

## Lipoprotéine lipase et différenciation adipocytaire

G. AILHAUD, E. AMRI, Dorota CZERUCKA, C. FOREST, Danielle GAILLARD,  
P. GRIMALDI, R. NÉGREL, C. VANNIER

*Laboratoire de Biologie du Développement du Tissu adipeux,  
Centre de Biochimie (CNRS LP7300), Université de Nice, Faculté des Sciences,  
Parc Valrose, 06034 Nice Cedex, France.*

---

### Summary. Lipoprotein lipase and adipose conversion.

Some hormonal factors, possibly involved in the proliferation and differentiation of adipose precursor cells *in vivo*, have been characterized *in vitro* using different preadipocyte cell lines established from rodent adipose tissue. The process of adipose conversion has also been studied using these cell lines; in this process, stem cells (adipoblasts) were committed at any cell division during the growth phase. At confluence, committed cells (preadipocytes) underwent a limited number of mitoses and differentiated into adipose cells, whereas the uncommitted cells remained as stem cells in the cell population. This stochastic model could be extended to the development of rat adipose tissue *in vivo*. The study of adipose conversion showed the early emergence of lipoprotein lipase (LPL) and monoglyceride lipase (MGL). LPL activity appeared in the cells before any triglyceride accumulation. In contrast, this accumulation seemed dependent upon the emergence of glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *In vitro* experiments clearly established that LPL-containing (differentiating) cells underwent postconfluent mitoses. This limited proliferation was in agreement with previous data obtained *in vivo* and indicates that only triglyceride-containing (mature) cells could not divide.

---

### Introduction.

Le processus de différenciation adipocytaire a été très étudié au cours de la dernière décennie à l'aide de modèles cellulaires en culture (Green, 1979; Ailhaud, 1982). Diverses lignées préadipocytaires établies (« cell lines ») ou non établies (« cell strains ») ont été utilisées, parmi lesquelles les lignées établies Ob17 (Négrel *et al.*, 1978; Forest *et al.*, 1983a) et HGFu (Forest *et al.*, 1983a et b) obtenues dans notre laboratoire à partir du tissu adipeux épидидymaire de souris C57 BL/6J respectivement obèse et non obèse génétiquement. Parmi les principaux avantages liés à la culture de cellules adipeuses figure la possibilité de suivre les événements morphologiques et biochimiques qui accompagnent la conversion adipocytaire.

Chez les cellules des lignées préadipocytaires établies (Green, 1979 ; Ailhaud, 1982) comme chez les cellules de la fraction stroma-vasculaire (SVF) de tissu adipeux de rat et de bœuf (Björntorp *et al.*, 1980 ; Plaas et Cryer, 1980 ; Gaben-Cogneville *et al.*, 1983 ; Djian *et al.*, 1983), les changements morphologiques observés en culture après la confluence (arrondissement des cellules) s'accompagnent d'augmentations spectaculaires dans le contenu intracellulaire en enzymes qui participent aux processus de lipolyse, de lipogenèse et d'estérification des acides gras. La lipoprotéine lipase (LPL) est connue pour jouer *in vivo* un rôle-clef dans l'assimilation des triglycérides circulants par le tissu adipeux, au niveau de la surface luminale des cellules endothéliales (Cryer, 1981). La disponibilité de modèles préadipocytaires en culture a permis en particulier d'évaluer l'importance de cet enzyme dans le programme de différenciation et, très récemment (Vannier *et al.*, travaux soumis à la publication), d'aborder le problème de son activation intracellulaire et de sa sécrétion.

