

**PROPRIETES CONTRACTILES DES MUSCLES SQUELETTIQUES DE  
souris rendues diabétiques par administration de  
STREPTOZOTOCINE**

AWEDE Bonaventure<sup>1</sup>, LEBACQ Jean<sup>2</sup>

1 Unité de Physiologie, Faculté des Sciences de la Santé, UAC, 01 BP 188 Cotonou, Bénin

2 Unité de Physiologie Cellulaire, Université Catholique de Louvain UCL 5540, Avenue Hippocrate 55,  
1200 Bruxelles, Belgique

Correspondance : Bonaventure AWEDE Unité de Physiologie

Faculté des Sciences de la Santé

Université d'Abomey-Calavi 01 Boîte Postale 188, Cotonou, BENIN

Adresse électronique : [Bonawed@yahoo.com](mailto:Bonawed@yahoo.com)

**RESUME**

Les propriétés contractiles du muscle soléaire et de l'extensor digitorum longus (EDL) ont été étudiées chez des souris C57 rendues diabétiques par une injection intrapéritonéale de streptozotocine à la dose de 200 mg/kg. L'administration de streptozotocine a entraîné au bout de 8 semaines une atrophie musculaire avec une diminution de la masse du soléaire de 30% et de l'EDL de 38,7%. En contraction isométrique, la tension développée par les deux muscles lors de la secousse et de la contraction tétanique n'est pas modifiée par le diabète. Par contre, le temps de contraction et le temps de demi-relâchement de la secousse de même que les temps de relâchement du tétanos du soléaire des souris diabétiques sont plus élevés que ceux du muscle soléaire des souris contrôles. Au niveau des muscles EDL, le seul le temps de demi-relâchement de la secousse des EDL de souris diabétiques est augmenté. Ces résultats montrent que l'adaptation du muscle à l'état diabétique varie d'un muscle à l'autre. Le ralentissement du relâchement musculaire induit par le diabète est plus prononcé au niveau du soléaire que de l'EDL et peut être en rapport avec une diminution d'activité et ou d'expression de la pompe calcique du réticulum sarcoplasmique.

**Mots clés** : streptozotocine, diabète, relâchement musculaire

**ABSTRACT**

We have studied the contractile properties of soleus muscle, a slow twitch muscle, and of extensor digitorum longus (EDL) muscle, a fast twitch muscle, of mice which have been made diabetic by intraperitoneal injection of a single dose of streptozotocin (200mg/kg of body weight). 8 weeks after streptozotocin administration, muscle atrophy has been observed with a 30% loss of soleus muscle mass and a 38.7% loss of EDL muscle mass. In isometric contraction, twitch and tetanic tensions of both soleus and EDL muscles remained unchanged by the diabetic condition. In contrast, twitch time-to-peak and half relaxation time as well as tetanic relaxation times of soleus muscle from diabetic mouse were increased. In EDL muscle from diabetic mouse, only an increase of the twitch half relaxation time was observed. These data suggest that the adaptation of skeletal muscle to diabetes condition is fiber type specific. Alteration in muscle relaxation induced by diabetes is more pronounced in soleus than in EDL muscle and could be related to a decrease activity and or expression of sarcoplasmic reticulum calcium pump.

**Key words**: streptozotocin, diabetes, muscle relaxation

## INTRODUCTION

La contraction du muscle squelettique est contrôlée par le niveau de  $[Ca^{2+}]$  cytosolique. Cette  $[Ca^{2+}]$  qui au repos est de l'ordre de 10-7 M, augmente suite à une libération du calcium du réticulum sarcoplasmique lorsque la cellule musculaire est stimulée. Suite à la contraction, le relâchement musculaire survient lorsque la concentration cytosolique de calcium diminue vers sa valeur de repos. Cette diminution du niveau de calcium dans le cytosol s'effectue par récupération du calcium dans le réticulum sarcoplasmique par la pompe SERCA dont deux isoformes sont exprimées dans les muscles squelettiques : SERCA1 exprimée dans les fibres musculaires rapides et SERCA2a exprimée dans les fibres musculaires lentes. Cette pompe peut faire l'objet de régulation notamment par le phospholamban qui exerce une inhibition sur l'activité du SERCA2a. La phosphorylation du phospholamban permet de lever cette inhibition ce qui entraîne une augmentation de l'activité de la pompe.

