

BIOCHIMIE CELLULAIRE. — *Influence de la supplémentation en acides gras polyinsaturés de milieux de culture sur la morphologie et la composition des cultures de cellules fœtales de cerveau de Souris.* Note (*) de **Jean-Marie Bourre, Annie Faivre-Bauman, Odile Dumont, André Nouvelot, Catherine Loudes, Jack Puymirat et Andrée Tixier-Vidal**, présentée par Etienne Wolff.

Les cultures de cellules dissociées ont été obtenues à partir d'hémisphère cérébral fœtal de Souris au 16^e jour de la gestation, et cultivées en milieu chimiquement défini (MCD). Les cellules cultivées en MCD contiennent deux fois moins d'acides gras polyinsaturés que les cellules de départ. Elles contiennent du 20 : 3, *n*-9, preuve que ces cellules sont carencées en acides gras essentiels. La diminution en acides gras polyinsaturés est équilibrée par une augmentation en monoinsaturés, les acides gras saturés n'étant pas affectés.

Les acides gras polyinsaturés ajoutés dans le MCD sont incorporés dans les phospholipides; l'addition d'acides de la série *n*-6 provoque de plus une augmentation des acides de la série *n*-3, ceci étant probablement dû à une meilleure réutilisation des acides gras présents dans les cellules de départ.

Après essai de plusieurs combinaisons d'acides gras polyinsaturés nous trouvons que seule l'addition simultanée de 20 : 4 et de 22 : 6 dans le MCD à raison de respectivement 1 µg/ml et 0,5 µg/ml et liés à l'albumine dégraissée (respectivement 25 et 12,5 µg/ml), permet de cultiver des cellules dont le profil en acides gras est similaire à celui du tissu vivant du même âge.

Cette addition stimule la prolifération de petites cellules denses qui ne sont pas des neurones comme l'ont montré des études de liaison avec la toxine tétanique. L'effet mitogène des acides gras polyinsaturés a été de plus mesuré en étudiant l'incorporation de H³-thymidine dans le DNA.

CELLULAR BIOCHEMISTRY. — Polyunsaturated Fatty Acids Added to the Chemically Defined Media Used for Fetal Mouse Brain Cell Culture Change Fatty Acids Composition, Morphology and Multiplication of the Cells.

*Dissociated cell cultures were grown from fetal Mouse Cerebral hemisphere taken on the 16th day of gestation. Cells grown in chemically defined medium (MCD) for 8 days contain half the polyunsaturated fatty acids (PUFA) (in %) found at day 0. Cells contain *n*-9 trienes demonstrating that they are grown under conditions of essential fatty acid deficiency. The reduced amount of PUFA in MCD cells is balanced by an increase in monounsaturated fatty acids. The saturated fatty acids are not affected. The PUFA present in the starting cells are partly preserved and reutilized (70%).*

*Adding fatty acids of the *n*-6 series increases the content of *n*-6 fatty acids in the cells, but also provokes an increase in the *n*-3 fatty acids. Among several combinations of fatty acids, only the mixture of 20 : 4 and 22 : 6, added to the culture restores a fatty acid profile similar to controls (i. e. in vivo tissue taken at post-natal day 5). The concentrations were respectively 1 µg 20 : 4/25 µg albumin/ml and 0,5 µg/12,5 µg albumin/ml.*

Adding PUFA stimulates the proliferation of small dense cells by more than 200% of the control, as quantified by autoradiography of ³H-thymidine. These cells are not neurons, but possibly oligodendrocytes.

INTRODUCTION. — Les phospholipides des membranes du système nerveux sont formés en parties d'acides gras polyinsaturés, les deux classes *n*-6 et *n*-3 étant dérivées des acides linoléique (18 : 2, *n*-6) et linoléique (18 : 3, *n*-3). Ce sont des acides gras essentiels, car ils ne peuvent être synthétisés par les tissus de Mammifères. Le tissu nerveux est particulièrement riche en acide arachidonique (20 : 4, *n*-6) et docosahexaénoïque (22 : 6, *n*-3); ces acides contrôlent la fluidité des membranes, donc leurs propriétés physicochimiques et leur fonctionnement à travers diverses activités enzymatiques.