### **Formation de foyers adipeux et mitoses post-confluentes.**

Le processus de conversion adipocytaire conduit *in vitro*, pour les différentes lignées, à la formation de cellules adipeuses groupées en foyers séparés par des cellules indifférenciées. Ces dernières possèdent cependant la potentialité de se différencier en cellules adipeuses dans la mesure où elles peuvent à nouveau se diviser soit en provoquant à leur niveau une « plaie » (les cellules indifférenciées prolifèrent en comblant la « plaie » et se différencient), soit après dissociation, séparation et remise en culture des cellules indifférenciées (Djian *et al.*, 1982). Le développement des foyers adipeux n'est pas un phénomène synchrone et s'étale sur une dizaine de jours après la confluence. De plus, pour un foyer adipeux donné, l'accumulation lipidique démarre dans les cellules centrales et se poursuit de manière centrifuge à la suite d'une prolifération limitée. En effet les travaux sur la lignée 3T3-F442A (issue d'embryon total de souris ; Pairault et Green, 1979) et sur la lignée Ob17 (Djian *et al.*, 1982) ont permis de conclure à l'existence d'une prolifération limitée des cellules converties par la suite en cellules adipeuses. Des résultats récents sur les cellules Ob17 conduisent à exclure l'insuline, présente à des concentrations physiologiques, comme facteur de croissance régulant cette prolifération limitée (Grimaldi *et al.*, 1983a et b ; Amri *et al.*, 1984), à l'inverse d'une fraction ACF (« Adipose Conversion Factor(s) ») partiellement purifiée à partir de sérum fœtal de veau et à l'inverse d'une fraction à activité ACF-semblable présente dans l'hypophyse de bœuf (Grimaldi *et al.*, 1982).

### **Développement de la lipoprotéine lipase au cours de la conversion adipocytaire.**

L'activité lipoprotéine lipase (LPL) apparaît très tôt après la confluence, avant toute accumulation significative de triglycérides, dans tous les modèles cellulaires étudiés à ce jour, incluant les cellules à la fois de lignées non établies (Björntorp *et al.*, 1980 ; Rothblat et DeMartinis, 1977) et établies (Eckel *et al.*, 1977 ; Wise et

Green, 1978 ; Spooner *et al.*, 1979 ; Murphy *et al.*, 1981). Une preuve directe de cette émergence précoce a été apportée dans le cas des cellules Ob17 par la séparation sur gradient de Percoll d'une population cellulaire possédant la LPL mais dépourvue de triglycérides. Dans une autre population cellulaire possédant également la LPL, l'accumulation des lipides neutres coïncide par contre avec la présence de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (Vannier *et al.*, 1984), suggérant le rôle-clé de cet enzyme pour la synthèse d'un précurseur tricarboné, dérivant de la glycolyse, nécessaire à la synthèse des triglycérides. Ce résultat est en accord avec des résultats obtenus *in vivo* sur le tissu épидидymaire de rat, qui démontrent que les cellules contenant des triglycérides possèdent toutes de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase révélée par immunofluorescence indirecte (Cook et Kosak, 1982). Des études par immunoinhibition et par immunofluorescence indirecte de la LPL ont été réalisées sur les cellules Ob17 (Vannier *et al.*, 1982). L'activité LPL, absente des cellules en phase exponentielle de croissance, augmente de 20 à 50 fois au cours de la conversion adipocytaire. L'activité est totalement inhibée par des immunoglobulines dirigées comme la LPL de cœur de rat et se révèle, comme attendu, relarguable à l'héparine. L'activité monoglycéride lipase (MGL) qui augmente en parallèle avec l'activité LPL (Murphy *et al.*, 1981), n'est pas inhibée par les anticorps anti-LPL et représente donc une entité moléculaire différente. Par immunofluorescence indirecte, la présence de la LPL ne peut être mise en évidence ni dans les cellules pré-confluentes, ni dans les cellules qui restent indifférenciées après la confluence. Par double marquage faisant appel à la fois à des dérivés conjugués à la rhodamine et à la fluorescéine, il a été possible de révéler l'enzyme à la surface et à l'intérieur des seules cellules différenciées. L'activité LPL est augmentée lors d'une exposition chronique des cellules Ob17 confluentes à des concentrations physiologiques en insuline et en triiodothyronine. Les expériences d'immunotitration permettent de conclure que les variations d'activité LPL sont directement corrélées à des variations du contenu net en enzyme.

