

Effet de l'insuline sur le transport des acides aminés et la synthèse protéique dans le muscle squelettique de la souris normale et de la souris insulino-résistante

Yannick LE MARCHAND-BRUSTEL, Solange MONIER, P. FREYCHET

*I.N.S.E.R.M. U. 145 et Laboratoire de Médecine expérimentale,
Faculté de Médecine Pasteur,
Chemin de Vallombrose, 06034 Nice Cedex.*

Summary. *Effect of insulin on amino acid transport and protein synthesis in skeletal muscle of normal and insulin-resistant mice.*

The uptake of α -aminoisobutyric acid (AIB) and protein synthesis were studied in soleus muscles isolated from lean and goldthioglucose-obese mice (GTG-obese mice) in both basal and insulin-stimulated conditions. Insulin stimulated AIB influx by increasing the apparent V_{max} of transport ; this effect was partially dependent on new protein synthesis. In muscles of GTG-obese mice, the basal (*i.e.* non-insulin-stimulated) influx of AIB was decreased. Furthermore, the effect of insulin in obese mice was altered in two ways ; the absolute value of the maximally insulin-stimulated AIB influx was lower than in the muscles of lean controls, and the dose response of insulin-stimulated AIB influx was shifted to the right (half-maximally effective concentration : $EC_{50} \cong 1.7$ nM) compared to that observed in the muscles of lean animals ($EC_{50} \cong 0.7$ nM). On the contrary, protein synthesis was similar in control and GTG-obese mice in both basal and insulin-stimulated conditions.

It is concluded that in the muscles of obese mice *a*) amino acid transport *per se* is altered, *b*) the sensitivity of this process to the stimulatory effect of insulin is markedly diminished and *c*) protein synthesis is unchanged.

Introduction.

Le muscle strié squelettique est une cible majeure de l'insuline et un site prépondérant de l'utilisation du glucose et des acides aminés. L'insuline joue un rôle important dans le métabolisme protéique musculaire, puisqu'elle stimule la synthèse et diminue la dégradation des protéines chez l'animal normal, à la fois *in vivo* et *in vitro* (Wool *et al.*, 1972 ; Jefferson, 1980). Il est difficile de concilier ces données avec les observations faites chez l'animal obèse qui présente, en dépit d'un hyperinsulinisme marqué, une diminution relative de sa masse musculaire (Lin, Romsos et Leveille, 1977 ; Trostler *et al.*, 1979). D'autre part, de nombreuses anomalies semblent être impliquées dans l'insulino-résistance du muscle squelettique dans l'obésité : diminution du nombre des récepteurs insuliniques, altération du transport et du métabolisme du glucose, altération de l'activation de

la glycogène synthétase (Le Marchand-Brustel, Jeanrenaud et Freychet, 1978 ; Le Marchand-Brustel et Freychet, 1980 ; Cuendet *et al.*, 1976). Dans le travail résumé ici, nous avons étudié le transport des acides aminés et la synthèse protéique dans le muscle squelettique et nous avons recherché si ces paramètres étaient altérés dans les obésités avec insulino-résistance.

Matériel et méthodes.

1. *Animaux expérimentaux et isolement du muscle soleus.* — Les techniques d'isolement et de préparation des muscles de même que les conditions d'incubation ont déjà été décrites précédemment (Cuendet *et al.*, 1976 ; Le Marchand-Brustel, Jeanrenaud et Freychet, 1978). Chaque muscle est utilisé intact, et incubé individuellement dans les conditions décrites. Deux modèles d'obésité ont été étudiés : l'obésité génétique de la souris (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Me, USA) en utilisant les souris obèses (C57BL/6J-*ob/ob*) et leurs témoins non obèses (C57BL/6J-+/+), nourris *ad libitum* ; et l'obésité créée expérimentalement chez la souris Suisse albinos par injection intra-péritonéale d'aurothiogluucose (goldthiogluucose, GTG) (Le Marchand, Freychet et Jeanrenaud, 1978). Les souris GTG et les souris témoins sont utilisées à l'âge de 17 à 20 semaines, soit 14 à 16 semaines après l'injection de GTG, stade auquel l'obésité est devenue stationnaire. Les souris obèses étudiées présentent un poids corporel, une glycémie et une insulino-résistance significativement accrues par rapport à ceux des animaux témoins. Ces deux modèles réalisent une obésité avec hyperinsulinisme et résistance à l'insuline.