Il a été montré par ailleurs que les substrats du récepteur de l'insuline IRS-1 et IRS-2 interagissent avec la pompe calcique du réticulum sarcoplasmique (SERCA) et l'insuline augmentait cette interaction. De plus une diminution de l'interaction IRS et SERCA était observée dans le muscle de rat diabétique (Algenstaedt et al, 1997).

Nous avons donc émis l'hypothèse que la diminution de l'interaction IRS-SERCA pourrait modifier l'activité de la pompe SERCA et du coup entraîner une modification du relâchement musculaire.

Nous avons donc entrepris d'étudier les propriétés contractiles, en particulier le relâchement, des muscles soléaires et EDL de souris rendues diabétiques par administration de streptozotocine.

## MATERIEL ET METHODES

### Induction du diabète

Des souris C57 BL6 âgées de deux (2) mois ont été utilisées dans cette étude.

Deux groupes de souris ont été constitués : un groupe (STZ) auquel la streptozotocine, dissoute dans une solution de citrate de sodium pH 4.5, a été administrée par voie intrapéritonéale à la dose de 200mg/kg de poids ; un groupe contrôle où les souris n'ont reçu que la solution de citrate de sodium.

Au bout de deux semaines, la glycémie est mesurée sur une goutte de sang prélevée à la queue des souris en utilisant la méthode ACCU-CHEK<sup>R</sup> (Roche).

8 semaines après l'administration de streptozotocine, les souris ont été anesthésiées par

injection sous-cutanée de kétamine (100 mg/Kg) et de xylazine (10 mg/kg) et les muscles soléaires et EDL ont été disséqués pour la mesure de leur performance mécanique.

### Mesures mécaniques

Les mesures mécaniques ont été effectuées comme décrites précédemment (Awede et al. 1999). Les muscles sont montés dans une cuvette contenant de la solution de Krebs (NaCl, 118 mM ; NaHCO<sub>3</sub>, 25 mM ; KCl 5mM ; MgSO<sub>4</sub> 1 mM ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM ; Glucose 5mM ; CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM) continuellement gazée avec un mélange de 95% d'O<sub>2</sub> et de 5% de CO<sub>2</sub> et maintenue à 20°C.

Les muscles sont montés verticalement sur un transducteur de force et stimulés électriquement.

Les signaux de force ont été numérisés par un convertisseur de données analogiques en données numériques. Après détermination minutieuse de la longueur optimale du muscle, les mesures de secousse, du tétanos, de la relation force-fréquence ont été effectuées.

#### *Les paramètres de la secousse*

Les paramètres de la secousse étudiés sont la vitesse de développement de la tension (la tension étant la force par unité de section musculaire), le temps de contraction, la tension maximale et le temps de demi-relâchement (1/2RT) qui est la durée de temps nécessaire à la diminution de 50% de la tension de la secousse à partir de sa valeur de tension maximale.

#### *Les paramètres du tétanos*

Pour obtenir le tétanos, les muscles soléaires ont été stimulés pendant 700 ms à la fréquence de 50 Hz et les muscles EDL pendant 500 ms à la fréquence de 100 Hz.

Un intervalle de 3 minutes a été observé entre deux stimulations successives pour permettre au muscle de récupérer.

Au niveau du tétanos, la vitesse de développement de la tension, la tension maximale et les temps de relâchement T<sub>5</sub>, T<sub>20</sub> et T<sub>50</sub> ont été étudiés.

Les temps T<sub>5</sub>, T<sub>20</sub> et T<sub>50</sub> représentent respectivement les temps au bout desquels la tension développée par le muscle diminue respectivement de 5, de 20 et de 50% de sa valeur à l'arrêt de la stimulation tétanique.

#### *La relation force-fréquence*

La relation entre la force et la fréquence de stimulation est établie en stimulant les muscles pendant 500 ms à différentes fréquences avec un intervalle de 2 minutes de repos entre les

stimulations et la tension maximale développée par le muscle est mesurée.

### Analyses statistiques

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  SEM. Les différences entre les groupes contrôle et STZ ont été comparées utilisant Student's t-test et les différences sont considérées comme statistiquement significatives pour une p-value inférieure à 0,05.

## RESULTATS

### Le développement du diabète

Il a été confirmé par le dosage de la glycémie effectuée deux semaines après l'administration de streptozotocine. Ainsi, la glycémie était de  $583,5 \pm 51,4$  mg/dl (n=4) dans le groupe STZ alors qu'elle était de  $105,2 \pm 4,8$  mg/dl (n=5) dans le groupe contrôle.

