

Expansion et différenciation des cellules souches embryonnaires humaines H7 en milieu défini sur les surfaces Corning® Synthemax™

The logo consists of the word "CORNING" in white, uppercase, sans-serif font, centered within a solid orange square.

Note d'application

*Zara Melkounian, Jennifer L. Weber, Paula Dolley-Sonneville, David M. Weber, Andrei G. Fadeev, Yue Zhou - Corning Incorporated, Life Sciences, Corning, NY 14831
Jiwei Yang, Catherine Priest, Ralph Brandenberger - Geron Corporation, Menlo Park, CA 94025*

Introduction

Les cultures de cellules souches embryonnaires humaines (hESC) ont deux propriétés distinctes, attrayantes et adaptées aux recherches en thérapie cellulaires: leur capacité à se diviser et la possibilité de se différencier vers toutes les grandes lignées de cellules somatiques dans le corps humain. Pour permettre la commercialisation de cellules dérivées des lignées hESC à visée thérapeutiques, il est nécessaire de mettre au point des méthodes qui permettront aux chercheurs de développer leurs travaux sans se préoccuper de la variabilité de lot à lot et des contaminations potentielles. Le développement de ces outils de culture est essentiel pour que les lignées hESC soient correctement étudiées. Corning a développé un tel outil sous la forme d'une surface de culture spécifique qui permet l'expansion continue et la différenciation des lignées hESC.

Historiquement, les cultures de lignées hESC ont été réalisées dans des systèmes complexes. Ces systèmes intègrent souvent des couches de cellules nourricières d'origine humaine ou murine ainsi qu'un milieu contenant du sérum de veau fœtal (ou du sérum de remplacement) pour fournir un environnement riche en matrice extracellulaire (ECM) propice à l'adhésion cellulaire et en facteurs de croissance solubles pour la division cellulaire (1 - 3). Plusieurs chercheurs ont mis au point des systèmes sans cellules nourricières en les substituant par du Matrigel™, une préparation de membranes basales de sarcome de souris (4) ou de sérum humain (5) ou encore par des protéines purifiées de matrice extracellulaire (4,6,7). Cependant, la plupart de ces matériaux biologiques sont coûteux à fabriquer; ils limitent également le scale-up et peuvent poser des problèmes de variabilité de lot à lot. En outre, les produits d'origine animale sont soumis à des tests coûteux afin de s'assurer de l'absence d'agents pathogènes.

L'intérêt croissant pour des solutions alternatives de culture de cellules souches adaptées à la production en grand volume pour permettre des applications de thérapie cellulaire, a conduit à la mise au point d'une surface synthétique pour la croissance et la différenciation des hESC. Nous décrivons ici l'utilisation de la surface Synthemax de Corning pour permettre la division et la différenciation des hESC H7 en milieu chimiquement défini.

Matériels et méthodes

Réactifs

X-VIVO™ 10 (Lonza Cat. No. 04-743Q); hrbFGF (R&D Systems® Cat. No. 234-FSE-025/SF), hrTGF-β1 (R&D Systems Cat. No. 240-B002); Dulbecco's PBS (DPBS) (Invitrogen Cat. No. 14190250), KnockOut™ DMEM (KO-DMEM) (Invitrogen™ Cat. No. 10829-018), Collagenase IV (Invitrogen Cat. No. 17104); Matrigel (BD Biosciences Cat. No. 356231); Antibodies: Oct4 (Millipore® Chemicon® Cat. No. MAB4401), TRA-1-60 (Millipore Chemicon Cat. No. MAB4360), SSEA-4 (Millipore Chemicon Cat. No. MAB4304); α-actinin (Sigma® Cat. No. A7811), Nkx2.5 (Santa Cruz Biotechnology® Cat. No. SC-14033),