2. *Mesure du transport des acides aminés.* — L'acide α -aminoisobutyrique (AIB), analogue non métabolisé de l'alanine, a été employé. Les conditions expérimentales pour la mesure du transport par le muscle soleus ont été décrites ailleurs (Le Marchand-Brustel, Moutard et Freychet, 1982). Chaque muscle (incubé individuellement) est mis en contact avec le (^{14}C)-AIB pendant 30 min, période qui concilie un accroissement linéaire de la quantité captée (influx) avec une accumulation suffisamment mesurable ; la contribution du compartiment extracellulaire du muscle, déterminée par la « captation » de (^3H)-inuline, est soustraite du transport total d'AIB pour chaque muscle utilisé (Le Marchand-Brustel, Moutard et Freychet, 1982).

3. *Mesure de la synthèse protéique.* — Les taux de synthèse protéique sont estimés par l'incorporation de (^3H)-tyrosine dans les protéines (Fulks, Li et Goldberg, 1975), après incubation des muscles 3 h en présence de 1-(^3H)-tyrosine (0,1 mM, 1 $\mu\text{Ci/ml}$). L'activité spécifique intramusculaire de la tyrosine est déterminée dans chaque muscle.

Résultats.

1) *Transport de l'AIB dans le muscle soleus de la souris normale. Effet de l'insuline.* — L'insuline stimule *in vitro* le transport de l'AIB au niveau du soleus isolé. Nous avons étudié la dépendance temporelle de cet effet de l'insuline, en

mesurant l'influx d'AIB pendant 30 min, après un temps variable d'exposition des muscles à l'insuline. Comme le montre la figure 1 (panneau de gauche), cette stimulation résulte d'un effet rapide, déjà détectable en 15 à 30 min, et d'un processus plus lent. Lorsque les muscles sont incubés en présence de cycloheximide (0,5 mM), concentration qui inhibe totalement la synthèse protéique, seul l'effet rapide de l'insuline persiste (fig. 1, panneau de droite).

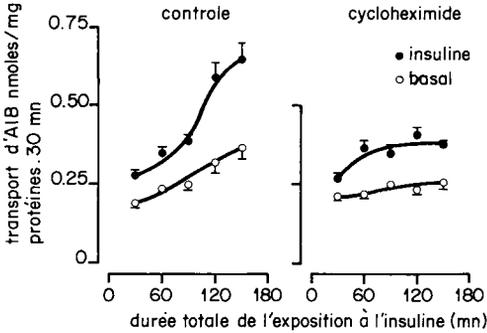


FIG. 1.

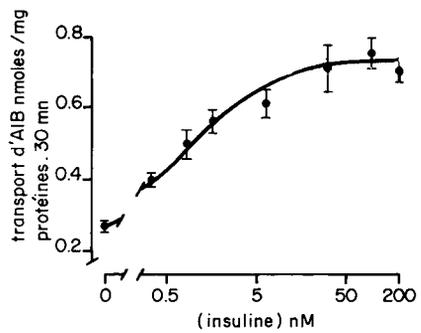


FIG. 2.

FIG. 1. — *Dépendance de l'influx d'AIB vis-à-vis de la durée d'exposition à l'insuline et de la synthèse protéique.* Les 2 muscles soleus d'une même souris sont incubés en absence (basal) ou en présence d'insuline (33 nM) pour les périodes de temps indiquées en abscisse. L'influx d'AIB (0,1 mM) est mesuré pendant les 30 dernières minutes de l'incubation. La cycloheximide (0,5 mM) est présente, si nécessaire, pendant toute la durée de l'incubation. Chaque point est la moyenne \pm SEM des résultats obtenus à partir de 8 à 12 muscles individuels.

