latérale appropriée. Les groupes β^- , γ^- , γ -hydroxyle ou sulfhydryl intensifient l'action co-substrat de Na^+ . Contrairement au système A, le système ASC montre régulièrement une trans-stimulation et il peut sous protonation aussi réagir avec les acides aminés anioniques (CHRISTENSEN 1990).

La Na^+ dépendance permet au système ASC (et A) l'accès aux stocks d'énergie inhérents aux gradients d'ions inorganiques, incluant éventuellement ceux de K^+ , comme pour le système A. Grâce à cet accès ces systèmes sont capables de

générer de forts gradients de divers acides aminés en faveur du cytoplasme (CHRISTENSEN 1990).

1.4.3.2. *Système A*

Une des caractéristiques principales des érythrocytes est l'absence du système A lequel est un transporteur commun dans la majorité des tissus des mammifères (EAVENSON et CHRISTENSEN 1967). En effet l'inhibition observée par MeAIB sur le transport dépendant de L-ALA suggérait l'absence du système A dans les érythrocytes. Il a été décrit que les globules rouges perdent ce système très tôt au stade érythroïde (FELIPE et coll. 1990, 1992).

L'activité du système A relative à celle de ASC tend à être réprimée en conditions physiologiques. Une faible trans-stimulation uniquement pour des substrats ayant une structure spéciale est observée. Ce système opère fortement contre gradient et donc montre une faible réversibilité. Il est la cible de régulation endocrine et aussi de régulations comme une adaptation à une restriction cellulaire en acides aminés (CHRISTENSEN 1990 ; LIN et coll. 1994).

1.4.3.3. *Système GLY*

Deux systèmes sont identifiés pour la glycine, la Bande 3 et le système GLY. Ce dernier est spécifiquement limité au transport de la glycine et de la sarcosine. Il montre une exigence absolue en Cl^- , F^- et Br^- (ELLORY 1987). Il dépend aussi du Na^+ (TUNNICLIFF 1994), interagit avec N-éthyl-glycine et il est inapte à produire une diffusion par échange accélérateur. Il possède une tolérance significative aux groupes N-méthyl. Ce système joue un rôle significatif mais non dominant sous concentration plasmatique physiologique de glycine. Il peut transporter PRO et il semble pouvoir être inhibé par d'autres acides aminés. Il est probable que les groupes sulphydril soient impliqués dans le fonctionnement du système GLY, le N-éthylmaleide inhibe le prélèvement Na^+ dépendant de GLY dans les érythrocytes

humains (AL-SALEH et WHEELER 1982). Le pyridoxal 5'-phosphate, le pyridoxal et autres analogues augmentent remarquablement la capture de GLY par les érythrocytes (rôle pour les métabolites de la vitamine B6) (TUNNICLIFF 1994).

Il est tentant de spéculer que la dépendance vis à vis du chlorure pourrait être parallèle au rôle de la glycine comme neurotransmetteur dans l'ouverture des canaux de chlorure. Chez certains animaux, particulièrement les vertébrés marins, le système GLY joue un rôle dans la régulation de volume avec l'acide aminé contribuant significativement à l'osmolarité intra-cellulaire.

1.4.3.4. Système L

Ce système a la capacité de transport la plus élevée. Il présente la distribution spécifique et tissulaire la plus large. Il préfère les acides aminés neutres de taille moyenne. Non stéréospécifique il montre une affinité 3.5 fois moindre pour D-LEU que pour L-LEU, mais une V_{max} 2 fois plus élevée (0.21 vs 0.12 mol.l⁻¹ cellules.h). Il opère en mode échange et en mode zéro transtimulation. Il représente la route majeure, chez la plupart des espèces à l'exclusion des ruminants, des chevaux et des chats, au prélèvement des acides aminés (ELLORY 1987). Le Cu^{++} est impliqué dans le transport de LEU.

Il est indépendant du sodium et de la nature de l'anion qui l'accompagne, mais présente une stéréospécificité pour les acides aminés neutres branchés. Les K_m et V_{max} des acides aminés transportés VAL, MET, ILE, LEU et PHE sont plus élevés que ceux des autres systèmes ASC et GLY, ce qui lui confère une importance plus grande au point de vue quantitatif.

Le système L génère plutôt de petits gradients de substrats d'acides aminés. Sa propriété d'échange ou transtimulation est si forte que des expériences minutieuses sont exigées pour pouvoir lui attribuer produit de transport net, dans un sens ou dans l'autre, selon la direction du gradient du substrat (CHRISTENSEN 1990). Les travaux de reconstitutions de systèmes de transport de YAO et coll.

(1993) démontrent que les érythrocytes de rat ont une capacité de transport du système L 400 fois plus grande que celle de l'humain.

1.4.3.5. *Système N*

Le système N constitue un des moyens majeurs d'accès de GLN. Il est sodium dépendant et reconnaît aussi ASN et HIS. Sa présence dans les érythrocytes humains est confirmée par les études cinétiques avec GLN comme substrat principal (TUNNICLIFF 1994). Mais selon ELLORY (1987), il n'y a pas de rôle évident à assigner à ce système dans les érythrocytes matures. Durant la maturation de l'érythrocyte de rat le système N disparaît. Une perte totale du transport de GLN par le système N (et ASC) est démontrée chez l'érythrocyte mature (FELIPE et coll. 1992).

1.4.3.6. *Système T*

Ce système montre une affinité significative de transport pour les seuls acides aminés aromatiques (TRP, TYR et PHE). IL représente 70 p. cent du flux à une concentration plasmatique autour de 0.1 mM. Mis en évidence par ROSENBERG et coll. (1980), il semble être confiné uniquement aux érythrocytes humains (CHRISTENSEN 1984 ; ELLORY 1987). Cependant, il existe un système similaire chez le rat (ZHOU et coll. 1990). C'est un processus de diffusion facilitée Na^+ indépendant et saturable, le K_i est égal à 1.5 mM. Les acides aminés aromatiques sont aussi transportés par le système L de façon linéaire inhibée par LEU.

La triiodotyronine (T3), métabolite actif de la thyroxine, peut être transportée à travers l'érythrocyte par un processus saturable Na^+ indépendant (OSTY et coll. 1990). Les cinétiques de transport de T3 et de TRP sont remarquablement similaires. Les deux substrats partageraient un système de transport commun (ZHOU et coll. 1990). Les acides aminés D-TRP, L-PHE et L-TYR inhibent le

prélèvement de L-TRP, mais LÓPEZ-BURILLO et coll. (1985) rapportent que le D-TRP n'est pas également transporté.

La 4-Azidophénylalanine semble être un inhibiteur spécifique du système T. Le réactif à groupe sulphydryl, N-éthylmaleimide (ou PCMPS) inhibe aussi le passage via ce transporteur indiquant que les résidus cystéines jouent un rôle dans le transport du TRP (VADGAMA et CHRISTENSEN 1985).

1.4.3.7. *Système pour la proline*

Ce système n'existe pas chez toutes les espèces. Les érythrocytes de rat ne montrent pas de système de transport pour L-PRO (FELIPE et coll. 1990).

A ces sept systèmes concernant les acides aminés neutres il y a lieu d'ajouter ceux qui concernent les acides aminés porteurs d'une charge électrique dans les conditions physiologiques.

1.4.3.8. *Système γ^+*

Il concerne les acides aminés cationiques. Il se trouve dans les érythrocytes de l'homme, du lapin, du pigeon, du chien et du chat (ELLORY 1987). Mais l'érythrocyte de rat semble ne pas posséder de système de transport spécifique pour les acides aminés cationiques (FELIPE et coll. 1990).

Auparavant appelé Ly^+ , le système γ^+ , processus de diffusion facilitée, est Na^+ indépendant, sélectif et à haute affinité (K_m apparent pour ARG 50 μM). Les acides aminés cationiques portant deux fonctions amines tels que LYS, ARG, ORN et HIS sont reconnus et transportés à travers la membrane par le système γ^+ . GARDNER et LEVY (1972) ont vu que les globules rouges prélèvent les acides aminés basiques par un processus thermo-sensible impliquant un transporteur, dont

le K_d était de 44 μM pour la lysine. La présence d'un système de prélèvement linéaire de haute capacité a été aussi observée.

Ce système reconnaît les acides aminés neutres si du Na^+ est présent. Ceci suggère que le système possède un domaine de liaison au sodium. En fait, il a été rapporté récemment (YOUNG et coll. 1991) que le sodium inhibe compétitivement le prélèvement érythrocytaire de LYS chez l'homme et le poisson. Ces observations ont été interprétées comme signifiant le fait que les systèmes γ^+ et ASC appartiendraient à une famille de transporteurs d'acides aminés apparentés ayant une origine évolutive commune (YOUNG et coll. 1991).

1.4.3.9. Système γ^+L

Ce système à haute affinité décrit dans les érythrocytes humains par DEVES et coll. (1992), reconnaît LYS et LEU et, par conséquent, a été désigné γ^+L . La liaison de la LEU au transporteur est améliorée d'une manière marquée en présence d'ions sodium. Le K_d est réduit par un facteur de 30 quand le sodium est retiré. Ainsi, dans les érythrocytes humains les deux voies significatives de pénétration pour LEU sont le système L et le système γ^+L .

Il est sensible à l'inhibition par LEU. Les travaux de ANGELO et DEVES (1994) sur les érythrocytes de l'homme montrent que des concentrations extracellulaires, saturantes, de lysine, de glutamate et de leucine provoquent un efflux érythrocytaire remarquable de lysine. Même si le transport de LEU a été amélioré en présence de Na^+ , celui de LYS via ce système est Na^+ indépendant. Ainsi à concentration plasmatique basse l'entrée dans le globule rouge peut avoir lieu par le système γ^+L . A concentration élevée l'entrée se fait par le système γ^+ . La lysine et la glutamine sont des inhibiteurs de transport mutuels. Il est possible que GLN puisse être aussi transportée via le système γ^+L (TUNNICLIFF 1994).

Chez le rat, l'inhibition de L-LYS sur le transport Na^+ dépendant de L-ALA suggère que tout deux, au moins en partie, utiliseraient le même transporteur (FELIPE et coll. 1990).

1.4.3.10. Système pour les acides aminés anioniques

Appelé X^- , la présence de ce système dans les érythrocytes est discutée. Le transport de GLU et ASP est présent dans d'autres tissus tels que le foie, le rein et les fibroblastes humains (CHRISTENSEN 1990). Cependant, dans les érythrocytes de mammifères il n'a été montré uniquement que chez le chien. Les résultats de FELIPE et coll. (1990) montrent clairement que l'érythrocyte de rat n'a pas ce système $X^- \text{Na}^+$ dépendant à haute affinité spécifique pour les acides aminés anioniques et responsable du rapport très élevé érythrocyte/plasma chez le chien. Ils montrent aussi que l'érythrocyte est très imperméable aux acides aminés anioniques tels que L-GLU.

Ces derniers systèmes concernant les acides aminés portant une charge ont été peu étudiés au niveau de la membrane érythrocytaire car la différence de potentiel entre le plasma et l'érythrocyte intervient certainement pour une part non négligeable dans les échanges des acides aminés polarisés.

D'autres mécanismes de transports érythrocytaires des acides aminés existent. Pour pénétrer dans l'érythrocyte, certains acides aminés peuvent emprunter d'autres voies non spécifiques ou destinées à transporter d'autres substrats.

1.4.3.11. Bande 3

Les membranes des globules rouges contiennent un transporteur connu sous le nom de protéine de la Bande 3 ou capnophorine (système de transport des

anions) dont la fonction dans les tissus qui respirent est d'évacuer les HCO_3^- des cellules en échange de Cl^- . La cystéine et la sérine peuvent aussi être transportés par cette protéine. La glycine en est un substrat accidentel (ELLORY 1987 ; TUNNICLIFF et coll 1994).

1.4.3.12. Canaux

Des canaux volume-activés, interviennent dans le transport de GLY, β -ALA, TAU, PRO, α -AB et THR. Les acides aminés de masse moléculaire inférieure à 125-131 Da sont transportés durant l'activation par le volume. Le diamètre des canaux est estimé à 5.7-6.3 Å. Cette voie décrite dans les érythrocytes de poisson (HAYNES et GOLDSTEIN 1993) est Na^+ indépendante, non saturable et transporte les acides aminés dans les deux sens de la membrane. L'efflux et l'afflux de la taurine sont inhibés par le DIDS et autres inhibiteurs du transporteur des anions.

1.4.3.13. Transport des oligopeptides

Chez l'humain, les caprins et les muridés, il est actuellement démontré des captations significatives et des hydrolyses de dipeptides par les globules rouges (LOCHS et coll. 1990 ; BACKWELL et coll. 1994 ; BANKS et KASTIN 1990). Cela suggère que les glutamyl peptides pourraient servir de source de GLU pour la biosynthèse de GSH. Ainsi, un nouveau rôle est conféré à l'érythrocyte en matière d'épuration et d'hydrolyse des peptides plasmatiques. Egalement, les érythrocytes pourraient intervenir dans le transport d'autres composants comme les médicaments (MATSUMOTO et coll. 1989 ; HELLWIG 1990).

Après cette rapide revue exposée pour contribuer à éclaircir le sujet et dans le but d'approfondir et tenter d'élucider ces problèmes, trois expériences ont été entreprises. La première effectuée *in vitro* sur du sang de rat a consisté en l'analyse des mouvements des acides aminés entre le plasma et les érythrocytes lorsque les concentrations plasmatiques étaient subitement modifiées. La seconde, réalisée chez le rat *in vivo*, a consisté en la mesure directe dans les deux compartiments sanguins considérés, plasma et globules, de différences artério-veineuses d'acides aminés dans un organe où les échanges sont importants : l'intestin. La troisième chez l'homme *in vivo* a consisté en l'étude des cinétiques des acides aminés plasmatiques et globulaires après ingestion d'une charge d'acides aminés. Ces résultats seront présentés et analysés en termes de perméabilité de la membrane érythrocytaire en confrontant les connaissances actuelles dans ce domaine à nos données.

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

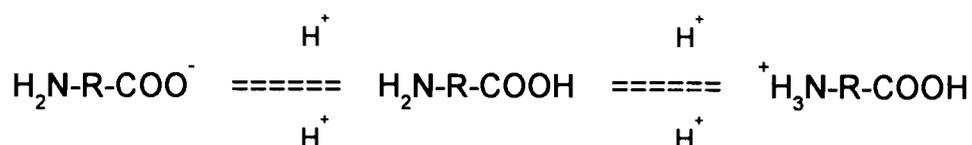
2.1. TECHNIQUES DE DOSAGE DES ACIDES AMINES

2.1.1. Principes généraux

Le dosage des acides aminés libres a été réalisé au moyen d'un analyseur automatique de type LIQUIMAT II LABOTRON commercialisé par la société KONTRON 91-Vélizy. La méthode de dosage est dérivée de celle décrite par SPARKMANN et coll. (1958). Les acides aminés sont séparés par chromatographie liquide sur résine échangeuse d'ions puis individuellement détectés par fluorométrie.

2.1.1.1. Séparation des acides aminés

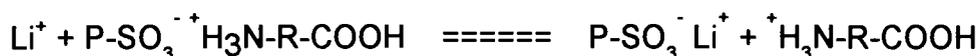
La séparation est obtenue par chromatographie liquide à moyenne pression (30 à 40 Bar) selon la méthode décrite par MOORE et STEIN (1954). L'élution est réalisée à travers une colonne unique de résine (DC6 DURRUM) de 33 cm de hauteur et de 0.45 cm de diamètre. Cette résine échangeuse d'ions est à base de polystyrène réticulée avec du divinyl-benzène et se caractérise par des radicaux -SO₃⁻ actifs où se fixent les acides aminés par liaison ionique. Les acides aminés par leurs propriétés amphotères peuvent exister soit sous forme d'anions, de cations ou sous forme neutre selon le pH du milieu dans lequel ils sont placés.



Lorsque le pH est plus bas (acide) que le pH_i (neutralité), l'équation ci-dessus est déplacé vers la droite et la forme cationique prédomine, par contre lorsque le pH est élevé (basique) l'équation est déplacée vers la gauche et la forme anionique prédomine. Pour chaque acide aminé le pH du point d'équilibre entre les deux formes (pK_a) est différent car dépendant de sa structure. Celui-ci est compris entre 2.8 (ASP) et 11.2 (ARG).

Seule la forme cationique se fixe sur les radicaux $-SO_3^-$ de la résine. Il est ainsi possible, après avoir fixé tous les acides aminés sur la résine avec une solution tampon (pH 2.2), de les détacher successivement avec des solutions tampons de pH croissant.

Le système de tampons de type PICO BUFFER IV commercialisé par DURRUM et préparé selon BENSON et HARE (1975) a été utilisé dans cette étude. Ce système est composé de cinq solutions de tampons de citrate de lithium dont le pH est constant mais dont la molarité de l'ion lithium varie. Cette méthode, qui diffère de celle décrite précédemment, est basée sur le principe de la compétition entre les acides aminés et les ions lithium au niveau des sites de fixation sur la résine. Ainsi malgré une affinité des acides aminés plus grande que celle des ions lithium, l'équilibre :



P = résine

sera déplacé vers la droite par une forte concentration d'ions lithium. les échanges d'ions vont ainsi se produire en fonction d'une concentration croissante de lithium dans les tampons d'élution. Cette méthode présente l'avantage d'une stabilité plus grande de la ligne de base et d'une meilleure séparation entre la glutamine, l'acide aspartique et l'acide glutamique.

La séparation des acides aminés est encore optimisée par l'adjonction d'un gradient thermique au gradient de concentration de lithium. Celui-ci est obtenu par

un manchon d'eau entourant la colonne de résine thermostaté à 3 températures successivement croissantes. La durée d'une élution est de sept heures.

2.1.1.2. Détection et quantification

La technique classique la plus utilisée à ce jour consiste à mélanger à l'éluat une solution de ninhydrine qui, après avoir été chauffée à 110 °C, produit une réaction colorée avec les fonctions amines des acides aminés. L'intensité de cette coloration est mesurée et enregistrée avec un spectrophotomètre à 570 nm pour les amines primaires et 440 nm pour les amines secondaires telles que la proline et l'hydroxyproline.

Pour des raisons de taille des échantillons, il a été nécessaire d'avoir recours à une technique de détection par fluorométrie environ 100 fois plus sensible que celle à la ninhydrine mise au point et développée par ROTH (1971, 1976). Le principe consiste à mélanger à l'éluat un réactif fluorigène qui en se combinant aux acides aminés, les rends fluorescents et par là détectables. Le réactif utilisé se compose d'un mélange d'orthophtaldialdéhyde (OPA) et de 2-mercaptoéthanol dissous dans un tampon borate pH 10.4. La réaction a lieu à température ordinaire en milieu basique et la substance fluorescente détectée se compose d'une association de 3 molécules : acide aminé, OPA et mércaptoéthanol (CHEN et coll. 1979). La fluorescence est détectée et enregistrée avec un fluorimètre à flux continu de type FFM 32 ROCHE-KONTRON. La longueur d'onde de la lumière excitatrice est de 340 nm, celle qui est détectée est de 455 nm.

Le principal inconvénient de l'utilisation de l'OPA est l'absence totale de réaction avec les acides aminés comportant des amines secondaires tels que la proline et l'hydroxyproline. Mais, malgré un essai de mise en oeuvre d'une modification de la technique publiée par BÖHLEN et MELLET (1979) permettant de doser ces acides aminés après les avoir transformés en amines primaires par de l'hypochlorite de sodium, il n'a pas été possible de déterminer la proline et l'hydroxyproline du fait de la lourdeur des transformations techniques que cela

imposait. La cystine qui est un complexe formé de deux cystéines liées par pont disulfure réagit assez faiblement avec l'OPA mais la fluorescence qui correspond à cet acide aminé, quoique faible, est suffisante pour sa détection et son dosage. Sur la figure 1 est représenté un aminogramme d'une solution étalon à 50 $\mu\text{mol/l}$ de chaque acide aminé.

2.1.2. Préparation des échantillons

2.1.2.1. Acides aminés plasmatiques

La déprotéinisation du plasma est obtenue en ajoutant au volume de plasma disponible (500-1000 μl) le dixième de celui-ci une solution aqueuse d'acide sulfosalicylique à 50 g pour 100 ml (MONDINO et coll. 1972). Après une agitation vigoureuse, le précipité est centrifugé à 1800 G pendant 3 minutes puis le surnageant est dilué au 1/4 dans une solution tampon citrate de lithium pH 2.2 contenant 66.6 $\mu\text{mol/l}$ d'acide α -Amino adipique servant de standard interne pour l'analyse.

2.1.2.2. Acides aminés totaux sanguins

La détermination des acides aminés sanguins nécessite au préalable une hémolyse totale des globules rouges. Pour ce faire, la combinaison de deux méthodes couramment utilisées (WOLFROM et ASPLUND 1976), la lyse par congélation et la lyse par diminution de la pression osmotique, est apparue comme satisfaisante. Ainsi aux 300 μl de sang sont additionnés 500 μl d'eau bidistillée, le mélange est fortement agité puis congelé dans de l'azote liquide à $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ et décongelé. Cette dernière opération est répétée deux fois. L'hémolysat obtenu est ensuite traité comme le plasma.

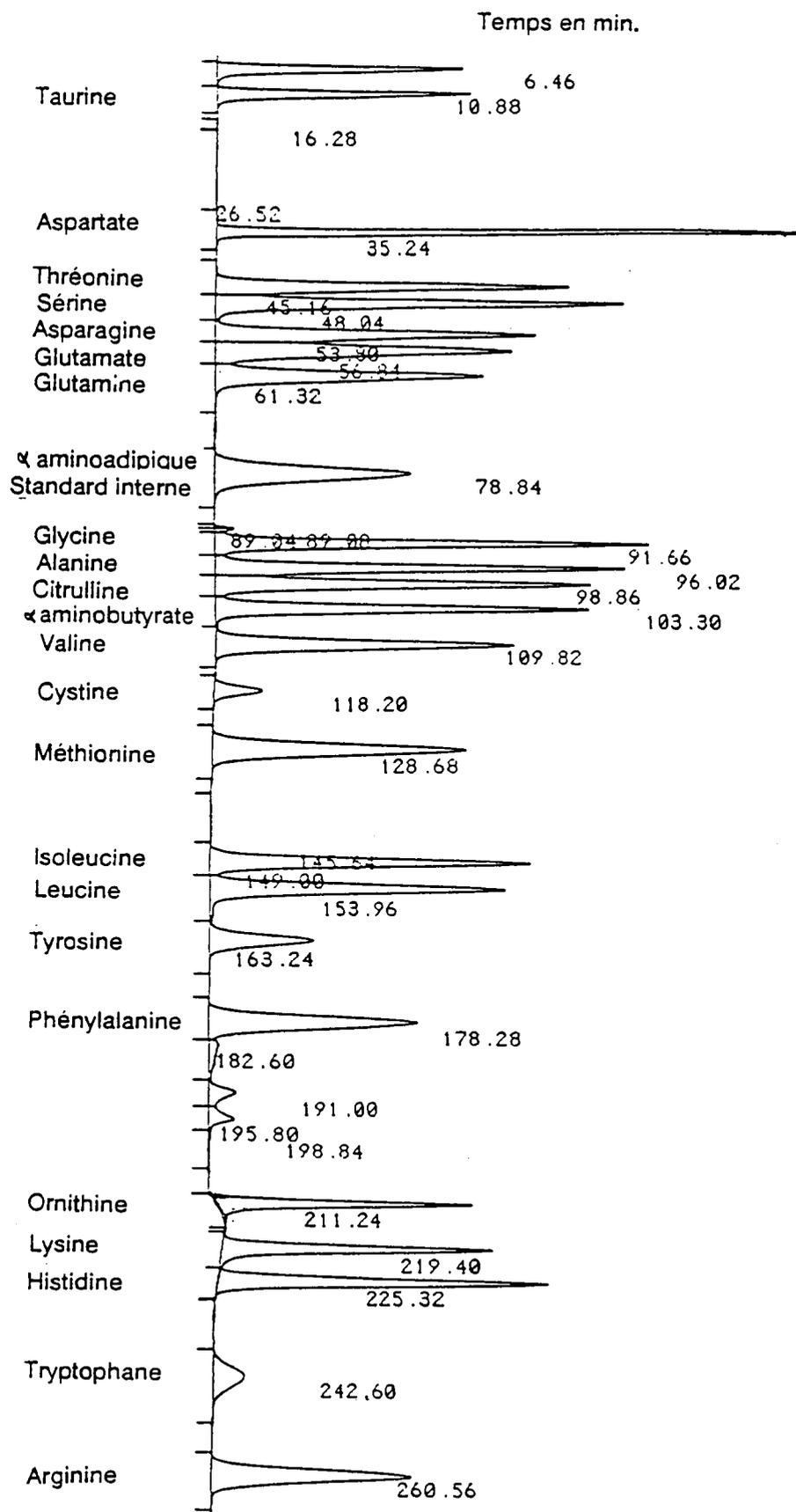


Figure 1. Aminogramme obtenu avec la technique décrite. Les temps de rétention sont indiqués en minutes depuis l'injection de l'échantillon.

Ces échantillons prêts à être analysés sont congelés à $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ en attendant de pouvoir être injectés dans l'analyseur.

2.1.3. Variabilité de la méthode de dosage des acides aminés

Le dosage des acides aminés est complexe. Sa mise en route comporte des étapes impossibles à contrôler parfaitement qui rendent illusoire les calculs à partir de calibrations et d'étalonnages initiaux. Les principaux facteurs de variation de cette technique ont été analysés dans d'autres études faites au laboratoire (AHN-LEE 1980 ; LAZARUS 1983) ; le lieu n'est pas ici de les évoquer en détail. Même l'addition à tout échantillon d'un acide aminé étranger au plasma et au sang, dont la quantité est connue avec précision et dont le rôle est de servir de standard interne pour déceler les fluctuations de réactivité de la chaîne de mesure, n'efface pas toute variabilité. Il est de ce fait indispensable d'en estimer l'importance afin de fixer la précision et la fiabilité de la technique pour dissocier les différences réelles de concentrations de celles dues à la méthode de dosage elle-même.

Ainsi, une étude de reproductibilité des concentrations d'un même échantillon de solution étalon stable contenant les 23 acides aminés a été entreprise. Cette solution a été préparée en dissolvant les 23 acides aminés sous forme cristallisée dans du liquide de Ringer pour aboutir à une concentration, identique pour tous, de $50\text{ }\mu\text{mol/l}$. Après cela le pH est ajusté à 2.2 à l'aide de potasse. Des échantillons de 2 ml de cette solution sont congelés à $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ et conservés dans les mêmes conditions que les échantillons de plasma traités en attendant d'être analysés. Une telle manière de procéder présente l'avantage de tester simultanément la variabilité cumulée de toutes les phases du dosage, depuis la séparation chromatographique jusqu'à la lecture et l'interprétation du tracé. De plus elle permet de calculer pour chaque acide aminé un coefficient de variation. Cette même solution témoin a été analysée 34 fois à différents moments au cours de cette étude. Pour ne pas faire intervenir de coefficient de réactivité, plutôt que de calculer une concentration absolue, la surface de chaque acide aminé a été divisée par celle du standard interne du même aminogramme. Ceci revenait à déterminer la réactivité propre de

chaque acide aminé par rapport au standard interne. Ainsi, les surfaces moyennes pour chaque acide aminé sont exprimées par rapport à celle du standard interne (acide α -aminoadipique) qui est à la même concentration. Ces moyennes, leurs écarts types et les coefficients de variation définis comme étant le rapport de l'écart type sur la moyenne exprimé en pourcentage, sont rassemblés dans le tableau 2.

Tableau 2. Rapports moyens entre la surface de chaque acide aminé et celle du standard interne, écarts types et coefficients de variation obtenus après 34 dosages d'une même solution d'acides aminés.

Acide aminé		Moyenne	Ecart type	Coefficient de variation (%)
Taurine	TAU	1.21	0.05	4.13
Aspartate	ASP	0.93	0.04	4.30
Thréonine	THR	0.89	0.04	4.50
Sérine	SER	1.22	0.04	3.28
Asparagine	ASN	1.04	0.06	5.77
Glutamate	GLU	1.07	0.04	3.74
Glutamine	GLN	0.86	0.03	3.49
Glycine	GLY	1.19	0.07	5.89
Alanine	ALA	1.07	0.06	5.61
Citrulline	CIT	1.05	0.06	5.71
α -aminobutyrate	α AB	1.01	0.06	5.94
Valine	VAL	0.93	0.04	4.30
Cystine	CYS	0.13	0.01	7.69
Méthionine	MET	0.90	0.10	11.10
Isoleucine	ILE	0.97	0.05	5.15
Leucine	LEU	1.04	0.07	6.73
Tyrosine	TYR	0.83	0.04	4.82
Phénylalanine	PHE	0.99	0.06	6.06
Ornithine	ORN	1.15	0.14	12.17
Lysine	LYS	1.53	0.23	15.03
Histidine	HIS	0.99	0.06	6.06
Tryptophane	TRP	0.84	0.06	7.14
Arginine	ARG	1.11	0.12	10.80

Ce tableau montre que le coefficient de variation diffère selon les acides aminés. Il est de 6.50 p. cent en moyenne avec pour extrême la sérine (3.28 p. cent) et la lysine (15.03 p. cent). Les coefficients relativement élevés de la méthionine, l'ornithine, la lysine et l'arginine s'expliquent par des particularités survenant lors de l'élution de la colonne chromatographique. En effet, le moment de leur élution est souvent contemporain d'un changement de tampon ou de température qui perturbe la ligne de base et rend ainsi difficile leur détermination tant graphique que par

intégration numérique. Néanmoins ce degré de reproductibilité ainsi établi, quoique apparemment un peu faible, peut être considéré comme satisfaisant eu égard à la complexité de la méthode et du nombre assez important de molécules dosées simultanément.

2.2. CALCULS DES CONCENTRATIONS

Les concentrations intra-érythrocytaires (E) ont été calculées à partir des concentrations du plasma (P), du sang total (ST) et de l'hématocrite (Ht) en utilisant la formule :

$$E = [ST - (1 - Ht) * P] / Ht$$

Ce calcul ne fournit seulement qu'une assez bonne estimation du contenu érythrocytaire. Il comprend deux approximations :

1- La contribution des plaquettes et des leucocytes au contenu en acides aminés du sang total est négligeable. Cette présomption pourrait conduire à surestimer la concentration de certains acides aminés dans l'érythrocyte, car les leucocytes ou les plaquettes peuvent être particulièrement riches en certains acides aminés telle la taurine dans les plaquettes (TRAUTWEIN et HAYES 1990). Cependant, McMENAMY et coll. (1960), ont montré que la légère contamination par les globules blancs ne pourrait augmenter de plus de 2 p. cent le niveaux des autres composants

2- L'espace aqueux dans lequel les acides aminés sont dissous est égal à l'hématocrite entier, ce qui mène à la sous-estimation de la concentration de la concentration en acides aminés dans l'eau intraglobulaire. Cette sous-estimation sera, cependant, de même grandeur pour chaque acide aminé mesuré et, de ce fait, n'exclue pas des comparaisons.

Dans l'expérience *in vitro* sur la simulation d'échanges interorganes des acides aminés dans le sang de rat, nous n'avons pas tenu compte de la différence de teneur en eau dans le plasma et les érythrocytes. Regardant la précision inhérente à la variabilité de la technique d'analyse des acides aminés d'une part, et les erreurs dues aux manipulations des échantillons de sang, lors des substitutions du plasma par les solutions de Ringer pour son enrichissement ou sa dilution en acides aminés d'autre part, nous avons estimé que cette correction n'était pas nécessaire. L'erreur sur la teneur différentielle en eau face aux erreurs relatives expérimentales était non significative. Dans les expériences *in vivo* sur le rat et sur l'humain, les teneurs en eau dans le plasma et les érythrocytes ont été corrigées. Ici, le sang prélevé n'a pas subi de manipulations autres que celles en vue de l'analyse des acides aminés.

Les concentrations sont exprimées en μ moles par litre de sang total ou de plasma et en μ moles par litre d'érythrocytes. Des taux plasmatiques et globulaires par rapport au contenu du sang total en tenant compte de l'hématocrite, des pourcentages pour apprécier l'amplitude de la dilution ou la concentration globulaire en acides aminés exprimés par rapport à la variation plasmatique sont calculés.

2.3. METHODES STATISTIQUES

D'une manière générale les données chiffrées seront présentées dans ce travail comme la moyenne \pm 1 écart type.

La comparaison d'échantillons dépendants couplés par paire a été réalisée par le test *t* de Student apparié. Dans tous les autres cas la comparaison entre les moyennes a été faite grâce à l'analyse de la variance à un facteur. Lorsque l'analyse de variance montre une différence globale significative entre plusieurs groupes, les comparaisons entre groupes individuels ont été établies par le test de Duncan, avec correction pour la taille différente des échantillons (WINER 1971). Ce test consiste à calculer et à classer par ordre croissant les différences entre les moyennes observées. Une différence minimale acceptable, pour un seuil donné de probabilité

est alors calculé à partir de la variance résiduelle et en fonction du rang de classement. Deux moyennes successives sont considérées comme différentes chaque fois que la différence observée est supérieure à la différence minimale acceptable.

La mise en évidence de corrélations entre une variable expliquée et une ou plusieurs variables explicatives a été réalisée par le calcul des régressions linéaires simples ou multiples (TOMASSONE 1989).

Pour tous les tests le seuil minimal de significativité a été choisi à $P < 0.05$.

CHAPITRE 3

INTERVENTION DES ERYTHROCYTES DANS LE TRANSPORT SANGUIN DES ACIDES AMINES CHEZ LE RAT

Le recours à l'expérimentation animale plutôt qu'humaine pour ces expériences trouve sa justification dans l'avantage de pouvoir programmer, contrôler les conditions et multiplier les observations. La technique de dosage fluorimétrique des acides aminés permettant, le dosage des échantillons de faibles volume, a orienté le choix de l'espèce vers le rat. Deux expériences ont été entreprises, la première *in vitro* et la deuxième *in vivo* sur le rat afin d'analyser les effets de variations de concentrations sanguines totales sur la répartition plasma/globules des acides aminés.

3.1. EFFET DE VARIATIONS DES CONCENTRATIONS DES ACIDES AMINES PLASMATIQUES SUR LE CONTENU INTRA-ERYTHROCYTAIRES DANS LE SANG DE RAT *IN VITRO*

3.1.1 Protocole expérimental

Par cette expérience la simulation *in vitro* des échanges d'acides aminés susceptibles de se produire lorsque le sang traverse un organe a été réalisée. L'enrichissement sanguin a été obtenu par addition d'acides aminés libres dans le plasma et l'appauvrissement par dilution du plasma à l'aide du liquide de Ringer. La détermination simultanée des concentrations d'acides aminés dans le plasma et dans le sang total a permis de calculer chaque fois les concentrations intra-érythrocytaires. Ainsi, la connaissance des concentrations d'acides aminés plasmatiques et globulaires dans chaque situation et leurs variations, a servi à

mettre en évidence les relations pouvant se dessiner entre les deux compartiments sanguins.

3.1.1.1. Animaux

Quinze rats mâles de souche Wistar (Iffa credo, les Oncins) ont servi à cette expérimentation. Le poids moyen le jour des prélèvements était de 418 ± 44 g. Ces animaux ont été placés au moins 15 jours avant de subir les prélèvements en conditions stables d'éclairage L/D 12/12 et de température 22 ± 1 °C, l'eau et la nourriture étant fournies *ad libitum*. La nourriture était de type aliment de laboratoire (U.A.R. protéines 22 p. cent, lipides 5 p. cent, glucides 51 p. cent). Durant ce protocole, l'augmentation du poids corporel des animaux a été le témoin d'une bonne adaptation aux conditions expérimentales (7 ± 2 g/j la première semaine et 13 ± 3 g/j la seconde).

3.1.1.2. Prélèvement de sang

La veille, les animaux sont mis à jeun. Le jour de l'expérimentation une anesthésie a été induite par inhalation d'éther. Le sang (2.5 ml) est prélevé par ponction cardiaque directe à l'aide d'une seringue stérile rincée avec de l'héparinate de sodium.

3.1.1.3. Variation des concentrations plasmatiques

Le sang prélevé et placé immédiatement sur de la glace, a été divisé en 3 fractions aliquotes.

- La première (NORM) a servi à la détermination des concentrations d'acides aminés dans le plasma et le sang normal.

- La seconde (CONC) et la troisième (DIL) ont immédiatement été centrifugées pendant 1 minute à 1500 G, puis 300 à 400 μ l de plasma ont été prélevés par ml de sang. Ce volume a été remplacé par un volume identique de solution de Ringer contenant environ 4 fois la quantité d'acides aminés du plasma normal dans l'échantillon 2 (CONC) et par de la solution de Ringer sans acides aminés dans l'échantillon 3 (DIL). La solution contenant les acides aminés a été préparée par dilution des acides aminés sous forme cristallisée dans du liquide de Ringer. Puis le pH des solutions de substitution a été ajusté à 7.35 à l'aide de soude.

Dès que les fractions de plasma ont été substituées par les solutions de Ringer avec et sans acides aminés, les trois échantillons NORM, CONC et DIL ont été simultanément homogénéisés puis placés exactement pendant 30 secondes (temps maximal estimé du séjour du sang dans l'organe) dans un bain-marie à 37 °C avec une légère agitation.

Après ces 30 secondes, les échantillons ont à nouveau été refroidis dans un bain de glace, puis immédiatement traités en vue de l'analyse des acides aminés plasmatiques et du sang total, puis conservés à -18 °C attendant d'être analysés.

Sur ces échantillons de sang ont été déterminés l'hématocrite et les concentrations (μ mol/l) en acides aminés plasmatiques et sanguins totaux. Le traitement du sang ou du plasma ainsi que l'analyse chromatographique sont similaires à ceux décrits précédemment (cf 2.1).

Dans un souci de précision, chaque échantillon est analysé trois fois, les 15 séries expérimentales ont exigé un délai de 26 semaines.

3.1.1.4. *Calculs*

Les concentrations intra-érythrocytaires ont été calculées comme décrit précédemment (cf 2.2) à partir des concentrations du plasma et du sang total en tenant compte de l'hématocrite réel.

Pour les 15 rats, l'hématocrite apparent mesuré était en moyenne de 44.3 ± 1.6 p. cent. Le volume résiduel de plasma intercellulaire de l'hématocrite apparent mesuré est estimé à 10 ± 1 p. cent (PICÓ et coll. 1991). Ce volume est soustrait de la valeur mesurée pour obtenir l'hématocrite réel utilisé dans le calcul. Il est de 39.8 ± 1.4 p. cent.

3.1.2. Résultats

L'étude a porté sur 23 acides aminés (TAU, ASP, THR, SER, ASN, GLU, GLN, GLY, ALA, CIT, α AB, VAL, CYS, MET, ILE, LEU, TYR, PHE, ORN, LYS, HIS, TRP et ARG) dans le sang de rat.

Les concentrations moyennes d'acides aminés ainsi que leurs écarts types (S.D.) déterminées dans le plasma, le sang total et celles calculées dans les érythrocytes correspondant au sang normal (NORM), au sang enrichi (CONC) et au sang appauvri (DIL) en acides aminés sont portées dans le tableau 3. L'impossibilité de doser la cystine dans le sang hémolysé porte à 22 le nombre d'acides aminés analysés dans les érythrocytes.

3.1.2.1. Comparaison entre les concentrations dans le sang total, le plasma et les érythrocytes

Les différences entre les concentrations normales déterminées dans le sang total et celles déterminées dans le plasma d'une part et les différences entre les contenus globulaires et les contenus plasmatiques initiaux d'autre part, ne sont pas significatives ($P < 0.05$) pour 5 acides aminés (VAL, MET, TYR PHE et HIS). Parmi les 17 autres acides aminés dont les concentrations sanguines ou globulaires sont différentes des concentrations plasmatiques, deux acides aminés, la glutamine et le tryptophane sont présents dans le plasma à des teneurs plus élevées (tableau 3). Suite à la variation des concentrations du plasma les trois fractions plasmatiques (NOR, DIL et CON) présentent des concentrations en acides aminés significativement différentes.

Tableau 3. Concentrations moyennes des acides aminés dans le plasma, le sang total et les érythrocytes avant et après concentration ou dilution plasmatique.

	PLASMA						SANG TOTAL						ERYTHROCYTES					
	NOR			CON			NOR			CON			NOR			CON		
	Moy	S.D.	DIL	Moy	S.D.	DIL	Moy	S.D.	DIL	Moy	S.D.	DIL	Moy	S.D.	DIL	Moy	S.D.	DIL
TAU	196	58	71	87	23	23	402	43	704	81	319	34	712	81	770	116 ^(b)	692	83 ^(c)
ASP	22	3	15	9	5	5	838	69	955	103	815	71	2074	184	2265	260	2025	177
THR	229	32	78	150	16	16	245	32	760	99	148	30	271	52	270	94 ^(b)	252	61 ^(c,d)
SER	194	23	60	129	13	13	244	23	731	91	156	18	320	45	327	62 ^(b)	300	33 ^(d)
ASN	52	10	16	47	4	4	62	8	234	30	39	8	77	12	68	18	73	17 ^(c,d)
GLU	88	14	28	44	6	6	239	30	400	37	191	26	468	72	482	87 ^(b)	435	60
GLN	659	88	194	241	43	43	591	74	1425	143	327	53	490	71	460	101 ^(b)	527	90
GLY	317	63	111	163	26	26	426	102	1169	175	274	71	591	203	760	312	519	136 ^(c)
ALA	405	59	136	245	28	28	462	105	1574	186	272	52	549	185	654	284	477	92 ^(c)
CIT	96	15	31	62	9	9	110	27	388	59	62	16	130	56	149	100 ^(b)	108	32 ^(c,d)
αAB	17	11	5	14	5	5	27	15	80	36	11	7	41	30	115	87	19	18
VAL	219	47 ^(a)	111	125	18	18	215	37	764	98	121	23	211	49	597	144	137	45
CYS	83	77	18	31	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MET	56	10 ^(a)	28	38	4	4	52	8	185	23	30	6	47	15	88	35	32	12
ILE	117	27	66	61	13	13	148	32	445	111	95	33	196	50	510	216	139	70
LEU	168	34	92	96	20	20	213	55	619	126	122	40	282	103	602	214	169	91
TYR	84	20 ^(a)	51	33	8	8	92	12	267	46	58	13	105	32	243	114	69	26
PHE	73	13 ^(a)	39	34	6	6	81	16	195	39	47	9	94	38	180	80	59	16
ORN	49	14	22	40	5	5	68	17	219	36	49	11	97	27	106	38 ^(b)	90	26 ^(c,d)
LYS	380	57	118	139	29	29	490	57	930	95	312	49	657	121	713	139 ^(b)	605	93 ^(c)
HIS	54	6 ^(a)	18	37	3	3	57	7	173	21	33	7	62	14	52	18	57	16 ^(c,d)
TRP	77	11	27	24	6	6	56	7	142	24	24	6	26	18	94	49	20	13 ^(c)
ARG	173	38	52	62	15	15	305	53	514	57	209	43	505	108	522	90 ^(b)	449	101
TOT	3807	493	1387	1794	227	227	5425	551	12874	1358	3713	440	8005	915	10026	1385	7253	841

Différences non significatives : ^(a) plasma (NOR) - sang total (NOR) ; plasma (NOR) - érythrocytes (NOR). Différences érythrocytaires non significatives : ^(b) (NOR - CONG), ^(c) (NOR - DIL), ^(d) (CONC - DIL). Test t apparié de Student, n = 15, P < 0.05. Concentrations exprimées en µmoles par litre (µmol/l) de plasma, de sang total ou d'érythrocytes, NOR = normal, CON = concentré, DIL = dilué, Moy = moyenne, S.D. = écart type.