Culture des hESC

La lignée H7 a été fournie par Geron Corporation suivant l'entente de collaboration. Les cellules ont été maintenues dans le milieu défini xeno-free (X -VIVO™10 basal medium) supplémenté avec 80 ng/mL de FGF recombinant humain et 0,5 ng/mL de TGFβ recombinant humain (hrTGF-β) selon le protocole Corning pour la culture des hESC sur Surface Synthemax™ (réf CLS-AN-148). Les cultures ont été repiquées tous les 4 à 6 jours. Une fois que les cellules ont atteint 80% de confluence, elles sont dissociées par une incubation avec 200U/mL de collagénase IV pendant 2 à 3 minutes, suivi d'un rinçage en DPBS et un grattage doux. Pour chaque passage, les cellules H7 ont été repiquées en plaques 6 puits Corning Synthemax Surface d'une part et en plaques Corning traitées pour la culture cellulaire (Corning cat. No. 3506) et coatée avec du Matrigel™ (à la dilution 1:30 en KO-DMEM) d'autre part à la densité de 100.000 cellules/cm² dans le milieu de culture défini décrit ci-dessus. Le milieu de culture a été remplacé tous les jours sauf le jour suivant le passage. L'examen microscopique des cellules et de la morphologie des colonies a été effectué quotidiennement. La viabilité cellulaire et le nombre de cellules ont été évalués à chaque passage en récoltant les cellules à partir des puits dupliqués et en les traitant à la collagénase IV/EDTA avant passage sur analyseur Vi-Cell™ (Beckman Coulter). L'expression des marqueurs spécifiques des hESC a été évaluée par cytométrie de flux et immunofluorescence à la fin de chaque passage sur des séries de plus de 10 repiquages. Pour vérifier l'intégrité du génome, des échantillons de cellules ont été caryotypés suivant la méthode «G-banding» (Cytogenetics Laboratories, Children's Hospital, Oakland, CA) aux repiquages 0, 5, et 10 sur les plaques Corning Synthemax Surface.

Test de formation de tératome

La pluripotence cellulaire a été évaluée par un test de formation de tératome. Après 10 passages sur la surface Corning Synthemax et la surface Matrigel, Les cellules H7 ont été récoltées et remises en suspension dans du PBS à la concentration de 1×10^5 cellules/mL. Avant chaque injection, 100 mL de cellules ont été mélangés avec 100 mL de Matrigel. Le mélange est immédiatement injecté dans un muscle du membre postérieur d'une souris SCID/bg. Chaque groupe (surface Corning Synthemax et Matrigel) contient 8 animaux. Les animaux ont été euthanasiés au cas par cas, en fonction de la taille de la tumeur visible dans le muscle. Les tumeurs ont été fixées *in situ* en utilisant 10% de formol et incluses en paraffine neutre en utilisant les méthodes histologiques standards. Des sections de 5 à 8 μm ont été réalisées et colorées à l'aide d'hématoxyline et d'éosine. Les tissus ont été examinés sous une optique à fond clair sur un photomicroscope ZEISS® Axioskop™ 2 Plus (Carl Zeiss, Inc, Göttingen, Allemagne) et les images numériques de microscopie ont été capturées en utilisant un appareil photo numérique Pixera® Penguin 600CL (Pixera Corporation, Los Gatos, CA). Les images numériques de la figure 5 ont été redimensionnées et la luminosité et le contraste équilibrés sur le logiciel

Photoshop® version 7.0.1 (Adobe Systems, San Jose, CA). Pas d'autre manipulation d'images numériques n'a été réalisée.

Différenciation en cardiomyocytes

La différenciation des cellules H7 a été étudiée sur la surface Corning Synthemax sur environ 25 à 30 jours en utilisant le protocole de différenciation directe, décrite par Laflamme, MA et al. (8). En bref, les hESC H7 sont cultivées sur surface Synthemax en milieu sans sérum (SRM: Knockout™ DMEM + 20% KnockOut SR, 1 mM de L - glutamine, 1% NEAA, 0,1 mm² - ME, 80 ng / mL hrbFGF, 0,5 ng / mL hrTGFb1) durant une semaine (phase d'adaptation) avant de passer en sous-culture sur surface Synthemax à la densité de 100.000 cellules/cm². Les cellules ont été alimentées quotidiennement avec le même milieu SRM pendant 6 jours. La différenciation en cardiomyocytes a été induite par l'exposition séquentielle des cellules à 100 ng/mL d'activine A pendant 24 heures, suivies de 10 ng/mL de BMP4 pendant 4 jours dans du RPMI-B27. Les cellules sont alimentées tous les 2 à 3 jours avec du RPMI-B27 sans facteur de croissance pendant 2 à 3 semaines supplémentaires. Une activité spontanée d'auto-contraction a été généralement observée environ 12 jours après l'induction par l'activine A. La différenciation des cardiomyocytes a été confirmée par la recherche de marqueurs spécifiques (α - actinine, Nkx2.5) par des techniques d'immunofluorescence.

Résultats et discussion

La surface Corning™ Synthemax permet la division des hESC sur plus de 10 repiquages en milieu définis Xenofree.

