

Relations entre la phosphorylation de molécules aminées et leur activité sur l'absorption du calcium

par Sylviane TARDIVEL, A. TOURE, Alice DIGAUD, P. FOURNIER

EPHE, Physiologie-Métabolisme minéral des Mammifères, AI-CNRS,
Faculté de Pharmacie, 92290 Châtenay Malabry, France

Summary. *Relations between the phosphorylation of aminated molecules and their action on calcium absorption.*

Various amino acids and guanidines (L-lysine, L-aspartic and L-glutamic acids, creatine, taurocyamine and glycoyamine), studied in ileal ligated loops, increased intestinal calcium absorption in the rat. L-arginine was effective *per os*.

Since these compounds are highly phosphorylable, a phosphorylation mechanism may be involved in the stimulation of calcium absorption. The phosphorylated derivative of creatine was detected in the iléal mucosa of rats receiving creatine in the ileal ligated loop.

Modified amino acids, such as 5-methyl-L-glutamate, asparagine or glutamine, whose phosphorylable function was masked by a methyl or an amide radical, were not effective in enhancing calcium absorption.

Assays *in vitro* showed that an ileal mucosa extract phosphorylated arginine, lysine, glycoyamine and taurocyamine in the presence of ATP, acting as a phosphate donor.

Introduction.

Il a été montré antérieurement que diverses molécules aminées, lysine et arginine (Raven, Lengemann et Wasserman, 1960), créatine et créatinine (Tardivel, 1979) accroissent l'absorption du calcium dans l'iléum de rat. L'action stimulante de ces amines est-elle en rapport avec leur phosphorylation au niveau de la muqueuse intestinale ?

Nous recherchons présentement si d'autres acides aminés tels que les acides L-aspartique et L-glutamique ainsi que d'autres guanidines telles que la taurocyamine et la glycoyamine dont on connaît les dérivés phosphorylés au titre des phosphagènes, sont capables d'augmenter l'absorption du calcium. D'autre part, afin d'assurer la réalité de la relation entre la phosphorylation d'une molécule et son activité sur l'absorption du calcium, nous examinons ce qu'il en est de cette activité lorsque l'on change la structure de cette molécule au lieu où se fait normalement sa phosphorylation. Enfin, par des expériences *in vivo* et *in vitro*, nous cherchons à mettre en évidence la formation de certains de ces dérivés phosphorylés.

Les essais sont réalisés au niveau de l'iléum. C'est le lieu du grêle dont la phosphatase alcaline est la plus activée par le même composé glucidique qui, là, plus que

partout ailleurs, est efficace sur l'absorption du calcium (Dupuis, Digaud et Fournier, 1978b). Sans doute, cette absorption est-elle plus active dans le duodénum. Mais, du fait d'un séjour beaucoup plus long, la majeure partie du calcium ingérée est, chez le Chien et chez le Rat, absorbée dans les parties terminales de l'intestin grêle (Cramer, 1959 ; Wasserman et Taylor, 1969).

Conditions expérimentales.

Expérience 1 : Effet de diverses molécules aminées sur l'absorption iléale du calcium. — A des rats mâles adultes, à jeun depuis la veille et anesthésiés, on injecte dans une anse iléale isolée *in situ* une solution de CaCl_2 10 mM (+ ^{45}Ca) accompagnée ou non de solutions 100 mM de divers composés : L-lysine, ϵ -méthyl-L-lysine, L-arginine, acide L-aspartique, asparagine, acide L-glutamique, glutamine, ϵ -méthyl-L-glutamate, L-valine, L-alanine, créatine, glycoyamine, taurocyamine. Le pH des solutions administrées est variable et précisé dans les résultats. Les pH 3,5 (asparagine) et 7,2 (lysine) sont obtenus par addition de HCl. Toutes ces solutions sont rendues isotoniques par addition de NaCl. Deux heures après l'injection, les rats sont sacrifiés, l'anse ligaturée (la paroi et le contenu) est prélevée. Après minéralisation sèche une nuit à 550°, les cendres sont dissoutes en milieu acide et la radioactivité est mesurée par scintillation liquide. On calcule le coefficient d'absorption calcique :

$$[(^{45}\text{Ca} \text{ injecté} - ^{45}\text{Ca} \text{ de l'anse}) / ^{45}\text{Ca} \text{ injecté}] \times 100$$