La mise en évidence d'une émergence précoce de la lipoprotéine lipase dans le programme de différenciation, avant toute accumulation lipidique, couplée à la détection de l'enzyme par immunofluorescence indirecte, devrait constituer une approche utile pour des études *in vivo* portant sur la cellularité du tissu adipeux au cours de son développement. En effet des résultats antérieurs ont clairement démontré dans le cas du tissu adipeux épидидymaire de rat, d'une part que l'activité LPL était déjà présente dans les cellules SVF avant d'apparaître dans les cellules matures, d'autre part que des cellules SVF exprimant l'activité LPL restaient toujours présentes chez l'animal adulte (Hietanen et Greenwood, 1977). Il est clair qu'une telle approche de la cellularité du tissu adipeux permettrait de prendre en compte les cellules engagées dans le programme de différenciation mais dont le contenu en lipides neutres est encore insuffisant pour les retrouver incluses dans la fraction « adipocyte ». Il est clair également que dans la fraction stroma vasculaire doivent exister, parmi d'autres types cellulaires (cellules endothéliales, mastocytes, hématies, etc...), des cellules présentes à des degrés divers de maturation, c'est-à-dire plus ou moins avancées dans le programme de différenciation. L'existence d'un tel « continuum » de cellules en voie de différenciation est en

accord avec la séparation de diverses populations cellulaires à partir de la SVF de tissu inguinal de rat sur la base de leur densité et donc vraisemblablement de leur contenu en triglycérides (Gaben-Cogneville *et al.*, 1983).

### Relations entre mitoses post-confluentes et développement de la lipoprotéine lipase.

La corrélation temporelle existant après la confluence entre une prolifération limitée des cellules susceptibles de se différencier et l'émergence de la LPL suggère fortement que les cellules ayant entamé le programme de différenciation restent encore capables de subir un nombre limité de mitoses contrairement aux cellules matures, c'est-à-dire trop « engagées » dans le programme de différenciation et qui paraissent ne plus pouvoir se diviser. Une telle situation semble prévaloir *in vivo* : des travaux récents montrent en effet dans les sites adipeux épидидymaire et rétropéritonéal du rat une absence complète de prolifération des cellules adipeuses matures, lors d'une phase de réalimentation succédant à un jeûne très prolongé de l'animal, jeûne au cours duquel ces cellules avaient perdu l'essentiel de leur contenu en triglycérides (Miller *et al.*, 1983).

Les expériences *in vitro* décrites dans la figure 1 montrent clairement que les cellules Ob17 exprimant la LPL sont capables au cours de leur cycle cellulaire d'incorporer de la radiothymidine dans l'ADN pendant la phase S précédant la

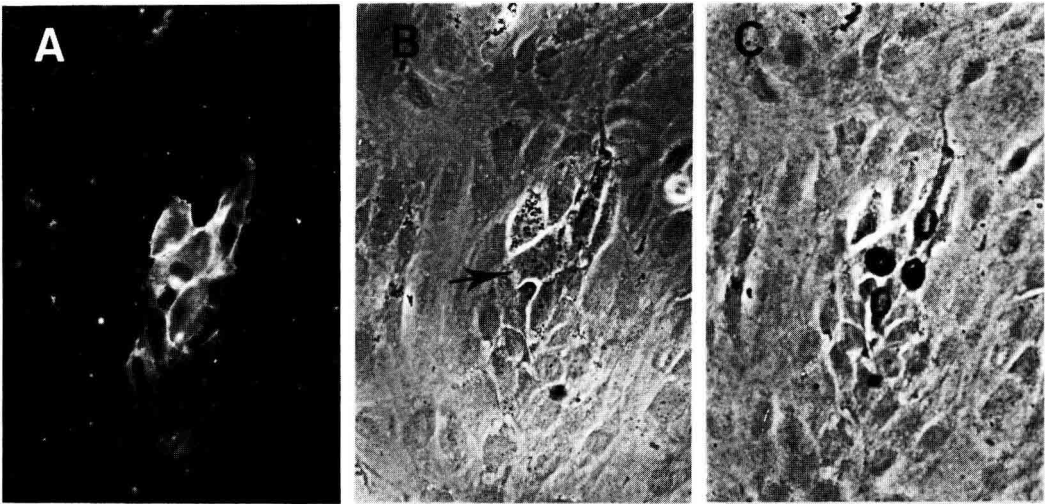


FIG. 1. — Mise en évidence de la lipoprotéine lipase dans les cellules Ob17 en cours de prolifération. Les cellules Ob17, cultivées sur lamelles de verre, sont maintenues après la confluence en présence d'insuline et de triiodothyronine (Forest *et al.*, 1983a). Au second jour après la confluence (début des mitoses post-confluentes) le milieu de culture est supplémenté en radiothymidine ( $1 \mu\text{Ci} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Après une période d'incorporation de 18 h, les cellules sont lavées, fixées et traitées pour la détection de la LPL par immunofluorescence (Vannier *et al.*, 1982). Les photographies en fluorescence (A) et en contraste de phase (B) sont alors prises. Les cellules sont ensuite lavées, l'incorporation de radiothymidine dans l'ADN des noyaux est alors révélée par autoradiographie (Djian *et al.*, 1982) et la photographie prise en contraste de phase (C). La flèche en B indique une cellule marquée à la radiothymidine et exprimant la lipoprotéine lipase. Grandissement  $\times 195$ .