FIG. 2. — *Dose-dépendance de la stimulation de l'influx d'AIB par l'insuline dans le muscle soleus de souris normale.* Les muscles sont incubés 150 min en présence de concentrations variables d'insuline, le transport d'AIB (0,1 mM) étant mesuré pendant les 30 dernières minutes de l'incubation. Chaque point est la moyenne \pm SEM des résultats obtenus à partir de 5-6 muscles.

Les paramètres cinétiques (V_{max} et K_m) du transport d'AIB ont été déterminés à partir des valeurs d'influx d'AIB pour des concentrations d'AIB comprises entre 0,1 et 30 mM, après 2 h d'incubation des muscles en l'absence (état basal) ou en présence d'une concentration d'insuline d'efficacité maximale (33 nM). La stimulation de l'influx d'AIB par l'insuline se traduit par une augmentation de la capacité maximale (V_{max}) du transport (basal : $V_{max} = 4,5 \pm 0,4$ nmol/mg protéine/30 min ; insuline : $V_{max} = 9,0 \pm 1,0$ nmol/mg protéine/30 min) sans modification de l'affinité ($K_m = 1,3$ mM).

La relation dose-effet de l'insuline a été étudiée dans des muscles incubés 2 h en présence d'insuline (fig. 2), l'influx d'AIB étant ensuite mesuré sur une période de 30 min. La stimulation de l'influx d'AIB est observée pour des concentrations d'insuline comprises entre 0,3 et 30 nM (soit entre 45 et 4 500 μ J/ml). Le demi-effet maximal est observé pour environ 0,7 nM insuline. La dose-réponse ainsi obtenue est très proche de celle obtenue pour la stimulation par l'insuline du transport et du métabolisme du glucose (Le Marchand-Brustel, Jeanrenaud et Freychet, 1978).

2) *Transport de l'AIB dans le muscle soleus de la souris obèse. Effet de l'insuline* (fig. 3). — Nous avons étudié les effets de l'insuline sur le transport de l'AIB dans les deux modèles d'obésité (génétique, et induite expérimentalement par l'aurothioglucose). Le transport basal de l'AIB (mesuré en l'absence d'hormone) est diminué au niveau des muscles de souris obèses. L'analyse des paramètres cinétiques du transport d'AIB a montré que cette diminution est entièrement due à une altération de la V_{max} du système de transport sans modification de son affinité (Le Marchand-Brustel, Moutard et Freychet, 1982).

De plus, les muscles de souris obèses présentent une résistance marquée à l'action de l'insuline qui se manifeste à la fois au niveau de la réponse maximale qui est fortement diminuée, et au niveau de la sensibilité à des concentrations inframaximales d'insuline (fig. 3). Cette différence dans les valeurs absolues d'AIB capté sous l'effet de l'insuline persiste lorsque les données sont exprimées en pourcentage d'accroissement au-dessus du transport basal (graphique non représenté).

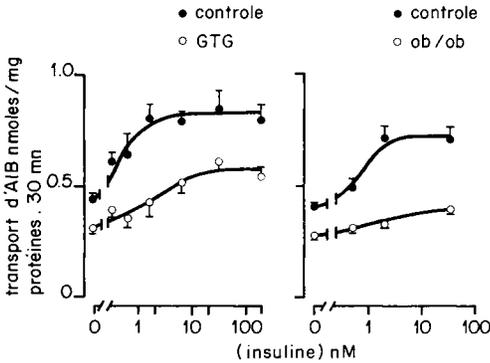


FIG. 3.

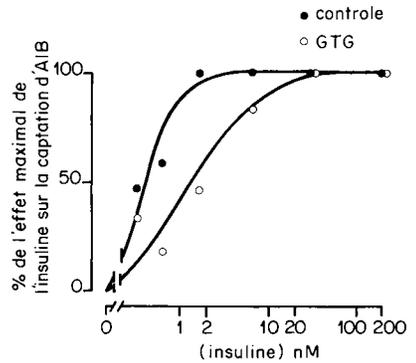


FIG. 4.