Expérience 2 : Phosphorylation de la créatine in vivo. — On injecte, en anse iléale ligaturée, 1 ml d'une solution de CaCl_2 10 mM contenant ou non de la créatine à une concentration 100 mM (lot témoin et lot créatine de 7 rats). Une heure après l'injection, les rats sont sacrifiés, les anses sont prélevées et rincées de leur contenu avec de l'eau distillée. Les muqueuses sont raclées sur plaque réfrigérée, réunies par lot et pesées. Créatine, créatine-phosphate et phosphate sont extraits par homogénéisation dans un égal volume de HClO_4 0,6 N, centrifugation et neutralisation du surnageant par KOH 5 N. Après centrifugation du KClO_4 , les surnageants sont passés sur résine Dowex 2 \times 10, 50-100 mesh. On élue successivement par NaHCO_3 0,05 M (élution de la créatine libre) puis par NaHCO_3 0,2 M (élution de la créatine-phosphate puis du phosphate minéral). Sur chaque fraction est réalisé un dosage de créatine (méthode à l' α -naphтол et au diacétyle selon Eggleton, Elsdén et Gough, 1943), de créatine-phosphate (par dosage de la créatine et du phosphate libérés après hydrolyse en milieu acide HCl 0,2 N pendant une minute à 100 °C) et de phosphate (Briggs, 1924).

Expérience 3 : Phosphorylation de diverses molécules aminées in vitro. — Les muqueuses iléales de 4 rats sont raclées, homogénéisées dans un égal volume d'eau glacée. Après centrifugation de l'homogénat, le surnageant est enrichi en sulfate d'ammonium cristallisé par additions successives. La fraction protéique qui précipite pour une concentration en sulfate d'ammonium comprise entre 20 et 45 p. 100 est retenue. L'extrait est redissous dans un volume connu d'eau distillée. Une partie aliquote de cette solution est ensuite mise à incuber 10 min à 30° en présence d'ATP 5 mM, du composé aminé étudié 10 mM, de $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 5 mM et de tampon glycine 0,2 M NaOH (pH 6,5) selon la méthode de Thoai, Pradel et Kassab (1970). On arrête la

réaction par addition d'HCIN (0,2 ml/ml). On porte à l'ébullition 1 min à 100 °C afin d'hydrolyser les produits phosphorylés labiles (lysine-phosphate, arginine-phosphate, etc...) mais non l'ATP. On dose alors le phosphate libéré (Briggs, 1924).

Résultats.

Expérience 1 : Effet de diverses molécules aminées sur l'absorption iléale du calcium.
Les résultats sont regroupés dans le tableau 1. L'acide L-aspartique (pH 3,5)

TABLEAU 1

Effet de diverses molécules aminées sur l'absorption iléale du calcium

Lots	Coefficient d'absorption *	Lots	Coefficient d'absorption
Témoin	16,5 ± 1,1	L-valine	17,3 ± 1,3 NS
<i>Acides aminés et dérivés</i>		<i>L-lysine</i>	
Acide L-aspartique pH 3,5	33,6 ± 3,1 p < 0,001 **	pH 10	16,9 ± 1,8 NS
Asparagine pH 3,5	12,9 ± 1,6 NS	pH 7,2	43,8 ± 2,2 p < 0,001
Acide L-glutamique pH 3,5	23,1 ± 1,0 p < 0,001	ε-méthyl-L-lysine	33,3 ± 2,5 p < 0,001
pH 7	19,2 ± 2,1 NS	<i>Guanidines, précurseurs de phosphagènes</i>	
8 < pH < 9	13,5 ± 2,2 NS	Créatine	49,1 ± 4,3 p < 0,001
5-méthyl-L-glutamate	15,9 ± 1,3 NS	Glycocyamine	34,7 ± 1,2 p < 0,001
L-alanine	18,8 ± 1,6 NS	Taurocyamine	48,9 ± 3,7 p < 0,001

* Coefficient d'absorption du ⁴⁵Ca en p. 100 de la dose injectée.