3.1.2.2. *Distribution des acides aminés entre le plasma et les érythrocytes dans le sang normal et après variation de la concentration plasmatique.*

Les proportions relatives moyennes des acides aminés libres et leurs écarts types (S.D.), dans le plasma et dans les érythrocytes, exprimées en pour cent du contenu sanguin total pour les trois fractions NORM, DIL et CONC, ainsi que la signification éventuelle ($P < 0.05$) entre les différences de concentrations relatives globulaires sont portés au tableau 4 et représentés dans la figure 2. Il est évident que la somme des pourcentages plasmatiques et globulaires est égale à 100 p. cent et que les écarts types des pourcentages moyens plasmatiques et globulaires sont les mêmes. A remarquer que la signification des différences dans les phases globulaires est identique à celle observée dans les phases plasmatiques.

Dans la fraction sanguine normale (NORM), 8 acides aminés libres sont présents dans les globules rouges en des proportions significativement supérieures à 50 p. cent de la concentration sanguine totale (TAU, ASP, SER, GLU, GLY, ORN, LYS et ARG) ; ASP, GLU et TAU étant les plus abondants avec respectivement 98.44 ± 0.27 p. cent, 77.78 ± 3.30 p.cent et 70.82 ± 6.89 p. cent. Sept acides aminés, ASN, CIT, α AB, ILE, LEU, TYR, et PHE se répartissent en des concentrations quasi égales entre le plasma et les érythrocytes.

Pour l'ensemble des 22 acides aminés examinés leur concentration sanguine totale normale se répartit comme suit : 41.27 ± 2.37 p. cent sont plasmatiques, le reste, 58.73 ± 2.37 p. cent se trouvent dans les globules rouges.

Au niveau du sang dont la concentration plasmatique a été diluée (DIL), 14 acides aminés présentent des proportions érythrocytaires relatives supérieures à 50 p. cent du contenu sanguin total (TAU, ASP, THR, SER, ASN, GLU, GLN, GLY, ALA, CIT, ORN, LYS, HIS et ARG). Les 4 acides aminés α AB, ILEU, LEU, TYR et PHE se trouvent dans les globules et le plasma à des pourcentages quasi égaux. Comparée au sang normal, il est à noter que la dilution a fait augmenter significativement ($P < 0.05$) la concentration globulaire relative de 17 acides aminés. Pour les 5 autres acides aminés, α AB, ILE, LEU, TYR et PHE les variations des proportions ne sont

pas significatives. La prise en compte de l'ensemble des acides aminés dans les érythrocytes correspondant au plasma dilué, le pourcentage a aussi augmenté de 19.12 p. cent et représente maintenant 77.85 ± 2.19 p. cent du sang total. Ainsi, la répartition exprimée en pourcentage du contenu du sang total des acides aminés entre le plasma et les érythrocytes se trouve significativement affectée par la dilution plasmatique.

Tableau 4 : Distributions moyennes des acides aminés entre le plasma et les érythrocytes en pour cent du sang total normal, dilué ou concentré.

	SANG NORMAL			SANG DILUE			SANG CONCENTRE		
	PLASMA	ERYTH.	SD	PLASMA	ERYTH.	SD	PLASMA	ERYTH.	SD
TAU	29.18	70.82	6.89	13.51	86.49	4.23	56.84	43.16	4.03
ASP	1.56	98.44	0.27	1.07	98.93	0.35	5.41	94.59	0.44
THR	56.27	43.73	4.56	32.23	67.77	5.95	86.07	13.93	3.99
SER	47.87	52.13	3.80	23.19	76.81	3.30	82.42	17.58	2.48
ASN	50.54 ^a	49.46	5.87	25.54	74.46	5.53	88.67	11.33	2.71
GLU	22.22	77.78	3.30	8.93	91.07	1.79	52.49 ^c	47.51	5.35
GLN	66.93	33.07	2.82	35.76	64.24	5.92	87.24	12.76	2.94
GLY	45.56	54.44	6.11	24.78	75.22	3.30	75.15	24.85	7.11
ALA	53.65	46.35	4.94	30.17	69.83	3.09	83.97	16.03	6.01
CIT	54.08 ^a	45.92	8.61	30.27	69.73	4.99	85.61	14.39	7.67
α AB	45.38 ^a	54.62	23.81	40.93 ^b	59.07 ^d	31.88	50.56 ^c	49.44 ^e	20.02
VAL	61.04	38.96	6.05	55.64	44.36	6.02	69.31	30.69	5.82
MET	64.81	35.19	7.93	58.08	41.92	7.90	81.34	18.66	7.04
ILE	47.59 ^a	52.41	5.70	45.66 ^b	54.34 ^d	16.32	56.89	43.11	8.29
LEU	48.42 ^a	51.58	6.53	47.38 ^b	52.62 ^d	9.88	62.64	37.36	6.17
TYR	54.87 ^a	45.13	11.93	53.96 ^b	46.04 ^d	8.93	65.26	34.74	10.65
PHE	55.27 ^a	44.73	9.95	50.56 ^b	49.44 ^d	5.20	64.91	35.09	9.37
ORN	43.07	56.93	6.30	27.98	72.02	7.18	81.51	18.49	4.26
LYS	46.81	53.19	5.76	22.64	77.36	4.15	69.92	30.08	5.38
HIS	57.03	42.97	5.98	32.52	67.48	6.16	88.08	11.92	4.28
TRP	82.11	17.89	11.16	69.14	30.86	14.52	75.27	24.73 ^{e,f}	10.33
ARG	34.37	65.63	5.57	14.87	85.13	3.51	60.42	39.58	4.30
TOT	41.27	58.73	2.37	22.15	77.85	2.19	69.36	30.64	3.00

Différences non significatives entre les distributions plasmatiques et érythrocytaires ^(a, b, c). Différences de distributions érythrocytaires non significatives entre normales et diluées ^(d); entre normales et concentrées ^(e); entre concentrées et diluées. Test t apparié de Student, n = 15, P < 0.05. SD = écart type.

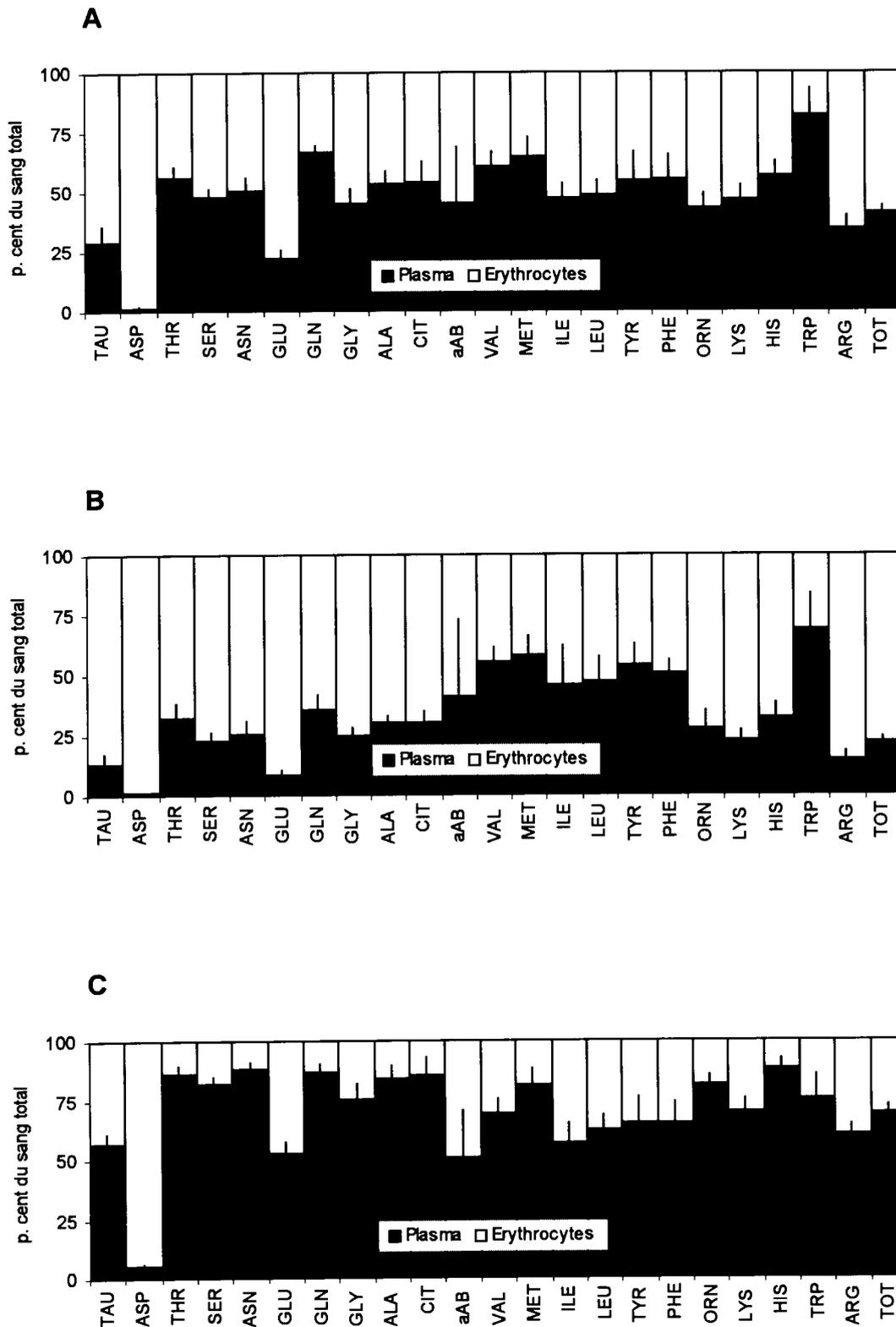


Figure 2. Distributions moyennes des acides aminés entre le plasma et les érythrocytes en p. cent du sang total, dans le sang normal (A), dans le sang dilué (B) et dans le sang concentré (C).

Dans le sang enrichi en acides aminés (CONC), seul un acide aminé, ASP se trouve dans les globules rouges à un taux supérieur à 50 p. cent (94.59 ± 0.44 p.cent). Le glutamate et l' α -aminobutyrate se redistribuent entre le plasma et les érythrocytes à des taux quasiment égaux. Comparées au sang normal, mis à part α AB et TRP, les proportions relatives diffèrent significativement ($P < 0.05$) pour tous les autres acides aminés. La proportion des acides aminés totaux érythrocytaires a chuté de 28.08 p. cent et ne représente plus que 30.67 p. cent du total. La répartition des acides aminés entre les deux phases du sang a donc varié considérablement, suite à l'enrichissement plasmatique, par une chute significative de la fraction globulaire.

La comparaison entre les taux globulaires des acides aminés dans le sang dilué (DIL) et dans le sang concentré (CONC) montre que seule la concentration relative du tryptophane ne diffère pas significativement.

3.1.2.3. Rapports érythrocytes sur plasma (E/P)

Les rapports (E/P) du contenu érythrocytaire (E) sur le contenu plasmatique (P) ont été calculés pour tous les acides aminés dans les trois situations, normale, suite à l'appauvrissement et à l'enrichissement plasmatique (tableau 5).

Dans la phase globulaire normale, l'acide aspartique est très abondant avec un rapport de 98.29 ± 17.65 , suivi du glutamate, de la taurine et de l'arginine avec des rapports respectivement de 5.46 ± 1.25 , de 3.94 ± 1.30 et de 3.01 ± 0.83 . A part TRP et GLN dont les rapports sont inférieurs à 1 (0.37 et 0.75), les autres acides aminés ont des rapports qui varient de 1 à 2. Les rapports de VAL, MET, TYR, PHE ne diffèrent pas de 1. Globalement, la somme des concentrations globulaires en acides aminés est double de celle du plasma.

La dilution a fait varier significativement les rapports de tous les acides aminés sauf ceux de LEU et TYR. Le rapport relatif à la somme totale des acides aminés est significativement supérieur à 5. Les rapports de MET et TRP ne sont pas

différents de 1 ; ceux de tous les autres acides aminés sont supérieurs. Les rapports de l'ASP, du GLU, de l'ALA et de l'ARG restent les plus élevés et ont considérablement augmenté, ils sont respectivement 151.61 ± 41.53 , 16.05 ± 3.57 , 11.26 ± 6.23 et 9.27 ± 3.06 .

Tableau 5. Rapports des contenus érythrocytaires sur les contenus plasmatiques, dans le sang normal, le sang dilué et le sang concentré.

	NORMAL		DILUE		CONCENTRE	
	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.
TAU	3.94	1.30	11.26	6.23	1.17	0.18
ASP	98.29	17.65	151.61	41.53	26.83	2.98
THR	1.20	0.26	3.30	0.75	0.25	0.09
SER	1.67	0.34	5.14	1.03	0.33	0.06
ASN	1.53	0.43	4.72	1.55	0.20	0.06
GLU	5.46	1.25	16.05	3.57	1.41	0.34
GLN	0.75	0.09	2.83	0.83	0.22	0.06
GLY	1.88	0.61	4.65	0.57	0.52	0.21
ALA	1.33	0.29	3.53	0.42	0.30	0.14
CIT	1.35	0.49	3.63	1.00	0.27	0.17
α AB	2.81	2.28	5.84	6.26	1.95	1.36
VAL	0.99	0.24 ^a	1.24	0.35	0.69	0.18
MET	0.86	0.31 ^a	1.14	0.38 ^b	0.36	0.16
ILE	1.72	0.45	2.09	0.88	1.21	0.42 ^c
LEU	1.67	0.49	1.86	0.89 ^d	0.93	0.25 ^c
TYR	1.53	1.51 ^a	1.36	0.45 ^d	0.87	0.40 ^c
PHE	1.32	0.59 ^a	1.51	0.35	0.88	0.40 ^c
ORN	2.07	0.54	4.28	1.75	0.35	0.11
LYS	1.77	0.45	5.40	1.49	0.67	0.17
HIS	1.17	0.30	3.28	0.84	0.21	0.09
TRP	0.37	0.28	0.78	0.55 ^b	0.54	0.28
ARG	3.01	0.83	9.27	3.06	1.01	0.20 ^c
TOT	2.17	0.26	5.38	0.76	0.68	0.10

Rapports non significativement différent de 1 dans le sang normal ^(a), dans le sang dilué ^(b) et dans le sang concentré ^(c). Différence entre rapports normal-dilué non significatives. Test t apparié de Student, n = 15, P < 0.05. Moy = moyenne, S.D. = écart type.

L'enrichissement plasmatique a fait chuter remarquablement les rapports. L'aspartate reste le plus important avec un rapport de 26.83 suivi de α AB, GLU et TAU dont les rapports se situent entre 1 et 2. Les autres acides aminés présentent des rapports inférieurs à 1 ; ceux de ILE, LEU, TYR, PHE et ARG ne sont pas significativement différents de 1. Le rapport du contenu total des acides aminés globulaires à celui du plasma est tombé à 0.68 ± 0.10 .

La comparaison des deux situations extrêmes, l'enrichissement et l'appauvrissement du plasma en acides aminés, montre que les rapports ont significativement variés.

Finalement, il est observé que les modifications de tous les rapports suite aux variations de la concentration plasmatique en acides aminés sont significatives à l'exception de LEU et TYR après dilution du plasma.

3.1.2.4. Comparaison des concentrations globulaires

L'augmentation ou la diminution des concentrations plasmatiques affectent les contenus globulaires de 17 acides aminés dont les variations vont dans la même direction que celle du plasma sauf pour GLN lors de la dilution, ainsi que ASN et HIS dans l'enrichissement qui évoluent contrairement au plasma (tableau 3). L'enrichissement de quatre fois du plasma en acides aminés se traduit par une augmentation significative de la concentration globulaire pour 13 d'entre eux, les 9 autres ne présentent pas de variations significatives (TAU, THR, SER, GLU, GLN, CIT, ORN, LYS et ARG). La diminution des concentrations plasmatiques ($\times 0.36$) a cependant entraîné la baisse de 12 acides aminés. Pour dix acides aminés : TAU, THR, ASN, GLY, ALA, CIT, ORN, LYS, HIS et TRP, la comparaison entre NORM et DIL ne permet pas de mettre en évidence de différences significatives. Considérant la somme des acides aminés, la variation de la concentration plasmatique résulte en un mouvement significatif, dans la même direction, de la somme des concentrations des acides aminés globulaires.

L'observation des deux situations extrêmes, la dilution et l'enrichissement, montre que pour six acides aminés (THR, SER, ASN, CIT, ORN et HIS) les différences dans les concentrations ne présentent pas de signification.

3.1.2.5. Relations entre les concentrations plasmatiques et globulaires

Les variations des concentrations plasmatiques et globulaires mises en évidence précédemment, suggèrent l'existence de relations entre les contenus plasmatiques et globulaires. Les paramètres de ces relations entre les concentrations plasmatiques et globulaires calculés séparément pour chaque échantillon ($n = 15$), NORM, CONC et DIL, ainsi que pour l'ensemble de ces échantillons ($n = 45$) sont indiqués dans le tableau 6. Les courbes pour les cas de signification sont tracées (figure 3).

3.1.2.5.1. Relations globales entre les concentrations plasmatiques et érythrocytaires

Les coefficients de corrélation (r) déterminés sont significatifs ($P < 0.05$) pour 13 acides aminés. Les pentes positives, vont de 0.078 (ALA) à 3.534 (ASP). Les coefficients de corrélation les moins significatifs sont ceux de TAU, GLY, ALA, et LYS. Aussi, le total des acides aminés globulaires est significativement corrélé à la somme des acides aminés plasmatiques.

3.1.2.5.2. Relations pour chaque échantillon suivant la situation (NOR, DIL, CON)

Cette manière de calculer fait ressortir que pour 11 acides aminés, il y a une corrélation significative entre la concentration plasmatique et la concentration globulaire :

La considération des valeurs relatives aux conditions initiales, dites normales, fait ressortir que les concentrations de 5 acides aminés, GLN, ALA, ILE, LEU et ORN, présentent des corrélations plasma-érythrocytes significatives. Remarquons que 2 acides aminés GLN et ORN étaient non corrélés dans le calcul avec les valeurs de tous les échantillons (NOR, DIL, CON).

Tableau 6. Paramètres des relations entre les contenus plasmatiques et érythrocytaires d'acides aminés calculés avec l'ensemble des observations, avec les observations initiales uniquement ou après dilution ou concentration du sang.

	Relations globales ⁽¹⁾			Relations initiales ⁽²⁾			Relations après dilution ⁽²⁾			Relation après concentration ⁽²⁾						
	r	P	R	a	r	P	R	a	r	P	R	a				
TAU	0.356	< 0.02	0.132 ^(a)	684	0.256	NS	-	-	0.252	NS	-	-	0.389	NS	-	-
ASP	0.497	< 0.001	3.534 ^(a)	1980	0.372	NS	-	-	0.253	NS	-	-	0.544	< 0.05	15.271 ^(a)	969
THR	0.100	NS	-	-	0.294	NS	-	-	0.540	< 0.05	2.072 ^(a)	91	0.133	NS	-	-
SER	0.237	NS	-	-	0.100	NS	-	-	0.527	< 0.05	1.357 ^(b)	218	0.395	NS	-	-
ASN	0.178	NS	-	-	0.102	NS	-	-	0.356	NS	-	-	0.121	NS	-	-
GLU	0.195	NS	-	-	0.008	NS	-	-	0.430	NS	-	-	0.253	NS	-	-
GLN	0.274	NS	-	-	0.640	< 0.01	0.517 ^(a)	150	0.415	NS	-	-	0.174	NS	-	-
GLY	0.453	< 0.01	0.183 ^(a)	508	0.401	NS	-	-	0.896	< 0.001	4.687 ^(a)	-3	0.269	NS	-	-
ALA	0.348	< 0.02	0.078 ^(a)	488	0.822	< 0.001	2.568 ^(a)	-491	0.865	< 0.001	2.806 ^(a)	94	0.001	NS	-	-
CIT	0.258	NS	-	-	0.413	NS	-	-	0.496	NS	-	-	0.250	NS	-	-
αAB	0.610	< 0.001	1.583 ^(a)	15	0.196	NS	-	-	0.188	NS	-	-	0.164	NS	-	-
VAL	0.909	< 0.001	0.573 ^(a)	83	0.190	NS	-	-	0.353	NS	-	-	0.146	NS	-	-
MET	0.680	< 0.001	0.217 ^(a)	31	0.124	NS	-	-	0.417	NS	-	-	0.235	NS	-	-
ILE	0.845	< 0.001	1.106 ^(a)	62	0.557	< 0.05	1.03	75	0.560	< 0.05	3.104 ^(a)	-65	0.577	< 0.05	2.037 ^(a)	-337
LEU	0.843	< 0.001	0.781 ^(a)	116	0.601	< 0.02	1.826 ^(a)	-26	0.219	NS	-	-	0.598	< 0.05	1.333 ^(b)	-253
TYR	0.714	< 0.001	0.682 ^(a)	44	0.506	NS	-	-	0.389	NS	-	-	0.063	NS	-	-
PHE	0.695	< 0.001	0.654 ^(a)	41	0.151	NS	-	-	0.463	NS	-	-	0.093	NS	-	-
ORN	0.275	NS	-	-	0.528	< 0.05	1.013	48	0.019	NS	-	-	0.528	NS	-	-
LYS	0.323	< 0.05	0.095 ^(a)	608	0.135	NS	-	-	0.553	< 0.05	1.772 ^(a)	396	0.193	NS	-	-
HIS	0.234	NS	-	-	0.070	NS	-	-	0.376	NS	-	-	0.352	NS	-	-
TRP	0.689	< 0.001	0.478 ^(a)	1	0.499	NS	-	-	0.124	NS	-	-	0.024	NS	-	-
ARG	0.292	NS	-	-	0.318	NS	-	-	0.572	< 0.05	3.861 ^(a)	249	0.073	NS	-	-
TOT	0.770	< 0.001	0.201 ^(a)	7088	0.457	NS	-	-	0.698	< 0.01	2.613 ^(a)	3674	0.325	NS	-	-

Coefficient de corrélation (r), coefficient de régression (R), terme constant (a), ⁽¹⁾ : n = 45, ⁽²⁾ : n = 15, seuil de signification (P), NS : non significatif. Pente significativement différente de 1, ^(a) P < 0.001, ^(b) P < 0.05.

La prise en compte des valeurs correspondant aux échantillons suite à la dilution plasmatique, montre que 7 acides aminés, THR, SER, GLY, ALA, ILE, LYS et ARG sont significativement corrélés. Dans ce cas, 3 acides aminés, THR, SER et ARG, n'étaient pas corrélés dans le calcul avec l'ensemble des valeurs (NOR, DIL, CON).

Le calcul avec les valeurs obtenues lors de la troisième situation expérimentale, la concentration plasmatique, montre que 3 acides aminés ASP, ILE et LEU présentent des corrélations significatives.

Considérant la somme de tous les acides aminés, il apparaît qu'une concentration plasmatique de 300.9 p. cent est accompagnée d'un accroissement de concentration dans l'érythrocyte de 25.2 p. cent soit 11.9 fois plus faible que la concentration du plasma. Cependant, une dilution plasmatique de 63.2 p. cent correspond à une diminution de 9.4 p. cent du contenu des érythrocytes, soit 6.7 fois moindre que la variation plasmatique. Ainsi, la réponse érythrocytaire à la dilution plasmatique est globalement plus intense que dans le cas d'une concentration.

D'autre part, l'augmentation de la concentration totale des acides aminés intra-érythrocytaires ne représente que 17.8 p. cent de l'augmentation plasmatique et 10.3 p. cent de l'augmentation totale sanguine en tenant compte de l'hématocrite. La diminution de la concentration intra-érythrocytaire représente 32.3 p. cent de la dilution plasmatique et 16.1 p. cent de la diminution totale sanguine.

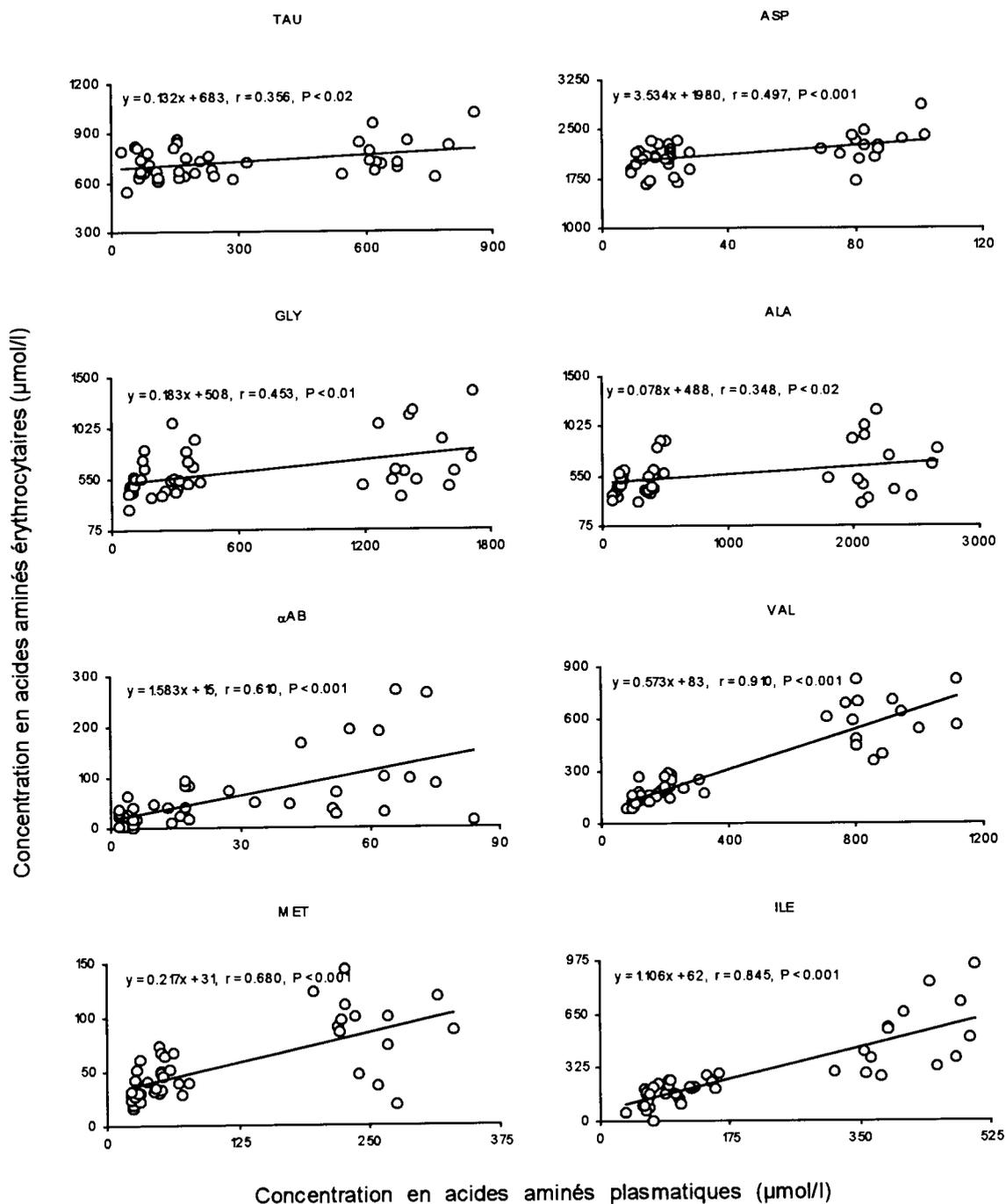


Figure 3a. Relations entre les concentrations plasmatiques et érythrocytaires.

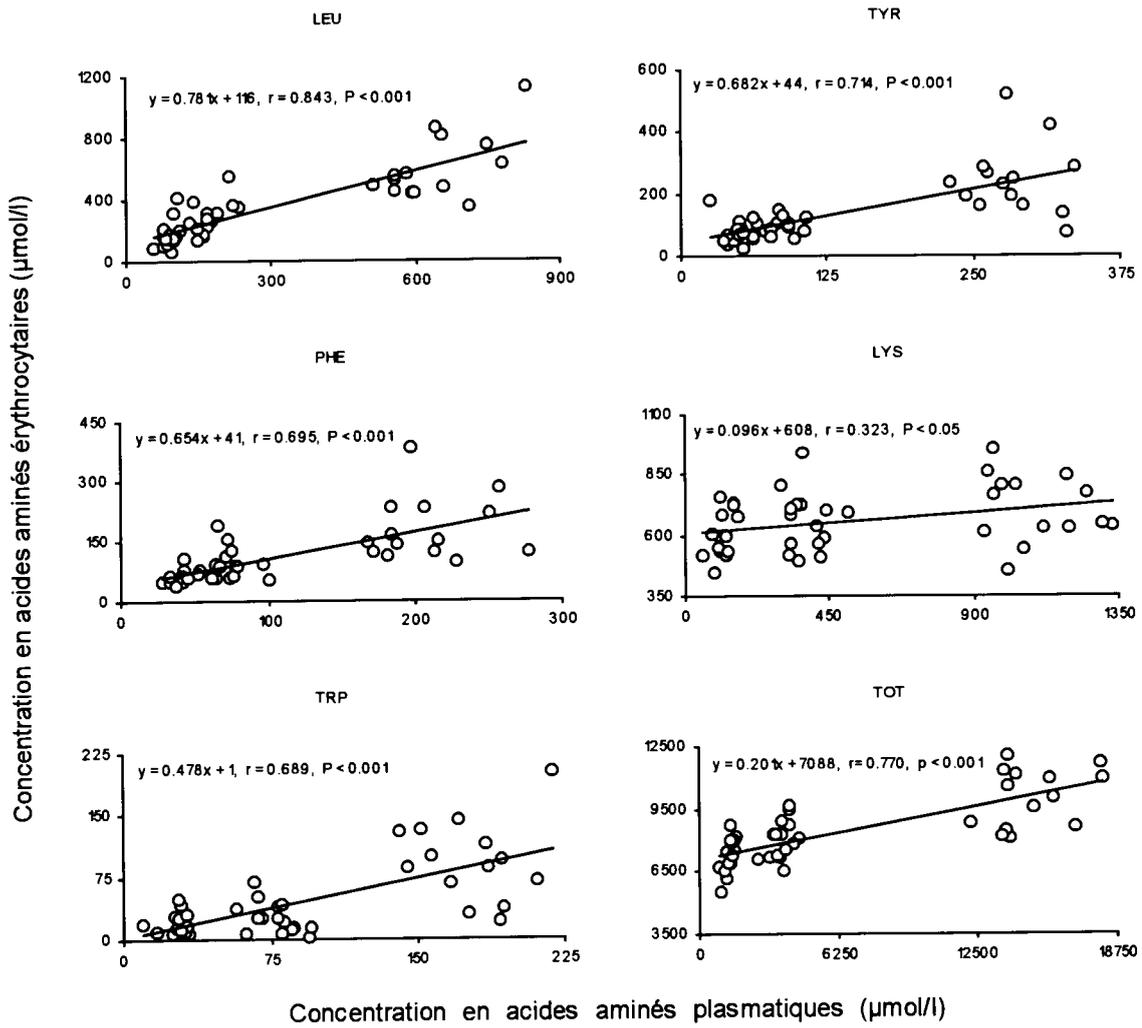


Figure 3b. Relations entre les concentrations plasmatiques et érythrocytaires.

3.1.3. Discussion

La présente investigation entreprise, *in vitro* sur du sang de rat, a pour objectif l'estimation de la part d'intervention des érythrocytes dans le transport des acides aminés par voie sanguine au cours des échanges inter-organes. Ainsi la simulation des échanges d'acides aminés entre le sang et un organe en induisant artificiellement, d'importantes variations de concentrations plasmatiques, a permis d'optimiser les modifications sanguines qui sont supposées se produire *in vivo* lorsque le sang traverse un organe.

La méthode utilisée pour obtenir la concentration en acides aminés dans les cellules sanguines repose sur la mesure des teneurs en acides aminés plasmatiques et sanguins totaux en tenant compte de la valeur de l'hématocrite. Cette procédure s'est avérée meilleure que la détermination des acides aminés sur les érythrocytes séparés du plasma par centrifugation et lavés par du sérum physiologique, où d'importante pertes en plusieurs acides aminés sont observés (HAGENFELDT et ARVIDSSON 1980). L'absence de valeurs pour la cystine du sang total est due à l'impossibilité de doser cet acide aminé dans le sang hémolysé en raison de la formation de pont disulfures avec les protéines cellulaires (PERRY et HANSEN 1969) lesquelles sont larguées lors de la déprotéinisation.

Les concentrations déterminées dans le plasma sont globalement comparables à celles mesurées par d'autres auteurs (REMESY et coll. 1978 ; LÓPEZ-TEJERO et coll. 1986 ; GIANOTTI et coll. 1990 ; PICÓ et coll. 1991, 1992, 1994a, 1995). Les conditions expérimentales et les techniques d'analyses n'étant pas identiques, des différences peuvent être observées pour certains acides aminés d'un auteur à l'autre. La concentration moyenne de glutamine est supérieure à celle déterminée par PICÓ et coll. (1991) et LÓPEZ-TEJERO et coll. (1986). La glutamine se transforme en glutamate par hydrolyse de la fonction amide (ARMSTONG et STAVE 1973) si le traitement est prolongé et l'échantillon n'est pas analysé rapidement. Elle est susceptible de cyclisation en pyrrolidone-5-carboxylate (ORESQUES et KUPFER 1967).

Concernant les concentrations érythrocytaires, les références bibliographiques permettant de comparer ces valeurs à celles d'autres équipes sont peu nombreuses chez cette espèce pourtant souvent étudiée. Ce fait a certainement pour origine la difficulté d'obtenir, chez cet animal de faible taille, des échantillons de sang assez importants pour permettre le dosage dans le plasma et dans le sang total avec les méthodes classiques d'analyse des acides aminés. Les valeurs publiées par les seuls travaux récents chez cette espèce et rapportant les concentrations globulaires semblent peu précises et très souvent inférieures à celles déterminées dans cette étude, du fait sans doute des techniques d'analyse mises en oeuvre : LÓPEZ-TEJERO (1986) ainsi que Gianotti ont dosé les acides aminés par chromatographie en couches minces, alors que l'hémolyse du sang paraît être incomplète dans les travaux de PICÓ et coll. (1991, 1992, 1994a).

L'objectif majeur de cette étude étant de rechercher et de comparer le transport globulaire au plasmatique, diverses procédures analytiques et grandeurs ont été exploitées : comparaisons des concentrations absolues dans le sang, le plasma et les globules rouges, études des différences globulaires, distributions relatives au sang total des concentrations en acides aminés, rapports des contenus érythrocytaires sur les contenus plasmatiques (E/P) et recherches de relations entre les concentrations érythrocytaires et plasmatiques par l'étude des corrélations et des régressions linéaires.

3.1.3.1. Distribution des acides aminés dans le plasma et les globules rouges

La distribution relative au sang total ou le rapport érythrocytes sur plasma (E/P) fournissent des informations intéressantes sur la répartition des acides aminés au niveau des compartiments globulaires et plasmatiques. Ces paramètres sont utilisés pour déterminer le profil des acides aminés, lequel permet de caractériser le pool des acides aminés d'une espèce et dans une situation physiologique donnée. Ces rapports sont aussi exploités pour comparer entre eux les résultats de différents auteurs ce qui permet de contourner partiellement les biais dûs aux différences de techniques et de précision des analyses.

3.1.3.1.1. *Distribution en situation initiale physiologique*

Il est généralement admis que les acides aminés dans le sang de rat se répartissent entre le plasma et le compartiment cellulaire (McMENAMY et coll. 1960 ; SOLEY et ALEMANY 1980 ; GIANOTTI et coll. 1990). Cependant, pour certains acides aminés, la distribution entre le plasma et les érythrocytes est très différente. Ainsi, plus de la moitié des proportions relatives sanguines de l'aspartate, du glutamate, de la taurine, de l'arginine, de l'ornithine, de la glycine, de la lysine et de la sérine sont concentrés dans les globules rouges. Par contre, la glutamine, la méthionine et particulièrement le tryptophane se trouvent principalement dans le plasma. Les autres acides aminés concernés par le présent travail, THR, ASN, ALA, CIT, α AB, VAL, ILE, LEU, TYR, PHE et HIS, se distribuent entre les deux phases sanguines en quantités quasi égales.

Nos observations, ne s'accordent pas avec les distributions estimées à partir de données publiées sur le rat par PICÓ et coll. (1991) où seul le glutamate se rencontre avec un taux érythrocytaire de 66 p. cent. Selon ces auteurs, les autres acides aminés sont plutôt plasmatiques, ou à la limite, se distribuent entre le plasma et les globules rouges en quantités relatives égales pour ASN, HIS et ASP soit environ 53 p. cent, 52 p. cent et 50 p. cent respectivement. Ces différences pourraient être attribuées à la technique expérimentale notamment le traitement de l'échantillon de sang avant analyse. Le temps de centrifugation pratiqué par ces auteurs était relativement long (30 mn), susceptible de provoquer une hémolyse résultant en une sortie d'acides aminés. Ceci conduit à surestimer les concentrations plasmatiques. En outre, l'hémolyse globulaire ne semble pas avoir été totale. La durée et les conditions du stockage des échantillons influencent beaucoup les résultats obtenus par autoanalyseur des acides aminés (SCHAEFER et coll. 1987 ; VAN EIJK et coll.1994).

D'autres calculs estimés à partir des données publiées par GIANOTTI et coll. (1990) sur des rats témoins, dans une expérience sur l'obésité induite par un régime de type "cafétéria", montrent que les acides aminés se concentrent essentiellement dans le plasma et que les globules rouges contiennent surtout la taurine (86 p. cent)

et la lysine (73 p. cent). L'arginine et le glutamate (dosé simultanément avec la glutamine) se trouvent en quantités semblables dans les deux phases du sang. Là aussi, les valeurs, sont très souvent éloignées de celles déterminées dans la présente étude ce qui ne permet pas de faire une comparaison valable. Ainsi, l'aspartate et le glutamate connus pour être plus abondants dans les globules rouges sont ici en faibles quantités.

D'un autre côté, le profil de distribution que nous avons analysé est similaire à celui rapporté dans le sang de le rat au niveau de la veine iliaque par PICÓ et coll. (1994_b).

La distribution entre le plasma et les érythrocytes est très différentes pour les divers acides aminés et varie considérablement en fonction des conditions expérimentales et de l'espèce animale. Le profil en acides aminés se rapporte à l'alimentation et au comportement alimentaire. Il pourrait résulter d'un métabolisme déprimé des acides aminés ou d'une adaptation métabolique, telle qu'une élévation du rapport P/G des concentrations en acides aminés indépendamment de l'alimentation mais associé à l'obésité elle même (SERRA et coll. 1991). Des changements dans la distribution des acides aminés entre les cellules sanguines et le plasma ont été décrits chez le rat dans plusieurs situations physiologiques, particulièrement au cours de la gestation et de la lactation (LÓPEZ-TEJERO et coll. 1986), en cas de restriction alimentaire (GIANOTTI et coll. 1990), au cours d'une suralimentation chronique (GIANOTTI et coll. 1990 ; PICÓ et coll. 1994_b) et en régime post-cafeteria chez des rats obèses (PICÓ et coll. 1994_b).

Dans notre étude, les acides aminés libres observés en proportions relatives importantes dans les érythrocytes (aspartate, glutamate, taurine et glycine notamment) sont principalement dits "compatibles". Cela signifie que des concentrations élevées de ces acides aminés n'interfèrent pas avec la structure et le fonctionnement propres des enzymes (VAN DER BOON et coll. 1991). En dehors de la cellule, en particulier les acides aminés dits "non-compatibles" sont rencontrés. Chez les animaux, les β -aminoacides (TAU, β -ALA), la citrulline, l'acide cystéique, l'ornithine, les acides α -, β -, γ -Aminobutyrique, la créatine, l'homosérine et la

sarcosine sont considérés comme métaboliquement inertes car ne faisant pas partie des protéines. Il est à remarquer que ces acides aminés contribuent de façon importante au pool des acides aminés libres des globules rouges.

3.1.3.1.2. Variations des distributions relatives au sang total suite aux variations des concentrations plasmatiques

Dans notre travail, l'approche adoptée est l'étude des variations des concentrations en acides aminés globulaires suites aux variations des concentrations plasmatiques. Il s'agit d'observations où des différences de concentrations globulaires suites à des variations plasmatiques sont à mettre en évidence. Or, les variations des distributions globulaires par rapports au sang total non plus que le rapport E/P ne nous renseignent exactement sur les variations des concentrations globulaires absolues ni sur les modalités des éventuelles relations plasma-érythrocytes. Ainsi dans le cas de figure où la distribution relative au sang ou le rapport E/P demeurent stables, cela implique qu'à tout changement de la concentration plasmatique est associée une variation érythrocytaire équivalente et de même sens. Tel n'est pas le cas lorsque ces rapports changent en fonction de la teneur plasmatique. En effet, les conclusions quant aux variations des concentrations globulaires absolues ne seront que partielles et non évidentes. Les relations entre le plasma et les érythrocytes peuvent alors exister ou non. Différentes situations sont envisageables dans le cas où la distribution varie : soit il y a absence de variation des concentrations globulaires suite aux variations des teneurs plasmatiques, ou bien les variations globulaires et plasmatiques sont d'amplitudes inégales et peuvent être de sens opposés.