FIG. 3. — *Dose-dépendance de la stimulation de l'influx d'AIB par l'insuline dans les muscles de souris normales et obèses.* Les muscles sont isolés de souris obèses (rendues obèses par aurothioglucose et souris *ob/ob*) ou de leur souris contrôles correspondantes ; l'incubation est réalisée comme décrit dans la figure 2. Chaque point est la moyenne \pm SEM des résultats obtenus à partir de 4 à 6 muscles individuels.

FIG. 4. — *Dose-dépendance de la stimulation de l'influx d'AIB par l'insuline dans les muscles de souris normales et rendues obèses par l'aurothioglucose.* Les résultats sont obtenus à partir de la figure 3, panneau de gauche. Le pourcentage de l'effet maximal de l'insuline est obtenu en divisant l'augmentation d'influx induit par l'insuline à chaque concentration (valeur stimulée-valeur basale) par l'augmentation maximale obtenue avec l'insuline 33 nM.

La comparaison des courbes dose-réponse pour la liaison de l'insuline (Le Marchand-Brustel, Jeanrenaud et Freychet, 1978) et pour son effet sur la captation d'AIB (fig. 2) révèle que l'effet biologique maximal est atteint pour une concentration d'hormone telle qu'elle ne permet l'occupation que d'un pourcentage relativement faible (environ 25 %) du nombre total des récepteurs disponibles. Par conséquent, la diminution (de 40 % environ) du nombre des récepteurs

insuliniques au niveau des muscles des souris obèses ne peut expliquer, par elle-même, la diminution marquée des réponses biologiques maximales de ces muscles à l'insuline. Dans ce système qui comporte donc des récepteurs de « réserve », la conséquence fonctionnelle d'un déficit en récepteurs ne devrait être qu'un déplacement vers la droite de la courbe dose-réponse biologique (Kahn, 1978). Un tel déplacement peut effectivement être mis en évidence dans le cas des muscles de souris obèses lorsque les résultats sont exprimés en pourcentage de l'effet maximal induit par l'insuline (fig. 4). Par contre, la dépression de la réponse maximale ne peut s'expliquer que par une altération propre du système de transport de l'AIB, dont la capacité à l'état basal (donc indépendamment de l'effet hormonal) est diminuée au niveau des muscles des animaux obèses.

3) *Synthèse protéique dans le muscle soleus de la souris normale et obèse.* — Pour mesurer les taux de synthèse protéique, nous avons utilisé comme pré-curseur la tyrosine, acide aminé dont le transport ne se fait pas par le système A (Manchester, 1970) et n'est donc pas stimulé par l'insuline. Nous étudions donc spécifiquement l'étape de synthèse sans intervention de l'étape de transport. Les résultats présentés dans le tableau 1 montrent que la synthèse protéique mesurée à l'état basal, en l'absence d'insuline, est identique dans les souris témoins et les souris obèses. De plus, l'insuline induit dans les 2 cas une stimulation de l'incorporation de tyrosine, d'environ 40 %, dans les protéines musculaires totales.

TABLE 1
*Effet de l'insuline sur les taux de synthèse protéique
dans les muscles soleus de souris contrôles et obèses*

| Incorporation de Tyrosine (nmoles/mg protéines. 3 h) | | |
|--|-------------|-------------|
| Insuline (nM) | 0 | 6,7 |
| Contrôle | 1,30 ± 0,09 | 1,83 ± 0,10 |
| GTG-obèse | 1,48 ± 0,10 | 1,88 ± 0,15 |

Les 2 muscles soleus d'une même souris sont incubés 3 h comme décrit dans la Méthodologie. Les valeurs sont des moyennes ± SEM de 9 à 10 muscles. L'effet de l'insuline est significatif avec $P < 0,001$.