Historiquement, l'efficacité des systèmes de culture pour la croissance des hESC est évaluée en déterminant si oui ou non le système de culture permet plus de 5 passages en série sur la lignée cellulaire. Pour cela, la surface Corning Synthemax a été évaluée avec la lignée hESC H7 en multipliant les repiquages tel que décrit dans la section matériels et méthodes ci-dessus. La figure 1 montre la division des cellules hESC H7 pour 12 passages en série sur la surface Corning Synthemax et compare les résultats avec un système de culture utilisant le Matrigel™. Au cours de repiquages sur la surface Corning Synthemax, on observe un temps de doublement très stable en moyenne de 41 ± 5 heures, ce qui est le signe de conditions de culture reproductibles. Le temps de doublement cellulaire pour les cultures repiquées en parallèle sur une surface utilisant du Matrigel montre une variabilité beaucoup plus élevée (temps de doublement en moyenne de 50 ± 12 heures), probablement due en partie à la variabilité de la composition de cette surface composée de produits d'origine animale.

Afin d'évaluer si les repiquages successifs sur la surface Corning Synthemax permettent la division des hESC dans leur état indifférencié, l'expression phénotypique des marqueurs Oct4 et TRA-1-60 et SSEA4 a été évalué. Oct4 est un facteur de transcription nucléaire alors que SSEA4 et TRA-1-60 sont des marqueurs membranaires, qui sont généralement tous exprimés chez les cellules hESC non différenciées. Au cours de 11 repiquages sur la surface Corning Synthemax, les cellules H7 maintiennent un haut niveau d'expression des marqueurs phénotypiques hESC Oct4, TRA-1-60 et SSEA4, comme le montre l'analyse de cytométrie de flux pour le marqueur Oct4 (figure 2) et les colorations par immunofluorescence respectivement pour les facteurs Oct4, TRA-1-60 et SSEA4 (Figure 3). Ces résultats confirment l'état non différencié des hESC H7 après repiquages successifs sur la surface Corning Synthemax en milieu chimiquement défini.

En général, lorsque les lignées hESC sont maintenues en culture, l'analyse de caryotype est recommandée pour s'assurer qu'il n'y a pas apparition d'anomalies chromosomiques. Par

conséquent, le caryotype des cellules hESC H7 a été réalisé dans cette étude. Fait important, aucune anomalie génétique n'a été associée à la propagation de ces hESC sur la surface Corning Synthemax, et les cellules conservent un caryotype normal après 10 passages (Figure 4).



Figure 1 : repiquages multiples de cellules hESC H7 en culture sur surface Corning Synthemax en milieu défini xeno-free. Le temps de doublement est déterminé en parallèle pour les cellules H7 sur surface Corning Synthemax et sur Matrigel. Le temps de doublement moyen sur surface Corning Synthemax s'établit à 41 ± 5 heures, et à 50 ± 12 heures sur Matrigel.

Ces résultats suggèrent que les cellules hESC H7 peuvent être cultivées avec succès sur la surface Corning Synthemax, avec des repiquages multiples en milieu défini xeno-free, tout en conservant leur intégrité : taux de prolifération stable, profil spécifique des marqueurs phénotypiques et caryotype normal.

Les hESC restent pluripotentes après 10 passages sur la surface Corning Synthemax.

Une propriété fondamentale des hESC est leur capacité à se différencier en cellules des trois feuillets embryonnaires. Le maintien de cette propriété est un paramètre critique pour évaluer l'utilisation de nouvelles conditions de culture pour les hESC. Nous avons donc examiné si les cellules H7 maintenues sur les surfaces Corning Synthemax conservent leur capacité à se différencier grâce à un essai de différenciation *in vivo* (formation de tératome chez la souris).

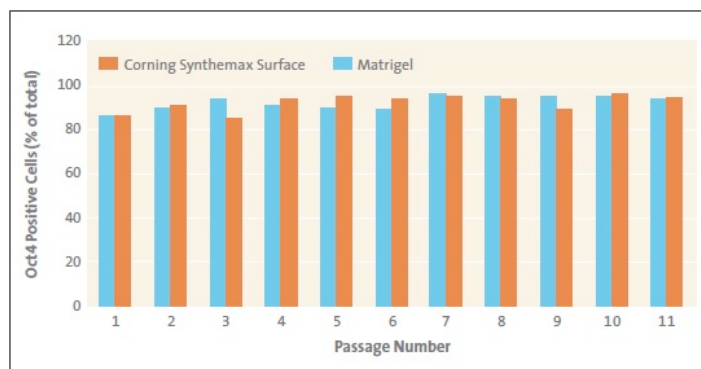


Figure 2 : analyse en cytométrie de flux de l'expression du marqueur phénotypique Oct4 dans les cellules H7 lors d'une série de 11 repiquages sur surface Corning Synthemax.