L'importance des acides gras essentiels dans le système nerveux a été démontrée par de nombreuses études, tant chez l'Homme, que chez l'animal de laboratoire ([1]-[4]). Leur utilisation par le cerveau a été examinée *in vivo* ([5]-[6]). *In vitro*, il a été démontré que les cellules ne sont pas capables de synthétiser des quantités appréciables d'acides docosahexaénoïque [8].

Les mélanges synthétiques sont de plus en plus utilisés comme milieu de culture. Ne contenant pas de sérum, ils possèdent peu d'acide linoléique, et pas d'acide linoléique.

L'importance de ces acides essentiels étant bien connue, ces études ont donc été entreprises pour déterminer leur effet sur les cellules cérébrales fœtales en culture, et pour préciser si les milieux synthétiques ne doivent pas être enrichis en acides gras essentiels, voire plutôt en acides polyinsaturés à 20 et 22 atomes de carbone.

MÉTHODOLOGIE. — Les cultures de cellules dissociées ont été obtenues à partir d'hémisphères de cerveau de Souris fœtales prélevés au 16^e jour de la vie embryonnaire. Elles ont été cultivées soit en présence d'un milieu chimiquement défini (MCD) [11] légèrement modifié [12], soit dans un milieu supplémenté avec 10 % de sérum de Veau fœtal (MSS). Eventuellement, des acides gras ont été ajoutés au milieu synthétique, liés à l'albumine délipidée (Sigma).

Les cultures ont été rincées avec du sérum physiologique, lyophilisées et les lipides extraits ([13], [14]) avec le mélange chloroforme-méthanol [15]. Les lipides complexes ont été purifiés par chromatographie sur couche mince. Les esters méthyliques des acides gras ont été obtenus par méthanolyse et analysés par chromatographie capillaire [16]. Les identifications ont été faites en utilisant des standards commerciaux et en mesurant les temps de rétention.

TABLEAU

Influence de la supplémentation en acides gras polyinsaturés de milieux de cultures sur la composition des cultures de cellules fœtales de cerveau de Souris. MSS : milieu supplémenté en sérum contenant entre autres de la séralbumine, donc des acides gras. MCD : milieu chimiquement défini. CDC : cellules dissociées de début de culture. TFC : tissu *in vivo* ayant l'âge de la culture (5 jours post-natal).

Effect of culture medium supplementation with poly-unsaturated fatty acids. MSS: 10% of serum supplemented medium, it contains serum albumin, therefore fatty acids. MCD: chemically defined medium. CDC: cells at day 0. TFC: in vivo tissue having the age of the culture (post-natal day 5).

	MSS	MCD	CDC	TFC	+18:2	+18:3	+20:4	+22:6	20:4+22:6
20:3 n-9	3,4	6,8	—	—	—	—	—	—	—
20:4 n-6	11,1	3,8	13,0	11,9	6,5	4,2	11,8	4,5	11,8
22:6 n-3	7,1	2,9	13,2	13,8	6,8	11,1	7,3	16,3	15,0
Σ polyinsaturés	28,2	19,5	34,6	32,1	38,1	21,5	34,2	33,2	33,1
Σ n-6	15,6	9,9	20,5	18,0	30,1	7,0	25,2	13,7	18,1
Σ n-3	9,2	2,9	14,1	14,1	8,0	14,5	9,0	19,5	15,4
Σ saturés	36,5	36,4	38,8	43,1	43,2	47,5	39,5	43,9	41,5
Σ monoinsaturés	35,3	44,1	26,6	24,8	18,7	31,0	26,3	22,9	25,0

+18:2, +18:3, +20:4, +22:6 signifie que le milieu synthétique a été supplémenté avec 1 µg/ml de l'un de ces acides. 20:4+22:6 le milieu synthétique a été supplémenté avec ces deux acides, simultanément, à raison de 1 µg/ml pour le 20:4 et 0,5 µg/ml pour le 22:6. Les solutions stock en acides gras sont à 4 mg d'acides gras pour 100 mg d'albumine délipidée dans 1 ml d'eau distillée désionisée.