### Effets sur la masse musculaire

Comme le montre le tableau 1, 8 semaines après l'injection de streptozotocine, on observe une diminution de la masse des muscles soléaires et EDL. La masse corporelle des souris traitées diminue elle aussi, ce qui fait que lorsque la masse musculaire est normalisée à la masse corporelle, on n'observe plus aucune différence de masse entre les muscles soléaires des souris diabétiques et ceux des animaux contrôles. Qu'aux muscles EDL, la masse musculaire rapportée à la masse de la souris est, dans le groupe des souris diabétiques, plus faible que celle des souris normales. L'état diabétique s'accompagne donc d'une atrophie musculaire plus prononcée au niveau des muscles EDL que des muscles soléaires.

**Tableau 1 : Masse corporelle, masse et longueur des muscles soléaires et EDL des souris diabétiques (STZ) et contrôles**

Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM, n=8 pour le groupe contrôle et n=10 pour le groupe diabétique, \* Significativement différent du contrôle (p<0,05)

	Lo	Masse muscle (mg)	Masse souris (g)	Muscle/souris (mg/g)
Soléaire contrôle	11.3 $\pm$ 0.2	11.8 $\pm$ 0.3	28 $\pm$ 0.8	0.42
Soléaire STZ	10.9 $\pm$ 0.2	<b>8.2 <math>\pm</math>0.4*</b>	<b>19.7<math>\pm</math>1.1*</b>	0.42
EDL contrôle	11.9 $\pm$ 0.1	13.4 $\pm$ 0.5	28 $\pm$ 0.8	0.48
EDL STZ	11.6 $\pm$ 0.2	<b>8.2<math>\pm</math> 0.7*</b>	19.7 $\pm$ 1.1	0.42

### Les paramètres de la secousse musculaire

Le tableau 2 indique les paramètres de la secousse des muscles soléaires et EDL des groupes contrôle et diabétique. Ce tableau montre que le développement de l'état diabétique ne modifie, de façon significative, ni la tension de la secousse des muscles soléaires, ni la vitesse à laquelle cette tension est développée.

Par contre, le temps de contraction augmente de 60,37 à 80 ms et le temps de demi-

relâchement connaît une augmentation de plus de 80% : 129,7 ms pour les diabétiques contre 71.25 ms pour les contrôles.

Les muscles soléaires des souris diabétiques présentent donc une contraction et un relâchement plus lents que ceux des souris non diabétiques. Quant aux muscles EDL, seul le temps de demi-relâchement des muscles des souris diabétiques présente une augmentation de 27,7% par rapport à celui des muscles de souris contrôle.

**Tableau 2 : Paramètres de la secousse des muscles soléaires et EDL des souris diabétiques (STZ) et contrôles**

Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM, =8 pour le groupe contrôle et n=10 pour le groupe diabétique, \* Significativement différent du contrôle (p<0,05), \*\* (p < 0,01)

	Tension (KN/m <sup>2</sup> )	Vitesse de développement de la tension (KN/m <sup>2</sup> /s)	Temps de contraction (ms)	1/2 RT (ms)
Soléaire contrôle	36.1 $\pm$ 3.6	1.18 $\pm$ 0.11	60.4 $\pm$ 2.5	71.3 $\pm$ 6.3
Soléaire STZ	40.2 $\pm$ 3.5	1.06 $\pm$ 0.09	<b>80 <math>\pm</math> 3.4**</b>	<b>129.7 <math>\pm</math> 10.9**</b>
EDL Contrôle	86.5 $\pm$ 11.8	5.12 $\pm$ 0.8	27.9 $\pm$ 0.7	24.6 $\pm$ 1.8
EDL STZ	102.9 $\pm$ 7.2	5.94 $\pm$ 0.48	28.6 $\pm$ 0.8	<b>31.4 <math>\pm</math> 1.7*</b>

### Les paramètres du tétanos

Les paramètres du tétanos sont présentés dans le tableau 3.

Ce tableau montre qu'en dehors de la tension tétanique, tous les paramètres du tétanos du muscle soléaire sont modifiés par l'état diabétique. La vitesse de développement de la tension diminue alors que les temps de relâchement augmentent.  $T_5$  passe de 68,5 à 91,8 ms,  $T_{20}$  de 100 ms à 141.9 ms et  $T_{50}$  de 135.8 à 212,4 ms.

Quant aux muscles EDL, les paramètres du tétanos ne présentent aucune différence entre les groupes de souris normales et de souris diabétiques.