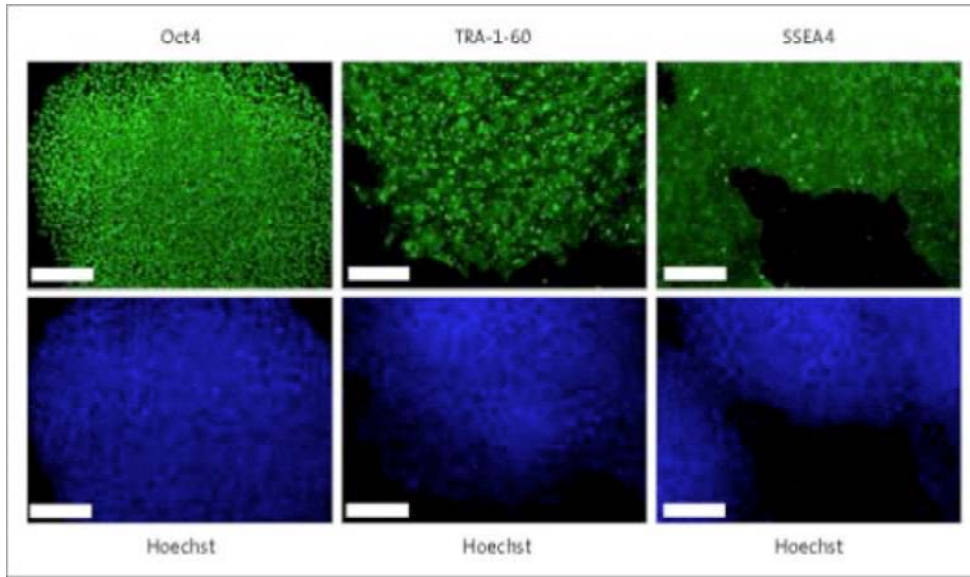


Figure 3 : coloration en immunofluorescence de 3 marqueurs phénotypiques dans les cellules H7 après 10 repiquages sur surface Corning Synthemax. Echelle : 100 μ M.

La figure 5 montre des colorations positives spécifiques des trois feuillets embryonnaires (épithélium sécrétoire, tissu osseux et mélanocytes) dans les tératomes qui se sont développés après injection des cellules en culture H7 sur surface Corning Synthemax et sur Matrigel™ après une série de 10 repiquages. Ces données confirment le maintien de la pluripotence des cellules H7 après culture sur les surfaces Corning Synthemax un milieu défini (figure 5).

Différenciation des hESC H7 en cardiomyocytes après maintien des cultures sur la surface Corning Synthemax.

Pour les applications thérapeutiques des hESC, il est souhaitable d'avoir défini des conditions de culture permettant à la fois la division et la différenciation des cellules thérapeutiques. Par conséquent, les hESC H7 cultivées sur la surface Corning Synthemax ont successivement été exposées aux cytokines appropriées décrites dans le paragraphe matériel et méthodes pour stimuler la différenciation en cardiomyocytes. Comme le montrent les résultats en immunofluorescence de la figure 6, la surface Corning Synthemax permet la différenciation des hESC H7 en cardiomyocytes fonctionnelles, exprimant des marqueurs spécifiques α actinine et Nkx 2.5. Une évaluation quantitative de la différenciation a été réalisée par cytométrie en flux sur la fraction de cellules positives en α actinine. Cette analyse a confirmé l'obtention de 83% de cellules différenciées sur la surface Corning Synthemax exprimant la marqueur α actinine, ce qui suggère une grande pureté des cardiomyocytes différenciés (données non présentées). Ces résultats suggèrent qu'il est possible d'obtenir des cellules H7 différenciées en cardiomyocytes fonctionnels sur la surface Corning Synthemax, offrant ainsi une solution de culture complète pour les deux phases de division et de différenciation des hESC (figure 6).