Discussion

Le modèle expérimental d'obésité créée chez la souris par GTG représente, au stade avancé de son évolution, un syndrome obèse hyperinsulinémique et hyperglycémique (Le Marchand, Freychet et Jeanrenaud, 1978) semblable à celui observé dans un certain nombre d'obésités humaines. Dans ce syndrome, l'insulinorésistance se développe de façon progressive et semble être un phénomène acquis secondairement. L'étude présentée ici analyse, *in vitro*, certains des facteurs impliqués dans l'insulinorésistance du muscle squelettique.

L'étude individuelle de muscles intacts possède divers avantages importants sur les travaux effectués au niveau de préparations subcellulaires. Elle permet d'étudier et de comparer la liaison de l'insuline et divers effets biologiques de l'hormone. Les résultats présentés ici confirment l'action stimulante directe de l'insuline sur le transport de l'AIB dans le muscle squelettique (revue par Guidotti, Borghetti et Gazzola, 1978). Le transport des acides aminés neutres dans la cellule fait intervenir trois systèmes, A (« Alanine »), ASC (« Alanine, Sérine, Cystéine ») et L (« Leucine »). L'insuline stimule l'influx d'AIB en augmentant la capacité du système A (résultats non montrés). Nos résultats montrent également que l'action stimulante de l'insuline procède d'un accroissement de la V_{max} sans modification du K_m , obéit à une relation dose-effet, et ne dépend que partiellement de protéine(s) nouvellement synthétisée(s).

L'insuline est bien moins efficace pour stimuler le transport de l'AIB au niveau des muscles de souris obèses qu'au niveau des muscles des témoins. Cette résistance marquée à l'action de l'insuline se manifeste à la fois au niveau de la réponse maximale, qui est fortement diminuée, et au niveau de la sensibilité à des concentrations inframaximales d'insuline : ainsi, l'ensemble de la dose-réponse est déplacé vers la droite pour les muscles des animaux obèses. Le nombre des récepteurs insuliniques est diminué au niveau du muscle soleus des souris obèses, mais cette diminution ne peut être limitante vis-à-vis de l'effet biologique maximal, du fait de l'existence de récepteurs de « réserve » au niveau du muscle comme de l'adipocyte. En effet, l'effet biologique maximal de l'hormone est obtenu lorsque seulement 25 % des récepteurs totaux sont occupés. Dans ces conditions, la conséquence fonctionnelle du déficit en récepteurs se limite à une diminution de la sensibilité du tissu à l'hormone (Kahn, 1978). Cette hyposensibilité est apparue plus nette chez la souris *ob/ob* que dans les souris GTG mais, même relativement modérée, elle n'est vraisemblablement pas sans conséquence physiopathologique *in vivo*, puisqu'elle implique que des concentrations plus élevées d'hormone sont requises pour engendrer un effet biologique de niveau donné. Cette hyposensibilité participe probablement au maintien du cercle vicieux de l'hyperinsulinémie, de l'obésité et de l'insulinorésistance.

La résistance observée pour le transport de l'AIB ne peut être surmontée par des concentrations élevées d'hormone, ce qui montre que la diminution du nombre des récepteurs n'est pas la seule anomalie impliquée. Des altérations situées au-delà (ou même indépendantes) du récepteur jouent donc un rôle important dans l'insulinorésistance du muscle squelettique. Enfin, le transport de l'AIB paraît être intrinsèquement altéré puisque déjà diminué à l'état basal.

Toutes les altérations décrites pour le transport de l'AIB dans le muscle squelettique (diminution du transport basal, du transport maximalelement stimulé et de la sensibilité du tissu à des concentrations inframaximales d'insuline) sont semblables à celles précédemment décrites pour le transport du glucose (Le Marchand-Brustel, Jeanrenaud et Freychet, 1978). La multiplicité des défauts observés au cours de l'obésité avec insulinorésistance explique, au moins en partie, la complexité physio-pathologique du syndrome obèse hyperglycémique.