** Degré de signification par rapport au lot témoin (test de Student).

Concentration du CaCl₂ : 10 mM, du composé aminé : 100 mM.

stimule l'absorption du calcium. Cependant, si le β-carboxyle de cet acide est bloqué par remplacement de cette fonction par une fonction amide (asparagine), le dérivé amidé n'est plus actif sur l'absorption du calcium. Il en est de même en ce qui concerne l'acide L-glutamique qui perd son activité lorsque la fonction γ carboxylique est bloquée (5-méthyl-L-glutamate et glutamine). Ces deux acides aminés diacides ne sont efficaces sur l'absorption du calcium que si les solutions administrées ont un pH égal à 3,5. Les pk des acides terminaux sont respectivement de 3,86 pour l'acide L-aspartique et de 4,25 pour l'acide L-glutamique. Les solutions d'acide glutamique dont le pH est supérieur au pk (pH ≥ 7) ne sont pas actives. Il semble donc bien que ce soit la présence du β-COOH ou du γ-COOH qui confère à ces molécules la propriété de stimuler l'absorption du calcium. Toute modification de ces fonctions (soit par substitution, soit par ionisation) entraînerait une perte d'activité. La lysine perd aussi son activité quand le pH de la solution est supérieur au pk. Mais, au contraire, dans ce

cas, la lysine n'agirait donc qu'à l'état ionisé (Raven, Lengemann et Wasserman, 1960). Notons que, tandis que la méthylation fait perdre à l'acide L-glutamique son activité, la ϵ -méthyl-L-lysine agit positivement sur l'absorption du calcium.

La L-alanine et la L-valine n'accroissent pas l'absorption du calcium. Au contraire, les trois guanidines étudiées : créatine, glycoeyamine et taurocyamine sont toutes très actives.

Expérience 2 : Phosphorylation de la créatine in vivo. — Les profils d'éluion des extraits de muqueuse de chacun des deux lots (témoin et créatine) présentent trois pics (fig. 1).

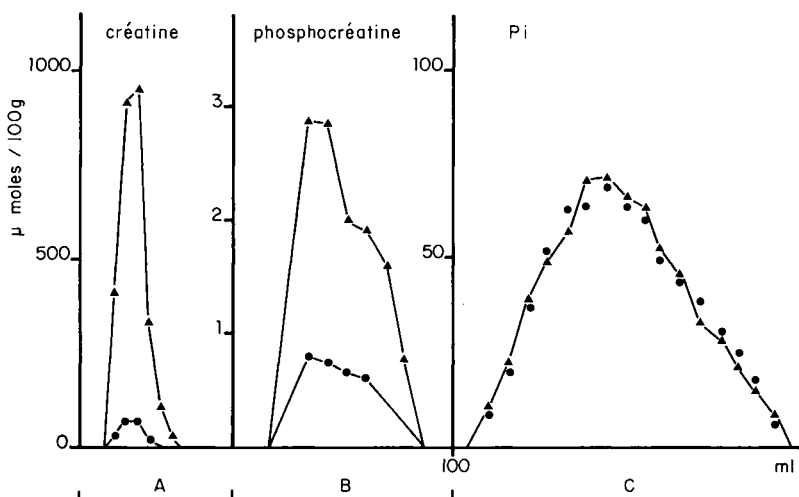


FIG. 1. — Profil d'éluion d'extraits de muqueuse iléale de rats ayant reçu ou non 200 μ moles de créatine en anse iléale.

▲—▲—▲ lot créatine ; ●—●—● lot témoin. A et B : éluion avec NaHCO_3 0,05 M ; C : éluion avec NaHCO_3 0,2 M.

Le nombre de μ moles de chaque produit d'éluion exprimé par 100 g de tissu est donné dans le tableau 2.

TABLEAU 2

Mise en évidence de la phosphorylation in vivo de la créatine

Lot	Créatine	Créatine-phosphate		Phosphate
		Créatine	hydrolyse Phosphate	
Témoin	277 *	1 *	1 *	633 *
Créatine	2 650	15	18	685

* μ moles/100 g de tissu. Injection, en anse iléale ligaturée, de 1 ml de CaCl_2 10 mM additionnée ou non de créatine 100 mM. Deux lots de 7 rats. Valeurs correspondant à l'analyse de l'ensemble des muqueuses de chaque lot.

Ainsi, la teneur en créatine de la muqueuse des rats du lot créatine est dix fois supérieure à celle des animaux du lot témoin. Il est, en effet, difficile de rincer la muqueuse avant l'extraction et de la débarrasser totalement de la créatine injectée. D'autre part, on peut remarquer que des quantités de phosphate sensiblement les mêmes sont retrouvées dans chacun des deux lots. Enfin, la teneur en créatine-phosphate de la muqueuse des animaux du lot créatine est quinze fois supérieure à celle des animaux du lot témoin.