L'appauvrissement par dilution de la teneur plasmatique n'a pas provoqué de variation de la distribution dans les globules rouges et dans le plasma par rapport au sang total de cinq acides aminés, α AB, ILE, LEU, TYR et PHE. Après enrichissement plasmatique, seuls les répartitions relatives au sang total de α AB et TRP n'ont pas varié. La comparaison des situations extrêmes (dilution-concentration) montre que seule la distribution du TRP est demeurée inchangée.

Dans les limites de cette étude et pour ces diverses situations, les concentrations globulaires absolues ont changé en réponse aux modifications des teneurs plasmatiques. Les variations globulaires seraient équivalentes à la variation du plasma. Les concentrations globulaires en ces acides aminés seraient alors en relations linéaires et de même sens avec les concentrations plasmatiques.

Or, pour les acides aminés dont les distributions ou les rapports E/P ont significativement bougé, cela n'implique pas toujours une stabilité des concentrations erythrocytaires absolues et les relations éventuellement existantes pourraient être non linéaires et même de sens contraire.

En une première approche, du fait de la stabilité des distributions relatives au sang suite aux variations de la concentration plasmatique, nous déduisons que les concentrations globulaires absolues de α AB (après dilution et enrichissement), ILE, LEU, TYR et PHE (après dilution) et TRP (après enrichissement) ont changé. Cela pourrait indiquer pour ces 6 acides aminés du moins que les globules rouges interviennent dans leur transport au cours des échanges inter-organes. Cependant, pour les acides aminés, dont les distributions ou les rapports E/P ont varié, au contraire de la stabilité, la variation des rapports E/P ne renseigne exactement ni sur les changements de concentrations globulaires ni sur la direction de ceux-ci, vers l'intérieur de la cellule ou hors de celle-ci. Ainsi, l'examen ci-après des différences de concentrations globulaires absolues permettrait alors une meilleure interprétation.

3.1.3.2. Variations des teneurs globulaires suite aux variations des teneurs plasmatiques

Pendant le temps de contact globules-plasma de 30 sec, l'augmentation ou la diminution des concentrations plasmatiques ont affecté les contenus globulaires de 17 acides aminés dont les variations vont dans la même direction que celle du plasma sauf pour GLN (lors de la dilution), ASN (lors de la concentration) et HIS (lors de la concentration) qui évoluent en sens contraire. Pour les acides aminés

dont le transport possible est mis en évidence par l'étude des variations des distributions par rapport au sang total (α AB, ILE, LEU, TYR, PHE et TRP), des variations significatives dans les concentrations globulaires sont observées.

L'analyse des données nous permet de retenir que les variations globulaires sont significatives pour 14 acides aminés. Huit acides aminés, ASP, α AB, VAL, MET, ILE, LEU, TYR et PHE pouvaient traverser la membrane érythrocytaire dans les deux sens selon le gradient de concentration. Pour 3 autres acides aminés, GLY, ALA, TRP, il semble que le mouvement soit dirigé vers la cellule et non pas vers l'extérieur, cependant que SER, GLU et ARG pouvaient seulement sortir de l'érythrocyte mais pas y entrer.

Chez le rat, tous ces acides aminés sont transportés par l'érythrocyte, mais des controverses, sur l'importance et la vitesse de passage à travers la membrane érythrocytaires, persistent dans la littérature notamment pour certains acides aminés : les acides aminés anioniques ASP et GLU, les acides aminés neutres ALA et GLN et les acides aminés basiques.

Concernant les acides aminés anioniques, PICÓ et coll. (1994b) ont mesuré de faibles variations de gradient erythrocytes-plasma, dans le sang artériel et veineux chez le rat nourri et à jeun. Des études *in vitro* sur les paramètres cinétiques, ont montré une entrée par diffusion de glutamate dans les erythrocytes de rat (PICÓ et coll. 1992).

Un système de transport pour les acides aminés anioniques est présent dans d'autres organes tels que le foie, le rein et le fibroblaste humain (CHRISTENSEN 1982). Cependant, dans les erythrocytes, il n'a été mis en évidence que chez le chien (ELWYN 1966 ; ELWYN et coll. 1972), alors que la plupart des érythrocytes des mammifères en sont dépourvus (ELLORY 1987). Chez le rat, FELIPE et coll. (1990) ont montré *in vitro* une grande imperméabilité des érythrocytes au glutamate et ont conclu à l'absence de systèmes spécifiques pour le transport des amino acides anioniques. Mais, dans ces derniers travaux, il y a une certaine entrée de glutamate très faible atteignant un rapport erythrocyte-plasma (E/P) de 0.15 après

deux heures d'incubation. Notons ici, qu'en plus du fait que ces expériences sont réalisées avec des globules lavés, le temps d'incubation de deux heures est à considérer. Egalement, les différences significatives de concentrations globulaires observées dans notre travail *in vitro* concernant ASP (dans les deux sens du gradient) et GLU (lors de la dilution), pourraient être attribuables au fait que les variations plasmatiques induites artificiellement soient beaucoup plus importantes (enrichissement x 4 et dilution x 0.36) que celles qui auraient lieu en réalité *in vivo* en conditions physiologiques. Il en résulte de ce qui précède que, chez le rat, les acides aminés anioniques n'ont pas de système de transport propre mais plutôt traversent faiblement la membrane érythrocytaire par processus de diffusion.

Parmi les acides aminés neutres, l'alanine, dans nos expériences *in vitro*, semble uniquement entrer dans le globule rouge, le passage dans le sens contraire n'a pas été mis en évidence. Toujours *in vitro*, PICÓ et coll. (1992) rapportent, pour cet acide aminé, des Km, Vmax et Kd respectivement de 13.5 μmol , 0.747 nmol l^{-1} et 2.42 h^{-1} lors de sa capture érythrocytaire. Ces observations témoignent d'un enrichissement globulaire en alanine suite à une augmentation de concentration plasmatique au cours de l'absorption intestinale ou induite artificiellement. Cela ne ferait qu'accroître le flux de l'alanine entre les tissus périphériques et le foie et rendre ainsi disponible pour le métabolisme hépatique une plus grande quantité de cet acide aminé. Des études de cinétiques sur le transport de l'alanine et la glutamine (FELIPE et coll. 1992) montrent que, durant la maturation des érythrocytes de rat, le système de transport Na^+ dépendant ASC perd de sa capacité et de son affinité pour l'alanine et que le système Na^+ dépendant N pour la glutamine disparaît totalement. La glutamine entrerait ainsi dans l'érythrocyte par diffusion non facilitée. L'entrée de la glycine que nous avons observée *in vitro* pourrait avoir lieu par la Bande 3, transporteur des anions. Le système GLY, Na^+ dépendant et exigeant en ions F^- , Br^- et Cl^- (ELLORY 1987), est peu susceptible d'intervenir dans nos conditions expérimentales. Il est à noter que cet acide aminé est nécessaire à la synthèse Na^+ dépendante du glutathion.

Les différences de concentrations globulaires pour les acides aminés dibasiques n'ont concerné *in vitro* que l'arginine lors de la dilution du plasma. Cela

rejoint les conclusions de FELIPE et coll. (1990) à propos de l'absence de système de transport spécifique pour les acides aminés basiques dans les érythrocytes de rat. Dans d'autres situations physiologiques, le jeûne par exemple, le transport érythrocytaire de ces acides aminés serait très actif (PICÓ et coll. 1992). Ils pourraient entrer dans le globule rouge par un système de type ASC. En effet, la lysine et l'histidine comptent parmi les acides aminés essentiels pour le rat.

3.1.3.3. Relations plasmatiques et érythrocytaires

L'étude des variations des distributions des concentrations globulaires par rapport au sang total et des différences des concentrations globulaires, a suggéré l'existence de relations entre les contenus plasmatiques et globulaires. Les relations recherchées ont porté sur l'ensemble des observations (globales) et sur les observations décomposées en groupes selon le sens de la variation des concentrations plasmatiques ou du gradient de concentration plasma-érythrocytes : normales, suite à l'appauvrissement (dilution) et suite à l'enrichissement (concentration) plasmatiques.

3.1.3.3.1. Relations plasmatiques et érythrocytaires globales

Des relations globales entre l'évolution de toutes les concentrations plasmatiques et de l'ensemble des concentrations globulaires ont été trouvées pour 13 acides aminés : TAU, ASP, GLY, ALA, α AB, VAL, MET, ILE, LEU, TYR, PHE, LYS et TRP. Les huit acides aminés qui traversent l'érythrocyte dans les deux sens et les trois qui sont uniquement prélevés par le globule rouge y sont représentés. Pour tous les acides aminés dont les variations globulaires ne sont significatives que suite à la dilution du plasma (SER, GLU, ARG) nous n'avons pas trouvé de relation entre l'érythrocyte et le plasma. Les taux globulaires des autres acides aminés semblent stables et indépendants de ceux du plasma.

Pour ces 13 acides aminés, toutes les pentes sont positives et diffèrent significativement de 1 c'est à dire que la quantité d'acide aminé véhiculée par le plasma est différente de celle véhiculée par les érythrocytes. La pente est fonction du taux de transport et de sa direction. Les variations dans les teneurs érythrocytaires des acides aminés sont concomitantes et de même sens que celles du plasma. L'intervention des globules rouges est ainsi très importante dans le transport des acides aminés, et la seule considération des teneurs du plasma sous-estime de beaucoup le transport des acides aminés dans les échanges inter-organes. Ainsi, ASP, α AB et ILE sont transportés à des taux très supérieurs à ceux du plasma respectivement : 353 p. cent, 158 p. cent et 111 p. cent du plasma. Ce transport est le plus faible pour TAU, GLY, ALA, MET et LYS. Pour les autres acides aminés l'érythrocyte contribue en une proportion allant de la moitié environ à 78 p. cent du transport plasmatique.

Les corrélations même significatives ne peuvent renseigner complètement sur la relation. En tout état de cause, et dans le contexte de notre étude, nous estimons qu'une corrélation n'a de sens véritable que si elle est ≥ 0.6 , ce qui suppose qu'au moins 36 p. cent des variations globulaires peuvent être expliquées par les variations plasmatiques et suivre celles-ci. Car dans notre travail où la mise en évidence du transport érythrocytaire repose sur l'influence de la variation des concentrations plasmatiques sur celles des globules, le coefficient de corrélation correspondant à l'éventuelle relation plasma-érythrocytes doit être suffisamment élevé pour mettre en relief cet effet. Ce seuil de corrélation retenu est à notre sens concordant avec la précision des résultats. L'erreur relative totale cumulée, en sommant l'erreur due à la variabilité de la technique d'analyse de 3 à 15 p. cent en fonction des acides aminés (cf. chapitre 2) avec l'erreur expérimentale propre de 25 p. cent en moyenne (prélèvement de sang, traitement des échantillons, fluctuations intra et inter-individuelles), peut atteindre et même dépasser 30 p. cent. Il en ressort que les relations globales considérées comme plausibles dans le présent travail concernent seulement α AB, VAL, MET, ILE, LEU, TYR, PHE, TRP et TOT.

Dans la littérature consultée sur l'érythrocyte de rat dans diverses conditions expérimentales et situations physiologiques, le transport de ces acides aminés par

le globule rouge est cité (LÓPEZ-TEJERO et coll. 1986 ; FELIPE et coll. 1990, 1992 ; GIANOTTI et coll. 1990 ; PICÓ et coll. 1991, 1992, 1994_{a,b} ; YAO et coll. 1993 ; ZHOU et coll. 1990).

Il est possible que des cas de corrélations ne soient ici significatifs uniquement qu'à cause du nombre d'observations relativement élevé, d'où l'importance d'examiner aussi les pentes. Une corrélation linéaire non significative pourrait être attribuée à deux évolutions simultanées et de sens opposés qui tendent à éliminer toute relation globale. Tous les acides aminés ne traversent pas la membrane érythrocytaire dans les deux sens. Certains sont uniquement prélevés par les globules rouges et d'autres en sont relargués. Ainsi est-il peut être plus judicieux de considérer le calcul des corrélations en décomposant les observations suivant chaque situation, normale (NORM), après dilution (DIL) et concentration (CONC) du plasma et de rechercher ainsi des relations en fonctions du sens de la variation de la teneur plasmatique.

3.1.3.3.2. Relations selon le sens de la variation de la concentration plasmatique

Les corrélations recherchées entre les concentrations globulaires et plasmatiques suivant la situation, normale, après enrichissement ou appauvrissement du contenu plasmatique, ont montré que 11 acides aminés présentent une corrélation positive et de même sens que le plasma. Mais, ces corrélations n'existent pas dans tous les sens du gradient. Dans les conditions physiologiques normales, GLN, ALA, ILE, LEU et ORN globulaires sont corrélées au plasma. L'enrichissement plasmatique est corrélé à un enrichissement globulaire en ASP, ILE et LEU. La dilution a fait varier THR, SER, GLY, ALA, ILE, LYS, ARG et l'ensemble (TOT) des acides aminés. De l'examen de cette liste il en ressort que des changements de concentration plasmatique n'affectent pas systématiquement le contenu globulaire. L'érythrocyte réagit différemment à ces variations selon le sens du gradient. Ainsi, lors des échanges inter-organes, le transport érythrocytaire des acides aminés ne semble pas se faire dans les deux sens, c'est à dire à la fois

prélèvement à partir du plasma et approvisionnement de celui-ci, pour tous les acides aminés.

Parmi les acides aminés dont la concentration globulaire varie significativement, dans un sens ou dans l'autre, suite à l'enrichissement ou à la dilution du plasma, seule l'isoleucine plasmatique est significativement corrélée à celle du globule. Les acides aminés dont les différences globulaires ne sont significatives que suite à l'enrichissement du plasma ne présentent pas de corrélation. Cependant, parmi ceux dont les variations des teneurs globulaires sont significatives lors de la dilution du plasma, les concentrations de SER et ARG au niveau de la phase plasmatique sont corrélées à celles de la phase globulaire.

L'aspartate et la leucine pénètrent dans l'érythrocyte mais ne peuvent le quitter pour le plasma. D'autres acides aminés érythrocytaires se comportent de façon inverse. Le transport par les hématies apparaît aussi pour THR, SER, GLY, ALA, LYS et ARG dans le sens de l'approvisionnement du plasma en ces acides aminés. Seule l'isoleucine semble être transportée par le globule rouge dans les deux sens de la variation de la concentration plasmatique.

Ces transports érythrocytaires trouvés par l'étude des relations plasma-globules en fonction du sens de l'échange simulé organe-sang (dilution ou enrichissement du plasma) sont très supérieurs de ceux observés dans le plasma. Ils sont au moins 130 p. cent de fois plus importants que ceux du plasma pour LEU et SER et dépassent 1500 fois pour l'ASP.

Encore faut-il que les corrélations même significatives soient suffisamment élevées pour indiquer l'existence d'une forte relation. A l'exception de la glycine et de l'alanine, les coefficients de corrélations obtenus en considérant le sens du gradient de concentration sont en général faibles se situant entre 0.54 et 0.60.

Pour la glycine après dilution du plasma ($r = 0.896$) 80 p. cent des variations globulaires pourraient être expliquées par les variations plasmatiques. L'alanine globulaire est fortement corrélée avec celle du plasma dans les conditions normales,

avec $r = 0.822$, ce qui signifie que 68 p. cent de la variation de la concentration globulaire suivent les fluctuations de la concentration plasmatique. De même, la sortie de l'alanine du globule est fortement associée à la diminution de la concentration plasmatique avec $r = 0.865$, ce qui veut dire que 75 p. cent de la fluctuation globulaire sont dûs aux fluctuations de la concentration plasmatiques.

Quatre acides aminés cependant, ASN, GLU, CIT et HIS, en dépit de leur important rôle métabolique, n'ont montré aucune corrélation entre les concentrations érythrocytaires et plasmatiques, ni globale ni en fonction du gradient de concentration. Ces acides aminés semblent ne pas franchir la membrane érythrocytaire *in vitro* chez le rat. A part le glutamate dont le transport érythrocytaire est étudié chez plusieurs espèces animales, les trois autres sont très peu mentionnés dans les publications et des systèmes de transports propres ne leur sont pas attribués.

3.3.1.4. Conclusions

Regardant d'une part les variations des concentrations globulaires suite aux variations des concentrations plasmatiques, et considérant la signification et l'importance des coefficients de corrélations, nos résultats obtenus chez le rat *in vitro* ont montré clairement que les érythrocytes sont perméables aux acides aminés α AB, VAL, MET, ILE, LEU, TYR, PHE et TRP. D'autres acides aminés sont susceptibles d'être échangés de manière plus faible par les globules rouges :

La glutamine globulaire est en relation ($r = 0,64$) avec celle du plasma dans les limites des fluctuations des concentrations normales (initiales) ; les variations plasmatiques, plus importantes, induites expérimentalement n'ont pas d'effets.

La glycine ne présente de forte corrélation ($r = 0.90$) entre les deux compartiments que lors de l'appauvrissement du plasma. Tout porte à considérer que le globule rouge se comporte comme fournisseur de glycine au plasma pour le maintien de la concentration normale.

Dans les conditions physiologiques dites normales, les variations plasmatiques de l'alanine sont corrélées à celles de l'érythrocyte. Comme pour la glycine, les deux compartiments sanguins sont corrélés lors de la dilution du plasma. Le rôle de l'alanine dans la gluconéogenèse est à envisager ici. L'érythrocyte fournit cet acide aminé au plasma, et augmente ainsi le transfert de l'alanine vers les organes gluconéoformateurs.

Considérés ensemble, les résultats obtenus ici fournissent de bons arguments pour la présence de systèmes de transport distinct dans la membrane érythrocytaire du rat¹.

Notons toutefois, des interactions ayant pour origine, d'une part la présence concomitante des 23 acides aminés et, d'autre part, les variations importantes des concentrations induites expérimentalement (enrichissement et appauvrissement plasmatiques), variations qui s'écartent beaucoup des conditions physiologiques. Ces interactions peuvent être de type activateur ou inhibiteur dans le transport des acides aminés. D'où l'observation d'un passage, même faible dans l'érythrocyte (ASP, GLU), qui ne devrait pas se faire ou l'absence de certains autres. En effet tous les phénomènes de transport : diffusion, sodium dépendance ou non, transtimulation, sont certainement modifiés en fonction de la situation physiologique.

Ces observations seront confrontés avec ceux obtenus dans l'expérience suivante sur le *rat in vivo*, ce qui permet une analyse plus globale de l'intervention des érythrocytes dans le transfert physiologique inter-organe des acides aminés.

¹ Cf 3.3 interprétation des échanges plasma-globules en termes de systèmes de transports membranaires.

3.2. PARTICIPATION DES ERYTHROCYTES AUX ECHANGES INTER-ORGANES DES ACIDES AMINES CHEZ LE RAT *IN VIVO*

3.2.1. Protocole expérimental

3.2.1.1 Animaux

Quinze rats mâles de souche Wistar (Iffa credo, les Oncins) ont servi à cette expérimentation. Le poids moyen le jour des prélèvements était de 228 ± 17 g. Ces animaux ont été placés trois semaines avant de subir les prélèvements en conditions stables d'éclairage L/D 12/12 et de température 22 ± 1 °C avec de la nourriture fournie *ad libitum*. Dans le but d'augmenter l'apport intestinal d'acides aminés au sang, pendant l'expérience, l'accès à la nourriture a été limité à la dernière heure de la phase obscure (8h30-9h30). Cette disposition a été prise pour habituer les animaux à ingérer leurs aliments à un moment précis du nyctémère selon la technique du *feeding schedule* (FABRY 1969). De l'eau a été fournie de manière permanente pendant tout le nyctémère. La nourriture était de type aliment de laboratoire (U.A.R. protéines 22 p. cent, lipides 5 p. cent, glucides 51 p. cent) sauf durant les 5 jours qui précédaient les prélèvements. A ce moment, pour augmenter l'apport protéique, en plus de la nourriture habituelle, un aliment protéique semi-synthétique préparé au laboratoire à base de caséine supplémentée en méthionine était proposé aux animaux en plus de l'alimentation habituelle (SCHAEFER et coll. 1976 ; PIQUARD et coll. 1978). Durant ce protocole, l'augmentation du poids corporel des animaux a été le témoin d'une bonne adaptation aux conditions expérimentales (3 ± 1 g/j la première semaine, 4 ± 1 g/j la seconde et 6 ± 2 g/j pour la troisième).

3.2.1.2. Prélèvement de sang

Dans l'heure suivant la période d'alimentation (en moyenne $46.5 \text{ min} \pm 28.2$ min) une anesthésie a été réalisée par ingestion intrapéritonéale de

PENTOBARBITAL SODIQUE à raison de 60 mg/kg. Après laparotomie, la veine porte a été cathétérisée et environ 1 ml de sang prélevé par lente aspiration en utilisant une pompe à perfusion inversée (débit 0.5 ml/min). Dès la mise en place du prélèvement dans la veine porte, la même quantité de sang a été prélevée dans une carotide par ponction directe.

Ces deux échantillons de sang ont été divisés en deux parties dont l'une a servi après centrifugation à la détermination des acides aminés plasmatiques, la seconde à la détermination des acides aminés totaux après hémolyse. Les techniques d'analyse ainsi que les traitements des échantillons ont été identiques à ceux décrits précédemment (cf 2.1). L'hématocrite a été déterminé sur chaque échantillon de sang. Dans le sang artériel, il a été de 41.0 ± 3.6 p. cent et de 46.5 ± 2.5 dans le sang portal.

Chaque échantillon est analysé trois fois, les 15 séries expérimentales ont exigé un délai de 18 semaines.

3.2.1.3. *Calculs*

Les concentrations ($\mu\text{mol/l}$) érythrocytaires et plasmatiques ont été divisées par des facteurs de corrections respectivement égaux à 0.70 et 0.92 (McMENAMY et coll. 1960 ; PICÓ et coll. 1991, 1992) pour tenir compte de la différence entre le contenu en eau des érythrocytes et du plasma. Les teneurs érythrocytaires ont été calculées au moyen de l'équation indiquée précédemment (cf 2.2).

3.2.2. **Résultats**

Les moyennes et leurs écarts types des acides aminés plasmatiques, sanguins totaux et érythrocytaires déterminées dans l'artère et dans la veine porte sont rassemblées dans le tableau 7. L'absence de valeurs pour la cystine dans le sang total a été déjà discutée.

Tableau 7. Concentrations moyennes d'acides aminés du plasma, du sang total et des érythrocytes, déterminées dans l'artère et dans la veine porte.

	ARTÈRE						VEINE PORTE					
	Plasma		Sang total		Erythrocytes		Plasma		Sang total		Erythrocytes	
	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.
TAU	244	66	454	94 ^(a)	1080	367	334	46	552	69 ^(a)	1145	188
ASP	25	5	969	146 ^(a)	3323	504	60	22	955	118 ^(a)	2834	361
THR	425	73	395	74 ^(c)	503	162	613	134	502	90 ^(a)	535	192
SER	388	59	429	61 ^(a)	697	135	697	201	600	114 ^(b)	697	149
ASN	135	37	153	32 ^(b)	256	63	351	125	268	62 ^(a)	246	64
GLU	129	32	288	47 ^(a)	739	135	258	71	358	53 ^(a)	675	117
GLN	762	91	715	88 ^(b)	925	199	1005	226	833	128 ^(a)	908	171
GLY	578	103	635	101 ^(c)	1025	278	1495	492	1184	210 ^(a)	1180	443
ALA	894	156	850	178	1123	465	2127	783	1758	415 ^(a)	1904	774
CIT	212	32	187	25 ^(b)	215	74	325	55	245	27 ^(b)	220	72
αAB	19	5	20	5	31	14	21	5	23	6	35	14
VAL	475	98	420	94 ^(a)	486	161	643	160	554	127 ^(c)	646	177
CYS	112	19	-	-	-	-	46	25	-	-	-	-
MET	126	22	114	20 ^(b)	136	45	182	44	152	32 ^(a)	166	61
ILE	206	63	187	63 ^(b)	230	108	345	113	289	90 ^(a)	319	120
LEU	345	92	333	77	449	104	573	180	517	126 ^(c)	647	139
TYR	166	51	169	50	249	92	251	73	258	72	381	144
PHE	111	31	120	30	189	76	224	74	227	71	329	126
ORN	127	54	146	55	247	141	148	110	179	91	309	177
LYS	437	103	545	124 ^(a)	1003	257	674	225	690	145	1013	276
HIS	106	28	88	27 ^(a)	88	46	200	67	153	61 ^(a)	141	117
TRP	127	24	101	21 ^(a)	90	38	142	27	108	21 ^(a)	99	60
ARG	203	48	329	44 ^(a)	728	91	372	134	442	77 ^(b)	747	128
TOT	6240	955	7645	1037 ^(a)	13810	2372	11039	2863	10846	1672	15176	2308

Différences significatives entre les concentrations (μmol/l) plasmatiques et sanguines totales, ^(a) P < 0.001, ^(b) P < 0.01, ^(c) P < 0.02 ; test t apparié de Student. Moy = moyenne, S.D. = écart type, n = 15 pour l'artère et n = 14 pour la veine porte.

3.2.2.1. Concentrations des acides aminés plasmatiques et sanguins totaux

Dans le sang artériel, les concentrations plasmatiques de 6 acides aminés, ALA, α AB, LEU, TYR, PHE et ORN, ne sont pas différentes de celles du sang total. Parmi ceux dont les concentrations sont différentes, 8 acides aminés, THR, GLN, CIT, VAL, MET, ILE, HIS et TRP, ont des valeurs supérieures dans le plasma.

Dans le sang de la veine porte, les concentrations plasmatiques de 17 acides aminés diffèrent de celles du sang total et 5 (α AB, TYR, PHE, ORN, LYS) ne présentent pas de différences significatives. Mais dans cet échantillon pour 13 acides aminés parmi les 17, THR, SER, ASN, GLN, GLY, ALA, CIT, VAL, MET, ILE, LEU, HIS et TRP, les concentrations plasmatiques sont supérieures. Pour les 4 restants, TAU, ASP, GLU et ARG, elles sont inférieures à celles du sang total.

3.2.2.2. Différences artério-veineuses plasmatiques et érythrocytaires

Dans le tableau 8 sont rassemblées les moyennes des différences de concentrations artério-veineuses.

Dans le plasma, les différences artério-veineuses positives pour tous les acides aminés sauf la cystine, traduisent un enrichissement plasmatique. Ces différences sont faibles et non significatives pour 2 acides aminés, α AB et ORN. La cystine est le seul acide aminé dont la différence négative significative semble indiquer un prélèvement dans le plasma.

Dans le sang total, l'acide aspatique présente une différence négative mais non significative. Quoique positives, les différences de trois acides aminés, α AB, ORN et TRP, sont faibles et non significatives.

Tableau 8. Moyennes des différences artério-veineuses des concentrations d'acides aminés déterminées dans le plasma, dans le sang total et dans les érythrocytes.

	DIFFERENCE VEINE PORTE - ARTERE					
	Plasma		Sang total		Erythrocytes	
	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.
TAU	91	69 ^(a)	98	119 ^(b)	65	423
ASP	35	20 ^(a)	-14	144	-489	484 ^(b)
THR	187	125 ^(a)	107	83 ^(a)	32	226
SER	308	171 ^(a)	171	89 ^(a)	0	185
ASN	216	106 ^(a)	115	47 ^(a)	-10	94
GLU	130	57 ^(a)	70	49 ^(a)	-64	169
GLN	243	190 ^(a)	118	92 ^(a)	-18	233
GLY	917	505 ^(a)	549	183 ^(a)	156	622
ALA	1233	753 ^(a)	908	318 ^(a)	781	1000 ^(c)
CIT	113	43 ^(a)	59	30 ^(a)	5	104
α AB	2	6	3	8	4	18
VAL	168	111 ^(a)	135	82 ^(a)	160	155 ^(b)
CYS	-66	27 ^(a)	-	-	-	-
MET	56	38 ^(a)	38	24 ^(a)	30	48 ^(d)
ILE	140	86 ^(a)	101	64 ^(a)	89	104 ^(b)
LEU	227	157 ^(a)	185	102 ^(a)	198	132 ^(a)
TYR	85	57 ^(a)	89	45 ^(a)	132	136 ^(b)
PHE	112	68 ^(a)	107	72 ^(a)	141	160 ^(b)
ORN	21	84	34	80	62	240
LYS	237	188 ^(a)	145	96 ^(a)	11	233
HIS	94	52 ^(a)	65	46 ^(a)	53	103
TRP	16	16 ^(b)	8	21	8	67
ARG	168	118 ^(a)	113	73 ^(a)	19	165
TOT	4799	2659 ^(a)	3200	1421 ^(a)	1366	3512

Différences artério-veineuses des concentrations ($\mu\text{mol/l}$) significatives, ^(a) $P < 0.001$, ^(b) $P < 0.01$, ^(c) $P < 0.02$, ^(d) $P < 0.05$; test t apparié de Student. Moy = moyenne, S.D. = écart type, $n = 14$.

Les différences de concentrations érythrocytaires calculées montrent une diminution pour quatre acides aminés, ASP, ASN, GLU et GLN, dont seule celle de l'acide aspartique est significative suggérant une libération par les érythrocytes. Ces différences sont positives pour les autres acides aminés, mais ne sont significatives que pour 7 d'entre eux, ALA, VAL, MET, ILE, LEU, TYR et PHE, indiquant un enrichissement des érythrocytes.

Il apparaît ainsi que pour ces 8 acides aminés, les différences significatives de concentration érythrocytaires artério-veineuses rendent compte de la participation des érythrocytes aux échanges organe-sang. De l'artère vers la veine porte, les variations des concentrations érythrocytaires vont dans le même sens que

celles du plasma sauf pour l'acide aspartique dont la concentration diminue dans les érythrocytes alors qu'elle augmente dans le plasma.

En faisant la somme des concentrations de tous les acides aminés, exception faite de la cystine, une variation artério-veineuse de 4799 $\mu\text{mol/l}$ dans le plasma est accompagnée d'une variation de 3200 $\mu\text{mol/l}$ dans le sang total et de 1366 $\mu\text{mol/l}$ dans les érythrocytes. Cette dernière représente 28 p. cent de la variation plasmatique. Tenant compte de l'hématocrite moyen, les variations dans le contenu érythrocytaire représentent 19 p. cent des différences artério-veineuses du sang total.

Les différences de concentrations des acides aminés plasmatiques, sanguins et érythrocytaires déterminées dans le sang de la veine porte et celui de l'artère, sont représentées sous la forme d'un histogramme (figure 4). L'ordre de présentation est fonction de l'importance des échanges plasmatiques.

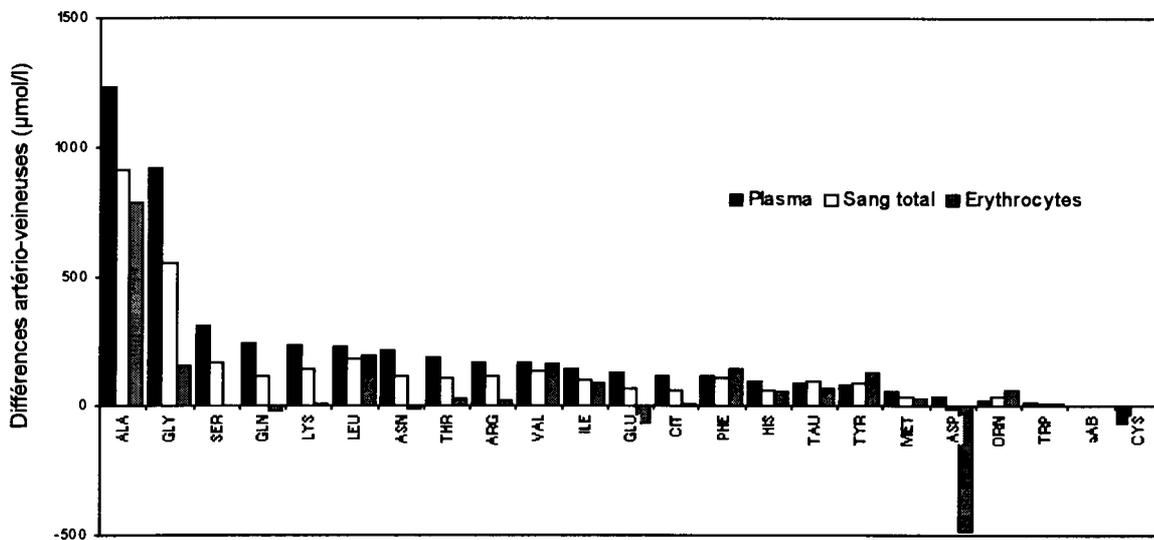


Figure 4. Différences artério-veineuses des concentrations d'acides aminés déterminées dans le plasma, le sang total et les érythrocytes.

3.2.2.3. Relations entre les concentrations plasmatiques et érythrocytaires

Les variations concomitantes et de même sens de la plupart des concentrations plasmatiques et érythrocytaires suggèrent l'existence de relations entre les concentrations d'acides aminés de ces deux compartiments sanguins. Dans le but de mettre en évidence de telles relations, les concentrations érythrocytaires ont été corrélées avec celles du plasma correspondant pour tous les échantillons sanguins. Les paramètres de ces corrélations sont rassemblés dans le tableau 9. Les coefficients de corrélations sont significatifs pour 6 acides aminés (VAL, ILE, LEU, TYR, PHE, HIS). Pour ces acides aminés, les coefficients de regression (pentes) sont positifs et varient dans un intervalle de 0.6 à 1. La figure 5 regroupe les représentations graphiques pour les acides aminés dont les relations sont significatives.

Tableau 9. Paramètres des relations entre les concentrations des acides aminés plasmatiques et érythrocytaires déterminés dans les sang artériels et veineux.

	r	R	a	P
TAU	-0.155	-	-	NS
ASP	-0.348	-	-	NS
THR	0.087	-	-	NS
SER	-0.001	-	-	NS
ASN	-0.217	-	-	NS
GLU	-0.171	-	-	NS
GLN	-0.015	-	-	NS
GLY	-0.115	-	-	NS
ALA	0.279	-	-	NS
CIT	-0.198	-	-	NS
α AB	0.334	-	-	NS
VAL	0.667	0.791	121	< 0.001
MET	0.263	-	-	NS
ILE	0.699	0.749	65	< 0.001
LEU	0.739	0.644	250	< 0.001
TYR	0.592	1.103	92	< 0.001
PHE	0.674	1.057	84	< 0.001
ORN	0.239	-	-	NS
LYS	0.161	-	-	NS
HIS	0.480	0.632	21	< 0.01
TRP	0.010	-	-	NS
ARG	0.040	-	-	NS
TOT	0.256	-	-	NS

Coefficient de corrélation (r), coefficient de regression (R), terme constant (a), seuil de signification (P), NS = non significatif.

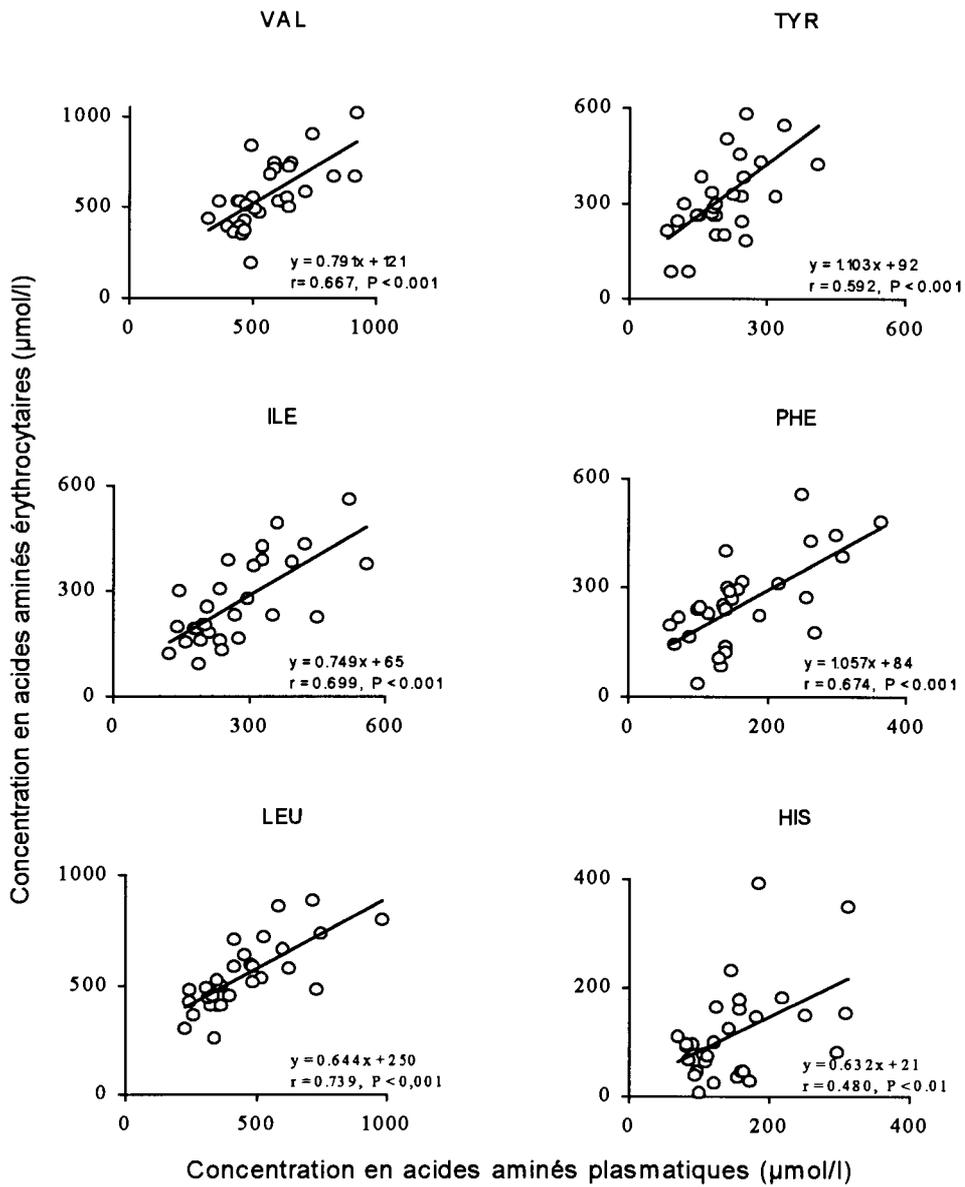


Figure 5. Relations entre les concentrations plasmatiques et érythrocytaires.

3.2. PARTICIPATION DES ERYTHROCYTES AUX ECHANGES INTER-ORGANES DES ACIDES AMINES CHEZ LE RAT *IN VIVO*

3.2.1. Protocole expérimental

3.2.1.1 Animaux

Quinze rats mâles de souche Wistar (Iffa credo, les Oncins) ont servi à cette expérimentation. Le poids moyen le jour des prélèvements était de 228 ± 17 g. Ces animaux ont été placés trois semaines avant de subir les prélèvements en conditions stables d'éclairage L/D 12/12 et de température 22 ± 1 °C avec de la nourriture fournie *ad libitum*. Dans le but d'augmenter l'apport intestinal d'acides aminés au sang, pendant l'expérience, l'accès à la nourriture a été limité à la dernière heure de la phase obscure (8h30-9h30). Cette disposition a été prise pour habituer les animaux à ingérer leurs aliments à un moment précis du nyctémère selon la technique du *feeding schedule* (FABRY 1969). De l'eau a été fournie de manière permanente pendant tout le nyctémère. La nourriture était de type aliment de laboratoire (U.A.R. protéines 22 p. cent, lipides 5 p. cent, glucides 51 p. cent) sauf durant les 5 jours qui précédaient les prélèvements. A ce moment, pour augmenter l'apport protéique, en plus de la nourriture habituelle, un aliment protéique semi-synthétique préparé au laboratoire à base de caséine supplémentée en méthionine était proposé aux animaux en plus de l'alimentation habituelle (SCHAEFER et coll. 1976 ; PIQUARD et coll. 1978). Durant ce protocole, l'augmentation du poids corporel des animaux a été le témoin d'une bonne adaptation aux conditions expérimentales (3 ± 1 g/j la première semaine, 4 ± 1 g/j la seconde et 6 ± 2 g/j pour la troisième).

3.2.1.2. Prélèvement de sang

Dans l'heure suivant la période d'alimentation (en moyenne $46.5 \text{ min} \pm 28.2$ min) une anesthésie a été réalisée par ingestion intrapéritonéale de

PENTOBARBITAL SODIQUE à raison de 60 mg/kg. Après laparotomie, la veine porte a été cathétérisée et environ 1 ml de sang prélevé par lente aspiration en utilisant une pompe à perfusion inversée (débit 0.5 ml/min). Dès la mise en place du prélèvement dans la veine porte, la même quantité de sang a été prélevée dans une carotide par ponction directe.

Ces deux échantillons de sang ont été divisés en deux parties dont l'une a servi après centrifugation à la détermination des acides aminés plasmatiques, la seconde à la détermination des acides aminés totaux après hémolyse. Les techniques d'analyse ainsi que les traitements des échantillons ont été identiques à ceux décrits précédemment (cf 2.1). L'hématocrite a été déterminé sur chaque échantillon de sang. Dans le sang artériel, il a été de 41.0 ± 3.6 p. cent et de 46.5 ± 2.5 dans le sang portal.

Chaque échantillon est analysé trois fois, les 15 séries expérimentales ont exigé un délai de 18 semaines.

3.2.1.3. Calculs

Les concentrations ($\mu\text{mol/l}$) érythrocytaires et plasmatiques ont été divisées par des facteurs de corrections respectivement égaux à 0.70 et 0.92 (McMENAMY et coll. 1960 ; PICÓ et coll. 1991, 1992) pour tenir compte de la différence entre le contenu en eau des érythrocytes et du plasma. Les teneurs érythrocytaires ont été calculées au moyen de l'équation indiquée précédemment (cf 2.2).