**Tableau 3 : Paramètres du tétanos des muscles soléaires et EDL des souris diabétiques (STZ) et contrôles**

Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM,  $n=8$  pour le groupe contrôle et  $n=10$  pour le groupe diabétique, \* Significativement différent du contrôle ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ )

	Tension (KN/m <sup>2</sup> )	Vitesse de développement de la tension (KN/m <sup>2</sup> /s)	T <sub>5</sub> (ms)	T <sub>20</sub> (ms)	T <sub>50</sub> (ms)
Soléaire contrôle	185.4 $\pm$ 6.9	1.82 $\pm$ 0.03	68.5 $\pm$ 8.8	100.5 $\pm$ 7	135.75 $\pm$ 8.8
Soléaire STZ	193.7 $\pm$ 9.1	<b>1.56 <math>\pm</math> 0.09*</b>	<b>91.8 <math>\pm</math> 8.6*</b>	<b>141.9 <math>\pm</math> 6.3**</b>	<b>212.4 <math>\pm</math> 6.2**</b>
EDL Contrôle	295.6 $\pm$ 25	7.64 $\pm$ 0.90	19 $\pm$ 0.9	36.9 $\pm$ 1.4	49.9 $\pm$ 1.5
EDL STZ	279.9 $\pm$ 16.6	7.68 $\pm$ 0.68	17.67 $\pm$ 0.6	34.1 $\pm$ 1.1	47.4 $\pm$ 1.5

### La relation force-fréquence

La figure 1 représente la relation entre la force développée et la fréquence de stimulation du muscle soléaire des souris diabétiques et contrôles. La courbe représentant la relation force-fréquence du soléaire des souris diabétiques présente un décalage vers la gauche avec la force tétanique à la fréquence de 10 stimulations par minute significativement plus élevée que celle du soléaire contrôle.

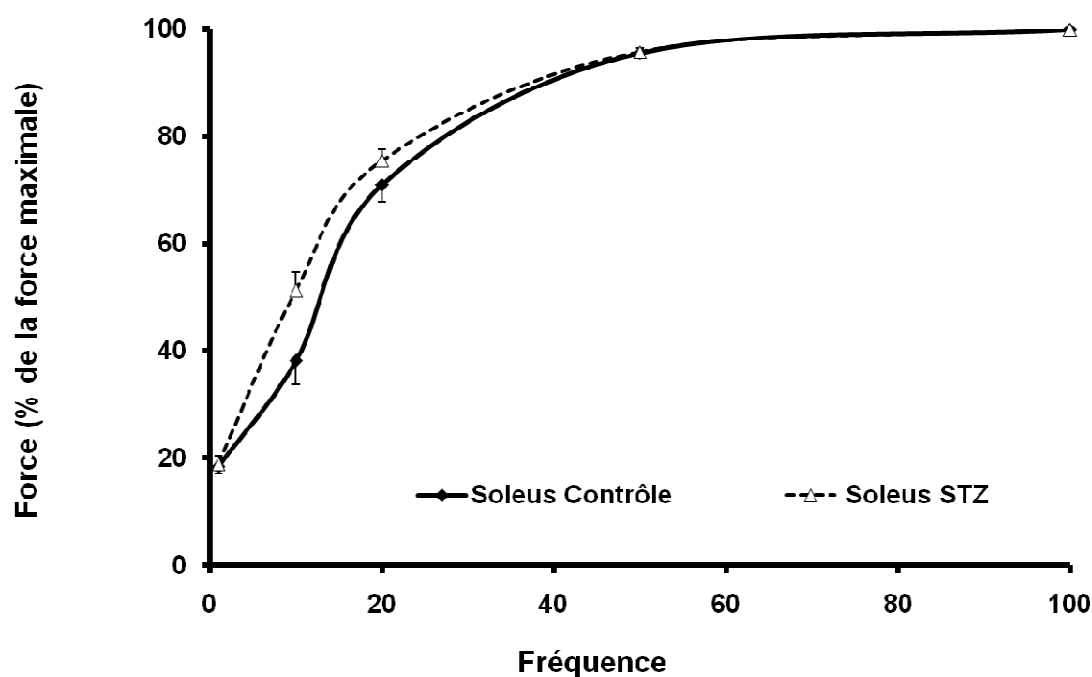


Figure 1: La relation force-fréquence des muscles soléaires des souris. Contrôle et diabétiques (STZ). Les valeurs de force sont exprimées en pourcentage de la force développée à la fréquence de 100Hz

La figure 2 indique la relation force-fréquence des muscle EDL des souris contrôle et diabétiques avec là aussi un décalage vers la gauche de la courbe force-fréquence de l'EDL diabétique.