Expérience 3 : Phosphorylation de diverses molécules aminées in vitro. — D'après les résultats du tableau 3, nous pouvons voir que l'extrait de muqueuse iléale, en présence d'ATP, possède l'aptitude de phosphoryler quatre composés : lysine, arginine, glycoyamine et taurocyamine.

TABLEAU 3

Phosphorylation in vitro à partir d'ATP de diverses molécules aminées

Composé ajouté	P libéré de l'hydrolyse acide * nmoles. min ⁻¹ . mg ⁻¹	Composé ajouté	P libéré de l'hydrolyse acide * nmoles. min ⁻¹ . mg ⁻¹
0.....	18,8 **		
ATP seul.....	16,2	L-alanine	21,3
Acide L-aspartique...	18,5	L-valine	24,4
Asparagine	22,6	Créatine	26,8
Acide L-glutamique..	14,2	L-arginine	42,6
Glutamine	20,8	Glycoyamine	31,7
L-lysine	45,4	Taurocyamine	34,8

* Hydrolyse en milieu chlorhydrique 0,2 N une minute au bain-marie bouillant.

** Moyenne de trois essais.

Discussion, conclusion.

Nous pouvons déduire de ces trois types d'expérience qu'il existe une corrélation entre le fait qu'une molécule soit active sur l'absorption du calcium et le fait qu'elle soit phosphorylable. Tel est le cas pour divers acides aminés : L-lysine, acides L-aspartique et glutamique et pour les guanidines : créatine, taurocyamine et glycoyamine. Le cas de la L-arginine est particulier. Le fait que cet acide aminé soit précurseur d'un phosphagène très répandu montre qu'il est éminemment phosphorylable. En ingestion, il augmente fortement l'absorption du calcium (Wasserman, Comar et Nold, 1956). Nous avons observé que l'injection en anse iléale d'une solution 100 mM en arginine provoque des flux d'eau importants entraînant une détermination erronée du coefficient d'absorption. De tels flux d'eau ont d'ailleurs été antérieurement signalés (Hellier, Holdworth et Perret, 1973).

Quand un radical occupe la position où se fait la phosphorylation de la molécule, l'activité de cette molécule sur l'absorption du calcium disparaît. Tel est le cas pour l'asparagine, la glutamine, le méthylglutamate qui, contrairement aux acides aspartique et glutamique, n'augmentent pas l'absorption du minéral. Par contre, la

ϵ -méthyl-L-lysine agit positivement sur l'absorption du calcium. L'intervention d'une ϵ -alkyllysine pourrait être en cause (Paik et Kim, 1974), d'autant plus que, chez le rat, un régime privé de lysine assure une croissance normale quand il comporte de la ϵ -méthyl-lysine (Neuberger et Sanger, 1944). Cependant, si l'on recherche l'existence de ces composés phosphorylés au niveau de la muqueuse iléale, la correspondance avec l'effet sur l'absorption du calcium n'est plus parfaite. Si la formation de créatine-phosphate est mise en évidence dans des expériences *in vivo*, elle ne l'est plus sensiblement dans les expériences *in vitro*. Il faut cependant noter que, parmi les kinases, la créatine kinase est une enzyme particulièrement labile (Thoai, 1965). D'autre part, au cours de l'expérience 3, les dérivés phosphorylés des acides glutamique et aspartique ne sont pas décelés. Toutefois, le dérivé phosphorylé de l'acide aspartique, le β -aspartyl-adénylate, n'est pas hydrolysé au cours de l'hydrolyse légère que nous faisons subir à l'extrait en fin de réaction, hydrolyse qui laisse intacts les nucléotides. En ce qui concerne le glutamate-phosphate, le type de liaison qui unit le phosphate au reste de la molécule est également plus solide que la liaison du type phosphagène.

La L-alanine et la L-valine qui n'accroissent pas l'absorption du calcium ne sont pas phosphorylables. A l'inverse, cinq composés : L-lysine et arginine, créatine, glyco-cyamine et taurocyamine sont à la fois actifs sur l'absorption du calcium et phosphorylés par la muqueuse iléale du rat. Si la lysine existe à l'état phosphorylé au sein de diverses protéines, la phospholysine, à l'état libre, n'avait, à notre connaissance, jamais été signalée.

De même qu'il semble exister une corrélation entre le fait qu'une molécule aminée soit phosphorylable et qu'elle soit active sur le transfert du calcium, une corrélation identique a été mise en évidence pour les glucides (Dupuis, Digaud et Fournier, 1978a).