+18:2, +18:3, +20:4, +22:6 = the defined medium was supplemented with 1 µg/ml of one of these acids. 20:4+22:6 = the defined medium was supplemented simultaneously with 20:4 (1 µg/ml) and 22:6 (0,5 µg/ml). Stock solutions were made with 4 mg fatty acids for 100 mg defatted albumin in 1 ml bi-distilled deionized water.

Des incubations de 8 h avec la ³H-thymidine ont été faites au 5^e jour *in vitro*. Après rinçage, les boîtes ont été fixées avec 4 % de paraformaldéhyde. Après dépôt de l'émulsion « Kodak NTB2 » et développement, les noyaux positifs ont été comptés sur 7 champs successifs, et ceci répété sur 2 axes perpendiculaires de chaque boîte de culture.

Les neurones ont été visualisés en culture par immunofluorescence, en utilisant comme marqueur la toxine tétanique purifiée par le Dr. Bizzini (Institut Pasteur, Paris).

Pour l'étude ultrastructurale, les cultures ont été fixées et incluses selon la technique précédemment décrite [17].

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — L'aspect des cultures de cellules fœtales d'hémisphères cérébraux en milieu sans sérum a été décrit précédemment [12]. Après 8 jours *in vitro*, on observe une couche basale de cellules gliales, sur laquelle se distinguent des cellules à prolongements, de caractéristiques neuronales.

La comparaison avec les cellules de début de culture (CDC), comme au tissu *in vivo* du même âge (TFC), montre que les cellules cultivées en milieu synthétique présentent un profil en acides gras très anormal, (tableau). On trouve en particulier l'acide gras à 20 atomes de carbone et 3 doubles liaisons (20 : 3, *n*-9), qui est normalement absent. Sa présence signifie une déficience en acides gras essentiels dans le milieu nutritif (le même phénomène a été décrit dans les déficiences en acides essentiels alimentaires chez l'Homme, comme dans divers modèles animaux). De plus, les cellules cultivées en MCD présentent une déficience importante en acides gras polyinsaturés, cette anomalie étant particulièrement importante au niveau de l'acide docosahexaénoïque (22 : 6, *n*-3), qui est diminué près de 5 fois en pourcentage. En se rapportant aux quantités de protéines, 70 % de cet acide présent dans les cellules dissociées de début de culture est réutilisé.

La diminution en acides gras polyinsaturés est équilibrée par une augmentation relative des acides gras monoinsaturés, les acides gras saturés n'étant pratiquement pas touchés. Le milieu supplémenté en sérum (MSS) qui contient de la sérumalbumine fœtale et donc des acides gras polyinsaturés, est imparfait, puisque les cellules synthétisent aussi du 20 : 3, *n*-9, et présentent des quantités réduites en acides polyinsaturés.

Ainsi donc, les acides gras insaturés présents dans les cellules de départ ont été largement préservés et réutilisés, mais n'ont pas été suffisants pour maintenir un index d'insaturation normal, malgré la synthèse d'un acide de remplacement (20 : 3, *n*-9). On peut donc supposer que la fluidité, par conséquent, les propriétés physicochimiques et donc les propriétés fonctionnelles des membranes des cellules cultivées en milieu synthétique, sont altérées.

Quand l'un des acides gras polyinsaturés est ajouté au milieu, il est incorporé dans les phospholipides des membranes des cellules (cet acide étant soit l'un des précurseurs linoléique ou linoléinique, soit un produit final arachidonique ou docosahexaénoïque). Chaque acide provoque une augmentation considérable des acides de sa série; seule l'addition de l'un des acides *n*-6 a pour effet d'augmenter aussi les acides de la série *n*-3, ceci étant dû, probablement à une meilleure réutilisation des acides gras présents dans les cellules de départ.

L'essai de plusieurs combinaisons d'acides gras polyinsaturés a montré que l'addition simultanée de 22 : 6 et de 22 : 4 dans le milieu synthétique conduit à un profil en acides gras des cellules similaire à celui du tissu vivant du même âge. Les régulations du métabolisme des acides ajoutés ont probablement permis aux cellules de posséder des quantités normales de chaînes plus courtes issues de l'acide ajouté.

