

Caractérisation et différenciation de préadipocytes de rats en culture primaire

Anne-Marie GABEN-COGNEVILLE, Annie QUIGNARD-BOULANGÉ (*), Yolande ARON (**), Lucienne BRIGANT (*), Thérèse JAHCHAN (**), J. Y. PELLO (**), Barbara POUSSIN, Elisabeth SWIERCZEWSKI (**)

INSERM U.55, 184, rue du Faubourg Saint-Antoine, 75012 Paris.

() INSERM U.177, 15, rue de l'Ecole de Médecine, 75006 Paris.*

*(**) INSERM U.29, 123, boulevard de Port-Royal, 75014 Paris, France.*

Summary. *Characterization and differentiation of rat preadipocytes in primary culture.*

Using a density gradient medium, we isolated homogeneous cell populations from the inguinal tissue of 3-day old rats. In primary culture we obtained, for the first time, the differentiation of 99 % of the cells in the presence of a physiological concentration of insulin (10^{-9} M). This model closely mimicked the events occurring during normal mammalian adipose development, *i.e.* a positive change in β -adrenergic sensitivity, early induction of lipoprotein lipase, expression of the enzymes involved in the triglyceride systems, and the development of responsiveness to glucagon.

Introduction.

L'utilisation en culture de souches de cellules préadipocytaires isolées à partir de tissu adipeux adulte humain et de rat, ou de lignées établies à partir de tissu de souris, est une voie d'approche relativement récente dans l'étude des mécanismes impliqués dans la différenciation des adipocytes (Ailhaud, 1982). Cependant la fréquence de conversion adipocytaire varie suivant les modèles et n'atteint généralement qu'un certain pourcentage de cellules.

Dans le présent travail nous avons réussi à isoler, à partir du tissu inguinal, une population cellulaire homogène de préadipocytes. Ces cellules mises en culture primaire se différencient dans une grande proportion (99 %) en adipocytes sous l'influence de l'insuline à 10^{-9} M.

Méthode.

Les cellules de la fraction stroma vasculaire proviennent de tissu inguinal de rats âgés de 3 jours. On les isole par centrifugation sur gradient continu de densité dans un mélange de Percoll et de milieu 199 de Parker. Trois fractions cellulai-

res de densités croissantes, FI, FII, FIII, sont recueillies et mises en culture dans le milieu 199, complétées avec 20 % de sérum de veau foetal (SVF). A confluence, 4 jours après l'ensemencement, les cellules entament leur programme de différenciation dans un milieu contenant 10 % de SVF et 5,5 mM de glucose (milieu basal). A ce stade, les cellules sont divisées en 4 lots expérimentaux : (I) cellules cultivées dans le milieu basal ; (II) milieu basal + insuline 10^{-9} M ; (III) milieu basal + insuline + VLDL (350 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (lipoprotéines de très faible densité) + héparine (10 UI/ml) ; (IV) milieu basal + VLDL + héparine.

Sur les trois fractions cellulaires cultivées dans ces différentes conditions nous avons étudié plusieurs marqueurs de différenciation, à savoir : l'accumulation des triglycérides, les activités enzymatiques de la glycérol-3P-déshydrogénase, de l'acide CoA ligase (Gaben-Cogneville *et al.*, 1983), de l'acide gras synthétase de l'ATP citrate lyase, de la lipoprotéine lipase ainsi que la synthèse d'AMP cyclique en présence d'isoprotérénol et de glucagon (Gaben-Cogneville *et al.*, 1984).

Résultats.

Durant la conversion adipocytaire la concentration des lipides totaux (essentiellement des triglycérides) croît d'environ 300 à 400 fois dans les fractions les plus légères FI et FII, en présence d'insuline 10^{-9} M ou d'insuline/héparine/VLDL.

Dans ces mêmes conditions, les activités spécifiques de plusieurs enzymes impliquées dans la synthèse des triglycérides et des acides gras : l'acide CoA ligase, la glycérol-3P-déshydrogénase, l'acide gras synthétase et l'ATP citrate lyase augmentent rapidement après confluence (de 30 à 60 fois) pour atteindre un maximum après 15 jours de culture. Par contre dans le milieu basal supplémenté ou non en VLDL on observe une très faible différenciation dans les fractions FI et FII, tant au niveau morphologique que biochimique. L'addition de VLDL seule au milieu contenant l'insuline n'a d'effet amplificateur que sur l'activité de l'acide gras synthétase. Contrairement aux enzymes précédents, la lipoprotéine lipase apparaît avant confluence et son activité augmente durant la phase exponentielle de croissance. Elle atteint un maximum entre le 4^e et 6^e jour de culture dans les 3 fractions cellulaires.

L'addition d'insuline à confluence (J4) augmente significativement, d'environ 20 %, le pic d'activité à J6. On constate que les cellules de la fraction III présentent une activité lipasique qui atteint 60 % de la valeur maximum observée pour les fractions légères.

Afin de tester la capacité lipolytique de notre modèle, nous avons étudié la stimulation de la synthèse d'AMPc en réponse à l'isoprotérénol (10^{-4} M) et au glucagon ($3 \cdot 10^{-7}$ M) dans les cellules issues de la fraction II. La concentration basale en AMPc croît en fonction du temps de culture et atteint un maximum à J11. Cette augmentation représente 10 à 30 fois la valeur de base, respectivement en absence ou en présence d'insuline. Les cellules prélevées sur le gradient et avant la mise en culture répondent à l'isoprotérénol en augmentant leur produc-

tion d'AMPc. En culture, la stimulation par l'isoprotérénol s'élevé durant toute la phase exponentielle de croissance, atteint un maximum à J8 (25 fois la valeur basale) et diminue ensuite quel que soit le milieu de culture utilisé. Par contre, la production d'AMPc en réponse au glucagon n'est pas décelable avant confluence et augmente progressivement pendant la phase de différenciation. L'addition de VLDL dans le milieu de culture complétement en insuline augmente la valeur du rapport stimulé/basal d'un facteur 4.

Conclusions.

En utilisant un gradient de densité en milieu Percoll nous avons isolé à partir de la fraction stroma-vasculaire du tissu inguinal de rats de 3 jours, deux populations cellulaires FI et FII qui possèdent en culture primaire, une forte susceptibilité (99 %) de conversion adipocytaire en présence d'insuline à concentration physiologique (10^{-9} M). Au cours de la différenciation en culture, ce modèle subit les transformations morphologiques et biochimiques qui lui confèrent les caractéristiques de l'adipocyte mature.

*10^e Réunion du groupe Développement I.N.R.A.,
Rennes, 9-10 mai 1984.*

Références

- AILHAUD C., 1982. Adipose cell differentiation in culture. *Mol. cell. Biochem.*, **49**, 17-31.
- GABEN-COGNEVILLE A. M., ARON Y., IDRIS G., JAHCHAN T., PELLO J. Y., SWIERCZEWSKI E., 1983. Differentiation under the control of insulin of rat preadipocytes in primary culture. Isolation of homogeneous cellular fractions by gradient centrifugation. *Biochim. biophys. Acta*, **762**, 437-444.
- GABEN-COGNEVILLE A. M., QUIGNARD-BOULANGÉ A., ARON Y., BRIGANT L., JAHCHAN T., PELLO J. Y., SWIERCZEWSKI E., 1984. Development under the control of insulin of lipogenic enzymes, lipoprotein lipase, isoproterenol and glucagon sensitivity in differentiating rat preadipocytes in primary culture. *Biochim. biophys. Acta*, **805**, 252-260.

Les détails expérimentaux sont indiqués dans les références précitées.