3.2.2. Résultats

Les moyennes et leurs écarts types des acides aminés plasmatiques, sanguins totaux et érythrocytaires déterminées dans l'artère et dans la veine porte sont rassemblées dans le tableau 7. L'absence de valeurs pour la cystine dans le sang total a été déjà discutée.

3.2.2.1. Concentrations des acides aminés plasmatiques et sanguins totaux

Dans le sang artériel, les concentrations plasmatiques de 6 acides aminés, ALA, α AB, LEU, TYR, PHE et ORN, ne sont pas différentes de celles du sang total. Parmi ceux dont les concentrations sont différentes, 8 acides aminés, THR, GLN, CIT, VAL, MET, ILE, HIS et TRP, ont des valeurs supérieures dans le plasma.

Dans le sang de la veine porte, les concentrations plasmatiques de 17 acides aminés diffèrent de celles du sang total et 5 (α AB, TYR, PHE, ORN, LYS) ne présentent pas de différences significatives. Mais dans cet échantillon pour 13 acides aminés parmi les 17, THR, SER, ASN, GLN, GLY, ALA, CIT, VAL, MET, ILE, LEU, HIS et TRP, les concentrations plasmatiques sont supérieures. Pour les 4 restants, TAU, ASP, GLU et ARG, elles sont inférieures à celles du sang total.

3.2.2.2. Différences artério-veineuses plasmatiques et érythrocytaires

Dans le tableau 8 sont rassemblées les moyennes des différences de concentrations artério-veineuses.

Dans le plasma, les différences artério-veineuses positives pour tous les acides aminés sauf la cystine, traduisent un enrichissement plasmatique. Ces différences sont faibles et non significatives pour 2 acides aminés, α AB et ORN. La cystine est le seul acide aminé dont la différence négative significative semble indiquer un prélèvement dans le plasma.

Dans le sang total, l'acide aspartique présente une différence négative mais non significative. Quoique positives, les différences de trois acides aminés, α AB, ORN et TRP, sont faibles et non significatives.

Tableau 8. Moyennes des différences artério-veineuses des concentrations d'acides aminés déterminées dans le plasma, dans le sang total et dans les érythrocytes.

	DIFFERENCE VEINE PORTE - ARTERE					
	Plasma		Sang total		Erythrocytes	
	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.
TAU	91	69 ^(a)	98	119 ^(b)	65	423
ASP	35	20 ^(a)	-14	144	-489	484 ^(b)
THR	187	125 ^(a)	107	83 ^(a)	32	226
SER	308	171 ^(a)	171	89 ^(a)	0	185
ASN	216	106 ^(a)	115	47 ^(a)	-10	94
GLU	130	57 ^(a)	70	49 ^(a)	-64	169
GLN	243	190 ^(a)	118	92 ^(a)	-18	233
GLY	917	505 ^(a)	549	183 ^(a)	156	622
ALA	1233	753 ^(a)	908	318 ^(a)	781	1000 ^(c)
CIT	113	43 ^(a)	59	30 ^(a)	5	104
αAB	2	6	3	8	4	18
VAL	168	111 ^(a)	135	82 ^(a)	160	155 ^(b)
CYS	-66	27 ^(a)	-	-	-	-
MET	56	38 ^(a)	38	24 ^(a)	30	48 ^(d)
ILE	140	86 ^(a)	101	64 ^(a)	89	104 ^(b)
LEU	227	157 ^(a)	185	102 ^(a)	198	132 ^(a)
TYR	85	57 ^(a)	89	45 ^(a)	132	136 ^(b)
PHE	112	68 ^(a)	107	72 ^(a)	141	160 ^(b)
ORN	21	84	34	80	62	240
LYS	237	188 ^(a)	145	96 ^(a)	11	233
HIS	94	52 ^(a)	65	46 ^(a)	53	103
TRP	16	16 ^(b)	8	21	8	67
ARG	168	118 ^(a)	113	73 ^(a)	19	165
TOT	4799	2659 ^(a)	3200	1421 ^(a)	1366	3512

Différences artério-veineuses des concentrations ($\mu\text{mol/l}$) significatives, ^(a) $P < 0.001$, ^(b) $P < 0.01$, ^(c) $P < 0.02$, ^(d) $P < 0.05$; test t apparié de Student. Moy = moyenne, S.D. = écart type, $n = 14$.

Les différences de concentrations érythrocytaires calculées montrent une diminution pour quatre acides aminés, ASP, ASN, GLU et GLN, dont seule celle de l'acide aspartique est significative suggérant une libération par les érythrocytes. Ces différences sont positives pour les autres acides aminés, mais ne sont significatives que pour 7 d'entre eux, ALA, VAL, MET, ILE, LEU, TYR et PHE, indiquant un enrichissement des érythrocytes.

Il apparaît ainsi que pour ces 8 acides aminés, les différences significatives de concentration érythrocytaires artério-veineuses rendent compte de la participation des érythrocytes aux échanges organe-sang. De l'artère vers la veine porte, les variations des concentrations érythrocytaires vont dans le même sens que

celles du plasma sauf pour l'acide aspartique dont la concentration diminue dans les érythrocytes alors qu'elle augmente dans le plasma.

En faisant la somme des concentrations de tous les acides aminés, exception faite de la cystine, une variation artério-veineuse de 4799 $\mu\text{mol/l}$ dans le plasma est accompagnée d'une variation de 3200 $\mu\text{mol/l}$ dans le sang total et de 1366 $\mu\text{mol/l}$ dans les érythrocytes. Cette dernière représente 28 p. cent de la variation plasmatique. Tenant compte de l'hématocrite moyen, les variations dans le contenu érythrocytaire représentent 19 p. cent des différences artério-veineuses du sang total.

Les différences de concentrations des acides aminés plasmatiques, sanguins et érythrocytaires déterminées dans le sang de la veine porte et celui de l'artère, sont représentées sous la forme d'un histogramme (figure 4). L'ordre de présentation est fonction de l'importance des échanges plasmatiques.

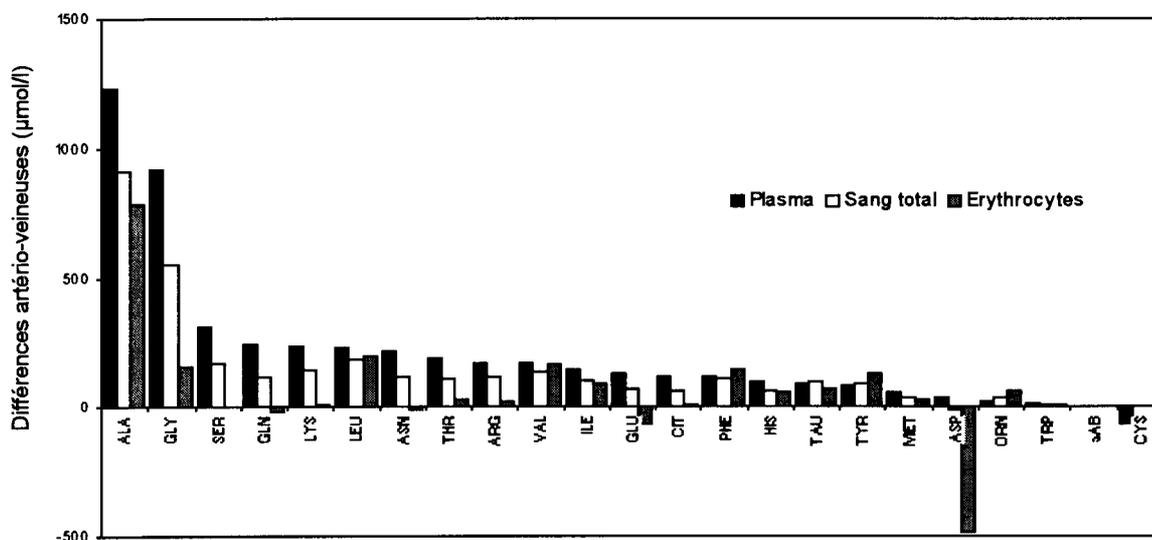


Figure 4. Différences artério-veineuses des concentrations d'acides aminés déterminées dans le plasma, le sang total et les érythrocytes.

3.2.2.3. Relations entre les concentrations plasmatiques et érythrocytaires

Les variations concomitantes et de même sens de la plupart des concentrations plasmatiques et érythrocytaires suggèrent l'existence de relations entre les concentrations d'acides aminés de ces deux compartiments sanguins. Dans le but de mettre en évidence de telles relations, les concentrations érythrocytaires ont été corrélées avec celles du plasma correspondant pour tous les échantillons sanguins. Les paramètres de ces corrélations sont rassemblés dans le tableau 9. Les coefficients de corrélations sont significatifs pour 6 acides aminés (VAL, ILE, LEU, TYR, PHE, HIS). Pour ces acides aminés, les coefficients de regression (pentés) sont positifs et varient dans un intervalle de 0.6 à 1. La figure 5 regroupe les représentations graphiques pour les acides aminés dont les relations sont significatives.

Tableau 9. Paramètres des relations entre les concentrations des acides aminés plasmatiques et érythrocytaires déterminés dans les sang artériels et veineux.

	r	R	a	P
TAU	-0.155	-	-	NS
ASP	-0.348	-	-	NS
THR	0.087	-	-	NS
SER	-0.001	-	-	NS
ASN	-0.217	-	-	NS
GLU	-0.171	-	-	NS
GLN	-0.015	-	-	NS
GLY	-0.115	-	-	NS
ALA	0.279	-	-	NS
CIT	-0.198	-	-	NS
α AB	0.334	-	-	NS
VAL	0.667	0.791	121	< 0.001
MET	0.263	-	-	NS
ILE	0.699	0.749	65	< 0.001
LEU	0.739	0.644	250	< 0.001
TYR	0.592	1.103	92	< 0.001
PHE	0.674	1.057	84	< 0.001
ORN	0.239	-	-	NS
LYS	0.161	-	-	NS
HIS	0.480	0.632	21	< 0.01
TRP	0.010	-	-	NS
ARG	0.040	-	-	NS
TOT	0.256	-	-	NS

Coefficient de corrélation (r), coefficient de regression (R), terme constant (a), seuil de signification (P), NS = non significatif.

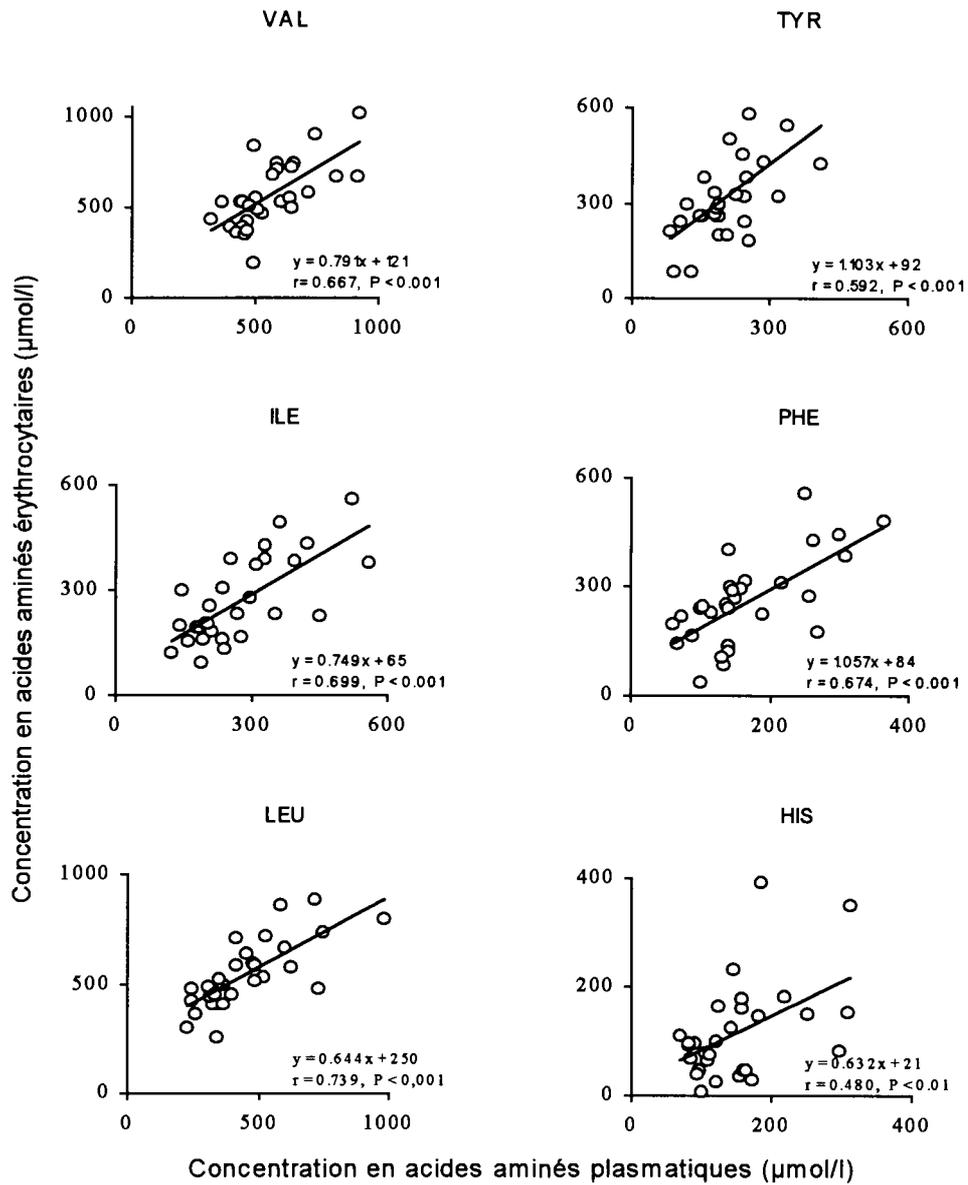


Figure 5. Relations entre les concentrations plasmatiques et érythrocytaires.

3.2.3. Discussion

Les résultats de cette expérimentation, réalisée *in vivo* chez le rat, permettent de vérifier l'hypothèse formulée au départ de la participation des érythrocytes au transport des acides aminés par voie sanguine au cours des échanges inter-organes. Les valeurs plasmatiques déterminées dans le sang de la carotide et de la veine porte sont comparables à celles mesurées par d'autres auteurs chez le rat (REMESY et coll. 1978 ; GALIBOIS et coll. 1991 ; PICÓ et coll. 1994_{a,b}, 1995). En ce qui concerne les concentrations érythrocytaires, comme déjà mentionné, les références bibliographiques permettant de comparer nos résultats sont peu nombreuses chez cette espèce. Tenant compte de la variabilité des méthodes analytiques, les teneurs érythrocytaires observées s'inscrivent dans le même ordre de grandeurs que celles publiées par PICÓ et coll. (1994_{a,b}, 1995).

Les concentrations déterminées *in vivo* sont supérieures à celles déterminées dans le sang normal dans l'expérience *in vitro*. Rappelons que dans le protocole d'expérience *in vitro*, les animaux ont été nourris normalement, leur alimentation n'a pas été enrichie par le supplément protéique et, avant les prélèvements, l'accès à la nourriture n'a pas été limité à la dernière heure de la phase obscure. Ainsi *in vivo*, le sang a été enrichi en acides aminés comme prévu par le protocole expérimental. Les concentrations plasmatiques et sanguines totales dans la veine porte sont plus élevées que celles de l'artère, indiquant une importante libération d'acides aminés par l'intestin. Dans les deux vaisseaux sanguins, la veine porte et la carotide, les concentrations de la majorité des acides aminés plasmatiques sont différentes de celles du sang total. Ces observations impliquent que les concentrations intracellulaires sont aussi différentes de celles déterminées dans le plasma.

A partir des différences artério-veineuses, il apparaît que les variations significatives dans les contenus érythrocytaires, concernent seulement 8 acides aminés, cependant qu'elles concernent la plupart d'entre eux dans le plasma et le sang total. Ainsi, durant l'irrigation du lit splanchnique par le sang, pendant que les concentrations plasmatiques de tous les acides aminés augmentent, des variations seulement de 8 parmi eux (ASP, ALA, VAL, MET, ILE, LEU, TYR, PHE) peuvent être

décelées dans les érythrocytes. Cette spécificité pour certains acides aminés à être prélevés par les érythrocytes dépendrait indubitablement de la perméabilité de la membrane érythrocytaire pour les acides aminés. En fait, pour 6 acides aminés (VAL, ILE, LEU, TYR, PHE, HIS) une corrélation significative a été observée entre les contenus intracellulaires et plasmatiques. Hormis la tyrosine, ces acides aminés sont essentiels pour le rat. Ces relations sont conformes à celles obtenues lors des expériences de simulation d'échanges inter-organes *in vitro* où notamment α AB, VAL, MET, ILE, LEU, TYR PHE et TRP présentent des corrélations plasma-érythrocytes significatives. Les différences observées seraient inhérentes aux différences du type d'expérience, *in vitro* ou *in vivo*.

Il n'est donc pas possible d'exclure l'existence de conditions particulières *in vivo*, lors de la traversée d'un organe par le sang, permettant des échanges érythrocytaires qui ne peuvent être reproduites *in vitro*. Ces conditions pourraient, par exemple, être induites par les mouvements d'autres substrats, électrolytes ou gaz respiratoires se produisant à ce moment. Ainsi, les échanges globulaires d'acide aspartique ou des autres acides aminés dits "acides", car dissociés, qui vont en sens inverse de ceux du plasma, sont certainement à mettre en rapport avec d'autres mouvements d'électrolytes y compris les protons entre le plasma, les érythrocytes et les tissus de l'organe.

Mais tous ces mécanismes restent à être confirmés et précisés. Ils pourraient expliquer certains échanges érythrocytaires d'acides aminés sans devoir faire appel à un hypothétique mécanisme d'échanges directs entre les globules rouges et les tissus de l'organe proposé par ELWYN et coll. (1972) chez le chien.

Malgré la participation confirmée dans cette étude des érythrocytes dans le transport de certains acides aminés, le rôle prépondérant du plasma doit être souligné. L'augmentation de la concentration totale des acides aminés intra-érythrocytaires ne représente que 28 p. cent de l'augmentation plasmatique et 19 p. cent de l'augmentation totale sanguine en tenant compte de l'hématocrite. Ces échanges entre le plasma et les érythrocytes qui se produisent pendant que le sang traverse l'organe sont certes rapides, mais pour certains acides aminés, ils ne sont

pas immédiats comme on peut le constater en comparant les rapport de concentrations plasma/globule du sang artériel à ceux de la veine porte. En effet, dans le sang artériel, 3 acides aminés ont des concentrations plasmatiques supérieures à celles des érythrocytes, tandis que dans le sang portal des concentrations supérieures pour 10 acides aminés ont été déterminées. Ces variations, qui témoignent d'échanges érythrocytaires n'aboutissant pas à un équilibre pendant le passage du sang dans l'organe, plaident en faveur du rôle primordial du plasma dans les échanges entre les tissus de l'organe et le sang et vont à l'encontre du mécanisme évoqué par ELWYN et coll. (1972). Ainsi, dans un organe, l'enrichissement ou l'appauvrissement sanguin en acides aminés peuvent être décomposés en deux phases : la première consistant en des échanges entre le plasma et les tissus de l'organe, la seconde s'effectuant plus lentement consiste en des échanges entre le plasma et les érythrocytes.

3.3. SYNTHÈSE DES OBSERVATIONS CONCERNANT LES ÉCHANGES ÉRYTHROCYTAIRES CHEZ LE RAT

L'expérience réalisée *in vitro* sur le sang de rat, a montré que les variations des concentrations érythrocytaires suite aux variations des concentrations plasmatiques induites artificiellement, ont concernés 14 acides aminés : ASP, SER, GLU, GLY, ALA, α AB, VAL, MET, ILE, LEU, TYR, PHE, TRP et ARG. Mais ces variations n'ont lieu dans les deux sens du gradient de concentrations que pour 8 acides aminés : ASP, α AB, VAL, MET, ILE, LEU, TYR et PHE. Les autres ne sont que prélevés par les érythrocytes (GLY, ALA, TRP) ou libérés par ceux-ci dans le plasma (SER, GLU, ARG). Les relations globales mises en évidence par l'étude des corrélations ont montré principalement que les concentrations érythrocytaires sont fortement corrélées à celles du plasma pour 8 acides aminés α AB, VAL, MET, ILE, LEU, TYR, PHE et TRP. Devant l'instabilité dans le comportement des acides aminés dans leur mouvement, et le fait que ceux-ci n'ont pas toujours montré des échanges entre le plasma et les érythrocytes dans les deux sens de la membrane érythrocytaire, nous ne pouvons affirmer l'intervention des érythrocytes dans les

échanges inter-organes chez le rat *in vitro* que pour 8 acides aminés : α AB, VAL, MET, ILE, LEU, TYR, PHE et TRP.

Chez le rat *in vivo*, les variations des concentrations érythrocytaires, déterminées à partir des différences artériovoineuses, ont pu être mis en évidence pour 8 acides aminés (ASP, ALA, VAL, MET, ILE, LEU, TYR et PHE. et PHE). L'étude des corrélations a montré que 6 acides aminés (VAL, ILE, LEU, TYR, PHE et HIS) font l'objet d'échange entre le plasma et les érythrocytes et donc sont principalement concernés par l'intervention des érythrocytes dans les échanges inter-organes.

La confrontation des deux expériences réalisées sur le rat *in vitro et in vivo*, fait ressortir que les résultats sont globalement concordants. Les différences observées sont certainement dues aux conditions expérimentales différentes. Ces résultats mettent en évidence la participation active des érythrocytes dans le transport inter-organes au moins des 9 acides aminés pour lesquels l'analyse des données a révélé des valeurs très significatives, α AB, VAL, MET, ILE, LEU, TYR, PHE, HIS et TRP. Cependant, d'autres acides aminés sont susceptibles d'être échangés de manière plus faible par les érythrocytes, ASP, GLY, et ALA. Sauf pour l' α -aminobutyrate les systèmes de transport membranaires sont connus pour ces acides aminés.

En termes de transport membranaire, nos résultats peuvent être expliqués par l'existence dans l'érythrocytes de rat de divers systèmes de transports distincts (décrits dans le chapitre 1) :

- un système L pour les acides aminés neutres α AB, VAL, MET, ILE, LEU et PHE (YOUNG et ELLORY 1977 ; CHRISTENSEN 1990 ; YAO et coll. 1993),
- un système T pour les acides aminés aromatiques TYR, PHE et TRP (ROSENBERG et coll. 1980 ; ZHOU et coll. 1990),
- un système ASC de faible capacité pour l'alanine (FELIPE et coll. 1992 ; ELLORY et YOUNG 1977).

Les autres acides aminés dont le passage érythrocytaire a été faiblement mis en évidence pourraient emprunter une voie non spécifique. La glutamine peut rentrer par une voie de simple diffusion non facilitée (FELIPE et coll. 1992). La glycine serait prise en charge par le système de transport des anions Bande 3 ou capnophorine. L'absence de transporteurs spécifiques pour les acides aminés cationiques et anioniques chez le rat laisse supposer que ces acides aminés pourraient traverser la membranes érythrocytaire par diffusion ou en empruntant d'autres transporteurs. Le système γ^+L permet le passage à la fois des acides aminés neutres (GLN, LEU) et basiques (LYS). Les systèmes γ^+ et ASC auraient une origine évolutive commune (TUNNICLIFF 1994) et pourraient, sous protonation, réagir avec les acides aminés anioniques (CHRISTENSEN 1990).

Au terme de cette étude sur le rat, il apparaît que le transport érythrocytaire des acides aminés ne fait aucun doute. Son importance cependant, ne doit pas être surestimée. Le plasma reste le principal vecteur des acides aminés sanguins. La comparaison des données concernant les perméabilités des membranes érythrocytaires avec les résultats obtenus au cours de nos expériences permet de constater que les mécanismes de transport décrits, couplés ou non au Na^+ , suffisent pour rendre compte des mouvements observés. La participation des érythrocytes dans le transport sanguin des acides aminés semble néanmoins être limitée quantitativement mais aussi qualitativement, car elle ne concerne pas tous les acides aminés.

Si pour certains acides aminés et notamment ceux transportés par le système L, une grande perméabilité de la membrane érythrocytaire a été décrite chez toutes les espèces, pour d'autres acides aminés qui présentent des variations selon les conditions ou l'espèce à laquelle on s'intéresse, les critères de transport membranaire sont encore à définir. Ce problème mérite certainement une exploration plus poussée. Les travaux concernant les mécanismes moléculaires de transfert dans la membrane cellulaire actuellement entrepris par plusieurs équipes, permettront certainement de préciser les perméabilités ainsi que l'influence des divers facteurs.

Ainsi, l'interprétation des résultats de ces expériences à la lumière des perméabilités érythrocytaires non seulement confirme les données, mais permet également d'expliquer pourquoi il n'a pas été possible de mettre en évidence des mouvements d'autres acides aminés.

Ces résultats appuient l'hypothèse que les acides aminés intra-globulaires pourraient exercer un rôle dans l'homéostasie (AOKI et coll. 1972, 1973 ; AL-SALEH et WHEELER 1982 ; LÓPEZ-TEJERO et coll. 1986 ; CETIN et coll. 1991 ; PICÓ et coll. 1991, 1992, 1994b, 1995). Dans ce cas, les mouvements entre les compartiments globulaires et plasmatiques de certains acides aminés, seraient régis par les concentrations plasmatiques comme il a pu être montré dans ce travail. Les acides aminés érythrocytaires constitueraient un pool de réserve qui permettrait d'accroître les échanges inter-organes. Mais pour confirmer cette hypothèse, une étude détaillée pour chaque acide aminé précisant non seulement sa perméabilité érythrocytaire, mais également les limites de celle-ci *in vivo* chez l'homme notamment serait nécessaire. De même, une étude précise des facteurs biologiques, potentiel de membrane (BUSSOLATI et coll. 1992 ; KAVANAUGH 1993), hormones, neurotransmetteurs, pH, Na⁺ etc... sur l'équilibre résultant de cette perméabilité, pourrait peut être expliquer les variations des rapports de concentrations plasma/érythrocytes au cours de différents états physiologiques comme la gestation (LÓPEZ-TEJERO et coll. 1986 ; CETIN et coll. 1991), pathologiques comme l'obésité ou au cours du jeûne (PICÓ et coll. 1992, 1994_{a,b} 1995).

En conclusion, il est possible d'affirmer que, chez le rat, le calcul des échanges sang-organes à partir des seules valeurs plasmatiques aurait pour effet de sous ou de surestimer les mouvements de certains acides aminés (α AB, VAL, MET, ILE, LEU, TYR, PHE, TRP et HIS). Les autres acides aminés ne présentant pas de variation intraglobulaire significative au cours de la perfusion sanguine de l'organe, ne semblent pas être transportés par les globules rouges. La prise en compte de ces variations spécifiques pour ces acides aminés, permet de substituer, éventuellement, aux dosages dans le sang total ceux réalisés dans le plasma pour la détermination des différences artério-veineuses sanguines.

Les différences observées entre les mouvements érythrocytaires des acides aminés lors de la première et de la seconde expérience, montrent qu'il n'est pas possible de transposer directement les résultats obtenus *in vitro* aux conditions *in vivo*. Par ailleurs, nous ne pouvons transposer directement ces résultats à l'homme. L'existence de différences interspécifiques au niveau des systèmes de transport des acides aminés a souvent été décrite (ELLORY et YOUNG. 1977 ; ELLORY et coll. 1981 ; AL-SALEH et WHEELER 1982 ; DYKE et FINCHAM 1993). Ces raisons nous ont fait entreprendre une autre étude *in vivo* sur l'homme qui fait l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE 4

EFFETS D'UN APPORT EXOGENE PAR VOIE ORALE D'UNE CHARGE D'ACIDES AMINES SUR LES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES ET GLOBULAIRES AU COURS DE L'ABSORPTION CHEZ L'HOMME

L'érythrocyte contient la plupart des acides aminés à des concentrations comparables ou supérieures à celles du plasma (HAGENFELDT et ARVIDSSON 1980). Des études *in vitro* ont montré que la capture des acides aminés par les érythrocytes de l'homme est très lente (WINTER et CHRISTENSEN 1964), suggérant que ces cellules et le plasma représentent des compartiments complètement séparés en rapport avec le métabolisme des acides aminés. D'autres études utilisant des prélèvements artério-veineux dans divers organes montrent l'évidence d'une participation active des érythrocytes aux échanges des acides aminés entre le sang et les tissus. Cela implique, que la capture ou la libération des acides aminés par les érythrocytes est plus rapide *in vivo* que de ce qui est attendu à partir de données *in vitro* (AOKI et coll. 1972 ; ELWYN 1966 ; ELWYN et coll. 1968, 1972 ; FELIG et coll. 1973 ; HEITMANN et BERGMAN 1980a ; DARMAUN et coll. 1989). Ces divergences pourraient être le fait de différences méthodologiques. Des études de cinétiques plasmatiques *in vivo* portant sur la glutamine, l'alanine et la leucine utilisant des traceurs isotopiques chez l'homme ont été publiées (MATHEWS et coll. 1980 ; DECHELOTTE et coll. 1991 ; HANKARD et Coll. 1995, 1996). Plus précisément, des cinétiques isotopiques à la fois plasmatiques et globulaires de la glutamine le glutamate, la glycine l'alanine et la leucine ont été étudiées (DARMAUN et coll. 1986, 1989). Mais à part ces études ponctuelles, jusqu'à présent, nous n'avons pas trouvé de travaux étudiant simultanément les cinétiques et les relations plasmatiques et globulaires de la plupart des acides aminés chez l'homme au cours de l'absorption intestinale suite à une surcharge par voie entérale. L'objet du présent travail est d'établir les cinétiques d'apparition et de disparition des acides aminés dans les différents compartiments sanguins suite à un

apport *per os* d'une solution d'acides aminés libres. Cette étude aura également pour but de montrer, si des relations peuvent être établies entre les concentrations d'acides aminés dans les compartiments sanguins.

4.1. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

4.1.1. Les sujets

Cette étude a été réalisée chez des sujets volontaires de sexe masculin sains ne présentant aucun risque de trouble métabolique ou d'une autre pathologie. Les caractéristiques de base des sujets sont portées dans le tableau 10. A chaque sujet, il était clairement expliqué le but et la méthodologie de l'expérience, avant de solliciter son consentement écrit.

La détermination à l'état de repos des concentrations basales en acides aminés et de leurs distributions plasmatiques et globulaires a été obtenue chez dix huit sujets. Le protocole de l'étude des cinétiques des acides aminés plasmatiques, sanguins et globulaires ainsi que des relations entre les concentrations plasmatiques et globulaires était mené avec neuf sujets parmi les dix huit.

Tableau 10. Caractéristiques de base des sujets

	Age, ans	Poids, kg	Taille, cm	Hématocrite*, p. cent
<i>Ensemble des sujets, n = 18</i>				
Intervalle	18-57	60-92	162-187	40-47
Moyenne ± S.D.	35 ± 11	75 ± 10	177 ± 7	43 ± 3
<i>Groupe protocole cinétique, n = 9</i>				
Intervalle	27-57	60-92	162-187	40-47
Moyenne ± S.D.	41 ± 7	77 ± 12	176 ± 8	43 ± 3

* Hématocrite réel (Hct) = hématocrite mesuré x 0.96.

4.1.2. Cinétique et prélèvement de sang

Les sujets ont été étudiés après 13 heures de jeûne. Les cinétiques des acides aminés étaient déterminées après ingestion en une seule prise de 125 ml d'AZONUTRIL 25 (Laboratoire Roger Bellon, Neuilly-Sur-Seine, France) contenant 148 g/l d'acides aminés, correspondant à 25 g/l d'azote soit 156.25 g/l de protéines en solution hypertonique (tableau 11). Une reproductibilité fiable des résultats a été obtenue en menant les expériences de manière identique, à la même heure, dans le même lieu et dans les mêmes conditions. Durant le protocole les sujets, confortablement allongés sur une chaise longue, au repos et calmes, sont autorisés à lire.

La veille du jour de l'expérience, il est demandé aux sujets de prendre le dîner entre 19 heures et 20 heures et de ne rien consommer (à l'exception de l'eau) jusqu'à la fin du protocole le lendemain à 11 heures. Le jour de l'étude, à 08 heures 30 minutes, un court cathéter a été placé dans l'avant bras au niveau de la veine antécubitale pour les prélèvements de sang. A 9 heures le prélèvement pour les valeurs basales de repos (temps $t = 0$) est réalisé et le sujet ingère 125 ml d'AZONUTRIL en une seule fois. Les prélèvements sanguins suivants ont eu lieu à 5, 15, 25, 35, 50, 65, 80, 95, 110 et 125 min, soit au total 11 points de mesure le point 0 compris.

A l'aide de seringues héparinées au préalable, les prélèvements de 2 ml de sang sont mis dans des tubes à hémolyse maintenus sur glace et sont immédiatement traités. Une partie aliquote sert pour la mesure de l'hématocrite. Les échantillons traités sont congelés dans de l'azote liquide et sont conservés à -20 °C avant d'être analysés. Les acides aminés du plasma (P) et les acides aminés du sang total hémolysé (St) sont analysés suivant les techniques décrites dans le chapitre 2.

4.1.3. Caractéristiques de la solution de surcharge en acides aminés

Notre choix s'est porté sur Azonutril (Laboratoire Roger Bellon, Neuilly-Sur-Seine, France) obtenu auprès de la pharmacie centrale des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, soluté apyrogène destiné à l'alimentation parentérale. Il est conditionné en flacons de 125 ml, solution hypertonique contenant 18.79 g d'acides aminés totaux, soit 3.13 g d'azote. Il renferme 20 acides aminés appartenant à la série L, non salifiés pour la plupart sauf l'ornithine et la lysine apportées sous forme d'acétates et la cystéine apportée sous forme chlorhydrate. Ce soluté est sans polypeptides et présente un pH de 6.3 et a une osmolalité d'environ 1520 mOsm/kg. Il renferme un grand nombre d'acides aminés en équilibre correspondant aux normes exigées : le rapport acides aminés essentiels/tryptophane (E/T) est de 3.2 ou 3 (selon qu'on compte ou non l'histidine dans les acides aminés essentiels) et le rapport acides aminés essentiels/acides aminés totaux est de 0.53 ou 0.51 (selon qu'on compte ou non l'histidine dans les acides aminés essentiels). Il permet d'apporter suffisamment d'acides aminés dans peu de volume liquidien et ne contient ni oligo-éléments, ni vitamines, et pratiquement pas d'autres électrolytes. Il n'apporte pas de calories glucidiques ou lipidiques.

Dans le tableau 11 est présentée la composition en gramme d'un flacon (verre) de 125 ml telle qu'indiquée par la fiche technique du produit, et les conversions correspondantes en μmol et $\mu\text{mol/l}$ que nous avons calculées. Nous avons aussi analysé au laboratoire à des fins de vérifications la composition en acides aminés. Dans nos propres calculs de cinétiques nous avons considéré la composition analysée et non pas celle de la fiche technique du produit. Car, d'une part, celle-ci donne la composition approchée au centième de gramme ce qui correspond à près de $\pm 75 \mu\text{mol}$ et nos résultats sont donnés dans l'ordre de $\pm 1 \mu\text{mol}$, et d'autre part, pour avoir la même base, nos données comparées doivent être rapportées à la quantité ingérée analysée dans les mêmes conditions que nos résultats sanguins.

Tableau 11. Composition de la solution d'AZONUTRIL 25, flacon (verre) de 125 ml. Le contenu est exprimé en g par flacon et sa correspondance en μmol ou en $\mu\text{mol/l}$.

	Fiche technique flacon (125ml) ^a			Analyse ^b	
	g	μmol	$\mu\text{mol.l}^{-1}$	μmol	$\mu\text{mol.l}^{-1}$
Acide L-Aspartique	0.50	3756	30052	3978	31824
L-Thréonine	0.63	5247	41975	5423	43384
L-Sérine	0.16	1546	12370	1550	12400
Acide L-Glutamique	0.63	4248	33984	4087	32696
Glycine	1.13	14987	119893	14429	115432
L-Alanine	1.19	13329	106630	12927	103416
L-Citrulline	0.38	2141	17124	1840	14720
L-Valine	1.56	13338	106704	14243	113944
L-Cystine ^c	0.14	595	4758	339	2712
L-Méthionine	1.18	7875	62998	7784	62272
L-Isoleucine	0.64	4860	38882	5231	41848
L-Leucine	1.74	13246	105972	13538	108304
L-Tyrosine	0.03	172	1380	184	1472
L-Phénylalanine	1.56	9459	75672	10002	80016
L-Ornithine ^d	0.33	2469	19748	2400	19200
L-Lysine ^d	1.90	12951	103604	10930	87440
L-Histidine	0.63	4028	32226	3260	26080
L-Tryptophane	0.33	1591	12731	1873	14984
L-Arginine	3.13	17939	143513	19382	155056
L-Proline	1.00	8688	69504	-	-
Total acides aminés	18.79	142465	1139720	133400	1067200
Hydrosulfite de sodium	0.06				
Eau pour préparations q.s.p	125 ml				

^a Masse en g par 125 ml de soluté selon la fiche technique du soluté. Les quantités en μmol et les concentrations en $\mu\text{mol/l}$ sont calculées par nous même à partir de la masse en g.

^b Analyses réalisées dans notre laboratoire.

^c Cystine apportée sous forme de L-Cystéine chlorhydrate

^d L-Ornithine et L-Lysine apportées sous forme acétates

4.1.4. Calculs des paramètres

4.1.4.1. Hématocrite réel, concentrations en acides aminés plasmatiques, sanguins totaux et globulaires

La valeur mesurée de l'hématocrite a été corrigée pour tenir compte de la quantité d'eau qui demeure piégée entre les globules rouges lors de la

centrifugation du sang. Ce volume mort est estimé à 4 p. cent du volume globulaire. Ainsi toutes les valeurs de l'hématocrite mesuré sont multipliées par 0.96 pour obtenir l'hématocrite réel (Hct) (DANIEL et coll. 1964 ; BUONO et YEAGER 1986).

Pour les comparaisons entre les deux compartiments sanguins, le calcul des distributions relatives au sang total du plasma et des globules rouges ainsi que pour les calculs des corrélations entre les concentrations plasmatiques et érythrocytaires, les concentrations des acides aminés plasmatiques et globulaires ont été corrigées pour leur teneur en eau. Le contenu en eau du plasma est de 94 p. cent celui des érythrocytes est de 73 p. cent (SIGGAARD-ANDERSEN 1974). Les concentrations érythrocytaires corrigées (Ew) sont calculées à partir du plasma corrigé (Pw) du sang corrigé (Sw) et de l'hématocrite réel (Hct) selon la formule donnée dans le chapitre 2.

Hct = hématocrite mesuré . 0.96

Pw = P . 0.94⁻¹

Sw = S . [0.73 Hct + 0.94 . (1 - Hct)]⁻¹

4.1.4.2. Constante de disparition, concentration initiale et volume corporel de distribution des acides aminés

Beaucoup d'acides aminés présentent après leur ingestion une augmentation plasmatique ou érythrocytaire qui correspond à l'apport, puis une diminution lente correspondant à leur métabolisation. Par métabolisation nous entendons tout ce qui tend à diminuer à nouveau leur concentration, soit un éventuel catabolisme, leur intégration dans les protéines ou leur stockage ou excrétion.

Il nous a semblé intéressant de mettre à profit cette diminution régulière (clairance métabolique) pour estimer par la méthode cinétique de détermination du volume d'un compartiment corporel le volume de distribution de ces acides aminés.

Le principe du calcul repose sur le fait que nous considérons que l'acide aminé est assimilé à un indicateur se répartissant dans tout le compartiment considéré. Dans tous les cas la masse d'indicateur effectivement présente quand on la dose est inférieure à la masse de l'indicateur administrée du fait des pertes ou de l'activité métabolique. Il faut donc tenir compte de la cinétique de la concentration de l'indicateur dans son volume de distribution. Les mécanismes dont dépend la disparition progressive de l'indicateur obéissent tous à la même loi générale : la variation de la concentration de l'indicateur à un instant t est proportionnelle à la concentration de l'indicateur au même instant : $\Delta C_i = k \cdot C_i$. En considérant les instants successifs :

$$C_t = k \cdot k \cdot k \cdot \dots \cdot K \cdot C_0 = K^t \cdot C_0 \quad (C_0 = C_{t=0})$$

$$\log C_t = t \cdot \log k + \log C_0$$

$$\log k = [\log C_t - \log C_0] \cdot t^{-1}$$

k = constante de disparition ou clairance métabolique, signifie qu'après chaque minute il reste $100 \cdot k\%$ de la quantité d'indicateur présente à la minute précédente ; $(100 - 100 \cdot k)\%$ disparaît chaque minute.

C_0 = concentration qu'aurait l'indicateur s'il se distribuait totalement et instantanément dans son volume de distribution au temps $t = 0$.

Sur une représentation semi-logarithmique on trace la courbe $\log C_t$ en fonction de t . On détermine la droite correspondant à la partie rectiligne décroissante de la courbe qui est de la forme $y = -bx + a$; y étant $\log C_t$, b étant $\log k$ et a étant $\log C_0$, ce qui permet de calculer k et C_0 . Le cas de la méthionine est présenté comme exemple dans la figure 6.

Connaissant C_0 qui représente la concentration initiale théorique extrapolée au temps $t = 0$ si toute la quantité ingérée (m) aurait été instantanément dissoute dans le volume de distribution, on peut calculer ce volume $v = m \cdot C_0^{-1}$

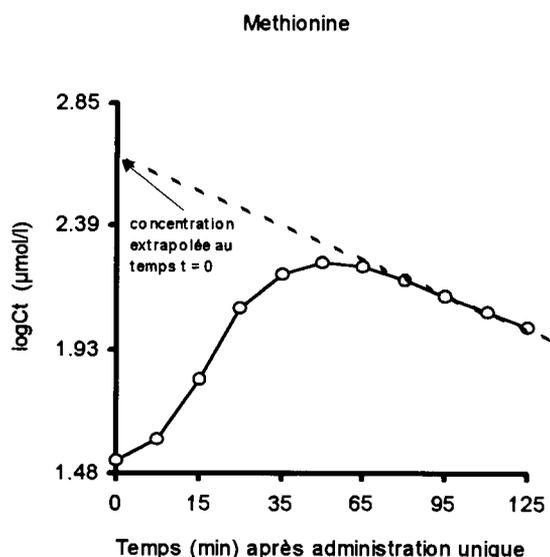


Figure 6. Exemple de représentation semi-logarithmique ($\log Ct$) de la concentration de la méthionine ($\mu\text{mol/l}$) en fonction du temps (min) après ingestion unique pour la détermination par extrapolation de la concentration initiale dans son volume de distribution.