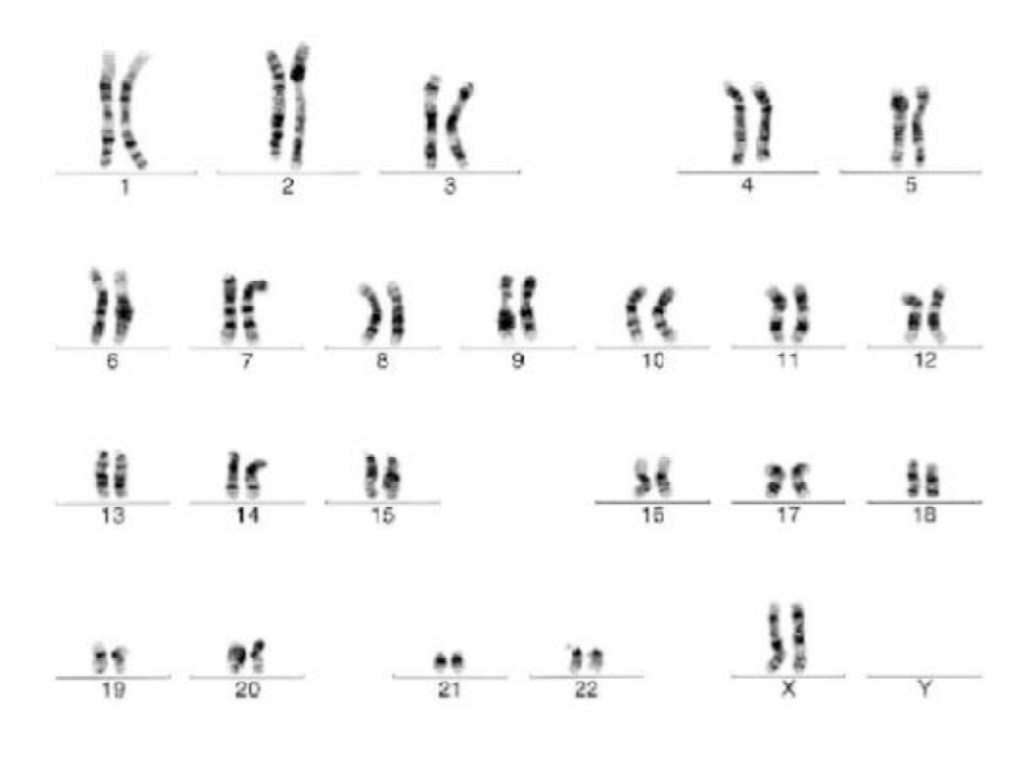


Figure 4 : caryotype normal de cellule H7 après 10 repiquages sur surface Corning Synthemax.

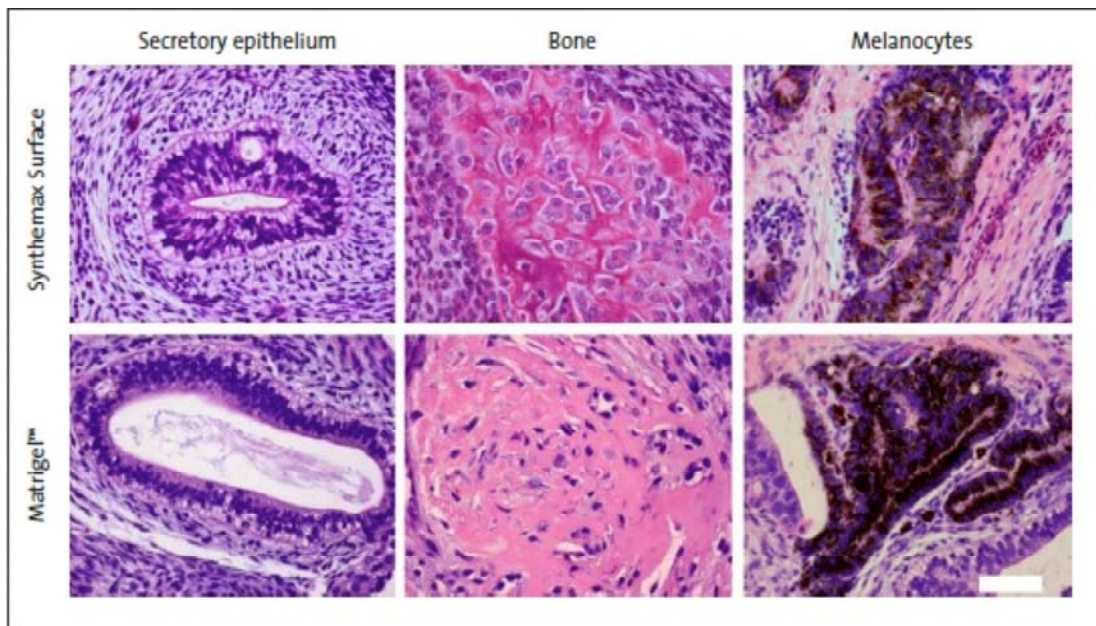


Figure 5 : colorations positives spécifiques des trois feuilletts embryonnaires (épithélium sécrétoire, tissu osseux et mélanocytes) dans les tératomes qui se sont développés après injection des cellules en culture H7 sur surface Corning Synthemax et sur Matrigel™ après une série de 10 repiquages. Echelle : 50µm.