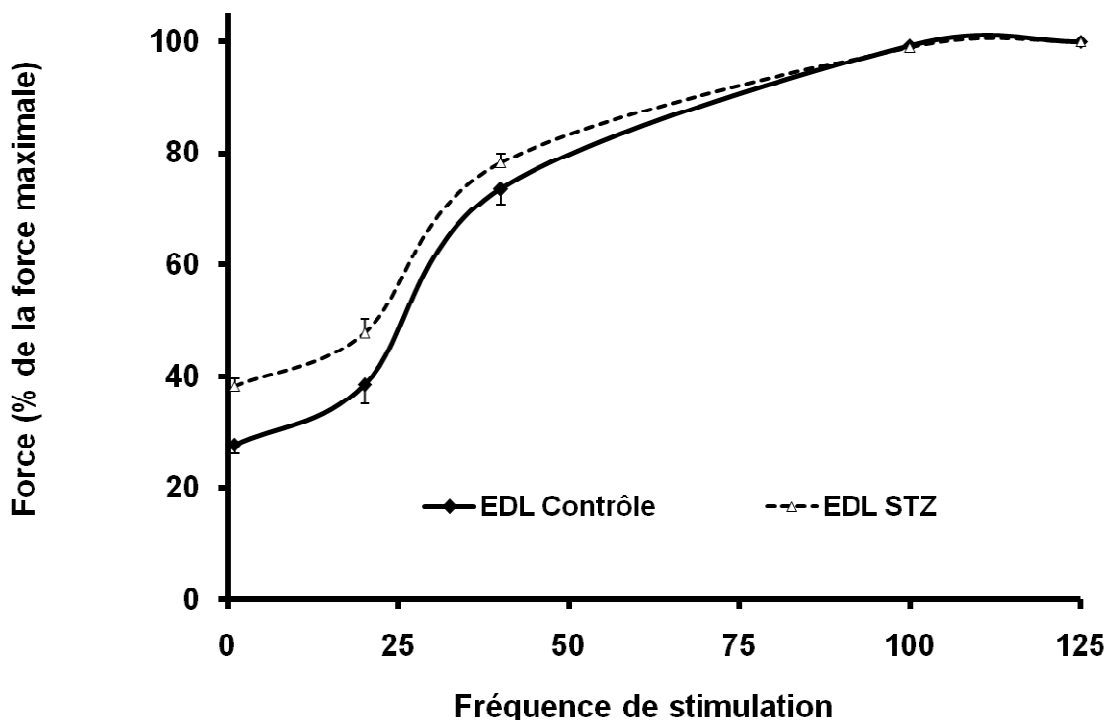


Figure 2: La relation force-fréquence des muscles EDL des souris. Contrôles et diabétiques (STZ). Les valeurs de force sont exprimées en Pourcentage de la force développée à la fréquence de 100Hz

## DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons retrouvé une atrophie et une altération des propriétés contractiles, notamment le relâchement, des muscles squelettiques des souris diabétiques. L'atrophie musculaire observée est plus importante au niveau du muscle EDL, muscle à contraction rapide que du muscle soléaire, muscle à contraction lente. Ces résultats suggèrent que le degré de la diminution de la masse musculaire est fonction du type de fibres musculaires.

Dans notre étude, les tensions maximales développées par les muscles de souris diabétiques ne sont pas significativement différentes de celles des souris contrôles. Ces résultats sont en désaccord avec des études précédemment publiées qui ont noté une diminution de la force de contraction ou de la tension du soléaire, de l'EDL et du diaphragme (Stephenson et al. 1994, McGuire and MacDermott 1998, Lesniewski et al. 2003, Chonkar et al. 2006). Dans notre étude, bien que la tension ne soit pas modifiée, la force non normalisée des muscles des souris diabétiques est plus faible que celle des souris contrôles, le diabète

ayant induit une atrophie musculaire sans modification de la longueur du muscle.

Les paramètres de la contraction de l'EDL sont peu affectés par le diabète alors que le temps de contraction et de  $\frac{1}{2}$  relâchement de la secousse du soléaire, la vitesse de la tension téτανique, et les temps de relâchement du téτανos du soléaire sont tous modifiés par le diabète.