4.2. RESULTATS

Les données basales des 18 sujets volontaires ainsi que les cinétiques des concentrations des acides aminés après surcharge par voie entérale relatives à 9 sujets sont présentées dans les tableaux suivants.

4.2.1. Concentrations de base en acides aminés au repos

Dans le tableau 12 sont présentées les concentrations basales moyennes et les écarts types dans le plasma, le sang total et les érythrocytes ($n = 18$). Par acide aminé pour comparer ces valeurs entre elles, la signification de la différence entre d'une part les concentrations plasmatiques et sanguines totales et d'autre part les concentrations plasmatiques et érythrocytaires, y est indiquée (test t de Student apparié, $n = 18$, $P < 0.05$). L'absence de valeurs pour la cystine dans le sang total et les érythrocytes a déjà été discutée.

4.2.1.1. Comparaison des concentrations en acides aminés entre les différents compartiments sanguins

Les concentrations plasmatiques et sanguines totales (tableau 12) sont très proches pour douze acides aminés : THR, ALA, CIT, α AB, VAL, MET, ILE, LEU, TYR, PHE, LYS et HIS. Parmi les acides aminés dont la concentration diffère significativement, seuls trois acides aminés, GLN, TRP et ARG, présentent des concentrations plasmatiques supérieures à celles du sang total. La teneur globale (TOT) des acides aminés du sang total est plus élevée que celle du plasma.

Tableau 12. Concentrations basales moyennes ($\mu\text{mol/l}$) plasmatiques, sanguines totales et érythrocytaires.

	Plasma		Sang total		Erythrocytes	
	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.
TAU	78	53	287	134	572	255
ASP	10	4	1222	295	2845	706
THR ^{a,b}	180	44	195	55	216	78
SER	138	38	173	36	219	53
ASN	70	16	116	40	177	82
GLU	37	23	235	64	487	155
GLN	887	174	758	149	592	200
GLY	292	80	392	81	527	126
ALA ^{a,b}	487	148	469	130	448	126
CIT ^{a,b}	49	17	50	18	56	27
α AB ^{a,b}	31	20	25	13	24	18
VAL ^a	305	80	269	71	221	66
CYS	87	22	-	-	-	-
MET ^{a,b}	33	6	31	6	28	10
ILE ^{a,b}	84	21	86	30	89	48
LEU ^{a,b}	162	41	164	50	165	67
TYR ^a	86	19	96	25	109	37
PHE ^a	72	15	82	19	95	31
ORN	83	26	160	43	262	77
LYS ^{a,b}	226	47	223	45	219	71
HIS ^{a,b}	99	16	95	21	90	33
TRP	73	19	51	21	37	31
ARG	129	30	77	22	42	31
TOT	3649	666	5241	801	7291	1338

(a) Différence non significative entre les concentrations plasmatiques et sanguines totales ; (b) différence non significative entre les concentrations plasmatiques et érythrocytaires (test t de Student apparié, n = 18, P < 0.05). Moy = moyenne, S.D. = écart type.

Les concentrations érythrocytaires et plasmatiques (tableau 12) ne sont pas différentes pour neuf acides aminés : THR, ALA, CIT, α AB, MET, ILE, LEU, LYS et

HIS. Tous les autres acides aminés exceptés GLN, TRP et ARG sont plus concentrés dans les érythrocytes. Globalement, la concentration totale des acides aminés érythrocytaires est nettement supérieure à celle du plasma.

4.2.2. Distributions basales des acides aminés plasmatiques et érythrocytaires

Les valeurs moyennes et les écarts types des distributions des concentrations basales des acides aminés entre le plasma et les érythrocytes, exprimées en p. cent de la concentration sanguine totale, sont rassemblées dans le tableau 13 et représentées sous forme d'un histogramme dans la figure 7. La signification des différences, entre les distributions plasmatiques et les distributions érythrocytaires, y est indiquée (test t de Student apparié, $n = 18$, $P < 0.05$).

Tableau 13. Distribution basale moyenne des acides aminés entre le plasma et les érythrocytes en p. cent du sang total.

	Plasma		Erythrocytes	
	Moy	S.D.	Moy	S.D.
TAU	12.67	3.06	87.33	3.06
ASP	0.41	0.16	99.59	0.16
THR*	48.20	6.27	51.80	6.27
SER	41.02	7.52	58.98	7.52
ASN	33.08	9.17	66.92	9.17
GLU	8.22	5.35	91.78	5.35
GLN	60.73	6.84	39.27	6.84
GLY	38.45	6.37	61.55	6.37
ALA	53.25	4.41	46.75	4.41
CIT*	51.33	12.45	48.67	12.45
α AB	56.64	11.22	43.36	11.22
VAL	58.65	4.06	41.35	4.06
MET	56.26	8.70	43.74	8.70
ILE*	51.38	9.01	48.62	9.01
LEU*	51.93	5.59	48.07	5.59
TYR	46.85	6.30	53.15	6.30
PHE*	46.30	8.07	53.70	8.07
ORN	27.35	6.43	72.65	6.43
LYS*	53.03	7.85	46.97	7.85
HIS	54.93	8.99	45.07	8.99
TRP	70.49	15.64	29.51	15.64
ARG	76.67	13.03	23.33	13.03
TOT	34.27	4.04	65.73	4.04

(*) Différences entre les distributions plasmatiques et érythrocytaires non significatives (test t de Student apparié, $n = 18$, $P < 0.05$). Moy = moyenne, S.D. = écart type.

Les distributions relatives de seize acides aminés diffèrent significativement entre les deux phases du sang. Les proportions relatives de huit acides aminés (TAU, ASP, SER, ASN, GLU, GLY, TYR et ORN) ainsi que la proportion totale (TOT) sont significativement plus élevées dans les érythrocytes que dans le plasma. Pour huit autres acides aminés (GLN, ALA, α AB, VAL, MET, HIS, TRP et ARG) les proportions sont plus importantes dans le plasma. Par contre la distribution n'est pas significativement différente entre les deux compartiments sanguins pour six acides aminés (THR, CIT, ILE, LEU, PHE et LYS).

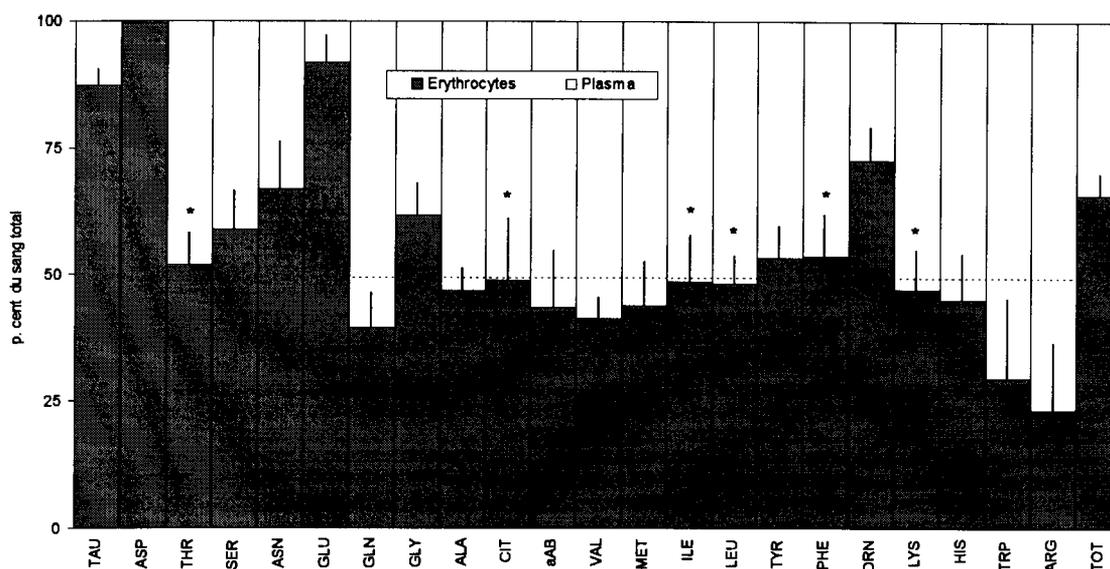


Figure 7. Distribution moyenne basale des acides aminés entre le plasma et les érythrocytes en p. cent du sang total. (*) Différence plasma-érythrocytes non significative (Test t de Student, $n = 18$, $P < 0.05$).

4.2.3. Cinétique des acides aminés suite à l'ingestion de 125 ml d'Azonutril 25

4.2.3.1. Cinétiques plasmatiques, sanguines totales et érythrocytaires

Suite à l'ingestion de 125 ml d'Azonutril 25, les évolutions en fonction du temps en minutes (0 - 125 min) des concentrations moyennes plasmatiques, sanguines et érythrocytaires sont reportées dans les tableaux 14a, 14b et 14c. Ces cinétiques ont été testées par l'analyse de la variance (ANOVA) pour déterminer si les évolutions des concentrations observées sont statistiquement significatives.

Il en ressort que les concentrations plasmatiques (tableau 14a) de huit acides aminés individuels, TAU, ASN, GLU, GLN, ALA, α AB, CYS et HIS, ne varient pas significativement ($P < 0.05$). Parmi ces acides aminés, TAU, ASN, GLN et α AB ne sont pas contenus dans la solution ingérée. Cependant, au niveau des érythrocytes, des variations significatives des concentrations (tableau 14c) ont lieu pour six acides aminés, VAL, MET, ILE, LEU, TYR, PHE et ORN.

Les cinétiques des concentrations des divers acides aminés plasmatiques sont représentées seules sous forme de courbes dans les figures 8a, 8b et 8c. Pour la comparaison entre les compartiments sanguins, les courbes des cinétiques plasmatiques, des cinétiques sanguines totales et celles des érythrocytes sont regroupées dans un même graphique dans les figures 9a, 9b et 9c.

Tableau 14a. Evolution en fonction du temps (min) des concentrations ($\mu\text{mol/l}$) moyennes plasmatiques suite à l'ingestion de 125 ml d'Azonutril 25.

	0 min		5 min		15 min		25 min		35 min		50 min		65 min		80 min		95 min		110 min		125 min	
	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.
TAU	57	16	60	19	57	19	57	19	61	17	62	19	66	18	65	20	62	18	59	18	60	20
ASP ^d	12	4	11	2	11	2	13	3	13	4	13	3	12	2	12	2	11	2	9	2	9	1
THR ^a	198	33	208	31	218	36	259	44	295	53	314	58	299	53	286	46	277	50	249	53	238	32
SER ^c	148	29	161	26	162	33	178	33	187	33	197	36	192	44	183	46	172	42	155	39	150	37
ASN	76	15	78	13	79	15	81	19	81	18	88	20	82	19	82	22	76	21	70	14	71	14
GLU	45	30	47	34	48	35	64	46	78	49	74	39	73	43	68	43	53	32	57	34	44	32
GLN	872	141	908	145	928	154	987	164	1013	183	1036	178	1065	224	1066	236	1045	232	958	199	987	203
GLY ^b	304	82	327	83	331	92	358	87	413	79	459	102	459	120	428	121	396	121	347	111	345	100
ALA	514	171	544	167	551	158	580	155	636	177	684	200	684	203	661	202	628	186	570	162	569	163
CIT ^a	53	18	52	10	51	14	61	19	74	18	94	23	107	26	113	25	109	29	98	31	92	32
α AB	31	14	32	12	32	10	34	12	38	16	41	17	43	18	38	11	41	18	40	16	36	11
VAL ^a	341	72	364	79	433	137	572	181	704	173	750	105	739	132	693	79	654	76	597	102	548	67
CYS	91	25	88	26	84	28	83	16	105	37	98	24	102	39	80	21	94	51	95	55	83	25
MET ^a	34	5	41	9	76	45	137	69	175	65	183	32	176	29	160	32	141	31	122	32	107	23
ILE ^a	95	15	106	22	134	39	180	49	210	47	211	36	195	46	167	36	146	47	124	35	107	32
LEU ^a	177	34	200	51	277	97	392	123	469	107	472	59	452	88	409	81	349	87	306	75	274	68
TYR ^a	92	18	101	21	106	20	119	20	137	25	132	19	133	25	121	16	112	20	110	22	107	18
PHE ^a	81	9	91	18	113	38	153	66	192	77	191	34	185	35	168	22	153	26	134	29	128	22
ORN ^a	76	17	80	18	88	26	127	37	168	46	198	33	221	45	213	38	211	49	199	48	179	44
LYS ^a	228	41	241	53	263	57	349	67	423	64	475	66	531	111	494	88	467	91	412	82	377	76
HIS	96	15	113	30	104	26	118	33	127	32	141	31	149	47	137	45	126	42	113	33	111	38
TRP ^a	68	11	69	12	74	14	92	19	109	25	114	16	121	16	114	16	107	19	89	22	92	15
ARG ^a	139	29	151	37	219	66	352	128	471	151	511	88	540	128	479	95	426	104	353	107	318	85
TOT ^a	3827	488	4072	536	4440	684	5344	792	6180	874	6540	748	6627	972	6238	924	5856	935	5267	897	5032	838

Cinétiques des concentrations plasmatiques significatives, ^(a) P < 0.001, ^(b) P < 0.01, ^(c) P < 0.05, (ANOVA, 10ddl, 88 ddl). Moy = moyenne, S.D. = écart type.

Tableau 14b. Evolution en fonction du temps (min) des concentrations ($\mu\text{mol/l}$) moyennes sanguines totales suite à l'ingestion de 125 ml d'Azonutril 25.

	0 min		5 min		15 min		25 min		35 min		50 min		65 min		80 min		95 min		110 min		125 min	
	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.
TAU	250	68	253	64	252	63	255	81	263	71	272	73	268	63	268	66	265	65	278	77	272	76
ASP	1450	195	1459	163	1474	146	1460	170	1503	137	1475	221	1473	183	1469	166	1480	202	1585	260	1518	154
THR	213	54	233	38	231	44	257	47	306	43	300	57	301	49	304	66	289	67	283	60	271	39
SER	188	36	190	34	197	37	200	31	217	29	212	39	206	44	205	43	201	42	202	44	192	37
ASN	135	42	123	23	129	16	130	29	138	33	126	32	126	19	128	37	134	34	134	34	135	27
GLU	257	57	267	54	265	55	272	47	302	42	284	50	291	63	277	56	269	50	279	45	267	48
GLN	737	101	780	111	789	97	812	128	828	118	847	132	845	141	868	144	839	152	831	142	822	133
GLY	422	80	431	93	443	78	471	105	514	90	530	98	515	110	503	101	474	98	474	99	456	87
ALA	502	156	526	156	543	166	591	208	629	206	629	166	619	165	595	148	586	151	583	184	556	152
CIT	53	13	64	16	63	13	80	41	92	43	84	23	98	30	96	20	99	32	95	24	87	26
α AB	27	18	34	22	32	18	39	30	39	37	35	22	40	20	37	18	43	28	41	23	36	22
VAL	301	62	321	65	400	96	524	147	639	148	694	68	658	100	628	93	596	91	576	100	486	89
MET	31	4	38	8	73	37	119	46	157	55	162	25	150	23	140	33	125	34	114	28	91	17
ILE	96	38	98	31	133	44	183	55	193	39	187	32	167	39	162	50	136	47	115	33	93	33
LEU	189	49	199	41	275	72	365	107	449	124	445	52	431	102	403	95	361	107	328	81	273	88
TYR	108	25	101	27	110	21	115	18	141	26	131	17	139	20	141	19	134	31	127	21	123	26
PHE	88	13	91	18	118	30	146	29	191	62	186	20	179	34	169	26	151	30	141	25	125	26
ORN	149	44	161	40	185	50	221	63	280	48	287	64	321	97	319	70	310	99	317	92	267	85
LYS	235	37	236	39	268	39	293	47	350	46	371	42	407	73	407	69	384	86	373	72	316	63
HIS	92	20	102	17	114	25	104	22	116	27	120	22	121	34	124	34	112	38	110	27	104	32
TRP	45	11	51	5	57	9	59	11	70	13	76	9	79	19	76	15	67	12	67	17	59	12
ARG	77	22	81	22	119	39	167	74	239	95	256	92	261	95	261	107	220	96	197	83	168	65
TOT	5642	542	5839	506	6270	404	6863	654	7658	730	7709	598	7694	813	7581	897	7275	1023	7250	971	6716	767

Moy = moyenne, S.D. = écart type.

Tableau 14c. Evolution en fonction du temps (min) des concentrations ($\mu\text{mol/l}$) moyennes érythrocytaires suite à l'ingestion de 125 ml d'Azonutril 25.

	0 min		5 min		15 min		25 min		35 min		50 min		65 min		80 min		95 min		110 min		125 min	
	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.
TAU	506	143	508	134	507	128	520	167	531	153	538	150	531	127	537	134	531	131	567	152	553	155
ASP	3366	468	3365	413	3391	444	3398	470	3469	387	3339	561	3397	503	3408	488	3420	565	3669	654	3521	359
THR	234	89	266	72	251	82	254	80	323	87	281	96	298	92	330	117	303	123	329	92	316	85
SER	240	60	228	56	242	53	230	44	257	44	229	65	222	58	237	62	240	55	265	62	249	66
ASN	214	92	183	47	193	48	196	75	214	73	176	69	186	41	191	79	210	71	220	79	220	66
GLU	540	158	560	164	554	186	557	174	604	152	553	138	581	176	558	154	557	155	577	153	569	162
GLN	558	151	614	153	608	237	575	252	580	190	608	200	555	206	604	205	562	203	657	242	602	154
GLY	580	142	571	131	589	118	622	190	649	181	619	156	590	142	605	148	575	100	641	130	602	120
ALA	487	154	503	152	532	234	607	291	622	263	558	168	536	184	510	247	531	159	599	250	538	180
CIT	54	17	79	33	79	20	106	80	117	91	72	38	86	53	73	35	86	70	91	44	80	45
α AB	25	24	35	37	32	29	46	59	43	72	30	43	36	26	36	32	45	48	43	32	35	41
VAL ^a	248	64	265	61	357	106	462	148	554	154	629	136	549	135	540	146	519	146	545	177	404	137
MET ^a	27	9	34	14	69	38	95	28	134	46	133	31	117	23	114	41	105	47	102	29	71	17
ILE ^a	95	67	89	44	129	66	187	78	169	47	156	42	131	44	155	77	124	52	104	44	75	50
LEU ^a	204	71	199	71	274	57	330	123	426	184	411	70	402	137	395	145	376	141	355	105	270	122
TYR ^c	128	38	103	62	114	34	111	41	146	46	132	27	147	22	169	30	162	55	151	37	143	43
PHE ^a	97	25	92	24	127	31	139	39	190	49	179	19	172	50	170	43	149	45	150	31	120	38
ORN ^p	246	89	267	79	312	95	349	155	432	96	398	159	456	212	462	133	441	175	474	165	386	156
LYS	244	62	233	65	278	78	224	111	256	85	237	119	243	103	294	131	278	107	323	110	234	104
HIS	86	32	87	11	126	41	88	41	102	35	95	30	85	33	106	35	94	48	106	35	93	38
TRP	18	15	29	13	36	29	23	23	20	10	28	10	24	27	28	19	15	13	37	37	17	14
ARG	20	36	17	31	29	63	31	89	25	58	48	96	35	95	57	144	47	111	57	114	32	80
TOT	8218	957	8325	848	8829	1084	9151	1355	9863	1314	9447	1397	9381	1359	9575	1498	9369	1476	10062	1640	9133	1139

Cinétiques des concentrations érythrocytaires significatives, ^(a) $P < 0.001$, ^(b) $P < 0.01$, ^(c) $P < 0.05$, (ANOVA, 10ddl, 88 ddl). Moy = moyenne, S.D. = écart type.

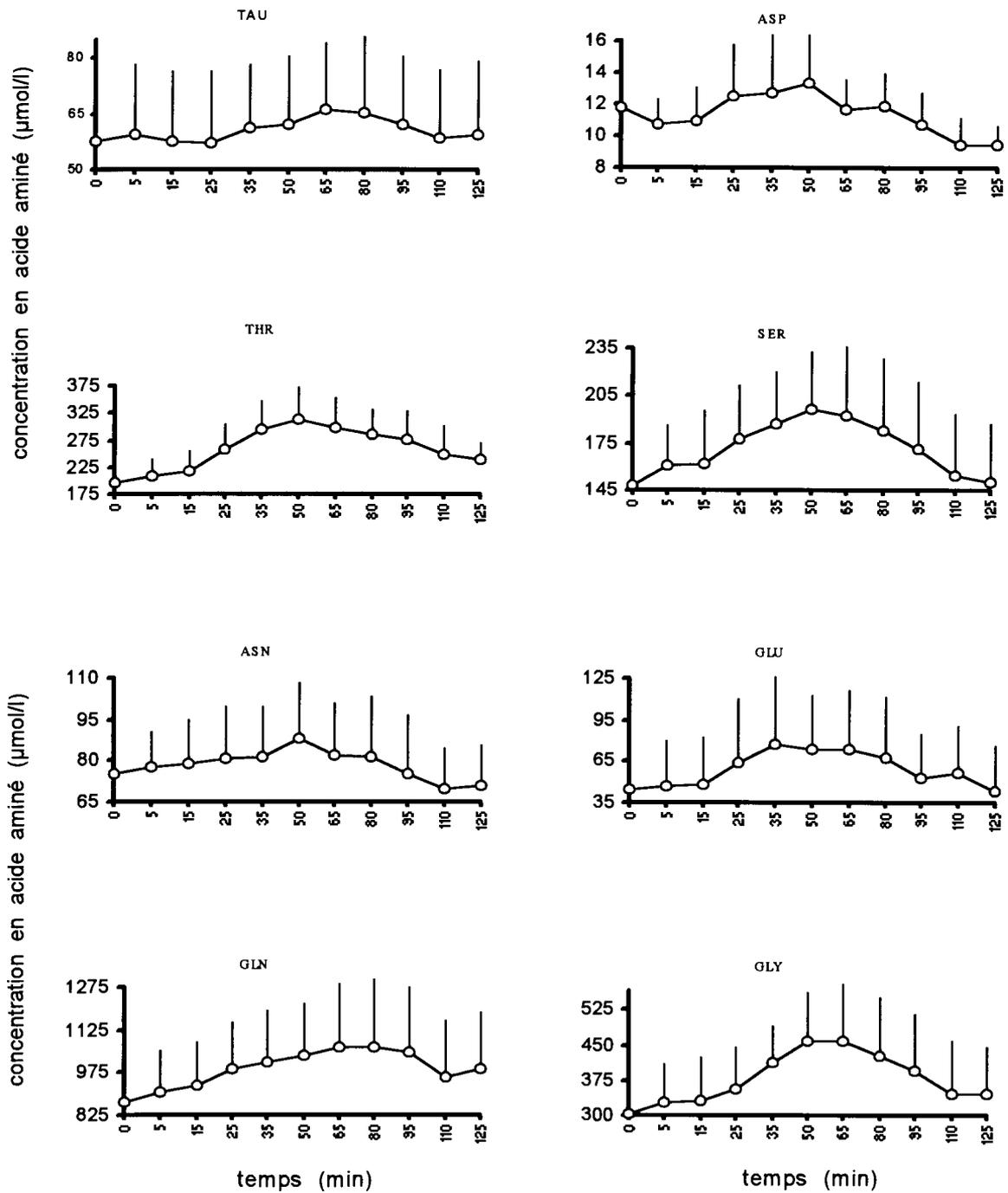


Figure 8a. Evolution en fonction du temps (min) des concentrations moyennes ($\mu\text{mol/l}$) des acides aminés plasmatiques.

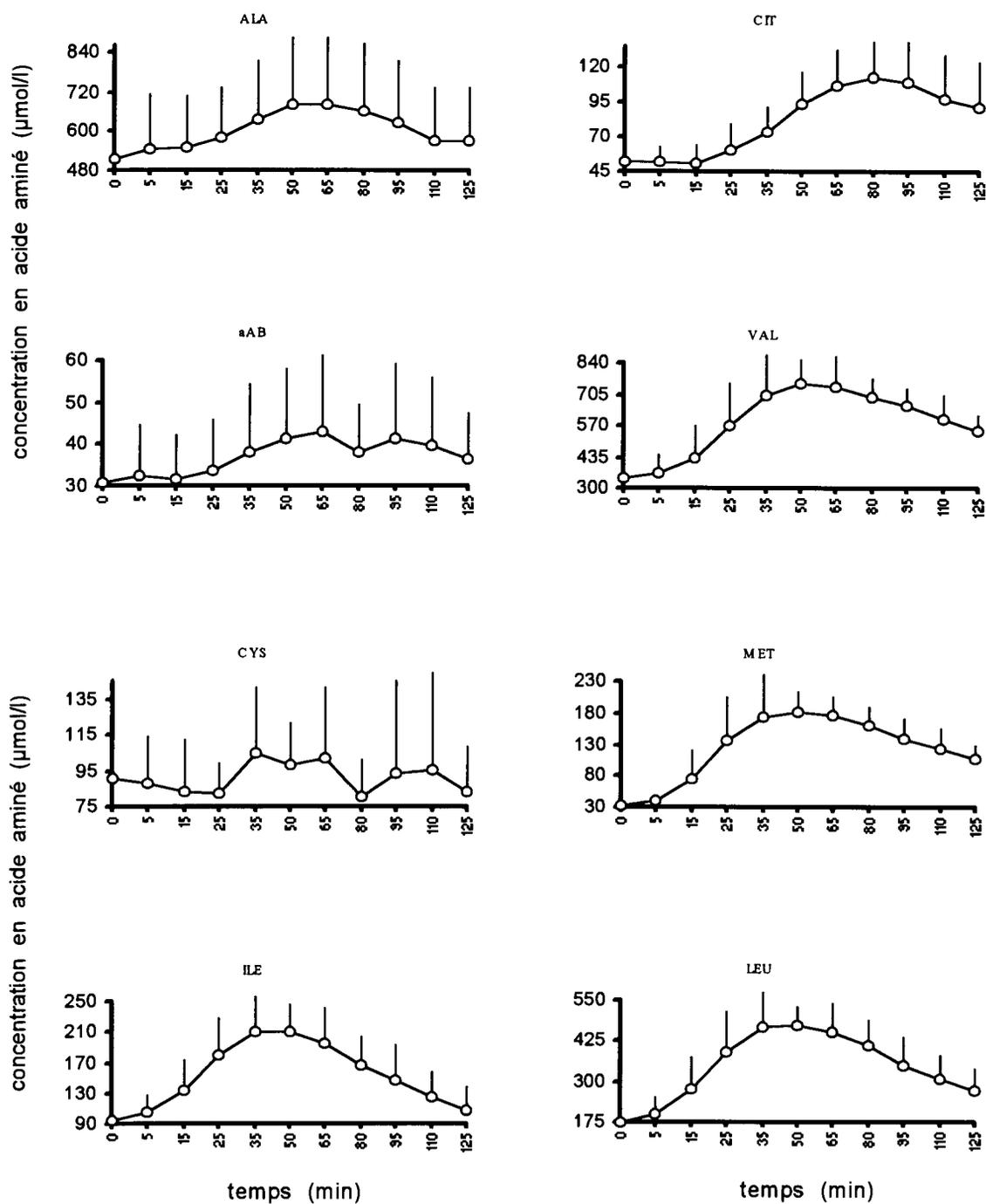


Figure 8b. Evolution en fonction du temps (min) des concentrations moyennes (µmol/l) des acides aminés plasmatiques.

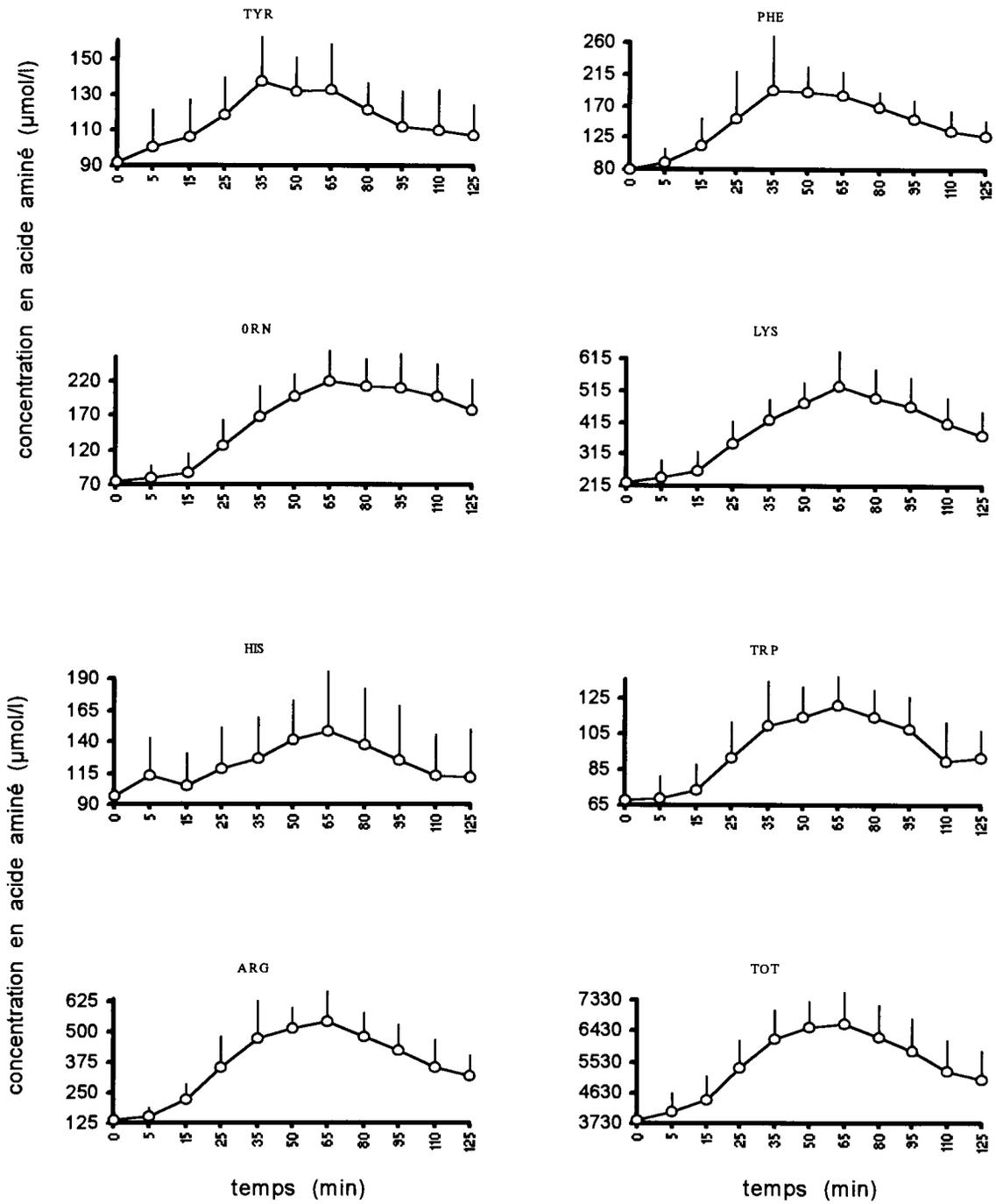


Figure 8c. Evolution en fonction du temps (min) des concentrations moyennes ($\mu\text{mol/l}$) des acides aminés plasmatiques.

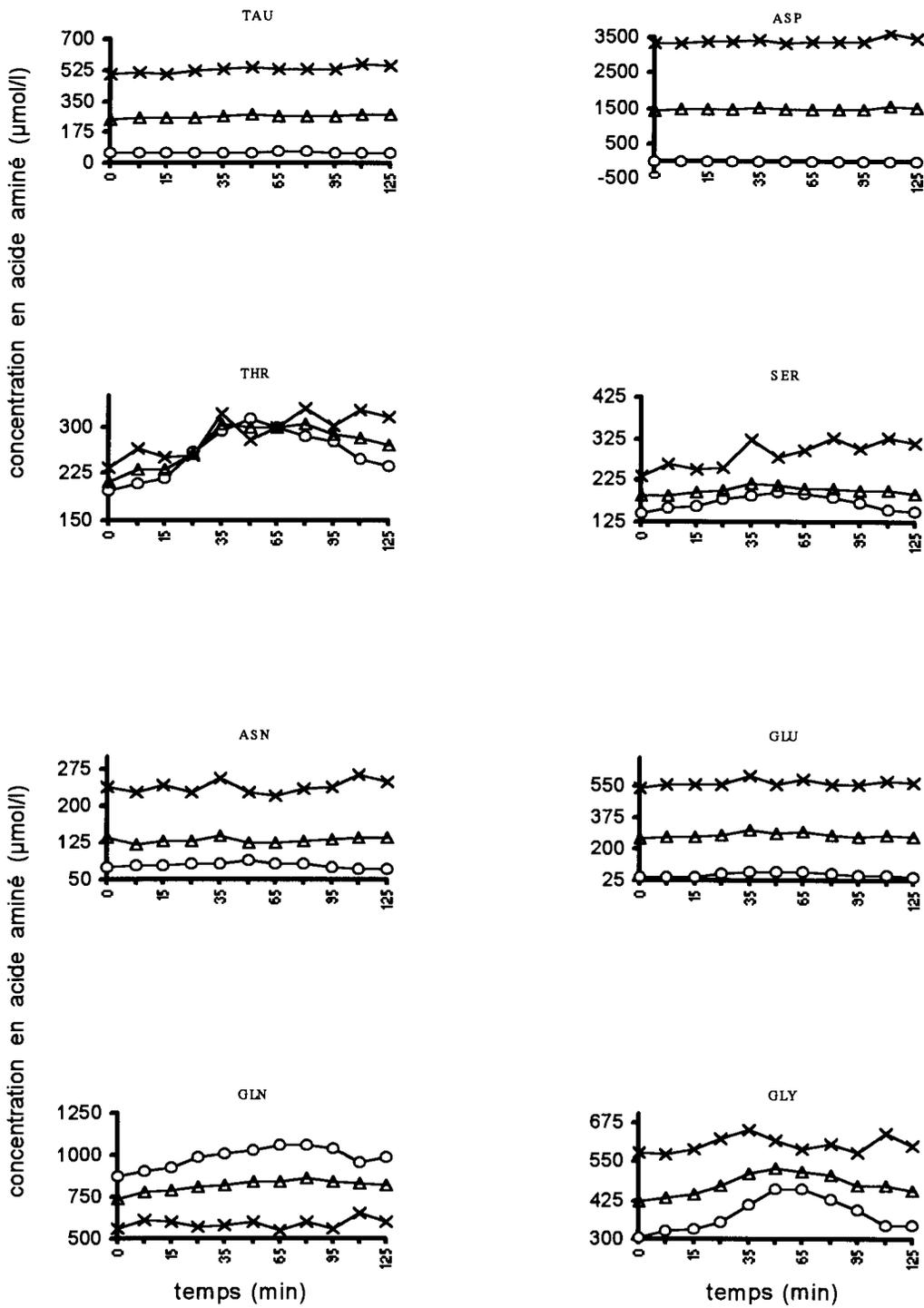


Figure 9a. Evolution simultanée en fonctions du temps (min) des concentrations moyennes ($\mu\text{mol/l}$) des acides aminés plasmatiques (o), sanguins totaux (Δ) et érythrocytaires (x).

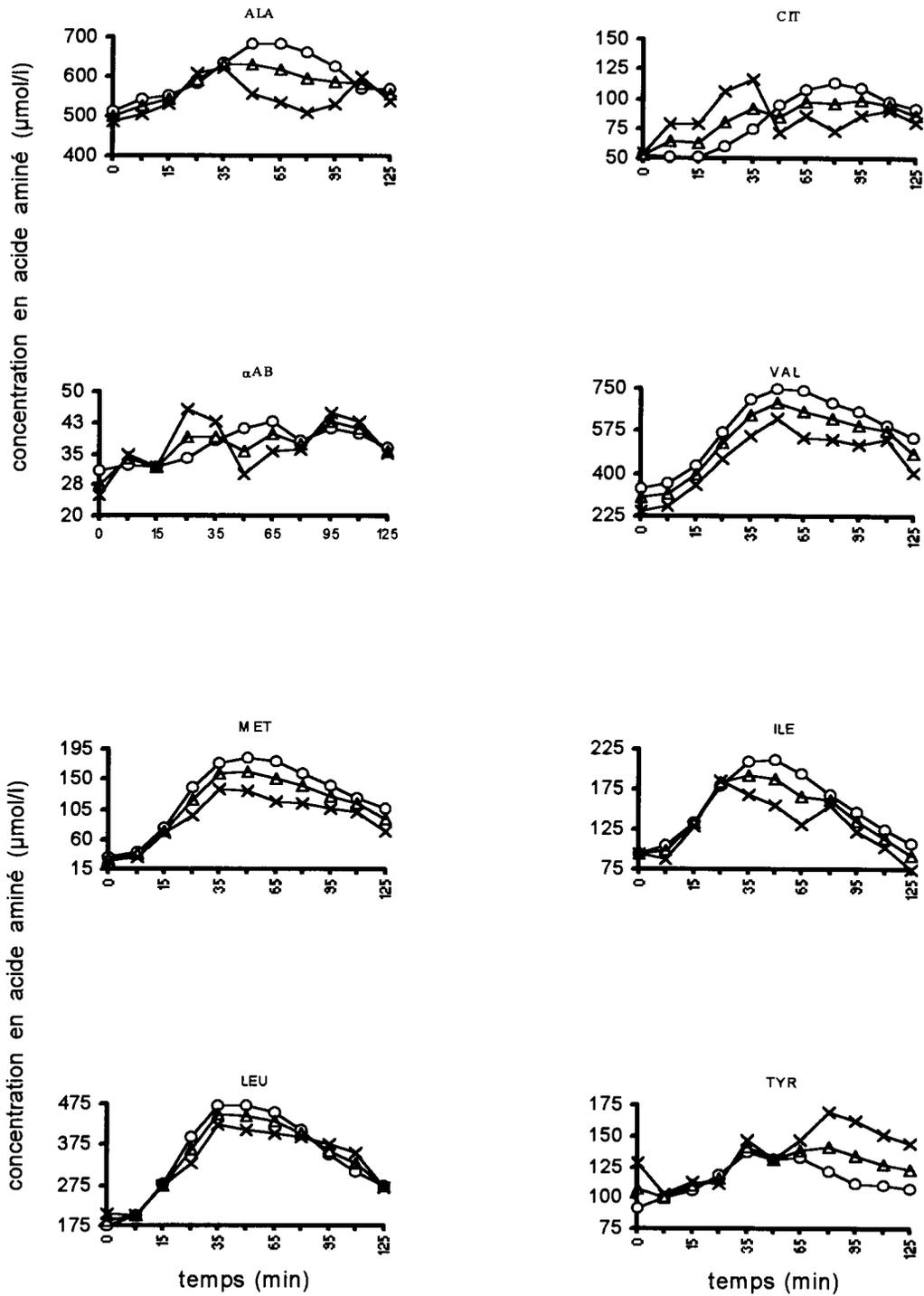


Figure 9b. Evolution simultanée en fonctions du temps (min) des concentrations moyennes ($\mu\text{mol/l}$) des acides aminés plasmatiques (o), sanguins totaux (Δ) et érythrocytaires (x).

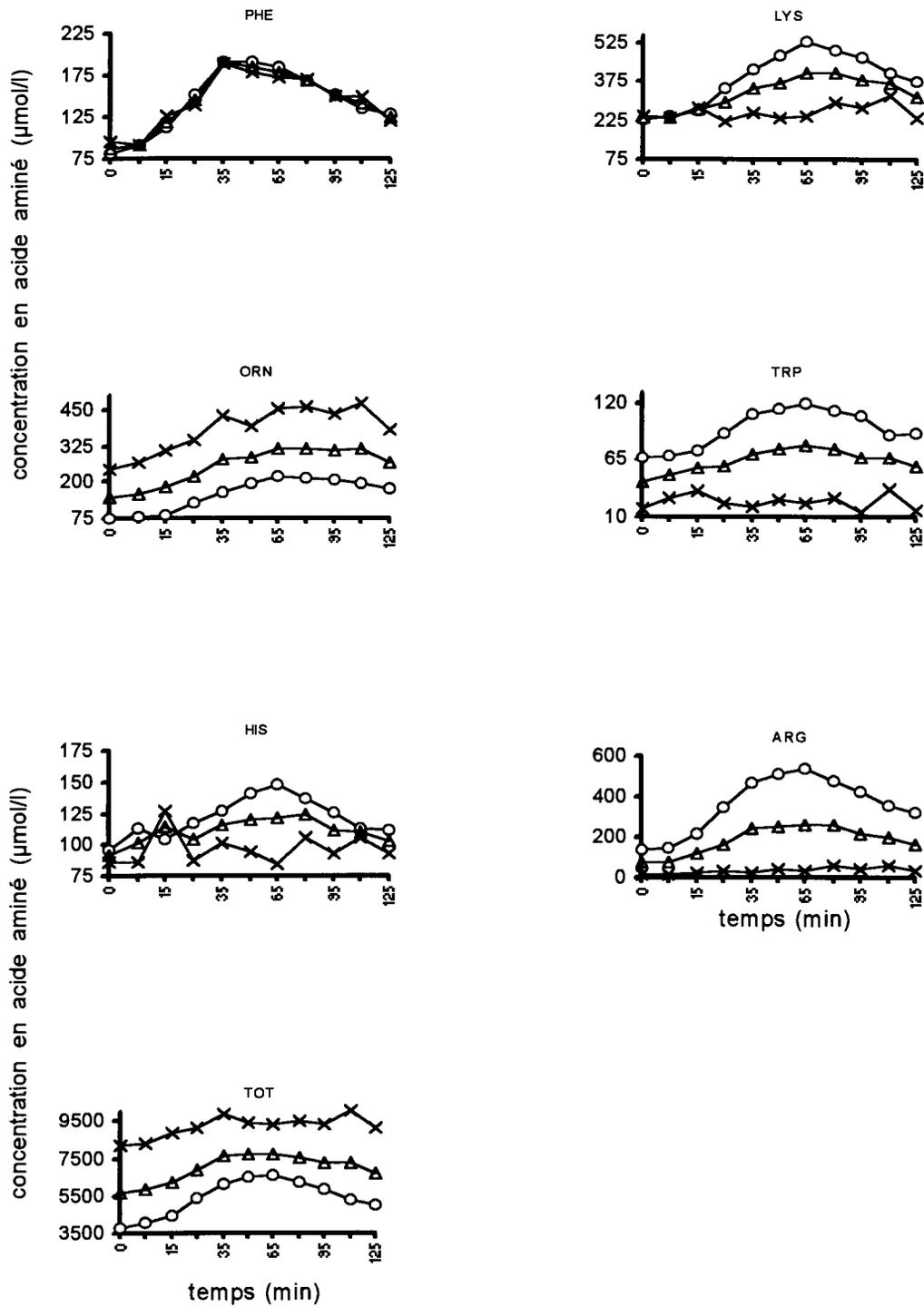


Figure 9c. Evolution simultanée en fonctions du temps (min) des concentrations moyennes (µmol/l) des acides aminés plasmatiques (o), sanguins totaux (Δ) et érythrocytaires (x).