De plus, les résultats préliminaires montrent que l'addition des acides stimule la prolifération de petites cellules denses. Cet effet mitogène a été mesuré par l'incorporation de ³H-thymidine dans le DNA. L'analyse autohistoradiographique a montré que l'albumine délipidée ne contenant pas d'acides gras provoque une très légère stimulation : 56 à 60 cellules radiomarquées dans leur noyau sont visibles par axe de la boîte de culture. L'addition de l'un des quatre acides gras testés provoque une stimulation, de 200 à 300% selon les cas, du nombre des mitoses. Les cellules qui se divisent ne sont pas des neurones comme l'ont montré les comptages de cellules positives à la toxine tétanique. L'analyse en microscopie électronique suggère qu'il s'agit probablement d'oligodendrocytes. Ceci est confirmé par l'étude des acides gras, avec l'apparition de très longues chaînes saturées et monoinsaturées à 22 atomes de carbone, spécifiques de l'oligodendrocyte et de la membrane qu'il synthétise, la myéline.

(*) Remise le 8 novembre 1982, acceptée après révision le 21 mars 1983.

- [1] M. A. CRAWFORD et A. J. SINCLAIR, *Lipid, Malnutrition and the Developing Brain (CIBA Foundation Symposium, 1972, p. 267-282).*
- [2] J. F. MEAD et G. A. DHOPESHWARKAR, *Lipid, Malnutrition and the Developing Brain (CIBA Foundation Symposium, 1972, p. 59-72).*
- [3] R. PAOLETTI et C. GALLI, *Lipid, Malnutrition and the Developing Brain (CIBA Foundation Symposium, 1972, p. 121-140).*
- [4] L. SVENNERHOLM, C. ALLING, A. BRUCE, I. KARLSSON et O. SAPIA, *Lipid, Malnutrition and the Developing Brain (CIBA Foundation Symposium, 1972, p. 141-157).*
- [5] G. A. DHOPESHWARKAR et J. F. MEAD, *Adv. Lipid Res.*, 11, 1973, p. 109.
- [6] S. R. COHEN et J. BERNSOHN, *J. Neurochem.*, 30, 1978, p. 661.
- [7] J. ROBERT, G. REBEL et P. MANDEL, *Biochimie*, 59, 1977, p. 417.
- [8] J. ROBERT, G. REBEL et P. MANDEL, *J. Neurochem.*, 30, 1978, p. 54.
- [9] E. YAVIN et J. H. MENKES, *Lipids*, 9, 1974, p. 248.
- [10] E. YAVIN et J. H. MENKES, *J. Lipid Res.*, 15, 1974, p. 152.
- [11] J. E. BOTTENSTEIN et G. H. SATO, *Proc. Natl. Acad. Sc., U.S.A.*, 76, 1979, p. 514.
- [12] A. FAIVRE-BAUMAN, E. ROSENBAUM, J. PUYMIRAT, D. GROUSELLE et A. TIXIER-VIDAL, *Developmental Neurosc.*, 4, 1981, p. 118.
- [13] J. M. BOURRE, S. A. POLLET, O. DAUDU, F. LE SAUX et N. A. BAUMANN, *Biochimie*, 59, 1977, p. 819.
- [14] S. POLLET, J. J. HAUW, J. C. TURPIN, F. LE SAUX, R. ESCOUROLLE et N. BAUMANN, *J. Neurol. Sc.*, 41, 1979, p. 199.
- [15] J. FOLCH, M. LEES et G. H. SLOANE-STANLEY, *J. Biol. Chem.*, 226, 1957, p. 497.
- [16] J. M. BOURRE, O. MORAND, O. DUMONT, J. M. BOUTRY et J. J. HAUW, *J. Neurochem.*, 37, 1981, p. 272.
- [17] P. BENDA, F. DE VITRY, R. PICART et A. TIXIER-VIDAL, *Exp. Brain Res.*, 23, 1975, p. 29.

J. M. B. et O. D. : I.N.S.E.R.M. U. 26, Unité de Neurotoxicologie,
Hôpital F. Vidal, 200, rue du Faubourg Saint-Denis, 75475 Paris Cedex 10,
A. F.-B., C. L., J. P. et A. T.-V. : Groupe de Neuroendocrinologie cellulaire;
Collège de France, 75231 Paris Cedex 5;
A. N. : Laboratoire de Physio-pathologie des Lipides,
Faculté de Pharmacie, 53045 Lille.