mitose. En d'autres termes, elles démontrent que les cellules ne doivent pas obligatoirement cesser de se diviser pour amorcer leur programme de différenciation. Un tel résultat est en accord avec des travaux antérieurs obtenus *in vivo* au cours du développement du tissu adipeux sous-cutané de rat. En effet, après marquage à la radiothymidine, l'index nucléaire le plus élevé est trouvé dans des cellules adipeuses ne contenant *pas* de triglycérides mais contenant une activité d'hydrolyse de l'acétate de  $\beta$ -naphtol (Pilgrim, 1971) dont on peut supposer qu'elle est due, au moins en partie, à la monoglycéride lipase (Tornqvist et Belfrage, 1976).

## Conclusions.

L'ensemble des données obtenues *in vitro* comme *in vivo* sur le développement du tissu adipeux sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle il peut exister une prolifération limitée des cellules précurseurs d'adipocytes *déjà* engagées dans le programme de différenciation. Cette prolifération s'accompagne de l'acquisition des divers phénotypes enzymatiques, en particulier de la lipoprotéine lipase puis plus tardivement de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase nécessaire à la synthèse des triglycérides. Le caractère relativement asynchrone de la différenciation adipocytaire rend compte de l'existence d'un « continuum » de cellules présentant des stades divers de maturation, les cellules les plus matures cessant seules de se diviser.

10<sup>e</sup> Réunion du groupe Développement I.N.R.A.,  
Rennes, 9-10 mai 1984.

## Références

- AILHAUD G., 1982. Adipose cell differentiation in culture. *Molec. cell. Biochem.*, **49**, 17-31.
- AMRI E., GRIMALDI P., NÉGREL R., AILHAUD G., 1984. Adipose conversion of Ob17 cells : insulin acts solely as a modulator in the expression of the differentiation program. *Exp. Cell Res.*, **152**, 368-377.
- BJÖRNTORP P., KARLSSON M., PETTERSON P., SYPNIEWSKA G., 1980. Differentiation and function of rat adipocyte precursor cells in primary culture. *J. Lipid Res.*, **21**, 714-723.
- COOK J. R., KOSAK L. P., 1982. sn-Glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene expression during mouse adipocyte development *in vivo*. *Dev. Biol.*, **92**, 440-448.
- CRYER A., 1981. Tissue lipoprotein lipase activity and its action in lipoprotein metabolism. *Int. J. Biochem.*, **13**, 525-541.
- DJIAN P., GRIMALDI P., NÉGREL R., AILHAUD G., 1982. Adipose conversion of Ob17 preadipocytes : relationships between cell division and fat cell cluster formation. *Exp. Cell Res.*, **142**, 273-281.
- DJIAN P., RONCARI D. A. K., HOLLENBERG C. H., 1983. Influence of anatomic site and age on the replication and differentiation of rat adipocyte precursors in culture. *J. clin. Invest.*, **72**, 1200-1208.
- ECKEL R. H., FUJIMOTO W. Y., BRUNZELL J. D., 1977. Development of lipoprotein lipase in cultured 3T3-L1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 288-293.
- FOREST C., GRIMALDI P., CZERUCKA D., NÉGREL R., AILHAUD G., 1983a. Establishment of a preadipocyte cell line from the epididymal fat pad of the lean C57 BL/6J mouse. Long-term effects of insulin and triiodothyronine on adipose conversion. *In vitro*, **19**, 344-354.