4.2.3.2. *Rapports de variations maxima des concentrations en acides aminés plasmatiques et érythrocytaires*

Les rapports de variations des concentrations en acides aminés relatifs aux concentrations initiales au temps $t = 0$ ont été calculés pour les cinétiques plasmatiques et les cinétiques globulaires (tableau 15). Les rapports de variations les plus élevés (ΔC_{max}) dans le plasma, ne sont pas significatifs pour trois acides aminés ASP, GLU et CYS. Dans les érythrocytes, ces rapports ne sont pas significatifs pour douze acides aminés, TAU, ASP, SER, ASN, GLU, GLN, GLY, α AB, TYR, LYS, HIS et TRP.

Le temps correspondant au pic de la courbe d'apparition des acides aminés, et qui correspond au rapport de variation maximum indique la fin de l'enrichissement du sang.

Dans le plasma, ces temps varient de 35 min pour GLU, CYS, ILE, LEU, TYR et PHE à 80 min pour CIT. Il est en moyenne de 54 ± 13 min. La concentration du total des acides aminés (TOT) atteint son maximum au bout de 65 min.

Au niveau des érythrocytes, les temps correspondants aux maxima de variations des concentrations des acides aminés sont nettement inférieurs à ceux du plasma. Ils varient de 25 min pour TRP à 80 min pour TYR. Le temps moyen pour tous les acides aminés est de 38 ± 8 min. La concentration du total des acides aminés (TOT) atteint son maximum au bout de 35 min.

Tableau 15. Rapports moyens des variations maxima des concentrations en acides aminés en p. cent de la concentration initiale et temps (min) correspondants déterminés au cours des cinétiques plasmatiques et érythrocytaires.

	PLASMA			ERYTHROCYTES		
	ΔC_{max} (%)	S.D.	temps (min)	ΔC_{max} (%)	S.D.	temps (min)
TAU	16.3	14.5	65	7.2	11.3	50*
ASP	24.5	45.2	50*	4.0	12.4	35*
THR	58.8	14.3	50	54.0	66.6	35
SER	33.8	16.2	50	10.9	25.7	35*
ASN	17.7	20.6	50	8.0	36.5	35*
GLU	125.3	183.5	35*	14.3	21.4	35*
GLN	21.7	12.6	65	9.9	22.2	50*
GLY	53.6	23.2	50	12.6	19.4	35*
ALA	37.3	22.4	50	24.7	14.7	35
CIT	122.2	34.8	80	103.2	109.8	35
α AB	45.0	35.4	65	84.0	72.3	25*
VAL	123.6	28.7	50	165.7	73.7	50
CYS	16.1	28.4	35*	-	-	-
MET	451.5	114.9	50	514.3	482.5	35
ILE	123.9	51.7	35	111.0	76.7	35
LEU	171.7	75.5	35	114.0	68.7	35
TYR	52.0	27.9	35	37.0	25.9	80*
PHE	136.3	83.2	35	106.9	66.2	35
ORN	200.7	81.7	65	92.4	73.3	35
LYS	136.4	51.2	65	7.2	27.3	35*
HIS	52.3	39.1	65	55.1	178.8	50*
TRP	79.7	23.7	65	26.3	187.6	25*
ARG	298.9	124.6	65	89.8	132.9	35
TOT	73.1	12.7	65	20.0	15.1	35
Moyenne**	104.3		54	75.1		38
Ecart type	103.5		13	108.7		8

* Rapport de variation maxima (ΔC_{max}) non significatif (test t apparié de Student, $n = 9$, $P < 0.05$). ** Moyenne et écart type calculés, sur l'ensemble des acides aminés individuels ne comprenant pas le total (TOT), pour les rapports de variations maxima et les temps correspondants.

4.2.3.3. Concentration initiale, clairance et volumes de distributions calculés

Considérant les acides aminés comme des marqueurs qui sont totalement absorbés, nous avons tenté d'estimer par le calcul, leur concentration initiale (C_{oc}) si toute la quantité ingérée aurait été instantanément dissoute, leur constante de disparition ou de métabolisation (K) et le volume (V) dans lequel ils se distribuent totalement (tableau 16). Ces estimations étant approximatives, nous n'avons

considéré que les acides aminés ingérés dont les cinétiques plasmatiques sont hautement significatives ($P < 0.001$). Les constantes de disparition ou de métabolisation (K) varient de 0.990 (ILE) à 0.997 (PHE et ORN). Les volumes de distribution totale (V) des acides aminés varient de 1.2 l (TYR) à 36.2 l (PHE). Le total des acides aminés (TOT) se distribue dans un volume 14.8 l et présente une constante de métabolisation de 0.995.

Tableau 16. Paramètres cinétiques de quelques acides aminés.

	C_{oc} ($\mu\text{mol/l}$)	K (p. cent)	Ingéré (μmol)	V (l)
THR	376	0.996	5423	14.42
CIT	175	0.994	1840	10.54
VAL	1019	0.995	14243	13.98
MET	306	0.991	7784	25.43
ILE	373	0.990	5231	14.04
LEU	792	0.991	13538	17.09
TYR	152	0.997	184	1.21
PHE	277	0.994	10002	36.16
ORN	276	0.997	2400	8.69
LYS	771	0.994	10930	14.17
TRP	163	0.995	1873	11.49
ARG	974	0.991	19382	19.91
TOT	9046	0.995	133400	14.75

C_{oc} : concentration initiale calculée, K : constante disparition ou clairance métabolique de l'acide aminé, V : volume de distribution correspondant à C_{oc} .

4.2.3.4. Variations des distributions des acides aminés dans les deux phases du sang au cours de l'absorption

Suite à l'ingestion de la solution d'acides aminés, les variations des distributions plasmatiques des acides aminés relatives au sang total et la signification statistique éventuelle (ANOVA) de ces évolutions, sont rapportées dans le tableau 17. Pour des raisons de commodité nous n'avons pas présenté les variations des distributions érythrocytaires. Les valeurs de celles-ci sont évidemment complémentaires aux valeurs plasmatiques (100 - distribution plasmatique) et les écarts types sont identiques pour les deux distributions.

Tableau 17. Evolution en fonction du temps (min) de la distribution moyenne des concentrations en acides aminés plasmatiques en p. cent de la concentration sanguine totale.

	0 min		5 min		15 min		25 min		35 min		50 min		65 min		80 min		95 min		110 min		125 min	
	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.	Moy	S.D.
TAU	11.8	2.8	11.7	2.2	11.2	2.4	11.2	2.0	11.7	2.8	11.4	2.8	12.3	2.5	12.1	2.2	11.7	2.4	10.5	2.2	11.0	2.5
ASP	0.4	0.2	0.4	0.1	0.4	0.1	0.4	0.1	0.4	0.1	0.5	0.2	0.4	0.1	0.4	0.1	0.4	0.1	0.3	0.1	0.3	0.1
THR	47.1	7.4	44.5	7.2	46.6	6.3	50.5	8.7	47.6	9.4	51.1	8.6	49.4	8.7	47.3	7.3	48.5	10.2	43.7	6.8	44.1	8.1
SER	39.5	6.0	42.1	5.5	40.5	5.1	44.0	5.6	42.4	6.5	45.5	8.5	46.2	7.0	43.9	6.7	42.0	6.2	37.7	4.7	38.8	6.6
ASN	29.3	8.1	31.7	6.4	31.1	9.5	32.5	11.3	30.0	8.4	35.1	11.2	32.0	7.3	32.6	9.3	29.1	9.8	27.0	8.4	27.3	9.0
GLU	9.1	6.0	9.1	7.1	9.5	7.4	11.9	8.5	12.6	7.8	12.8	7.6	12.5	7.7	12.0	7.2	10.0	6.4	10.2	6.4	8.3	6.0
GLN	58.8	7.7	57.5	6.2	58.0	10.0	60.9	9.9	60.3	9.2	59.4	8.1	62.2	9.8	60.6	9.1	61.4	9.4	57.2	9.7	59.3	7.3
GLY	35.9	7.4	37.3	4.9	36.7	7.9	38.1	7.8	40.0	8.2	42.2	8.4	43.9	7.1	41.9	7.9	40.6	6.6	35.8	7.1	37.3	7.0
ALA	50.5	5.3	50.9	4.6	50.5	7.9	50.0	5.6	50.5	6.0	52.7	6.7	54.4	6.5	55.0	11.1	52.6	5.5	50.1	11.2	50.9	5.8
CIT ^b	48.8	9.2	41.5	9.5	39.8	8.6	40.4	9.7	44.1	15.7	55.2	11.0	55.7	13.3	59.0	10.6	56.8	14.2	51.7	13.1	53.3	12.0
αAB	63.2	29.3	53.8	13.4	52.5	12.3	50.3	16.5	62.3	27.0	61.8	17.4	54.8	9.0	55.3	13.2	52.3	15.0	50.4	8.8	57.6	14.8
VAL	56.3	4.9	55.8	4.4	52.8	9.0	54.1	6.3	54.2	6.1	52.2	6.6	55.3	6.9	54.8	4.7	54.5	6.2	51.8	8.6	56.4	6.1
MET	54.9	8.6	53.9	10.6	50.7	11.8	55.5	6.4	54.3	6.0	54.9	7.6	57.5	5.0	56.7	5.1	56.3	8.3	53.2	5.1	57.6	4.3
ILE	52.3	9.6	54.3	7.0	50.8	10.2	49.6	7.4	53.8	7.8	54.7	6.5	57.7	6.6	52.4	7.3	53.5	7.5	53.9	6.6	57.6	11.9
LEU	47.1	4.9	49.7	7.0	48.6	6.0	53.5	6.7	52.0	6.9	51.4	4.6	52.2	6.1	50.7	6.0	48.1	4.5	46.5	6.4	50.5	5.9
TYR ^c	42.7	5.6	51.2	12.5	48.0	8.1	51.6	10.8	48.2	8.2	48.6	5.1	46.9	5.7	42.3	3.5	42.0	7.1	42.5	5.9	43.6	5.3
PHE	46.2	6.3	49.2	5.4	46.1	7.2	50.3	10.0	48.7	6.4	49.6	5.3	51.1	6.9	49.6	4.7	50.1	6.7	46.9	6.0	51.3	6.8
ORN ^b	26.3	6.6	24.8	4.4	23.6	4.9	30.5	12.9	29.3	6.2	35.0	9.8	35.2	7.3	33.4	4.1	34.4	4.1	31.5	4.1	34.2	6.3
LYS ^a	48.4	6.8	50.1	6.3	48.1	8.1	59.5	11.0	59.6	7.1	62.5	11.1	64.4	8.8	60.4	8.6	60.3	6.1	54.9	7.1	59.6	10.0
HIS	52.9	8.0	54.0	6.6	45.1	8.7	56.4	13.1	54.3	10.0	56.8	9.0	60.8	11.4	54.2	8.8	57.3	15.6	50.7	9.9	53.3	10.2
TRP	79.2	22.1	66.1	9.6	64.9	15.4	78.2	20.5	75.6	4.6	72.4	4.6	77.0	9.5	75.2	9.6	78.7	7.3	67.4	16.1	78.1	11.4
ARG	94.2	24.5	95.2	23.5	95.4	28.6	100.0	38.4	100.0	26.1	100.0	26.7	100.0	29.1	98.2	27.2	100.0	30.1	95.7	29.5	100.0	32.7
TOT ^a	32.9	3.7	33.5	2.7	34.1	5.2	38.0	5.2	39.0	5.0	40.5	5.8	41.7	4.9	40.1	4.4	38.9	3.7	35.2	4.8	36.4	4.3

Cinétiques des distributions plasmatiques significatives, ^(a) P < 0.001, ^(b) P < 0.01, ^(c) P < 0.05 (ANOVA, 10 ddl, 88 ddl). Moy = moyenne, S.D. = écart type.

Dans les figures 10a, 10b et 10c, sont présentées les distributions plasmatiques et érythrocytaires dans un même histogramme. Seules les variations de distributions de quatre acides aminés (CIT, TYR, ORN et LYS) ainsi que celle du total (TOT) des acides aminés sont significatives.

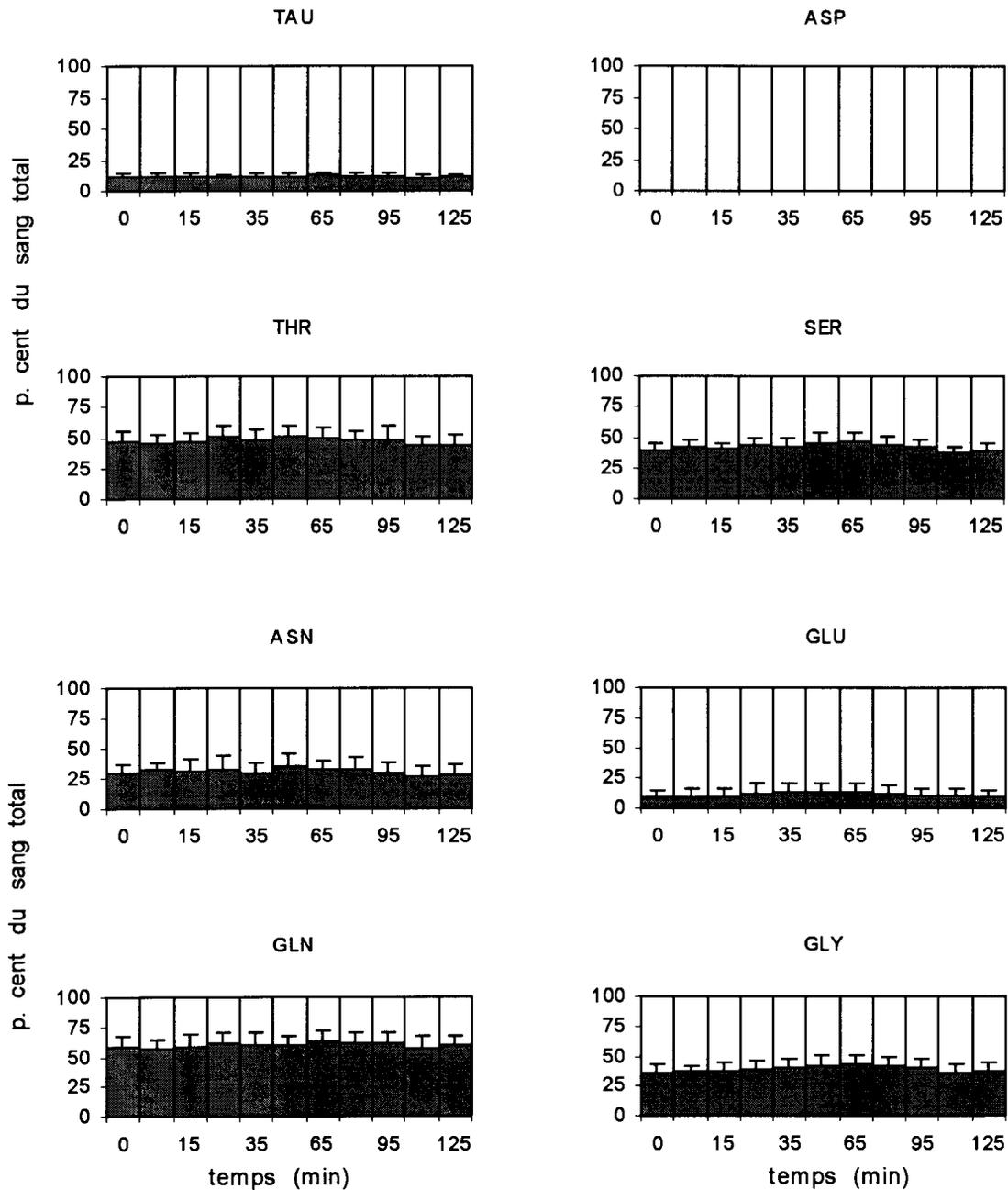


Figure 10a. Evolution en fonction du temps (min) des distributions des concentrations en acides aminés plasmatiques (grisé) et érythrocytaires (vide) en p. cent des concentrations sanguines totales.

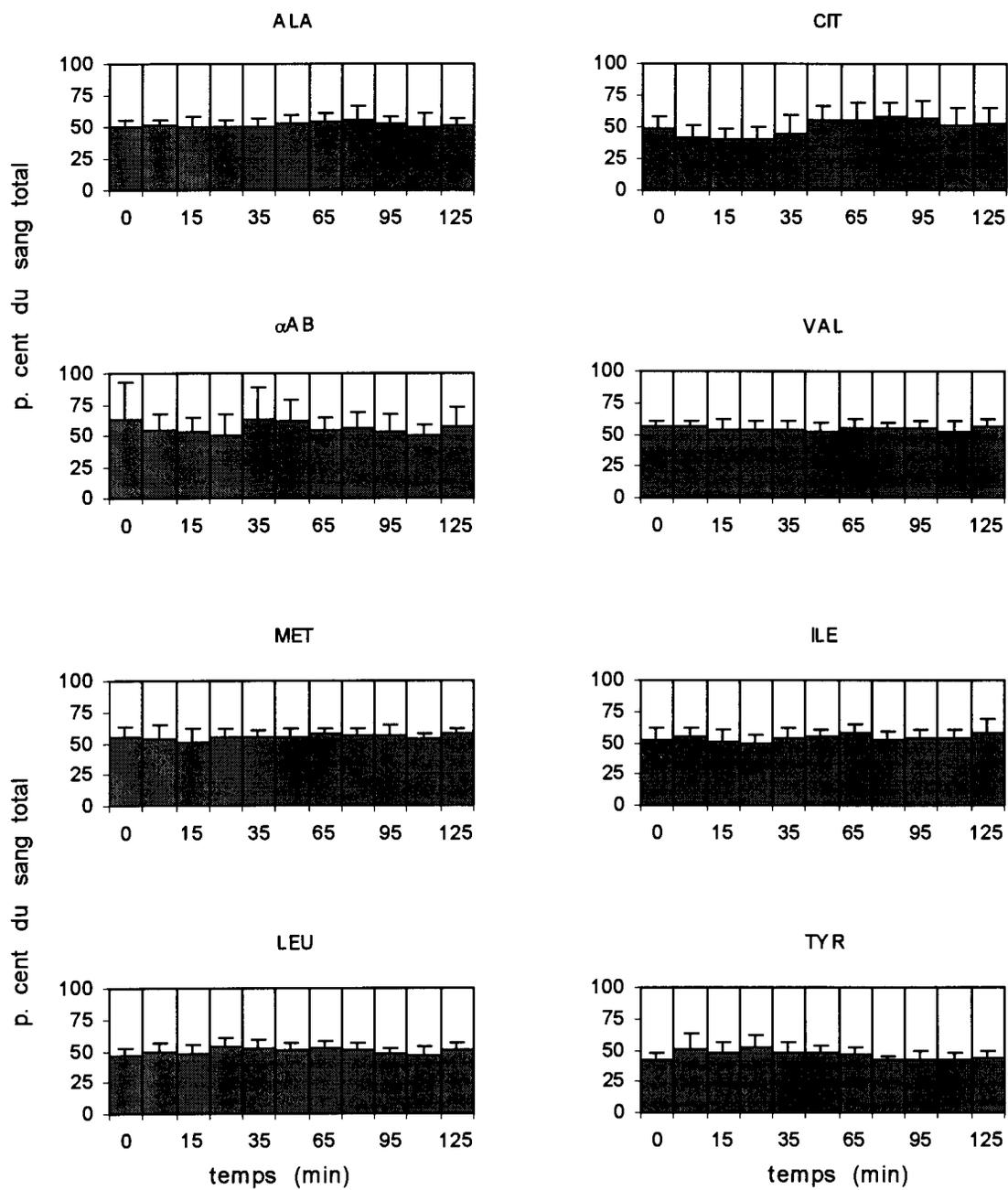


Figure 10b. Evolution en fonction du temps (min) des distributions des concentrations en acides aminés plasmatiques (grisé) et érythrocytaires (vide) en p. cent des concentrations sanguines totales.

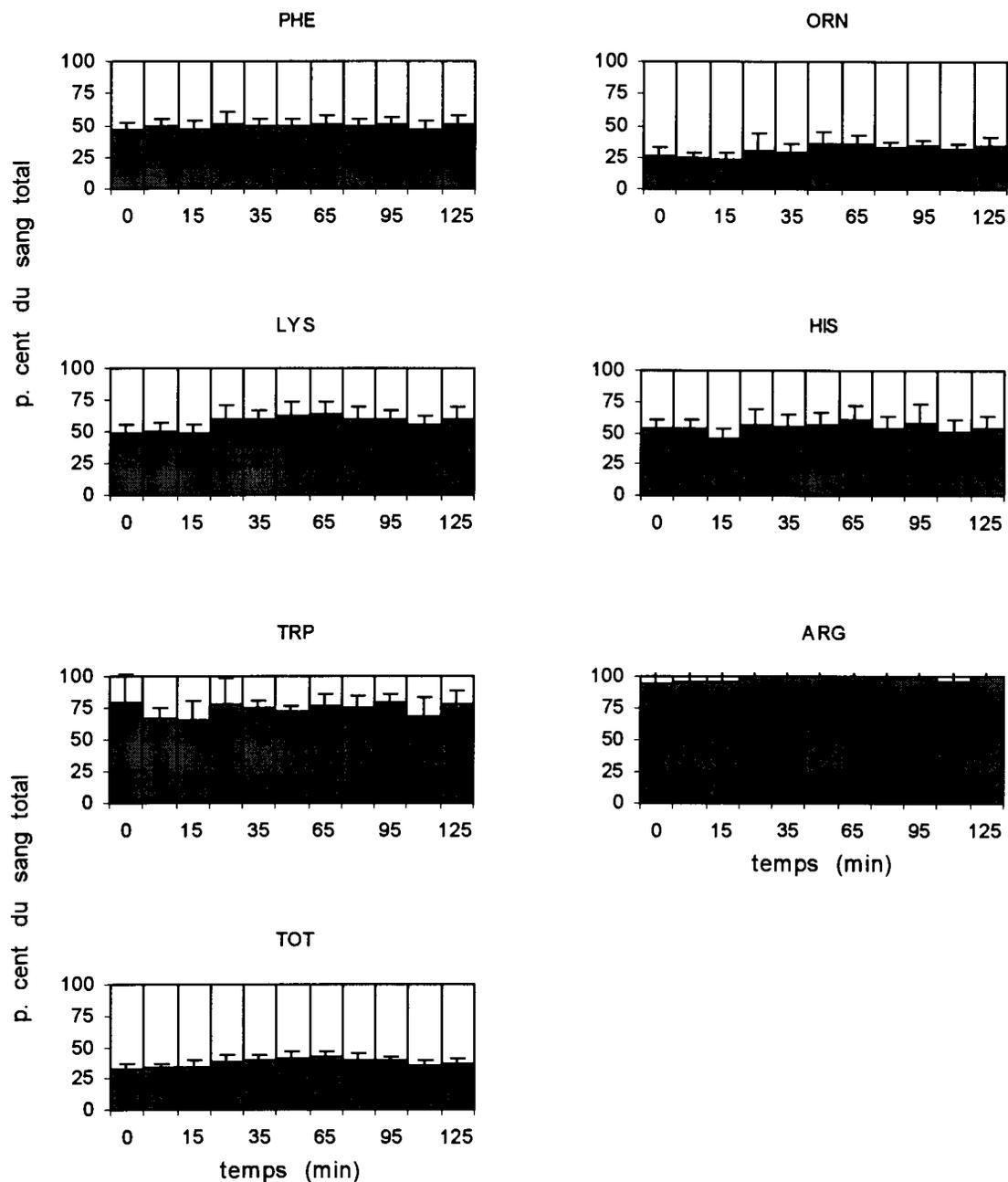


Figure 10c. Evolution en fonction du temps (min) des distributions des concentrations en acides aminés plasmatiques (grisé) et érythrocytaires (vide) en p. cent des concentrations sanguines totales.

4.2.3.5. Relations entre les concentrations en acides aminés plasmatiques et érythrocytaires

L'observation de variations simultanées des concentrations absolues et des distributions plasmatiques et érythrocytaires pour certains acides aminés, laissait

supposer que des échanges entre le plasma et les érythrocytes pouvaient exister. La recherche de relations entre ces deux compartiments sanguins par le calcul des coefficients de corrélations et de régressions linéaires permettent la mise en évidence de tels échanges. Dans le tableau 18 sont présentés les paramètres des relations recherchées. Pour les acides aminés qui présentent des coefficients de corrélations significatifs ($P < 0.05$) entre les concentrations plasmatiques et érythrocytaires les relations sont tracées (figures 11a et 11b). Ainsi, seuls quatre acides aminés ne présentent pas de corrélations significatives (ASP, ASN, GLN et TRP).

Tableau 18. Relations entre les concentrations des acides aminés plasmatiques et érythrocytaires.

	r	R	S.D.	a	S.D.	P
TAU	0.684	5.161	0.537	309	36	< 0.001
ASP	0.141	-	-	-	-	NS
THR	0.474	0.936	0.169	139	45	< 0.001
SER	0.452	0.796	0.152	171	27	< 0.001
ASN	-0.042	-	-	-	-	NS
GLU	-0.225	-1.102	0.466	722	32	< 0.02
GLN	-0.005	-	-	-	-	NS
GLY	0.419	0.721	0.152	490	60	< 0.001
ALA	0.572	0.824	0.115	241	73	< 0.001
CIT	0.225	0.416	0.176	78	15	< 0.02
α AB	0.617	2.050	0.257	-26	10	< 0.001
VAL	0.764	1.010	0.083	51	50	< 0.001
MET	0.882	0.930	0.048	14	7	< 0.001
ILE	0.734	1.042	0.094	19	15	< 0.001
LEU	0.822	1.164	0.078	43	28	< 0.001
TYR	0.435	0.944	0.190	69	22	< 0.001
PHE	0.736	0.903	0.081	64	12	< 0.001
ORN	0.636	1.812	0.213	182	37	< 0.001
LYS	0.310	0.320	0.095	247	38	< 0.001
HIS	0.334	0.419	0.115	84	15	< 0.001
TRP	0.030	-	-	-	-	NS
ARG	0.367	0.313	0.109	34	40	< 0.01
TOT	0.510	0.863	0.142	6858	768	< 0.001

Coefficient de corrélation (r), coefficient de régression (R), terme constant (a), écart type (S.D.), seuil de signification (P), NS : non significatif.

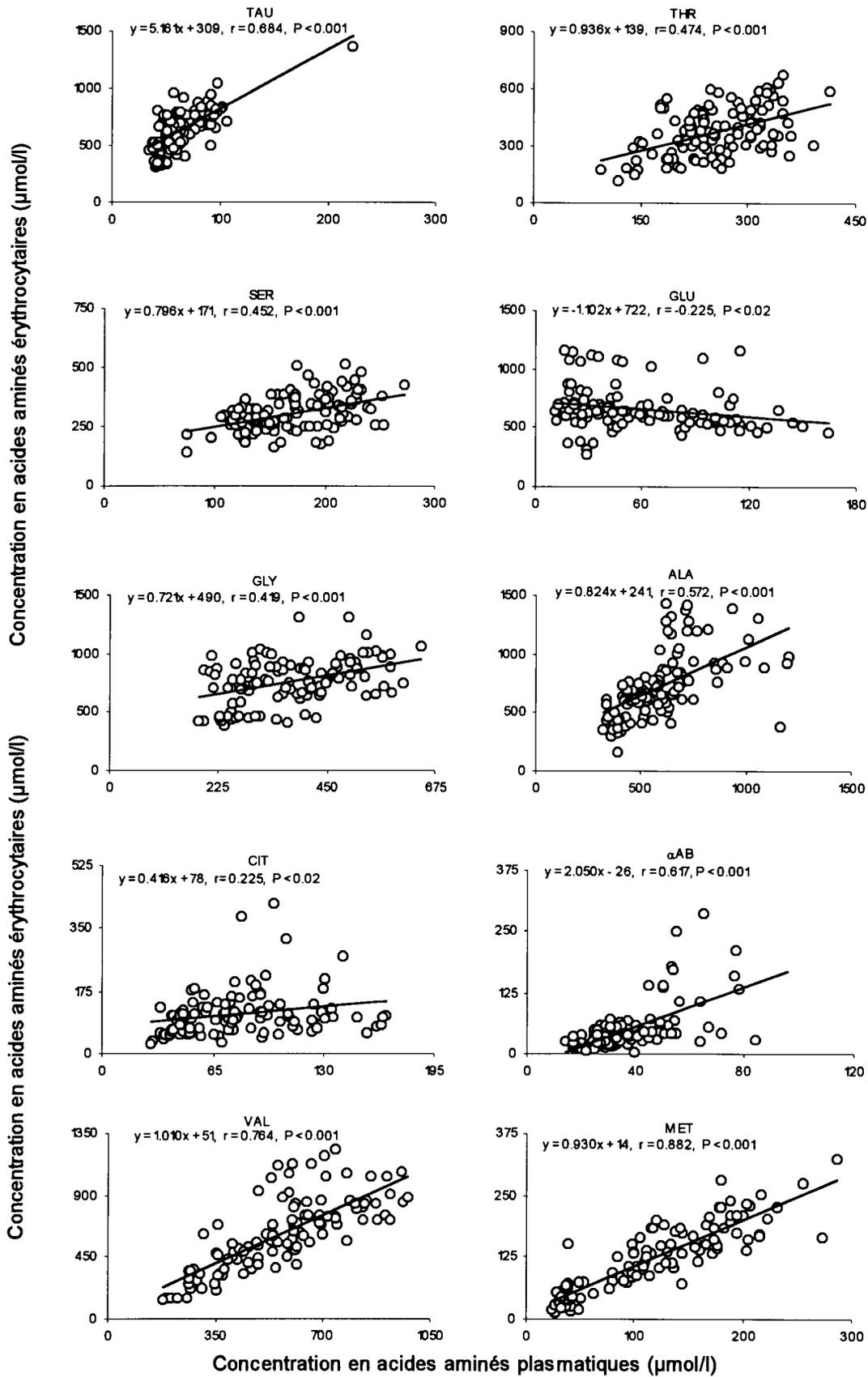
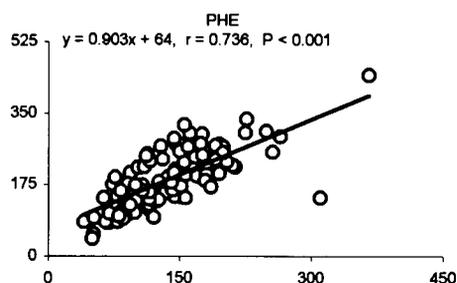
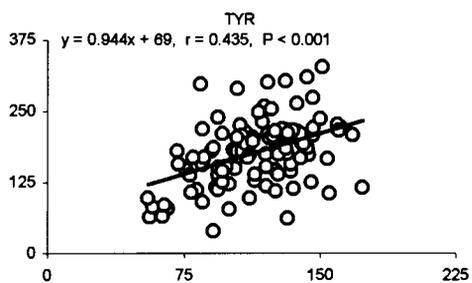
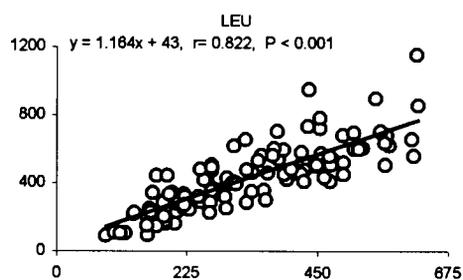
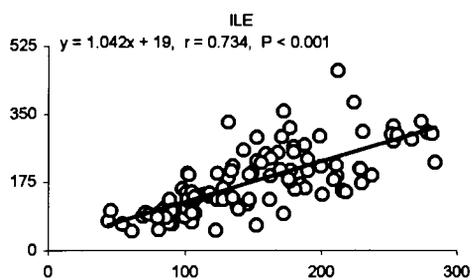
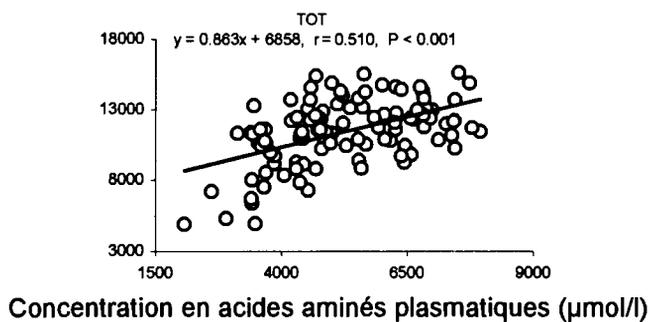
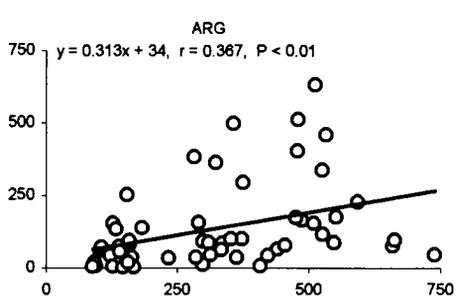
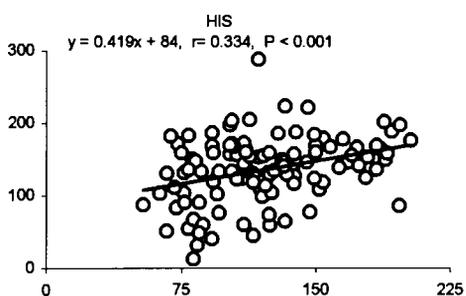
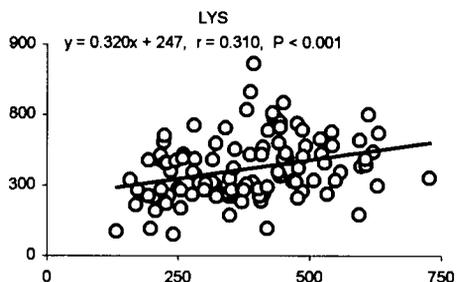
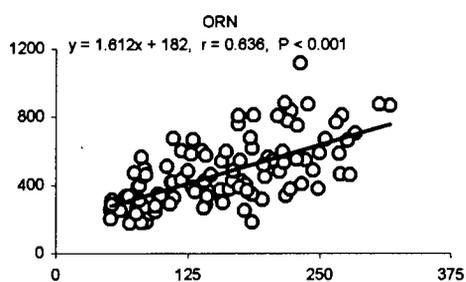


Figure 11a. Relations entre les concentrations plasmatiques et érythrocytaires ($n = 108$).

Concentration en acides aminés érythrocytaires ($\mu\text{mol/l}$)Concentration en acides aminés érythrocytaires ($\mu\text{mol/l}$)Figure 11b. Relations entre les concentrations plasmatiques et érythrocytaires ($n = 108$).

4.3. DISCUSSION

La première remarque à formuler est le peu de données publiées jusqu'à présent sur les teneurs érythrocytaires en acides aminés chez l'homme ainsi que les distributions relatives au sang total de ceux-ci, ce qui limite la confrontation de nos résultats. Cela est inhérent d'une part, aux contraintes techniques d'analyse des acides aminés dans le sang total et, d'autre part, au fait que la détermination des acides aminés érythrocytaires pour les études cliniques, métaboliques ou de bilans n'est pas encore perçue comme une exigence.

La deuxième remarque est celle de la grande dispersion des valeurs comme en témoigne l'importance des écarts types par rapport à la moyenne. Ce fait déjà rapporté par d'autres auteurs (IOB et coll. 1963 ; PRENTON et YOUNG 1969 ; ARMSTRONG et STAVE 1973 ; CETIN et coll. 1991 ; PROENZA et coll. 1994) rend compte d'une grande variabilité interindividuelle dans l'espèce humaine. Cette variabilité semble trouver son origine dans les conditions alimentaires, car en expérimentation animale, une alimentation identique et contrôlée permet de réduire quelque peu cette dispersion. Pour les concentrations déterminées dans le sang total, le traitement (hémolyse) augmente encore cette dispersion qui se répercute sur l'estimation des valeurs globulaires. McMENAMY et coll. (1960) ont montré que la légère contamination par les globules blancs, ne pourrait augmenter plus de 2 p. cent le niveau des autres composants.

4.3.1 Concentrations basales des acides aminés au repos

Les concentrations plasmatiques moyennes déterminées dans les conditions expérimentales décrites s'inscrivent dans les rangs des valeurs obtenues par différents auteurs (STEIN et MOORE 1954 ; FELIG et coll. 1973 ; DARMAUN et coll. 1986,1989 ; SCHAEFER et coll. 1990 ; MARCHESINI et coll. 1992 ; TEERLINK et coll. 1994 ; TESSARI et coll. 1994 ; LOUARD et coll. 1995 ; HANKARD et coll. 1996).

Tenant compte des dispersions interindividuelles et des coefficients de variations des techniques mises en oeuvre par différents auteurs, nos valeurs érythrocytaires et sanguines totales bien qu'elles soient plus élevées pour certains acides aminés (TAU, ASP, GLN), sont également du même ordre de grandeur et sont parfaitement cohérentes avec celles rapportées par AOKI et coll. (1973), FELIG et coll. (1973), HAGENFELDT et ARVIDSSON (1980), DARMAUN et coll. (1986, 1989), SCHAEFER et coll. (1990).

La taurine, acide aminé non protéique, est certainement un des acides aminés dont la variabilité interindividuelle est la plus grande. Il est connu que son contenu plasmatique peut varier de plus de 100 p. cent, suivant l'échantillonnage et les techniques utilisées (TRAUTWEIN et HAYES 1990). Cet acide aminé qui peut être synthétisé dans l'organisme à partir de la cystéine (LAIDLAW et KOPPLER 1987 ; KOPPLE et coll. 1990) ou apporté par l'alimentation, a suscité un grand intérêt à partir du moment où un rôle de neurotransmetteur ou de régulateur de l'activité neurologique lui a été attribué.

Malgré la significative contribution des thrombocytes pour TAU et GLU, les acides aminés acides ASP, GLU et TAU sont connus pour être plus concentrés dans les globules rouges que dans le plasma (CETIN et coll. 1991). Les érythrocytes, cellules dépourvues de noyaux, sont capables de métabolisme catabolique et anabolique. Des interconversions entre l'aspartate et l'asparagine sont possible. Si nous admettons que la synthèse du glutathion a lieu dans l'érythrocyte, nous pouvons déduire que les précurseurs correspondants doivent provenir du plasma ou d'autres organes. Il est probable que le métabolisme intracellulaire contribue aux teneurs de glycine et de glutamate, puisque ces acides aminés sont incorporés par synthèse peptidique *de novo* et par échange dans le glutathion (TUNNICLIFF 1994). Pour ELLORY (1987) le glutamate ne provient pas de la conversion de la glutamine car l'érythrocyte ne possède pas de glutaminase. Cet acide aminé serait alors le produit de l'action d'hydrolases érythrocytaires sur des peptides exogènes. Cette voie est décrite pour la phénylalanine par BACKWELL et coll. (1994).

A propos de la concentration en glutamine supérieure à celle déterminée par d'autres auteurs (AOKI et coll. 1973 ; HAGENFELDT et ARVIDSSON 1980), celle-ci trouve son explication dans la méthodologie utilisée : seul un traitement immédiat tel que pratiqué ici après prélèvement prévient toute transformation de la glutamine en glutamate par hydrolyse de la fonction amide (ARMSTRONG et STAVE 1973) ou cyclisation en pyrrolidone-5-carboxylate (ORESQUES et KUPFER 1967).

4.3.2. Distributions basales des acides aminés plasmatiques et érythrocytaires

L'intérêt de l'étude des distributions relatives au sang total des concentrations des acides aminés a été discutée au chapitre 3. Comme déjà souligné ces rapports sont utilisés pour déterminer le profil des acides aminés, lequel permet de caractériser le pool des acides aminés d'une espèce et dans une situation physiologique donnée.

Pour les distributions relatives au sang total des acides aminés basiques, la lysine se trouve en des proportions équivalentes dans le plasma et les érythrocytes. L'histidine et l'arginine semblent être plutôt plasmatiques. Le niveau élevé de l'ornithine dans les érythrocytes pourrait provenir de l'hydrolyse de l'arginine par l'arginase globulaire (HAGENFELDT et ARVIDSSON 1980). Les acides aminés acides sont concentrés dans l'érythrocyte. Parmi les acides aminés neutres, la glutamine, l'alanine, l' α -aminobutyrate, la valine, la méthionine et le tryptophane se trouvent en proportion supérieure dans le plasma à celle trouvée dans les érythrocytes. D'autres acides aminés neutres se rencontrent en plus grande quantité dans les érythrocytes, la sérine, l'asparagine, la glycine et la tyrosine. Cinq autres acides aminés neutres par contre se répartissent de manière équivalente dans les deux phases du sang, la thréonine, la citrulline, l'isoleucine, la leucine et la phenylalanine.

Considérant leur rôle physiologique, exceptées l'alanine et la glutamine, les acides aminés gluconéogénétiques, prédominent dans l'érythrocyte. Cela permet une relative disponibilité de ALA et GLN comme substrats de la gluconéogenèse.

FELIG et coll. (1973) ont rapporté l'intérêt particulier de la prédominance de l'alanine dans les mouvements inter-organes des acides aminés. Trois des huit acides aminés essentiels conventionnels VAL, MET, et TRP prédominent dans le plasma. Les autres THR, PHE, ILE, LEU et LYS se trouvent en proportion équivalente dans les deux phases.