On peut se demander pourquoi la phosphorylation d'une molécule conduit à une stimulation de l'absorption du calcium. Nous avons vu dans le tableau 1 qu'une solution 100 mM de créatine triplait l'absorption. Il a été observé par ailleurs que des doses très faibles de phosphate (5 mM) diminuaient des 2/3 cette même absorption, l'injection simultanée de ces deux composés ramenant le coefficient d'absorption du calcium à la valeur témoin (CaCl_2 seul) (Tardivel, travaux en cours de publication). Le fait qu'un accepteur de phosphate soit introduit dans la lumière intestinale a donc pour effet de supprimer un inhibiteur de l'absorption. Le déséquilibre entre les concentrations nécessaires en créatine et en phosphate pour ramener le coefficient d'absorption à la valeur témoin peut rendre compte des faibles quantités de dérivés phosphorylés retrouvés au cours des expériences 2 et 3.

Au cours des expériences que nous avons effectuées *in vitro*, la phosphorylation des molécules étudiées s'est faite à partir d'ATP. Agit-il aussi dans la muqueuse en qualité de donneur universel de phosphate ?

Un problème également important à résoudre est de savoir si la phosphorylation de ces diverses molécules met en cause une ou plusieurs enzymes, problème déjà soulevé en ce qui concerne les phosphagènes (Robin, 1974).

Références

- BRIGGS A. P., 1924. Some applications of the colorimetric phosphate method. *J. biol. Chem.*, **59**, 255-264.
- CRAMER C. F., 1959. Movement of radiostrontium through intestinal tract of fed or fasted rats. *Proc. Soc. expt. Med.*, **102**, 514-515.
- DUPUIS Y., DIGAUD A., FOURNIER P., 1978a. The relations between intestinal alkaline phosphatase and carbohydrates with regard to calcium absorption. *Arch. int. Physiol. Biochim.*, **86**, 543-556.
- DUPUIS Y., DIGAUD A., FOURNIER P., 1978b. Phosphatases alcalines intestinales et composés glucidiques dans leurs rapports avec l'absorption du calcium. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **18**, 1129-1139.
- EGGLETON P., ELSDEN S. R., GOUGH N., 1943. The estimation of creatine and of diacetyl. *Biochem. J.*, **37**, 526-529.
- HELLIER M. D., HOLDWORTH C. D., PERRET D., 1973. Dibasic amino-acid absorption in man. *Gastroenterology*, **65**, 613-618.
- NEUBERGER A., SANGER F., 1944. The availability of ϵ -acetyl-d-lysine and ϵ -methyl-dl-lysine for growth. *Biochem. J.*, **38**, 125-129.
- PAIK W. K., KIM S., 1974. ϵ -alkyllysine. New assay method, purification and biological significance. *Arch. Biochem. Biophys.*, **165**, 369-374.
- RAVEN A. M., LENGEMANN F. W., WASSERMAN R. H., 1960. Studies of the effect of lysine on absorption of radiocalcium and radiostrontium by the rat. *J. Nutr.*, **72**, 29-36.
- ROBIN Y., 1974. Phosphagens and molecular evolution in worms. *Biosystems*, **6**, 49-56.
- TARDIVEL S., 1979. Action comparée de divers composés glucidiques et azotés sur le transfert intestinal du calcium. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **19**, 763-767.
- THOAI V. N., 1965. Nitrogenous bases, **6**, 208-247. In FLORKIN M., STOTZ G., *Comprehensive Biochemistry*, Elsevier, Amsterdam.
- THOAI V. N., PRADEL L. A., KASSAB R., 1970. Phosphokinases for miscellaneous guanidine compounds (Invertebrates). In TABOR H., TABOR C. W., *Methods in Enzymology*, **17**, 1002-1007. Acad. Press, New York.
- WASSERMAN R. H., COMAR C. L., NOLD M. M., 1956. The influence of amino-acids and other organic compounds on the gastrointestinal absorption of calcium and strontium in the rat. *J. Nutr.*, **59**, 371-383.
- WASSERMAN R. H., TAYLOR A. N., 1969. Some aspects of the intestinal absorption of calcium with special reference to Vitamin D, **III**, 345-346. In COMAR C. L., BRONNER F., *Mineral Metabolism*, Acad. Press, New York.
-