La constatation d'une synthèse protéique normale aussi bien à l'état basal qu'en présence de concentrations maximalelement efficaces d'insuline est assez

inattendue. En effet, il a été montré dans les obésités génétiques que la masse musculaire est diminuée (Lin, Romsos et Leveille, 1977 ; Trostler *et al.*, 1979). Les résultats normaux de la mesure de la synthèse protéique *in vitro* suggèrent que les anomalies observées *in vivo* sont probablement la conséquence d'anomalies hormonales complexes et d'une activité physique réduite, plutôt que la conséquence d'une altération de la synthèse protéique.

8^e Réunion du groupe Développement I.N.R.A.,
Tours, 12-13 mai 1982.

Remerciements. — Ce travail a été réalisé grâce au financement de l'INSERM (CRL 79.5.215.4), de la Fondation pour la Recherche Médicale, et de l'Université de Nice.

Nous sommes très reconnaissants à Mme N. Grenier-Brossette et M. G. Visciano pour leur aide technique efficace et à Mlle J. Duch et Mme L. Capolongo pour leur aide de secrétariat.

Références

- CUENDET G. S., LOTEN E. G., JEANRENAUD B., RENOLD A. E., 1976. Decreased-basal, non-insulin stimulated glucose uptake and metabolism by skeletal soleus muscle isolated from obese-hyperglycemic (*ob/ob*) mice. *J. clin. Invest.*, **58**, 1078-1088.
- FULKS R. M., LI J. B., GOLDBERG A. L., 1975. Effects of insulin, glucose, and amino acids on protein turnover in rat diaphragm. *J. biol. Chem.*, **250**, 290-298.
- GUIDOTTI G. G., BORGHETTI A. F., GAZZOLA G. C., 1978. The regulation of amino acid transport in animal cells. *Biochim. biophys. Acta*, **515**, 329-366.
- JEFFERSON L. S., 1980. Role of insulin in the regulation of protein synthesis. *Diabetes*, **29**, 487-496.
- KAHN C. R., 1978. Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness : a necessary distinction. *Metabolism*, **27** (suppl. 2), 1893-1902.
- LE MARCHAND-BRUSTEL Y., FREYCHET P., 1980. Alteration of glycogen synthase activation by insulin in soleus muscles of obese mice. *FEBS Letters*, **120**, 205-208.
- LE MARCHAND Y., FREYCHET P., JEANRENAUD B., 1978. Longitudinal study on the establishment of insulin resistance in hypothalamic obese mice. *Endocrinology*, **102**, 74-85.
- LE MARCHAND-BRUSTEL Y., JEANRENAUD B., FREYCHET P., 1978. Insulin binding and effects in isolated soleus muscle of lean and obese mice. *Am. J. Physiol.*, **234**, E348-E358.
- LE MARCHAND-BRUSTEL Y., MOUTARD N., FREYCHET P., 1982. Aminoisobutyric acid transport in soleus muscles of lean and goldthiogluucose-obese mice. *Am. J. Physiol.*, **243**, E74-E79.
- LIN P. Y., ROMSOS D. R., LEVEILLE G. A., 1977. Food intake, body weight gain, and body composition of the young obese (*ob/ob*) mouse. *J. Nutr.*, **107**, 1715-1723.
- MANCHESTER K. L., 1970. The control by insulin of amino acid accumulation in muscle. *Biochem. J.*, **117**, 457-465.
- TROSTLER N., ROMSOS D. R., BERGEN W. G., LEVEILLE G. A., 1979. Skeletal muscle accretion and turnover in lean and obese (*ob/ob*) mice. *Metabolism*, **28**, 928-933.
- WOOL I. G., CASTLES J. J., LEADER D. P., FOX A., 1972. Insulin and the function of muscle ribosomes. In STEINER D. F., FREINKEL N., *Handbook of physiology*, sect. 7, *Endocrinology*, Vol. 1, Amer. Physiol. Soc. Washington, 385-394.