Ces résultats sont concordants avec ceux de la littérature. La distribution des acides aminés entre le plasma et les érythrocytes a été décrite chez l'homme par HAGENFELDT et ARVIDSSON (1980), CETIN et coll. (1991) et PROENZA et coll. (1994). Ces études ont montré que la distribution des acides aminés libres peut varier largement pour certains acides aminés. Par exemple, GLU et ASP ont une répartition élevée dans les érythrocytes, et les acides aminés branchés sont présents en grande partie dans le plasma (AOKI et coll. 1973 ; DARMAUN et coll. 1989 ; CETIN et coll. 1991). Cependant des variations significatives existent dans certaines conditions physiologiques, pathologiques comportementales et alimentaires. YUNIS et ARIMURA (1965) ont observé un rapport érythrocytes/plasma de lysine marquée au ^{14}C de 1.7 à 2.0 pour les érythrocytes humains. GARDNER et LEVY (1972) démontrent cependant, que cet acide aminé est significativement métabolisé par l'érythrocyte de l'homme, et quand cela est considéré, il ne trouvent pas d'accumulation significative de cet acide aminé. Les acides aminés neutres étudiés *in vitro* par WINTER et CHRISTENSEN (1964) présentaient des rapports d'équilibres de concentration érythrocytaire aqueuse/milieu extracellulaire supérieurs à 1 exception possible pour GLY dont le rapport est égal à 1.3.

A la lumière de ces résultats, il ressort alors, que chez l'homme bien portant, l'érythrocyte contient la plupart des acides aminés à des concentrations comparables ou supérieures à celle du plasma. Le profil obtenu peut être considéré comme caractéristique et peut servir de référence.

4.3.3. Cinétiques et distributions plasmatiques et érythrocytaires des acides aminés

4.3.3.1. Cinétiques plasmatiques et érythrocytaires

Jusqu'à présent, nous n'avons pas trouvé de travaux étudiant simultanément les cinétiques plasmatiques et érythrocytaires des acides aminés ainsi que les relations possibles entre ces deux compartiments sanguins chez l'homme au cours de l'absorption intestinale.

Après ingestion de la solution d'acides aminés, les concentrations des acides aminés ont évolué différemment dans le sang en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques et métaboliques.

Dans le plasma les concentrations maximales sont atteintes après un temps moyen de 54 ± 13 min pour tous les acides aminés. Le glutamate, la cystine, l'isoleucine, la leucine, la tyrosine et la phenylalanine sont absorbés les premiers, en 35 min, la plupart des acides aminés neutres suivront en 50 min. L' α -aminobutyrate avec les acides aminés basiques apparaissent dans le sang plus tardivement soit en 65 min et la citrulline en dernier au bout de 80 min. Globalement, l'apparition se fait dans l'ordre suivant : d'abord les acides aminés acides et à chaînes branchées, puis les acides aminés neutres et enfin les acides aminés basiques. Ces temps concordent avec ceux rapportés par GROPPER et coll. (1993) qui varient de 30 à 60 min pour les acides aminés plasmatiques étudiés par ces auteurs suite à l'ingestion d'acides aminés seuls ou associés à des protéines complètes.

Au niveau des érythrocytes le temps moyen correspondant au maximum de concentration est de 38 ± 8 min. Presque tous les acides aminés atteignent un rapport de concentration par rapport à la valeur basale le plus élevé au bout de 35 min avec l' α -aminobutyrate et le tryptophane les plus rapides en 25 min, la valine et l'histidine en 50 min et la tyrosine en dernier en 80 min.

En comparant les temps d'apparition des acides aminés dans les deux phases du sang, il est intéressant de constater que d'une manière générale les maxima sont atteints plus rapidement dans les érythrocytes. Cela indique une saturation du transport à travers la membrane érythrocytaire pour ces acides aminés. Les temps correspondants aux maxima sont les mêmes et coïncident dans les deux compartiments pour le glutamate, la valine et la phenylalanine, le passage transmembranaire érythrocytaire n'étant pas encore saturé. La concentration de la tyrosine cependant, continue d'augmenter même quand le maximum d'absorption mesuré dans le plasma est déjà atteint.

Nous n'avons pas observé d'évolution nette pour tous les acides aminés. Pour rappel, la taurine, l'asparagine, le glutamate, l'alanine, l' α -aminobutyrate, la cystine et l'histidine ont présenté de faibles variations au cours de l'absorption de la solution d'acides aminés. Parmi cette liste et considérant uniquement les acides aminés ingérés (contenus dans la solution Azonutril 25), l'alanine, le glutamate et la cystine, l'absence de changements significatifs pour ces acides aminés est concevable du fait du métabolisme. De l'alanine est constamment produite par les muscles périphériques et utilisée par le foie pour la néoglucogenèse ; le glutamate et la cystine sont quant à eux prélevés par les muscles (FELIG 1975). Cependant, au niveau des érythrocytes ces évolutions ne sont significatives que pour la valine, la méthionine, l'isoleucine, la leucine, la tyrosine, la phenylalanine et l'ornithine. Les cinétiques de ces acides aminés sont globalement parallèles à celles du plasma. Tout laisse supposer que des échanges plasmatiques et globulaires existent pour ces acides aminés au cours de l'absorption. Notons toutefois, au vu de la décroissance des courbes, que la vitesse d'utilisation de la tyrosine au niveau de la phase plasmatique est plus élevée qu'au niveau des érythrocytes. Cette chute des teneurs au cours de l'absorption est plus rapide cependant pour l'alanine et la citrulline dans les érythrocytes en regard du plasma. Nous devons aussi remarquer que l'absence d'évolution significative ou le peu de variations au niveau des érythrocytes pour les autres acides aminés sont à rapporter à la saturation rapide de l'entrée de ces acides aminés en plus des processus métaboliques propres dans ce compartiment sanguin.

Chez un sujet moyen pesant 70 kg l'eau totale représente un volume de 40 l, soit 57 p. cent du poids du corps. Chez le même sujet le volume d'eau extracellulaire est d'environ 15 l, le volume intracellulaire est donc de 25 l et les volumes plasmatiques et érythrocytaires moyens respectivement de 3 et 2 l. Dans notre expérience les volumes de distribution calculés, pour les acides aminés ayant montré une évolution cinétique plasmatique très significative, font ressortir que ces acides aminés ont des espaces de dilutions différents (tableau 16). Nous pouvons déduire, toute réserve émise cependant, tenant compte du fait que ces calculs n'étaient qu'approximatifs, que la tyrosine se dilue dans un volume plus restreint principalement dans le plasma et que la méthionine, la leucine, la phenylalanine, et l'arginine se distribuent dans un espace corporel beaucoup plus large comprenant le milieu extracellulaire et intracellulaire. Le volume de distribution total pour d'autres acides aminés cependant, ne couvre pas l'ensemble des deux compartiments extracellulaire et intracellulaire corporels. Ces différences de distribution viennent du fait qu'il existent des sous-compartiments liquides, chacun étant plus ou moins perméable aux acides aminés.

Les clairances métaboliques (constantes d'utilisation ou de disparition) calculées pour ces acides aminés sont aussi différentes. L'isoleucine, la leucine, la méthionine et l'arginine sont utilisées plus rapidement et donc leur vitesse de disparition du sang est relativement plus élevée que celle de la thréonine, de la tyrosine et de l'ornithine. Les autres acides aminés ont une clairance métabolique intermédiaire. Ces observations sont parfaitement cohérentes avec le métabolisme et les flux inter-organes propres de ces acides aminés, lesquels sont abordés pour les besoins de la discussion ci-après.

Les prélèvements à partir de la veine antécubitale mesurent la concentration des acides aminés au niveau systémique après un premier passage par le foie et les muscles du bras. Le foie est branché en "série" sur la circulation porte, c'est-à-dire que tout le sang arrivant par la veine porte doit obligatoirement le traverser pour gagner la circulation générale. Le sang veineux porte est un mélange de sang d'origine digestive et splénique. Le foie reçoit donc en premier l'essentiel des produits de l'absorption intestinale. Il les retient, les stocke, les modifie, les distribue

à l'organisme selon les besoins. L'interprétation des cinétiques observées ne peut se faire sans considération de la circulation sanguine et des événements métaboliques se déroulant au cours de l'absorption intestinale. Nous présentons ici, une synthèse inspirée notamment des travaux de FELIG et coll. (1970), FELIG (1973, 1975), CAHILL (1976) et CHRISTENSEN (1982, 1990).

4.3.3.1.1. Métabolisme des acides aminés

Du fait du remaniement de certains acides aminés alimentaires par l'intestin, les muscles et les reins, JUNGAS et coll. (1992) estiment que les arrivées au foie diffèrent substantiellement de ce qui est ingéré. Ainsi, l'approvisionnement (du foie) en alanine a plus que triplé et celui de la sérine est doublé, cependant six acides aminés (ASP, GLN, GLU, GLY, LEU, ILE, VAL et TOT) sont complètement ou en grande partie métabolisés ailleurs.

Le transport intestinal des molécules de nutriments provenant de la digestion fournit l'exemple central d'un flux d'acides aminés dirigé du compartiment d'un organe à un autre. Le rôle de deux membranes anatomiquement distinctes et la présence du compartiment intracellulaire, intervenant entre la lumière et le côté plasmatique, sont caractéristiques du transport épithélial.

Les systèmes de transport et les régulations intervenant dans l'absorption intestinale des acides aminés sont revus par KILBERG et coll. (1993). Les transports des acides aminés dans la bordure en brosse et dans les pôles basolatéraux d'une cellule dans un épithélium sont différents. Les systèmes de transport identifiés jusqu'à présent dans la membrane basolatérale de l'épithélium rénal et intestinal sont analogues à ceux des membranes plasmiques en général. Par contraste l'un, au moins, des systèmes de transport principaux de la bordure en brosse intestinale est manifestement un système à large spectre d'acides aminés. Il est sodium dépendant. Au contraire des systèmes A et ASC il accepte même les acides aminés cationiques et bicycliques en plus de presque tous les acides aminés ordinaires bipolaires. Ainsi, un système B plutôt semblable au système B⁰⁺ observé dans les

blastocytes et certains oocytes (McGIVAN et PASTOR-ANGLADA 1994) semble être actif. Une régulation différentielle du transport des acides aminés par un tel système présenterait des difficultés. A cause des différences apicales et basolatérales, la fonction épithéliale habituelle de transfert de solutés, ioniques ou non, à travers chacune des deux barrières en série apparaît se faire par des voies plutôt dissemblables. Cette caractéristique quand elle est analysée, permettrait une reconnaissance d'étapes dans l'amplification de la polarisation d'un épithélium.

Pour expliquer les cinétiques observées à la suite de l'ingestion d'acides aminés nous nous basons sur des résultats précis trouvés dans la littérature. Schématiquement les auteurs considèrent que les acides aminés sont entièrement métabolisés dans quatre organes : l'intestin grêle, les muscles squelettiques, le foie et les reins.

Notre discussion commence par porter sur ceux des acides aminés pour lesquels une importante et nette circulation d'organes à organe a pu être établie. Sont concernés essentiellement par ces échanges les acides aminés suivants : alanine, glutamine, glycine, lysine et sérine. La figure 12 tirée d'un travail de CAHILL et coll. (1976) objective ces échanges chez l'homme en état post-absorptif.

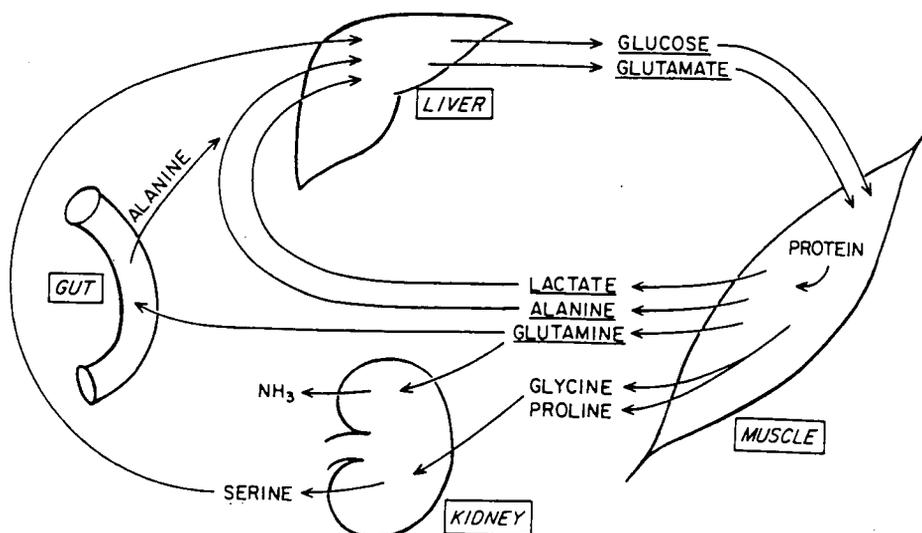


Figure 12. Cycles des échanges des acides aminés entre divers organes chez l'homme en état post-absorptif (CAHILL et coll. 1976).

Le flux de l'alanine fait partie du cycle alanine-glucose (FELIG 1969, 1975) par quoi l'alanine synthétisée dans le muscle par transamination du pyruvate va au foie pour la reconversion de son squelette carboné en glucose. Le cycle achemine les groupes aminés du muscle au foie et indubitablement participe à la régulation de l'épargne du glucose malgré le fait qu'il ne transfère pas le carbone des acides aminés aux hydrates de carbonés. La gluconéogenèse intervient alors dans le foie pour compléter le cycle. Même chez l'animal nourri, on ne s'attend pas à ce que la digestion des protéines produise proportionnellement un si grand flux d'alanine de l'intestin vers le foie (CHRISTENSEN 1990). La quantité d'alanine qui se rajoute au plasma portal pendant l'absorption à partir de l'intestin est remarquablement plus grande que celle de tout autre acide aminé (AIKAWA et coll. 1973).

Durant le jeûne, par la libération des acides aminés par protéolyse (CAHILL 1976), le muscle sert de donneur de précurseurs pour la synthèse du glucose quand les provisions en hydrates de carbonés diminuent. Avec la chute du niveau d'insuline, les muscles squelettiques libèrent les acides aminés, qui passent par la circulation au lit splanchnique pour la gluconéogenèse, grâce à laquelle, le glucose est rendu disponible pour le cerveau et les autres tissus. L'administration d'insuline supprime la libération des acides aminés. L'insuline est aussi connue pour accroître l'entrée du glucose et des acides aminés dans les cellules musculaires. Ultérieurement, quand le jeûne se poursuit, la lipolyse dans les tissus adipeux, épargne les acides aminés musculaires. Le profil de la libération des acides aminés à partir du muscle lors du jeûne est caractéristique de cette situation physiologique. Le rejet d'alanine et de glutamine à partir de l'avant bras de l'homme excède celui de tout autre acide aminé et compte pour plus de la moitié de la libération des acides aminés totaux. L'alanine sanguine a un rôle unique en tant que régulateur de la libération des acides aminés musculaires chez le rat anesthésié (DANIEL et coll. 1979). Le muscle cardiaque montre aussi un équilibre négatif avec la glutamine représentant plus de 80 p. cent du total libéré. Contrastant avec ces sorties ou productions nettes, les tissus périphériques montrent de faibles mais consistantes extractions de sérine, cystine et de glutamate à partir du sang. L'équilibre négatif de divers acides aminés dans la périphérie est compensé par leur captation à travers le lit splanchnique mesurée par les différences artério-veineuse hépatiques (FELIG

1975). Ces différences mesurent les échanges avec le foie, l'intestin supérieur et la rate. L'intestin est probablement entièrement responsable du prélèvement net de glutamine, pendant que les tissus périphériques libèrent plutôt qu'ils extraient l'alanine en quantités substantielles. Alors, la prise nette de l'alanine par le foie est plutôt plus élevée que la différence artério-veineuse hépatique mesurée. Ainsi, les faibles cinétiques plasmatiques et globulaires que nous avons observées peuvent s'expliquer par la métabolisation de l'alanine par le foie lors du premier passage et l'extraction musculaire de cystine et de glutamate.

En dépit du fait que la glutamine n'ait pas été présente dans le mélange ingéré, il nous semble utile de donner un aperçu de son métabolisme compte tenu des interrelations possibles de cet acide aminé avec d'autres acides aminés. La glutamine participe aussi au transport des groupes aminés à partir du muscle, et ceci, malgré le fait que beaucoup de cet acide aminé soit retiré de la circulation splanchnique par le rein et l'intestin. Ce qui reste des molécules de glutamine ayant fourni de l'énergie à l'intestin tend à être passé au foie sous la forme d'alanine (JUNGAS et coll. 1992). Le foie utilise en général plus de glutamine que ce qui est rajouté au plasma portal (HANKARD et coll. 1995 ; WINDMULLER et SPAETH (1974,1980) ; HANSON et PARSONS (1980). Dans le foie la glutamine constitue un carburant principal et fournit un groupe amide pour la formation de l'urée. La glutamine contribue à la gluconéogenèse rénale, et des flux conséquents, principalement musculaires (BETZ et GOLDSTEIN 1978 ; SHRÖCK et coll. 1980), de cet acide aminé doivent être dirigés vers les reins pour fournir des quantités suffisantes de précurseurs de la synthèse d'ammoniaque. Quand l'acidose métabolique se développe, le flux de glutamine du lit splanchnique est dévié vers les reins. Cette déviation de glutamine vers les reins est associée à un déclin brusque dans la concentration en glutamine artérielle ; inversement, la déviation opposée est associée à des niveaux artériels élevés. Ainsi, il apparaît que l'homéostasie de la concentration est sacrifiée en produisant le revirement de la destination physiologiquement appropriée. La régulation des H^+ de l'organisme dans l'acidose chronique dépend du flux de glutamine à partir d'organes capables de libérer cet acide aminé vers les organes capable de le capter et d'éliminer de l'organisme les H^+ . Ces protons sont inévitablement extraits quand le NH_4^+ de l'excrétion est

substitué par une quantité équivalente d'urée d'excrétion (CHRISTENSEN 1990). Dans le contrôle de la direction des flux inter-organes de glutamine vers l'organe approprié, de multiples mécanismes de régulation doivent être considérés (WELBOURNE 1987), comprenant des modifications d'activités enzymatiques et de perméabilités membranaires dans les nombreux organes impliqués. De même quelques possibles différences inter-spécifiques ne peuvent être écartées à priori. Sont inclus dans cette dernière liste les modifications de la libération à partir du muscle ; les modifications de la captation et la libération par les sites "salvateurs", le foie par exemple ; et la captation modifiée par les tissus "épurateurs", comprenant le rein.

Contrastant avec l'alanine, la libération de glutamine se poursuit même en état post-absorptif chez le rat. Il serait faux de considérer que le jeûne est une simple inversion des directions des échanges majeurs. DECHELOTTE et coll. (1991), étudiant l'absorption et les effets métaboliques de la glutamine administrée par voie entérale *in vivo* chez l'humain sain en état post-absorptif, concluent à une absorption efficace de la glutamine dans le jéjunum et à une possibilité d'inhibition directe de la lipolyse, par contre il n'y a pas d'effet sur la protéolyse ni sur la production de glucose. Cependant, d'autres auteurs montrent une gluconéogenèse rénale à partir de glutamine (BETZ et GOLDSTEIN 1978 ; SHRÖCK et coll. 1980).

La glutamine et la glycine du muscle sont converties en serine dans les reins, processus nécessaire à l'équilibre acide-base (JUNGAS et coll. 1992). HANKARD et coll. (1996) montrent que la glycine marquée administrée par voie entérale fait baisser le *turn over* des protéines par un faible effet anabolique résultant d'une chute plus grande dans la protéolyse comparée à la protéosynthèse.

Peu d'aspartate et de glutamate est rajouté par l'intestin en dépit de l'abondance de ces acides aminés (spécialement le glutamate) dans l'alimentation. L'apport de glutamate a une origine plus compliquée, même chez l'animal nourri. Presque tout le glutamate et l'aspartate et peut être les deux tiers de la glutamine alimentaire sont métabolisés dans les cellules muqueuses pendant leur transport (JUNGAS 1992). Comme montré par les différences artério-veineuses lors de

perfusion, le glutamate capté tend à être converti en glutamine (CHRISTENSEN 1990). Ainsi, pour ces acides aminés les cinétiques que nous avons obtenues trouvent leur interprétation.

A l'opposé de la majeure partie des autres acides aminés, ceux à chaînes branchées (BCAA), valine, leucine et isoleucine, dont les variations de concentrations observées au cours de l'absorption sont très significatives, ne sont pas retirés par le foie et se rajoutent au sang portal. Ces acides aminés sont, chez l'homme et les non ruminants, en grande partie désaminés dans le muscle pour fournir l'azote aminé rejeté en tant qu'alanine et glutamine. Les céto-acides formés semblent avoir un destin dépendant de l'espèce, impliquant l'exportation vers le foie chez le rat et plus de catabolisme chez l'homme. La décarboxylation, plutôt que la désamination constitue l'étape limitant la vitesse du catabolisme de la leucine chez l'homme normal (MATTHEWS et coll. 1981). Les BCAA dans une moindre mesure sont métabolisés dans d'autres organes. Le foie peut remanier des quantités significatives de leucine, principalement par une voie mitochondriale (JUNGAS et coll. 1992). MATTHEWS et coll. (1993) ont rapporté que 38 p. cent de la leucine marquée administrée par voie nasogastrique est séquestrée par le lit splanchnique au premier passage, dont 40 p. cent seraient oxydés en α -cetoisocaproate et 50 p. cent seraient incorporés dans les synthèses protéiques. La leucine a une fonction particulière de régulation sur le *turn over* protéique dans les muscles. Cet acide aminé serait plus catabolisé en CO₂ que la valine et l'isoleucine (ODESSEY et GOLDBERG 1972). Lors de la diminution de l'azote musculaire pendant le jeûne, les acides aminés des protéines catabolisées constituent une source supplémentaire d'exportation d'azote. Dans le rein, chez l'homme, par l'intermédiaire de la conversion d'une certaine quantité de glutamine en glucose, la valine et l'isoleucine servent d'acides gluconéogénétiques effectifs même si leur métabolisme est commencé dans un organe inapte de sécréter du glucose. Les échanges de leucine sont significativement diminués avec la restriction de la quantité de protéines ingérées. Ils ne varient pas avec les changements dans l'apport énergétique alimentaire ou avec un excès de prise protéique (YANG et coll. 1986). Cet acide aminé semble avoir un effet régulateur sur les deux autres acides aminés à chaînes branchées et sur la synthèse et la dégradation protéiques musculaires. De plus, la

leucine semble jouer un rôle important dans le métabolisme oxydatif et semble être la source principale d'azote α -aminé des acides aminés gluconéogéniques (MATTHEWS et coll. 1980) libérés par le muscle.

Les acides aminés aromatiques et la méthionine sont catabolisés dans le foie en conditions physiologiques normales. Utilisant une technique isotopique multiple non invasive, il a été montré par BILOLO et coll. (1992) chez l'homme normal que le lit splanchnique prélève deux fois plus de phenylalanine que de leucine. Par conséquent, la libération dans la circulation systémique de la phenylalanine dérivée de l'alimentation est faible et beaucoup moins importante que celle de la leucine. MATTHEWS et coll. (1993) estiment que 29 p. cent de la phenylalanine marquée administrée par voie nasogastrique est séquestrée par le lit splanchnique au premier passage. Supposant qu'une quantité moindre de phenylalanine que de leucine serait incorporée dans les protéines, ils estiment que 80 p. cent de cette quantité serait transformée en tyrosine, la seule autre destinée connue de la phenylalanine.

Environ un tiers de l'arginine est métabolisée pendant le transport intestinal. L'azote apparaît en tant qu'urée, ornithine et citrulline (FLATT et BALL 1966 ; FELIG et coll. 1973). La citrulline libérée dans la veine porte est en grande partie ignorée par le foie et est cependant captée par les reins, qui la reconvertissent en arginine. C'est un processus important, car il permet à une fraction significative, peut être la moitié de l'arginine alimentaire, d'éviter l'arginase du foie et d'atteindre ainsi les tissus périphériques (JUNGAS et coll. 1992). Pour CHRISTENSEN (1982) le rein peut être la source principale d'arginine à cause du niveau relativement bas d'arginase dans ce tissu. Le cerveau peut aussi synthétiser l'urée mais à partir de citrulline et rarement à partir d'ornithine. Le foie produit de l'ornithine et capte l'arginine du sang. Le rein et le muscle tendent à libérer l'arginine mais ici aussi la citrulline et l'ornithine bougent dans la direction opposée. Des différences interspécifiques importantes ont été mises en évidence (MORRIS et ROGERS 1978 ; HEITMANN et BERGMAN 1980b).

La présentation globale que nous venons de faire sur les grands mouvements métaboliques des acides aminés montre la difficulté de préciser les éléments

nutritionnels par lesquels les cellules sont simplement ravitaillées avec les produits directs de la digestion. Toutefois, ces quelques échanges inter-organes quantitativement importants ne doivent pas naturellement nous détourner de considérer finalement aussi les échanges inter-organes plus faibles. Même quand ceux-là représentent seulement des aspects quantitatifs mineurs du métabolisme azoté, certains parmi eux, sont indubitablement d'importance générale substantielle.

Cette discussion montre qu'il est vain de vouloir interpréter le métabolisme des acides aminés sans faire intervenir les échanges inter-organes et le rôle éventuel d'autres métabolites. Citons par exemple l'effet des hormones aussi bien que celui de la leucine sur le niveau du potentiel rédox : on sait en effet que les hormones pancréatiques diminuent significativement ce potentiel dans le muscle comme en témoigne le rapport β -hydroxybutyrate/acétoacétate libéré. Au même moment, l'excrétion d'azote diminue. La triiodotyronine et le cortisol ont, quant à eux, un effet opposé (AOKI et coll. 1978). Pour ces auteurs une chute du potentiel rédox représente une réponse conservatoire, lors du jeûne, du pool des acides aminés.

4.3.3.2. Cinétique des distributions plasmatiques et érythrocytaires des acides aminés

Après l'ingestion de la solution d'acides aminés, seules les distributions de quatre acides aminés CIT, TYR, ORN et LYS ainsi que celle du total (TOT) ont changé de façon significative. Pour ces acides aminés les conclusions quant aux échanges possibles entre les teneurs plasmatiques et globulaires ne sont que partielles et peu évidentes. Dans ce cas de figure différentes situations sont envisageables : soit il y a absence d'échange entre les deux compartiments sanguins, ou bien les variations des teneurs plasmatiques et globulaires sont d'amplitudes inégales et peuvent être de sens opposés. Par contre, pour les autres acides aminés dont les distributions relatives au sang total sont demeurées stables, cela signifie que les changements dans les teneurs érythrocytaires correspondent à des changements équivalents et de même sens que ceux des teneurs plasmatiques. Les études de cinétiques avec des isotopes non-radioactifs, *in vivo* chez l'homme,

entreprises par DARMAUN et coll. (1989) ont montré un enrichissement du rapport érythrocytes/plasma plus élevé pour la leucine que pour l'alanine et la glycine. Un accroissement significatif du rapport des concentrations érythrocytes/plasma en azote α -aminé chez les femmes gestantes a été reporté par CETIN et coll. (1991). A part ces publications, faisons remarquer, cependant, que nous ne connaissons pas d'études portant sur les cinétiques des distributions des acides aminés dans le plasma et les érythrocytes pour confronter nos données. Nous pouvons suggérer que la distribution d'un acide aminé donné est relativement constante chez le sujet normal et que c'est surtout par les processus de diffusion que des changements dans les contenus plasmatiques se répercuteraient sur les contenus érythrocytaires circulant. Ces suppositions se doivent d'être vérifiées par la recherche des relations entre ces deux compartiments.

4.3.4. Relations entre les concentrations des acides aminés plasmatiques et érythrocytaires

Les résultats précédents ont montré qu'il existait d'importantes différences quantitatives et qualitatives entre les acides aminés plasmatiques et globulaires et entre les cinétiques dans les deux compartiments du sang. Il paraît alors intéressant de vérifier si les concentrations plasmatiques présentent des relations avec les concentrations érythrocytaires et ainsi montrer que le compartiment érythrocytaire participe aux transferts inter-organes des acides aminés pendant leur absorption intestinale. Une corrélation significative entre le plasma et les érythrocytes indique que les concentrations dans les deux compartiments du sang sont influencées par certains facteurs qui font que les concentrations varient dans la même direction visant à maintenir des rapports de concentrations stables entre ces deux compartiments.

Les coefficients de corrélation souvent hautement significatifs montrent que des relations étroites existent entre ces deux compartiments pour tous les acides aminés à l'exception de l'aspartate, de l'asparagine, de la glutamine et du tryptophane. Les évolutions entre les deux compartiments sont toujours positives

sauf pour le glutamate érythrocytaire qui est corrélé négativement avec celui du plasma.

Les pentes varient de 0.313 pour l'arginine à 5.161 pour la taurine. Il semble donc que la taurine, l' α -aminobutyrate et l'ornithine soient transportés plus par les érythrocytes que par le plasma. La thréonine, la serine, la glycine, l'alanine, la méthionine, la valine, l'isoleucine, la leucine, la tyrosine et la phenylalanine sont transportées en quantités équivalentes par les deux compartiments sanguins. La cirulline, la lysine, l'histidine et l'arginine paraissent être plutôt transportées par le plasma. Globalement la quantité totale (TOT) des acides aminés prise en charge par voie érythrocytaire représente plus de 86 p. cent de la quantité véhiculée par le plasma.

L'existence de relations entre le plasma et les érythrocytes serait dépendante de propriétés physico-chimiques et physiologiques. Les acides aminés les plus corrélés sont les acides aminés indispensables, les acides aminés gluconéogénique ou ceux qui ont un important rôle physiologique. Nos observations sont parfaitement compatibles d'une part, avec les études menées sur le passage des acides aminés à travers la membrane érythrocytaire, et d'autre part, avec les quelques publications sur le transfert inter-organes des acides aminés faisant intervenir les érythrocytes chez l'homme. Sans discuter en détail les systèmes de transports érythrocytaires des acides aminés, qui ont fait l'objet du chapitre 1, nous indiquerons au besoin leur intervention dans l'interprétation.

La taurine est impliquée en tant que modulateur de la neurotransmission et aurait un rôle dans le développement du système nerveux central et la fonction cardiaque (LAIDLAW et KOPPLE 1987), et elle est indispensable au fœtus (STURMAN ET coll. 1977 ; RIGO et SENTERRE 1977). Pour TRAUTWEIN et HAYES (1990), chez l'homme en conditions physiologiques normales, le pool de taurine du sang total, représenté principalement par la taurine intracellulaire est relativement indépendant de celui du plasma. Il ne varie pas sauf en cas d'extrême déplétion ou supplémentation et suit lentement le flux de la taurine plasmatique. Le système de transport érythrocytaire de la taurine n'est pas décrit chez l'homme.

Cependant, FINCHAM et coll. (1990) ont étudié, dans les érythrocytes du poisson, un système Na^+ dépendant des β acides aminés actif pour cet acide aminé.

Malgré le nombre de travaux sur le transport à travers la membrane érythrocytaire chez les mammifères, une information limitée est cependant disponible sur la perméabilité des érythrocytes à la glutamine et au glutamate (YOUNG et ELLORY 1977).

La prise en charge érythrocytaire de la glutamine pour laquelle nous n'avons pas trouvé de relation plasma-érythrocyte reste discutée. FELIG et coll. (1973) estiment que le transport de cet acide aminé par les érythrocytes varie en fonction des sites et DARMAUN et coll. (1986) ne considèrent pas la glutamine des érythrocytes comme représentative du flux de glutamine de l'organisme.

La perméabilité de la membrane érythrocytaire au glutamate et à l'aspartate est controversée. Dans notre travail, nous n'avons pas observé de relation entre le plasma et les érythrocytes pour l'aspartate, mais le glutamate est négativement corrélé. USSING (1943), YOUNG et ELLORY (1977), AOKI et coll. (1972) et FELIG et coll. (1973) attribuent un rôle dynamique à l'érythrocyte dans le transport inter-organe du glutamate. Par contre, pour TUNNICLIFF (1994) l'érythrocyte est imperméable à l'acide glutamique et pour CHRISTENSEN (1982) et DARMAUN et coll. (1986), le transport de l'acide glutamique par l'érythrocyte humain est peu important. Signalons toutefois, que le transport érythrocytaire du glutamate et de l'aspartate est prouvé chez le chien (ELWYN et coll. 1972 ; DREWS et coll. 1977) et chez le mouton (HEITMANN et BERGMAN 1980a).

La thréonine et la sérine sont transportées par le système ASC (AL-SALEH et WHEELER 1982 ; ROSENBERG 1982), lequel a plus d'affinité pour la thréonine que pour la sérine. FELIG et coll. (1973) étudiant les transferts inter-organes ont observé un transport de la thréonine par les érythrocytes dépendant du site et de l'organe considéré et n'ont pas noté de transport de la sérine.

Dans cette étude, tous les acides aminés basiques ont montré une corrélation plasma-érythrocyte significative indiquant un transport érythrocytaire pour ces acides aminés. Le profil de perméabilité de l'érythrocyte humain aux acides aminés basiques a été étudié *in vitro* par GARDNER et LEVY (1972) et revu par ELLORY (1987) et CHRISTENSEN (1990). Ces acides aminés sont transportés à travers la membrane érythrocytaire par le système γ^+ . La lysine est transportée aussi par le système γ^+L (DEVES et coll. 1992) qui reconnaît la leucine également. Les travaux de ANGELO et DEVES (1994) sur les érythrocytes humains montrent que l'efflux érythrocytaire de lysine est accéléré par des concentrations extracellulaires saturantes de lysine, de glutamate et de leucine.

Nous avons déterminé des corrélations significatives pour la glycine transportée par un système spécifique GLY (ELLORY 1987) et pour l'alanine transportée par le système ASC (WINTER et CHRISTENSEN 1965 ; AL-SALEH et WHEELER 1982). Les autres acides aminés neutres ayant présenté des corrélations significatives, la valine, la méthionine, la leucine, l'isoleucine, la tyrosine et la phenylalanine sont transportés par le système L (CHRISTENSEN 1969 ; ELLORY 1987 ; CHRISTENSEN 1990). La phenylalanine et la tyrosine sont en plus transportées par le système T (ROSENBERG 1980 ; ELLORY 1987 ; OSTY et coll. 1990). Nos résultats concordent avec les observations de FELIG et coll. (1973) ; AOKI et coll. (1973) et DARMAUN et coll. (1989). Ces études montrent que les acides aminés neutres traversent les parois de l'érythrocyte et que ce passage est différent qualitativement et quantitativement selon l'acide aminé considéré et l'espèce animale étudiée.

Le présent travail avait pour objectif la détermination de la contribution des érythrocytes dans les échanges inter-organes des acides aminés au cours de l'absorption intestinale. Les corrélations significatives entre les variations des contenus plasmatiques et érythrocytaires, montrent clairement que les érythrocytes sont impliqués dans les échanges inter-organes des acides aminés. Le transport érythrocytaire peut parfois dépasser le plasmatique. Globalement la quantité d'acides aminés transportée par les érythrocytes représente plus de 86 p. cent de la

quantité transportée par le plasma. Le compartiment érythrocytaire constitue un pool de réserve en acides aminés permettant d'accroître les échanges inter-organes.

4.3.5. Synthèse - conclusions

Les résultats de cette expérimentation réalisée *in vivo* chez l'homme nous montrent que les concentrations basales plasmatiques et érythrocytaires sont fluctuantes en fonctions des individus et que l'érythrocyte contient la plupart des acides aminés à des concentrations comparables ou supérieures à celles du plasma. Nous avons aussi observé que les cinétiques des acides aminés au niveau du sang ne sont pas identiques pour tous les acides aminés. Cela est dû à l'utilisation préférentielle par l'intestin lors de l'absorption de certains acides aminés telle la glutamine, à l'extraction hépatique lors du premier passage des acides aminés notamment l'alanine, et au métabolisme spécifique à chaque acide aminé ou à certains groupes d'acides aminés comme les acides aminés à chaînes branchées et ceux du cycle de l'urée. Les distributions relatives au sang étaient généralement stables au cours de l'absorption intestinale de la solution d'acides aminés. Le fait de maintenir cette répartition invariable dans une certaine mesure, indique déjà que des échanges entre le plasma et les érythrocytes pourraient exister. L'analyse des corrélations entre les contenus plasmatiques et érythrocytaires des acides aminés a permis de montrer que les relations existent, pour la plupart des acides aminés, entre ces deux compartiments sanguins pendant l'absorption intestinale de la solution d'acides aminés. Le glutamate a présenté une corrélation significative négative mais faible ($r = - 0.225$). Cela veut dire que, lorsque le plasma est en train de s'enrichir en glutamate absorbé, les érythrocytes cèdent cet acide aminé. Le transport des acides aminés anioniques au niveau des érythrocytes humains étant peu évident (CHRISTENSEN 1982), le glutamate pourrait provenir d'une génération à l'intérieur même de l'érythrocyte plutôt que d'un lent transport contre gradient. L'hypothèse d'ELWYN et coll. (1972) d'un mécanisme d'échange direct entre les érythrocytes et les tissus des organes chez le chien reste encore à être confirmée chez l'humain.

Toutefois, ces corrélations même hautement significatives ($P < 0.001$) sont parfois faibles. Même en tenant compte de toutes les fluctuations, erreurs et imprécisions expérimentales et d'échantillonnage, et en ne considérant de ce fait que les acides aminés dont les coefficients de corrélations sont supérieurs à 0.5 comme réellement significatifs, les relations entre le plasma et les érythrocytes concernent principalement la taurine, l'alanine, l' α -aminobutyrate, la méthionine, la valine, l'isoleucine, la leucine, la phenylalanine et l'ornithine. Ces acides aminés qui paraissent franchir la membrane érythrocytaire, sont transportés par les systèmes Na^+ dépendant ASC et Na^+ indépendant L (CHRISTENSEN 1969 ; AL-SALEH et WHEELER 1982), le système T (ROSENBERG et coll. 1980 ; ZHOU et coll. 1990 ; WIDMER et coll. 1990, 1992) et le système γ^+ (GARDNER et LEVY 1972 ; ELLORY 1987 ; CHRISTENSEN 1990).

Ces résultats comme ceux d'autres auteurs paraissent corroborer que les érythrocytes humains sont actifs dans le transport circulatoire inter-organes des acides aminés. Notre travail a permis de préciser quels acides aminés étaient transportés par les globules rouges en situation physiologique normale ou au cours de l'absorption intestinale.

CONCLUSIONS GENERALES

Le but de la présente étude, objet de cette thèse, est de clarifier la participation des érythrocytes aux échanges inter-organes d'acides aminés.

Dans la première expérience, *in vitro*, chez le rat nous avons cherché à simuler les échanges d'acides aminés lorsque le sang traverse un organe et que des acides aminés y sont relâchés ou prélevés. Pendant le temps de contact plasma-globules de 30 sec, l'augmentation ou la diminution des concentrations plasmatiques ont affectés les contenus globulaires de 14 acides aminés. Mais ces mouvements ne se font tous dans la même direction. Les concentrations globulaires de 8 acides aminés, ASP, α AB, VAL, MET, ILE, LEU, TYR et PHE varient suivant le gradient de concentration. Pour 3 acides aminés, GLY, ALA et TRP, les érythrocytes peuvent les concentrer en leur intérieur mais pas les libérer dans le plasma. Par contre, 3 autres acides aminés, SER, GLU et ARG peuvent seulement sortir des érythrocytes. Ces variations observées dans les contenus globulaires sont pour la plupart confirmées par les corrélations significatives trouvées entre les teneurs plasmatiques et globulaires. Ainsi, 13 acides aminés semblent présenter des relations globales significatives entre les teneurs plasmatiques et celles des érythrocytes, TAU, ASP, GLY, ALA, α AB, VAL, MET, ILE, LEU, TYR, PHE, LYS et TRP. Mais, ces corrélations ne sont fortes, pour rendre compte d'un transport érythrocytaire certain, que pour 8 acides aminés, α AB, VAL, MET, ILE, LEU, TYR, PHE et TRP.

Ainsi, la participation des érythrocytes au transport de ces acides aminés peut être supérieure à celle du plasma. Pour α AB et ILE la part prise en charge par les érythrocytes représente respectivement 158 p. cent et 111 p. cent de celle du plasma. La quantité de méthionine transportée par les érythrocytes ne représente cependant, que 22 p. cent de celle du plasma. La participation érythrocytaire pour les autres est intermédiaire, entre 48 p. cent et 78 p. cent de celle du plasma.

Dans la deuxième expérience *in vivo* chez le rat, les différences de concentrations entre le sang artériel et celui de la veine porte reflètent les échanges se produisant au niveau de l'intestin. C'est la comparaison entre le sang provenant d'une artère et celui de la veine porte qui a été mis à profit pour préciser la part globulaire et la part plasmatique des échanges sanguins d'acides aminés dans l'intestin de rat. A partir des différences artério-veineuses, il apparaît que des variations significatives dans les contenus de 8 acides aminés, ASP, ALA, VAL, MET, ILE, LEU, LEU, TYR et PHE, sont décelées dans les érythrocytes, alors que dans le plasma, ces variations concernent tous les acides aminés sauf α AB et ORN. L'analyse des résultats fait apparaître qu'un lien étroit, existe entre les variations des concentrations plasmatiques et les variations des concentrations globulaires pour 6 acides aminés, VAL, ILE, LEU, TYR, PHE et HIS.

L'intervention des érythrocytes au transport sanguin de ces acides aminés, peut être très élevée. Le transport de TYR et PHE par les érythrocytes représente respectivement 110 p. cent et 106 p. cent de celui accompli par le plasma. Pour les autres, les érythrocytes interviennent pour 63 p. cent à 79 p. cent de la proportion transportée par le plasma.

La comparaison des résultats obtenus au cours de ces deux expériences, réalisées chez le rat, montre que les observations sont globalement concordantes. Les différences dans le comportement de certains acides aminés selon que l'enrichissement plasmatique, est ou artificiel ou naturel, suggère que les échanges globulaires peuvent dépendre également d'autres facteurs comme par exemple les échanges ioniques ou hormonaux, le pH etc... Il n'est donc pas possible d'exclure l'existence de conditions particulières *in vivo* lors de la traversée d'un organe par le sang permettant des échanges érythrocytaires qui ne peuvent être reproduits *in vitro*.