Ces résultats suggèrent que la réponse contractile du muscle à l'état de diabète est fonction des fibres muscles. Une spécificité de l'effet du diabète en fonction du type de fibre avait déjà retrouvée pour le contenu en adénosine triphosphate, en phosphocréatine et pour l'activité des enzymes intervenant dans le métabolisme énergétique du muscle (Fewell JG et Moerland TS, 1995).

L'augmentation des temps de relâchement observée traduisant un ralentissement du muscle soléaire de souris diabétique concorde avec les résultats publiés sur le soléaire et le muscle sterno-hyoïde (McGuire et MacDermott 1999, McGuire et al. 2001) mais différent de ceux publiés sur le diaphragme ou une accélération du relâchement a été observée

(McGuire et MacDermott 1998). Cette augmentation du temps de relâchement porte sur les différents temps de relâchement du tétanos ( $T_5$ ,  $T_{20}$  et  $T_{50}$ ) ce qui suggère non seulement une diminution de la vitesse à laquelle la concentration de calcium baisse dans le cytosol mais aussi une modification de la cinétique de détachement des ponts actine-myosine. Le ralentissement du relâchement pourrait donc s'expliquer par une diminution de l'activité de la pompe SERCA en rapport soit une diminution de son niveau d'expression, soit à une modification de la proportion des isoformes exprimées dans le muscle soléaire soit à une modification de son interaction avec les substrats des récepteurs de l'insuline (IRS). En

effet dans le muscle cardiaque d'animaux diabétiques une diminution d'activité et ou une réduction du niveau d'expression de la pompe SERCA2a ont été retrouvées (Zarain-herzberg et al. 1994, Zhong et al. 2001). L'étude de l'activité et de l'expression des isoformes de la pompe SERCA dans le soléaire de souris diabétique permettrait de mieux préciser le mécanisme du ralentissement du relâchement. Le ralentissement du relâchement et l'augmentation du temps de contraction peuvent aussi s'expliquer en partie par une modification de l'expression des protéines contractiles comme il a été observé dans le soléaire de souris diabétique (Fewell JG, Moerland TS 1995).

#### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Algenstaedt P, Antonetti DA, Yaffe MB, Kahn CR (1997) Insulin receptor substrate proteins create a link between the tyrosine phosphorylation cascade and the  $Ca^{2+}$ -ATPase in muscle and heart. *J. Biol. Chem.* 272: 23696-23702
2. Awede B, Berquin A., Wuytack F., Lebacqz J. (1999) Adaptation of skeletal muscle to a novel functional overload test: changes in myosin heavy chains and SERCA and physiological consequences. *Eur. J. Appl. Physiol.* 80: 519-526
3. Chonkar A, Hopkin R, Adeghate E, Singh J (2006) Contraction and contents of skeletal soleus and EDL muscles in age-matched control and diabetic rats. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1084: 442-451
4. Fewell JG, Moerland TS (1995) Response of mouse fast and slow skeletal muscle to streptozotocin diabetes: myosin isoenzymes and phosphorus metabolites. *Mol. Cell. Biochem.* 148:147-154
5. Lesniewski LA, Miller TA, Armstrong RB (2003) Mechanisms of force loss in diabetic mouse skeletal muscle. *Muscle Nerve* 28: 493-500
6. McGuire M, MacDermott M (1998) The influence of streptozotocin-induced diabetes and the antihyperglycaemic agent metformin on the contractile characteristics and the membrane potential of the rat diaphragm. *Exp. Physiol.* 83:481-487
7. McGuire M, MacDermott M (1999) The influence of streptozotocin diabetes and metformin on erythrocyte volume and on the membrane potential and the contractile characteristics of the extensor digitorum longus and soleus muscles in rats. *Exp. Physiol.* 84:1051-1058
8. McGuire M, Dumbleton M, MacDermott M, Bradford A (2001) Contractile and electrical properties of sternohyoid muscle in streptozotocin diabetic rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 28:184-187
9. Stephenson GM, O'Callaghan A, Stephenson DG (1994) Single-fiber study of contractile and biochemical properties of skeletal muscles in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 43: 622-628
10. Zarain-Herzberg A, Yano K, Elimban V, Dhalla NS (1994) Cardiac sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase expression in streptozotocin-induced diabetic rat heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203: 113-120
11. Zhong Y, Ahmed S, Grupp IL, Matlib MA (2001) Altered SR protein expression associated with contractile dysfunction in diabetic rat hearts. 281