- FOREST C., CZERUCKA D., GRIMALDI P., VANNIER C., NÉGREL R., AILHAUD G., 1983b. Metabolic characteristics of murine adipocyte precursor clones, 53-64. In ANGEL A., HOLLENBERG C. H., RONCARDI D. A. K. *The adipocyte and obesity : cellular and molecular mechanisms*, Raven Press, New York.
- GABEN-COGNEVILLE A. M., ARON Y., IDRISSE G., JAHCAN T., PELO P. Y., SWIERCZEWSKI E., 1983. Differentiation under control of insulin of rat preadipocytes in primary culture. Isolation of homogenous cellular fractions by gradient centrifugation. *Biochim. biophys. Acta*, **762**, 437-444.
- GREEN H., 1979. Adipose conversion : a program of differentiation, 15-24. In AILHAUD G., *Obesity : cellular and molecular aspects*. INSERM Publ., vol. **87**.
- GRIMALDI P., DJIAN P., NÉGREL R., AILHAUD G., 1982. Differentiation of Ob17 preadipocytes to adipocytes : requirement of adipose conversion factor(s) for fat cell cluster formation. *Embo J.*, **1**, 687-692.
- GRIMALDI P., DJIAN P., FOREST C., POLI P., NÉGREL R., AILHAUD G., 1983a. Lipogenic and mitogenic effects of insulin during conversion of Ob17 cells to adipose-like cells. *Mol. cell. Endocrin.*, **29**, 271-285.
- GRIMALDI P., FOREST C., POLI P., NÉGREL R., AILHAUD G., 1983b. Modulation of lipid-synthesizing enzymes by insulin in differentiated Ob17 adipose-cells. *Biochem. J.*, **214**, 443-449.
- HIETANEN E., GREENWOOD M. R. C., 1977. A comparison of lipoprotein lipase activity and adipocyte differentiation in growing male rats. *J. Lipid Res.*, **18**, 480-490.
- MILLER Jr. W. H., FAUST I. M., GOLDBERGER A. C., HIRSCH J., 1983. Effects of severe long-term food deprivation and refeeding on adipose tissue cells in the rat. *Am. J. Physiol.*, **245**, E74-E80.
- MURPHY M. G., NÉGREL R., AILHAUD G., 1981. Lipoprotein lipase and monoglyceride lipase activities during maturation of Ob17 preadipocytes. *Biochim. biophys. Acta*, **664**, 240-248.
- NÉGREL R., GRIMALDI P., AILHAUD G., 1978. Establishment of preadipocyte clonal line from epididymal fat pad of ob/ob mouse that responds to insulin and to lipolytic hormones. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 6054-6058.
- PAIRAULT J., GREEN H., 1979. A study of the adipose conversion of suspended 3T3 cells by using glycerophosphate dehydrogenase as differentiation marker. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 5138-5142.
- PILGRIM C., 1971. DNA synthesis and differentiation in developing white adipose tissue. *Develop. Biol.*, **26**, 69-76.
- PLAAS H. A. K., CRYER A., 1980. The isolation of a proposed adipocyte precursor cell type from bovine subcutaneous white adipose tissue. *J. Dev. Biol.*, **2**, 275-289.
- ROTHBLAT G. H., De MARTINIS F. D., 1977. Release of lipoprotein lipase from rat adipose tissue cells grown in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 45-50.
- SPOONER P. M., CHERNICK S. S., GARRISON M. M., SCOW R. O., 1979. Development of lipoprotein lipase activity and accumulation of triacylglycerol in differentiating 3T3-L1 adipocytes. *J. biol. Chem.*, **254**, 1305-1311.
- TORNQVIST H., BELFRAGE P., 1976. Purification and some properties of a monoacylglycerol-hydrolyzing enzyme of rat adipose tissue. *J. biol. Chem.*, **251**, 813-819.
- VANNIER C., JANSEN H., NÉGREL R., AILHAUD G., 1982. Study of lipoprotein lipase content in Ob17 preadipocytes during adipose conversion. Immunofluorescent localization of the enzyme. *J. biol. Chem.*, **257**, 12387-12393.
- VANNIER C., GAILLARD D., GRIMALDI P., AMRI E., DJIAN P., CERMOLACCE C., FOREST C., ETIENNE J. NÉGREL R., AILHAUD G., 1984. Adipose conversion of Ob17 cells and hormone-related events. In HIRSCH J., VAN ITALIE T., *Recent advances in obesity research IV*, John Libbey and Co. Ltd., London (in press).
- WISE L. S., GREEN H., 1978. Studies of lipoprotein lipase during the adipose conversion of 3T3 cells. *Cell*, **13**, 233-242.
-