Ces résultats mettent en évidence la participation active des érythrocytes de rat au transport inter-organes au moins des 8 acides aminés pour lesquels l'analyse des données a montré de fortes significations statistiques, α AB, VAL, MET, ILE, LEU, TYR, PHE et TRP. Cependant, d'autres acides aminés sont susceptibles d'être

échangés faiblement par les érythrocytes (ASP, GLY, ALA et HIS). Sauf pour l' α -aminobutyrate, les systèmes de transport membranaires sont décrits pour tous ces acides aminés.

Dans la troisième expérience réalisée *in vivo* chez l'homme, nous avons étudié les cinétiques ainsi que les relations entre les concentrations plasmatiques et érythrocytaires des acides aminés au cours de l'absorption intestinale suite à une surcharge d'acides aminés par voie entérale. Les concentrations basales lors de cette expériences qu'elles soient plasmatiques ou érythrocytaires fluctuent en fonction des individus. L'érythrocyte contient la plupart des acides aminés à des concentrations comparables ou supérieures à celles du plasma.

Les cinétiques des acides aminés dans le sang n'ont pas la même allure pour tous les acides aminés. Cela provient du remaniement intestinal lors de l'absorption de certains acides aminés, de l'extraction hépatique lors du premier passage, et du métabolisme spécifique à chaque acide aminé ou groupe d'acides aminés. Les corrélations déterminées entre les contenus en acides aminés plasmatiques et érythrocytaires ont permis de montrer que des relations existent entre les deux compartiments sanguins pendant l'absorption intestinale pour tous les acides aminés exceptés ASP, GLN et TRP. Mais ces corrélations ne sont fortes que pour TAU, ALA, α AB MET, VAL, ILE, LEU, PHE et ORN.

Les érythrocytes transportent l'alanine et la méthionine en proportions représentant respectivement, 82 p. cent et 93 p. cent de la quantité véhiculée par le plasma. Pour les autres acides aminés, les érythrocytes interviennent dans leur transport sanguin en des proportions supérieures à celles du plasma allant de 101 p. cent pour la valine à 516 p. cent pour la taurine.

De la confrontation des résultats obtenus chez l'homme à ceux observés chez le rat, il s'avère pour les acides aminés dont les mouvements érythrocytaires étaient manifestement significatifs ce qui suit :

- Les acides aminés neutres α AB, VAL, MET, ILE, LEU et PHE sont pris en charge à la fois par les érythrocytes de l'homme et du rat lors des échanges inter-organes.
- La taurine, l'alanine et l'ornithine sont transportées par les érythrocytes de l'homme et non pas par ceux du rat.
- La tyrosine et le tryptophane sont plutôt transportés par les érythrocytes de rat seulement.

Ces résultats sont compatibles avec l'existence au niveau des érythrocytes de l'homme et du rat des systèmes de transports suivants :

- système L indépendant du sodium pour les aminés neutres et branchés,
- système T indépendant du sodium pour les acides aminés aromatiques.

Le système ASC dépendant du sodium pour l'alanine et le système γ^+ indépendant du sodium pour les acides aminés basiques, ne seraient actifs dans la présente étude, que dans les érythrocytes humains.

Ces observations permettent de conclure que les érythrocytes n'interviennent que pour le transport de certains acides aminés pendant que le sang séjourne dans un organe. Mais par contre, on ne doit nullement exclure qu'il puisse exister un équilibre entre les concentrations plasmatiques et érythrocytaires, qui lui serait lent à se mettre en place. Le plasma reste le véhicule principal, nous ne pouvons cependant ignorer l'intervention des érythrocytes aux transferts inter-organes des acides aminés. Un rôle régulateur du pool des acides aminés érythrocytaires de l'homéostasie plasmatique est à envisager.

Des différences interspécifiques et méthodologiques (*in vitro*, *in vivo*) ont été mises en évidence. Les extrapolations systématiques des données obtenues en

situation *in vitro* à celles *in vivo* ou des observations obtenues chez le rat à l'homme s'avèrent hasardeuses. Toutefois, en dépit des données obtenues au cours de ces expériences et qui plaident en faveur du transport érythrocytaire des acides aminés, d'autres investigations *in vivo* chez l'homme utilisant les isotopes stables non radioactifs sont souhaitables pour éclairer davantage l'intervention des érythrocytes dans diverses situations physiologiques et pathologiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AHN-LEE H.-S. (1980). Echanges transplacentaires des acides aminés en fin de gestation chez le sujet humain. *Thèse d'Université, ULP Strasbourg*, 121p.

AIKAWA T., MATSUTAKA H., YAMAMOTO H., OKUDA T., ISHAKAWA E., KAWANO T. & MATSUMURA E. (1973). Interorganal relations and roles of glutamine and alanine in the amino acid metabolism of fasted rats. *J. Biochem. Tokyo* **74** : 1003-1007.

AL-SALEH E.A. & WHEELER K.P. (1982). Transport of neutral amino acids by human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **684** : 157-171.

ANGELO S. & DEVES R. (1994). Amino acid transport system γ^+L of human erythrocytes : Specificity and cation dependence of the translocation step. *J. Membr. Biol.* **141** : 183-192.

AOKI T.T., BRENNAN M.F., MULLER W.A., MOORE F.D. & CAHILL G.F. (1972). Effect of insulin on muscle glutamate uptake. Whole blood versus plasma glutamate analysis. *J. Clin. Invest.* **51** : 2889-2894.

AOKI T.T., MULLER W.A., BRENNAN M.F. & CAHILL G.F. (1973). Blood cell and plasma amino acid levels across forearm muscle during a protein meal. *Diabetes* **22** : 768-775.

AOKI T.T., FINLEY R.J. & CAHILL G.F.JR. (1978). The redox state and regulation of amino acid metabolism in man. *Biochem. Soc. Symp.* **43** : 17-29.

ARMSTRONG M.D. & STAVE U. (1973). A study of free amino acids levels. I - Study of factors affecting validity of amino acids analyses. *Metabolism* **22** : 549-560.

BACKWELL F.R.C., BEQUETTE B.J., WILSON D., CALDER A.G., METCALF J.A., WRAY-CAHEN D, MacRAE J.C., BEEVER D.E. & LOBLEY G.E. (1994). Utilization of dipeptides by the caprine mammary gland for milk proptein synthesis. *Am. J. Physiol.* **267** : R1-R6.

BANKS W.A. & KASTIN A. (1990). Uptake of dipeptides containing Tyr-Pro by human and mouse erythrocytes. *Biochem. Pharmacol.* **40** : 607-614.

BENSON J.R. & HARE P.E. (1975). O-Phtaldialdehyde : Fluorigenic detection of primary amines in the picomole range. Comparison with fluorescamine and ninhydrine. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* **72** : 619-622.

BETZ A.L. & GOLDSTEIN G.W. (1978). Polarity of the blood brain barrier : neutral amino acid transport into isolated brain capillaries. *Science Wash. DC.* **202** : 225-227.

- BIOLO G., TESSARI P., INCHIOSTRO S., BRUTTOMESSO D., FONGHER C., SABADIN L., FRATTON M.G., VALERIO A. & TIENGO A. (1992). Leucine and phenylalanine kinetics during mixed meal ingestion : a multiple tracer approach. *Am. J. Physiol.* **262** : E455-E463.
- BÖHLEN P. & MELLET M. (1979). Automated fluorometric amino acid analysis : The determination of proline and hydroxyproline. *Anal. Biochem.* **94** : 313-321.
- BUONO M.J. & YEAGER J.E. (1986). Intraerythrocyte and plasma lactate concentrations during exercise in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* **55** : 326-329.
- BUSSOLATI O., LARIS P.C., ROTOLI B.M., DALL'ASTRA V. & GAZZOLA G.C. (1992). Transport system ASC for neutral amino acids. An electroneutral sodium/amino acid cotransport sensitive to the membrane potential. *J. Biol. Chem.* **267** : 8330-8335.
- CAHILL G.F.JR. (1976). Protein and amino acid metabolism in man. *Circ. Res.* **38** : I109-I114.
- CAHILL G.F.JR., AOKI T.T. & SMITH R.J. (1981). Amino acid cycles in man. *Curr. Top. Cell. Regul.* **18** : 389-400.
- CETIN I., HIRST K., CORBETTA C., SERENI L.P., MARCONI A.M. & ZERBE G.O. (1991). Plasma and erythrocyte amino acids in mother and fetus. *Biol. Neonate* **60** : 83-91.
- CHAMBERLAIN M.E. & STRANGE K. (1989). Anisosmotic cell volume regulation : A comparative view. *Am. J. Physiol.* **257** : C159-C173.
- CHEN R.F., SCOTT C. & TREPMAN C. (1979). Fluorescence properties of O-phthaldialdehyde derivates of amino acids. *Biochim. Biophys. Acta* **576** : 440-455.
- CHRISTENSEN H.N., EKKER D.G., LYNCH E.L., MACKENZIE T.M. & POWERS J.H. (1947). The conjugated non-protein amino-acids of plasma. V. A Study of the clinical significance of peptidemia. *J Clin. Invest.* **26** : 853-859.
- CHRISTENSEN H.N. (1969). Some kinetic problems of transport. *Adv. in Enzymology* **32** : 1-20.
- CHRISTENSEN H.N. (1982). Interorgan amino acid nutrition. *Physiol. Rev.* **62** : 1193-1233.
- CHRISTENSEN H.N. (1984). Organic ion transport during seven decades. The amino acids. *Biochim. Biophys. Acta* **779** : 255-269.
- CHRISTENSEN H.N. (1990). Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol. Rev.* **70** : 43-77.

CONSTANTINO A. (1913a). Untersuchungen über die biologische Bedeutung und den Metabolismus der Eiweißstoffe. VII der durch Formol titrierbare Aminosäurenstickstoff im Blutserum und in den Blutkörperchen vor verschiedenen Tiere. *Biochem. Z.* **51** : 91-96.

CONSTANTINO A. (1913b). III Die Permeabilität der Blutkörperchen für Aminosäuren. *Biochem. Z.* **55** : 411-418.

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

DANIEL S.S., MORISHIMA H.O., JAMES L.S. & ADAMSONS JR. K. (1964). Lactate and pyruvate gradients between red blood cells and plasma during acute asphyxia. *J. Appl. Physiol.* **19** : 1100-1104.

DANIELSON I.S. (1933). Amino acid nitrogen in blood and its determination. *J. Biol. Chem.* **101** : 505-522.

DANIEL P.M., PRATT O.E. & SPARGO E. (1979). Blood alanine as a regulator of amino acid release in rats. *J. Physiol. London* **295** : 12P-13P.

DARMAUN D., MATTHEWS D.E. & BIER D.M. (1986). Glutamine and glutamate kinetics in humans. *Am. J. Physiol.* **251** : E117-E126.

DARMAUN D., FROGUEL P., RONGIER M. & ROBERT J.-J. (1989). Amino acid exchange between plasma and erythrocytes *in vivo* in humans. *J. Appl. Physiol.* **67** : 2383-2388.

DECHELOTTE P., DARMAUN D., RONGIER M., HECKETSWEILER B., RIGAL O. & DESJEUX J.-F. (1991). Absorption and metabolic effects of enterally administered glutamine in humans. *Am. J. Physiol.* **260** : G677-G682.

DEVES R., CHAVEZ P. & BOYD C.A.R. (1992). Identification of a new transport system (γ^+L) in human erythrocytes that recognizes lysine and leucine with high affinity. *J. Physiol.* **454** : 491-501.

DREWS L.R., CONWAY W.P. & GILBOE D.D. (1977). Net amino acid transport between plasma and erythrocytes and perfused dog brain. *Am. J. Physiol.* **233** : E320-E325.

DYKE C.J. & FINCHAM A.D. (1993). Characterization of amino acid transport in pig erythrocytes. *Biochem. Soc. Trans.* **21** : 307-309.

EAVENSON E. & CHRISTENSEN H.N. (1967). Transport systems for neutral amino acids in the pigeon erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **242** : 5386-5396.

ELLORY J.C. & YOUNG J.D. (1977). Neutral amino acid transport in erythrocytes from different mammalian species. *J. Physiol. London* **272** : 43P-44P.

- ELLORY J.C. & YOUNG J. D. (1978). Sodium-dependent amino acid transport in human erythrocytes. *J. Physiol. London* **278** : 51P-52P.
- ELLORY J.C., JONES S.E.M. & YOUNG J.D. (1981) Glycine transport in human erythrocytes. *J. Physiol. London* **320** : 403-422.
- ELLORY J.C. (1987). Amino acid transport systems in mammalian red cells. *In : Amino Acid Transport in Animal Cells. YUDILEVICH D.L. & BOYD C.A.R. eds., Physiological Society Study Guides, Manchester University Press, Manchester*, pp. 106-119.
- ELWYN D.H. (1966). Distribution of amino acids between plasma and red blood cells in dog. *Fed. Proc.* **25** : 854-861.
- ELWYN D.H., PARIKH H.C. & SHOEMAKER W.C. (1968). Amino acid movements between gut, liver and periphery in unanesthetized dogs. *Am. J. Physiol.* **215** : 1260-1275.
- ELWYN D.H., LAUNDER W.J., PARIKH H.C. & WISE JR E.M. (1972). Roles of plasma and erythrocytes in interorgan transport of amino acids in dogs. *Am. J. Physiol.* **222** : 1333-1342.
- FABRY P. (1969). Feeding frequency and intermediary metabolism. *Feeding Pattern and Nutritional Adaptations. Fabry ed.*, pp. 55-100.
- FELIG P., WAHREN J. & RÄF L. (1973). Evidence of inter-organ amino acid transport by blood cells in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70** : 1775-1779.
- FELIG P. (1975). Amino acid metabolism in man. *Annu. Rev. Biochem.* **44** : 933-955.
- FELIG P., POZEFSKY T., MARLISS E. & CAHILL G.F.JR. (1970). Alanine : key role in gluconeogenesis. *Science* **167** : 1003-1004.
- FELIG P. (1973). The glucose-alanine cycle. *Metabolism* **22** : 179-207.
- FELIPE A., VIÑAS O. & REMESAR X. (1990). Cationic and anionic amino acid transport studies in rat red blood cells. *Biosci. Rep.* **10** : 527-535.
- FELIPE A., VIÑAS O. & REMESAR X. (1992). Changes in alanine and glutamine transport during rat red blood cell maturation. *Biosci. Rep.* **12** : 47-56.
- FINCHAM D.A., MASON D.K. & YOUNG J.D. (1985). Characterization of a novel Na⁺-independent amino acid transporter in horse erythrocytes. *Biochem. J.* **227** : 13-20.
- FINCHAM D.A., WOLOWYK M.W. & YOUNG J.D. (1990). Characterization of amino acid transport in red blood cells of a primitive vertebrate, the pacific hagfish (*Eptatretus stouti*). *J. Exp. Biol.* **154** : 355-370.

FLATT J.P. & BALL E.G. (1966). Studies on the metabolism of adipose tissue. XIX. An evaluation of the major pathways of glucose catabolism as influenced by acetate in the presence of insulin. *J. Biol. Chem.* **241** : 2862-2869.

GALIBOIS I., PITRE F., PARENT G. & SAVOIE L. (1991). Analysis of bound amino acids in the plasma of fed rats : a new preparation procedure. *J. Nutr. Biochem.* **2** : 25-30.

GARDNER J.D. & LEVY A.G. (1972). Transport of dibasic amino acids by human erythrocytes. *Metabolism* **21** : 413-431.

GIANOTTI M., ROCA P. & PALOU A. (1990). The effects of cafeteria diet induced obesity on rat blood amino acid compartmentation. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* **98** : 155-161.

GILLES R. (1975). Mechanisms of ion and osmoregulation. *In : Marine Ecology. Vol. II. KINNE O., WILEY ed., London, pp. 259-347.*

GOLDSTEIN L. & MUSH M.W. (1994). Volume-activated amino acid transport and cell signaling in skate erythrocytes. *J. Exp. Zool.* **268** : 133-138.

GROPPER S.S., GROPPER D.M. & ACOSTA P.B. (1993). Plasma amino acid response to ingestion of L-amino acids and whole protein. *J. pediatr. gastroenterol. Nutr.* **16** : 143-150.

HAGENFELDT L. & ARVIDSSON A. (1980). The distribution of amino acids between plasma and erythrocytes. *Clin. Chim. Acta* **100** : 133-141.

HANKARD R.G., DARMAUN D., SAGER B.K., D'AMOR D., PARSONS W.R. & HAYMOND M. (1995). Response of glutamine metabolism to exogenous glutamine in humans. *Am. J. Physiol.* **269** : E663-E670.

HANKARD R.G., HAYMOND M.W. & DARMAUN D. (1996). Effect of glutamine on leucine metabolism in humans. *Am. J. Physiol.* **271** : E748-E754.

HANSON P.J. & PARSONS D.S. (1980). The interrelationship between glutamine and alanine in the intestine. *Biochem. Soc. Trans.* **8** : 506-509.

HAYNES J.K. & GOLDSTEIN L. (1993). Volume-regulatory amino acid transport erythrocytes of the little skate, *Raja erinacea*. *Am. J. Physiol.* **265** : R173-R179.

HEDIN S.G. (1897). Veber die permeabilität der blutkörperchen. *Archiv für die gesammte Physiologie* **68** : 229-338.

HEITMANN R.N. & BERGMAN E.N. (1980a). Transport of amino acids in whole blood and plasma of sheep. *Am. J. Physiol.* **239** : E242-E247.

HEITMANN R.N. & BERGMAN E.N. (1980b). Integration of amino acid metabolism in sheep : effects of fasting and acidosis. *Am. J. Physiol.* **239** : E248-E254.

HELLWIG U. (1990). Rote blutzellen als tragersysteme für pharmaka. *Pharmazie* **45** : 824-826.

HOULIER M.L., MIRAND P.P., DURAND D., BAUCHART D., LEFAIVRE J. & BAYLE G. (1991). Transport des acides aminés dans l'aire splanchnique par le plasma sanguin et le sang chez le veau preruminant. *Reprod Nutr Dev.* **31** : 399-410.

HOARE D.G. (1972_a). The transport of L-leucine in human erythrocytes : A new kinetic analysis. *J. Physiol. London* **221** : 311-329.

HOARE D.G. (1972_b). The temperature dependance of the transport of L-leucine in human erythrocytes. *J. Physiol. London* **221** : 331-348.

HORIO M., YAMAUCHI A., MORIYAMA T., IMAI E. & ORITA Y. (1997). Osmotic regulation of amino acids and system A transport in Madin-Darby canine kidney cells. *Am. J. Physiol.* **272** : C804-C809.

IOB V., McMATH M. & COON W.W. (1963). Intra-individual and inter-individual variations in plasma free amino acids in normal adults. *J Surg. Res.* **3** : 85-89.

JUNGAS R.L., HALPERIN M.L. & BROSNAN J.T. (1992). Quantitative analysis of amino acid oxidation and related gluconeogenesis in humans. *Physiol. Rev.* **72** : 419-448.

KAVANAUGH M.P. (1993). Voltage dependance of facilitated arginine flux mediated by the system Y⁺ basic amino acid transporter. *Biochemistry* **52** : 5781-5785.

KILBERG M.S., STEVENSEN B.R. & NOVAK A.D. (1993). Recent advances in mammalian amino acid transport. *Annu. Rev. Nutr.* **13** :137-165.

KOPPLE J.D., VINTON N.E., LAIDLAW S.A. & AMENT M.E. (1990). Effect of intravenous taurine supplementation on plasma, blood cell and urine taurine concentrations in adults undergoing long-term parenteral nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **52** : 846-853.

LAIDLAW S.A. & KOPPLER J.D. (1987). Newer concepts of the indispensable amino acids. *Am. J. Clin. Nutr.* **46** : 593-605.

LAZARUS S. (1983). Aminoacides plasmatiques au cours de la gestation chez la mère. *Thèse de Doctorat de Médecine, ULP Strasbourg, 172p.*

LIEB W.R. & STEIN W.D. (1974). Testing and characterizing the simple carrier. *Biochim. Biophys. Acta* **373** : 178-196.

LIN G., McCORMICK J.I. & JOHNSTONE R.M. (1994). Differentiation of two classes of A system amino acid transporters. *Arch. Biochem. Biophys.* **312** : 308-315.

LOCHS H., MORSE E.L. & ADIBI S.A. (1990). Uptake and metabolism of dipeptides by human red blood cells. *Biochem. J.* **271** : 133-137.

LÓPEZ-BURILLO S., GARCIA-SANCHO J. & HERREROS B. (1985). Tryptophan transport through transport system T in the human erythrocyte, the Ehrlich cell and the rat intestine. *Biochim. Biophys. Acta* **820** : 85-94.

LÓPEZ-TEJERO D., PASTOR-ANGLADA M. & REMESAR X. (1986). Blood amino acid compartmentalization during pregnancy and lactation in the rat. *Ann. Nutr. Metab.* **30** : 58-65.

LOUARD R.J., BARRETT E. J. & GELFAND R.A. (1995). Overnight branched-chain amino acid infusion causes sustained suppression of muscle proteolysis. *Metabolism* **44** : 424-429.

MARCHESINI G., BUGIANESI E., BIANCHI G., FABBRI A., MARCHI E., ZOLI M. & PISI E. (1992). Effect of S-adenosyl-L-methionine administration on plasma levels of sulphur-containing amino acids in patients with liver cirrhosis. *Clin. Nutr.* **11** : 303-308.

MATTHEWS D.E., MOTIL K.J., ROHRBAUGH D.K., BURKE J.F., YOUNG V.R. & BIER D.M. (1980). Measurement of leucine metabolism in man from a primed continuous infusion of L-[1-¹³C]leucine. *Am. J. Physiol.* **238** : E473-E479.

MATTHEWS D.E., BIER D.M., RENNIE M.J., EDWARDS R.H.T., HALLIDAY D., MILLWARD D.J. & CLUGSTON G.A. (1981). Regulation of leucine metabolism in man : a stable isotope study. *Science* **214** : 1129-1131.

MATTHEWS D.E., MARANO M.A. & CAMPBELL R.G. (1993). Splanchnic bed utilization of leucine and phenylalanine in humans. *Am. J. Physiol.* **264** : E109-E118.

MATSUMOTO Y., OHSAKO M. & NOTA F. (1989). Transport of drugs through human erythrocyte membrane *in vitro*. *Yakuzaigaku* **49** : 49-63.

McMENAMY R.H., LUND C.C., NEVILLE G.J. & WALLACH D.F.H. (1960). Studies of unbound amino acid distributions in plasma, erythrocytes, leucocytes and urine of normal human subjects. *J. Clin. Invest.* **39** : 1975-1987.

McGIVAN J.D. & PASTOR-ANGLADA M. (1994). Regulatory and molecular aspects of mammalian amino acid transport. *Biochem. J.* **229** : 321-334.

MONDINO A., BONGIOVANNI G., FUMERO S., ROSSI L. (1972). An improved method of plasma deproteinisation with sulfosalicylic acid for determining amino acids and related compounds. *J. Chromatogr.* **74** : 255-263.

MOORE S. & STEIN W.H. (1954). Procedures for the chromatographic determination of amino acids on four percent cross-linked sulfonated resins. *J. Biol. Chem.* **211** : 893-906.

MORRIS J.G. & ROGERS Q.R. (1978). Arginine : an essential amino acid for the cat. *J. Nutr.* **108** : 1944-1953.

- MUNRO H.N. (1972). Free amino acid pools and their role in regulation. *In: Mammalian Protein Metabolism. MUNRO H.N. ed., Academic Press, New York*, pp. 299-386.
- ODESSEY R. & GOLDBERG A.T. (1972). Oxidation of leucine by rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* **224** : 1376-1383.
- ORESQUES I. & KUPFER S. (1967). Degradation of glutamine at elevated temperatures in ion exchange chromatography. *Anal. Chem.* **39** : 397-398.
- OSTY J., ZHOU Y., CHANTOUX F., FRANCON J. & BLONDEAU J.P. (1990). The triiodothyronine carrier of rat erythrocytes : asymmetry and mechanism of trans-inhibition. *Biochim. Biophys. Acta* **1051** : 46-51.
- PERRY T.L. & HANSEN S. (1969). Technical pitfalls leading to errors in the quantitation of plasma amino acids. *Clin. Chim. Acta* **25** : 53-58.
- PICÓ C., PONS A. & PALOU A. (1991). A significant pool of amino acids is adsorbed on blood cell membranes. *Biosci. Rep.* **11** : 223-230.
- PICÓ C., PONS A. & PALOU A. (1992). Effect of diet-induced obesity on kinetics parameters of amino acid uptake by rat erythrocytes. *Biochem. Int.* **28** : 509-517.
- PICÓ C., LLADO I., PONS A. & PALOU A. (1994_a). Blood cell to plasma gradients of amino acids in arterial and venous blood in fed and fasted rats. *Comp. Biochem. Physiol.* **107A** : 589-595.
- PICÓ C., PONS A. & PALOU A. (1994_b). Blood amino acid compartmentation in obese rats is specifically altered in the iliac vein. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **33** : 421-427.
- PICÓ C., PONS A. & PALOU A. (1995). Decrease of the pool of amino acids adsorbed on blood cell membranes caused by starvation in rats. *Life Sci.* **57** : 675-683.
- PIQUARD F., SCHAEFER A. & HABEREY P. (1978). Influence of fasting and protein deprivation on food self-selection in the rat. *Physiol. Behav.* **20** : 771-778.
- PION R. (1976). Dietary effects and amino acids in tissues. *In: Protein Metabolism and Nutrition. COLE D.J.A., BOOTMAN K.N., BUTTERY P.J., LEWIS D., NEAL R.J. & SWAN H. eds, Butterworths, London*, pp. 259-227.
- PITTS R.F., DEHAAS J. & KLEIN J. (1963). Relation of renal amino and amide nitrogen extraction to ammonia production. *Am. J. Physiol.* **204** : 187-191.
- PRENTON M.A. & YOUNG M. (1969). Umbilical vein-artery and uterine arterio-venous plasma amino-acid differences in human subject. *J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth.* **76** : 404-411.

PROENZA A.M., PALOU A. & ROCA P. (1994). Amino acid distribution in human blood. A significant pool of amino acids is adsorbed onto blood cell membranes. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **34** : 971-982.

REMESY C., DEMIGNE C. & AUFRERE J. (1978). Inter-organ relationships between glucose, lactate and amino acids in rats fed on high-carbohydrate or high-protein diets. *Biochem. J.* **170** : 321-329.

RIESER P. (1962). The kinetics of valine transport in the human erythrocytes. *Exp. Cell Research* **27** : 577-580.

RIGO J. & SENTERRE J. (1977). Is taurine essential for neonates ? *Biol. Neonate* **32** : 73-76.

ROSENBERG R. & RAFELSON O.J. (1979). Transport of neutral amino acids across the human red blood cell membrane. *Prog. Neuro-Psychopharmacol.* **3** : 377-381.

ROSENBERG R., YOUNG J.D. & ELLORY J.C. (1980). L-Tryptophane transport in human red blood cells. *Biochim. Biophys. Acta* **598** : 375-381.

ROSENBERG R. (1982). Na-independent and Na-dependant transport of neutral amino acids in the human red blood cell. *Acta Physiol. Scand.* **116** : 321-330.

ROTH M. (1971). Fluorescence reaction for amino acids. *Anal. Chem.* **43** : 880-882.

ROTH M. (1976). Automated amino acid analysis with sensitive fluorescence detection. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **14** : 361-364.

SCHAEFER A., PIQUARD F. & HABEREY P. (1976). Food self selection during spontaneous body weight variations in the dormouse, *Glis glis*. *Comp. Biochem. Physiol.* **61B** : 233-236.

SCHAEFER A., PIQUARD F. & HABEREY P. (1987). Plasma amino-acids analysis : effects of delayed samples preparation and of storage. *Clin. Chim. Acta* **164** : 163-169.

SCHAEFER A., PIQUARD F. & HABEREY P. (1990). The effects of changes in plasma amino acid concentrations on erythrocyte amino acid content. *Clin. Biochem. Physiol.* **23** : 237-240.

SERRA F., JOHNSTON J., CARNIE J. & PALOU A. Altered blood amino acid distribution in genetically obese mice (1991). *Biochim. Biophys. Acta* **1097** : 289-292.

SHIHABI Z.K., GOODMAN H.O., HOLMES R.P. & O'CONNOR M.L. (1989). The taurine content of avian erythrocytes and its role in osmoregulation. *Comp. Biochem. Physiol.* **92A** : 545-549.

SHRÖK H., CHA C.-J.M. & GOLDSTEIN L. (1980). Glutamine release from hindlimb and uptake by kidney in the acutely acidotic rat. *Biochem. J.* **188** : 557-560.

SIGGAARD-ANDERSEN O. (1974). The acid-base status of the blood. *4th ed. Munksgaard, Copenhagen*, p79, 229p.

SOLEY M. & ALEMANY M. (1980). Amino acid concentrations in the plasma, serum and whole blood of the rat : blood amino acid compartmentation. *IRCS Med. Sci.* **8** : 159-160.

SPARKMANN D.H., STEIN W.H. & MOORE S. (1958). Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.* **30** : 1190-1206.

STEIN W.H. & MOORE S. (1954). The free amino acids of human blood plasma. *J. Biol. Chem.* **211** : 915-926.

STURMAN J.A., RASSIN D.K. & GAULL G.E. (1977). Taurine in development. *Life Sci.* **21** : 1-21.

TEERLINK T., VAN LEEUWEN P.A.M. & HOUDIJK A. (1994). Plasma amino acids determined by liquid chromatography within 17 minutes. *Clin. Chem.* **40** : 245-249.

TESSARI P., INCHIOSTRO S., BARAZZONI R., ZANETTI M., ORLANDO R., BIOLO G., SERGI G., PINO A. & TIENGO A. (1994). Fasting and postprandial phenylalanine and leucine kinetics in liver cirrhosis. *Am. J. Physiol.* **267** : E140-E149.

TOMASSONE R. (1989). Comment interpréter les résultats d'une régression linéaire. *ITCF ed., Paris*, 55p.

TRAUTWEIN E.A. & HAYES K.C. (1990). Taurine concentrations in plasma and whole blood in humans : estimation of error from intra- and inter individual variation and sampling techniques. *Am. J. Clin. Nutr.* **52** : 758-764.

TUNNICLIFF G. (1994). Amino acid transport by human erythrocyte membranes. *Comp. Biochem. Physiol.* **108A** : 471-478.

USSING H.H. (1943). The nature of the amino nitrogen of red corpuscles. *Acta Physiol. Scand.* **5** : 335-351.

VADGAMA J.V. & CHRISTENSEN H.N. (1985). Discrimination of Na⁺-independent transport systems L, T and asc in erythrocytes. Na⁺-independence of the latter a consequence of cell maturation ? *J. Biol. Chem.* **260** : 2912-2921.

VAN DER BOON J., VERHAGEN M.A.W.H., VAN DEN THILLART G.E.E.J.M. & ADDINK A.D.F. (1991). Free amino acids in whole blood and plasma of two cyprinids, *Cyprinus carpio* and *Carassius auratus* (CYPRINIDAE: TELEOSTEI). *Comp. Biochem. Physiol.* **99A** : 391-399.

VAN EIJK H.M.H., DEJONG C.H.C., DEUTZ N.E.P. & SOETERS P.B. (1994). Influence of storage conditions on normal plasma amino acid concentrations. *Clin. Nutr.* **13** : 374-380.

WELBOURNE T.C. (1987). Interorgan glutamine flow in metabolic acidosis. *Am. J. Physiol.* **253** : F1069-F1076.

WHEELER K.P. & CHRISTENSEN H.N. (1967). Interdependent fluxes of amino acids and sodium ion in the pigeon red blood cell. *J. Biol. Chem.* **242** : 3782-3788.

WHEELER K.P. (1982). Amino acid transport by rabbit erythrocytes and reticulocytes. *Biochem. J.* **202** : 613-621.

WIDMER J., RAFFIN Y., GAILLARD J.M., BOVIER P. & TISSOT R. (1990). Reversible *in vitro* decrease of *L*-tyrosine and *L*-tryptophan influx across the human erythrocyte membrane induced by cytochalasin b, the specific inhibitor of D-glucose transport. *Neuropsychobiology* **24** : 67-73.

WIDMER J., RAFFIN Y., MOUTHON D., GAILLARD J., BOVIER J. & TISSOT R. (1992). Effects of S-adenosyl-L-methionine (SAM), a methyl group donor, in the transport *in vitro* of L-tyrosine and L-tryptophan across the human red cell membrane. *Biogenic Amines* **8** : 245-256.

WINDMULLER H.G. & SPAETH A.E. (1974). Uptake and metabolism of plasma glutamine by the small intestine. *J. Biol. Chem.* **249** : 5070-5079.

WINDMULLER H.G. & SPAETH A.E. (1980). Respiratory fuels and nitrogen metabolism *in vivo* in small intestine of fed rats. Quantitative importance of glutamine, glutamate, and aspartate. *J. Biol. Chem.* **255** : 107-112.

WINER B.J. (1971). Design and analysis of single-factor experiments. *In* : *Statistical principles in experimental design*. 2d edition, Mc Grawhill Book Company, New York, pp. 149-241.

WINTER C.G. & CHRISTENSEN H.N. (1964). Migration of amino acids across the membrane of the human erythrocyte. *J. Biol. Chem.* **239** : 872-878.

WINTER C.G. & CHRISTENSEN H.N. (1965). Contrasts in neutral amino acid transport by rabbit erythrocytes and reticulocytes. *J. Biol. Chem.* **240** : 3594-3600.

WOLFROM G.H. & ASPLUND J.M. (1976). Effect of different lysing and washing methods on free amino acid concentrations of sheep whole blood and erythrocytes. *Clin. Biochem.* **9** : 180-193.

YANCEY P.H., CLARK M.E., HAND S.C., BOWLUS R.D. & SOMERO G.N. (1982). Living with water stress : Evolution of osmolyte systems. *Science* **217** : 1214-1222.

YANG R.D., MATTHEWS D.E., BIER D.M., WEN Z.M. & YOUNG V.R. (1986). Response of alanine metabolism in humans to manipulation of dietary protein and energy intakes. *Am. J. Physiol.* **250** : E39-E46.

YAO S.Y.M., GEORGE R. & YOUNG J.D. (1993). Reconstitution studies of amino acid transport system L in rat erythrocytes. *Biochem. J.* **292** : 655-660.

YOUNG J.D., FINCHAM D.A. & HARVEY C.M. (1991). Cation and harmaline interactions with Na⁺-independent dibasic amino acid transport system y⁺ in human erythrocytes and in erythrocytes from a primitive vertebrate the pacific hagfish (*Eptatretus stouti*). *Biochim. Biophys. Acta* **1070** : 111-118.

YOUNG J.D. & ELLORY J.C. (1977). Red cell amino acid transport. *In* : *Membrane transport in red cells*. ELLORY J.C. & LEW V.L. eds, *Academic Press, London*, pp. 301-325.

YOUNG J. D., WOLOWYK M.W., JONES S.E.M. & ELLORY J.C. (1979). Sodium dependant cysteine transport in human red blood cells. *Nature* **279** : 800-802.

YOUNG J.D., JONES S.E.M. & ELLORY J.C. (1980). Amino acid transport in human and sheep erythrocytes. *Proc. R. Soc. London* **B209** : 355-375.

YOUNG J.D., JONES S.E.M. & ELLORY J.C. (1981). Amino acid transport via red cell anion transport system. *Biochim. Biophys. Acta* **645** : 157-160.

YUNIS A.A. & ARIMURA G.K. (1965). Amino acid transport in blood cells. II - Patterns of transport of some amino acids in mammalian reticulocytes and mature red blood cells. *J. Lab. Clin. Med.* **66** : 177-186.

ZHOU Y., SAMSON M., OSTY J., FRANCON J. & BLONDEAU J.-P. (1990). Evidence for a close link between the thyroid hormone transport system and the aromatic amino acid transport system T in erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **265** : 17000-17004.

SUMMARY

The aim of the present study is to clarify the participation of the erythrocytes to inter-organ exchange of amino acids. Three experiments were carried out. The first, *in vitro* on the blood of rat, was concerned with the analysis of amino acids movements between plasma and erythrocytes when plasma concentrations were suddenly modified. In the second, *in vivo* in the rat, amino acids arterio-venous differences in the two blood compartments, plasma and erythrocytes, were assessed in the intestine. The third experiment carried *in vivo* in the man, dealt with the study of plasma and erythrocytes kinetics of amino acids after an orally uptake of a load of amino acids.

We have used liquid ion exchange chromatography for amino acids analysis. Erythrocytes contents have been estimated from plasma and hemolysed blood concentrations and the corrected hematocrit.

The confrontation of results obtained in man to those observed in rat, proves for amino acids whose erythrocytes movements were manifestly significant the following : α AB, VAL, MET, ILE, LEU and PHE are carried both by erythrocytes of man and rat ; TAU, ALA and ORN are transported by the erythrocytes of man and not by those of rat ; TYR and TRP are rather transported by rat erythrocytes only.

These results are compatible with the existence in man and rat erythrocytes membrane of the L system for neutral and branched chain amino acids and the T system for aromatic amino acids. The ASC system for alanine and the system y^+ for cationic amino acids, would be active in the present study only in human erythrocytes. The plasma remains the main vehicle. We can not however ignore the intervention of the erythrocytes in inter-organ transfer of amino acids. A regulating role of plasma homeostasis by the pool erythrocytes amino acid is to be considered.

Key words : amino acids, erythrocytes, plasma, transports systems, inter-organ

ملخص

الهدف من هذا البحث هو توضيح مساهمة كريات الدم الحمراء في تبادلات الأحماض الأمينية بين الأعضاء. ثلاث تجارب أجريت : الأولى بطريقة *IN VITRO* على دم الجرذ، تم فيها تحليل حركات الأحماض الأمينية بين البلازما و كريات الدم الحمراء عند تغيير فوري لتركيز البلازما ؛ الثانية أجريت بطريقة *IN VIVO* على الجرذ، تم فيها التقدير المباشر للفوارق الشريانية - الوريدية للأحماض الأمينية في البلازما و كريات الدم الحمراء ؛ الثالثة أجريت عند الإنسان *IN VIVO* و تمت فيها دراسة حركات الأحماض الأمينية في البلازما و كريات الدم الحمراء بعد تناول عبء من الأحماض الأمينية.

استعملنا تقنية الكروماتوغرافيا السائلة مبدلة الأيونات لقياس الأحماض الأمينية. التركيزات الكروية قدرت من تركيزات البلازما، الدم الكلي المحلل و الهيماتوكريت.

مواجهة النتائج المحصل عليها عند الإنسان بالنتائج الملحوظة عند الجرذ تظهر بالنسبة للأحماض الأمينية التي كانت حركاتها معبرة إحصائيا ما يلي : الأحماض الأمينية αAB ، *VAL* ، *MET* ، *ILE* ، *LEU* و *PHE* تؤخذ من طرف الكريات الحمراء للإنسان و الجرذ. الأحماض *ALA* ، *TAU* و *ORN* تنقل بكريات الإنسان و لا بكريات الجرذ. أما *TYR* و *TRP* تؤخذ بكريات الجرذ فقط.

هذه النتائج مطابقة لوجود في غشاء الكريات الحمراء للإنسان و الجرذ للنظام *L* لنقل الأحماض الأمينية الحيادية و للنظام *T* للأحماض العطرية. أما النظام *ASC* و *ALA* و النظام y^+ للأحماض القاعدية يمكن أن تكون نشطة ، في إطار هذا البحث، إلا عند كريات الإنسان.

البلازما يبقى وسيلة النقل الأساسية، لكن لا نستطيع تجاهل تدخل كريات الدم الحمراء في تبادلات الأحماض الأمينية بين الأعضاء. يجب النظر في دور منظم لضبط تركيزات البلازما من طرف مجموعة الأحماض الأمينية لكريات الدم الحمراء.

كلمات مفتاحية :

أحماض أمينية ، كريات الدم الحمراء ، بلازما ، نظام نقل ، بين الأعضاء.

RESUME

Le but de la présente étude est de clarifier la participation des érythrocytes aux échanges inter-organes d'acides aminés. Trois expériences ont été entreprises. La première, effectuée *in vitro* sur du sang de rat, a consisté en l'analyse des mouvements des acides aminés entre le plasma et les érythrocytes lorsque les concentrations plasmatiques étaient subitement modifiées. La seconde, réalisée chez le rat *in vivo*, a concerné la mesure directe dans les deux compartiments sanguins considérés, plasma et globules rouges, de différences artério-veineuses d'acides aminés dans l'intestin. La troisième, chez l'homme *in vivo*, a porté sur l'étude des cinétiques des acides aminés plasmatiques et globulaires après ingestion d'une charge d'acides aminés.

Nous avons utilisé la chromatographie liquide échangeuses d'ions pour la détermination des acides aminés. Les teneurs érythrocytaires ont été estimées par le calcul à partir des concentrations du plasma, du sang total hémolysé et de l'hématocrite corrigé.

De la confrontation des résultats obtenus chez l'homme à ceux observés chez le rat, il s'avère pour les acides aminés dont les mouvements érythrocytaires étaient manifestement significatifs ce qui suit : α AB, VAL, MET, ILE, LEU et PHE sont pris en charge à la fois par les érythrocytes de l'homme et du rat ; TAU, ALA et ORN sont transportés par les érythrocytes de l'homme et non pas par ceux du rat ; TYR et TRP sont plutôt transportés par les érythrocytes du rat seulement.

Ces résultats sont compatibles avec l'existence au niveau des érythrocytes de l'homme et du rat du système L pour le transport des acides aminés neutres et branchés et du système T pour les acides aminés aromatiques. Le système ASC pour l'alanine et le système γ^+ pour les acides aminés basiques, ne seraient actifs dans la présente étude, que dans les érythrocytes humains. Le plasma reste le véhicule principal. Nous ne pouvons cependant ignorer l'intervention des érythrocytes aux transferts inter-organes des acides aminés. Un rôle régulateur de l'homéostasie plasmatique par le pool des acides aminés érythrocytaires est à envisager.

Mots clés : acides aminés, érythrocytes, plasma, systèmes de transports, inter-organes