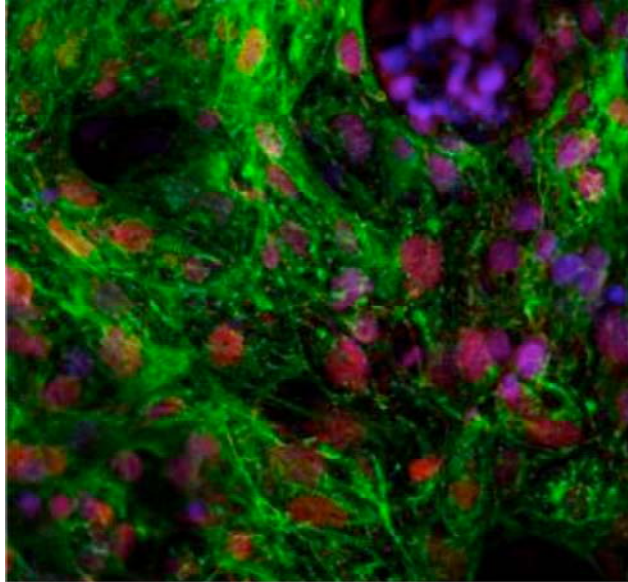


Figure 6 : coloration en immunofluorescence de hESC H7 différenciées en cardiomyocytes fonctionnelles, exprimant des marqueurs spécifiques Nkx2.5 (rouge), α -actinine (vert).

Conclusion

La lignée hESC H7 a été cultivée avec succès sur la surface Corning Synthemax, avec des repiquages multiples en milieu défini xeno-free. Les cellules maintenues ainsi en culture montrent non seulement un temps de doublement stable de 41 ± 5 heures, mais aussi un haut niveau d'expression des marqueurs phénotypiques spécifiques des hESC (Oct4, SSEA4 et la TRA-1-60) et un caryotype normal. La pluripotence cellulaire a été confirmée par la formation de tératome chez la souris. En outre, la surface Corning Synthemax permet la différenciation dirigée des cellules H7 en cardiomyocytes fonctionnels, ce qui prouve la capacité d'utilisation de cette surface pour la division et la différenciation des hESC.

Références

1. Thomson, le juge, Itskovitz - Eldor, J., Shapiro, SS, Waknitz, MA, Swiergiel, JJ, Marahall, VS et al. Lignées cellulaires embryonnaires souches provenant de blastocystes de l'homme. *Science* 282, 1145 - 1147 (1998).
2. M., Margulets, V., Segev Amit, H., Shariki, K., Laïevski, I., Coleman, R., et Itskovitz - Eldor, l'homme couches chargeur J. cellules souches embryonnaires humaines. *Biol. Reprod.* 68, 2150 - 2156 (2003).
3. Richards, M. Tan, S., Fong, CY, Biswas, A., Chan, WK, Bongso, A. Évaluation comparative des différents dépôts de l'homme pour la croissance indifférenciée prolongée de cellules souches embryonnaires humaines. *Cellules souches* 21, 546 - 556 (2003).
4. Xu, C., Inokuma, MS, Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Or, JD, Carpenter, Feeder MK - la croissance sans indifférencié cellules souches embryonnaires humaines. *Biotechnologie Nat* 19, 971 - 974 (2001).
5. Stojkovic, P., Lako, M., Przyborski, S., Stewart, R., Armstrong, L., Evans, J. et al. Humain - matrice de sérum soutient indifférencié croissance de cellules souches embryonnaires humaines. *Cellules souches* 23, 895 - 902 (2005).

6. Lu, J., Hou, R., Booth, le juge en chef, Yang, SH, Snyder, défini les conditions de culture de M. embryon humain - cellules souches ic.PNAS 103, 5688 - 5693 (2006).
7. Li, Y., Powell, S., Brunette, E., Lebkowski, J., mandalam, R. Expansion des cellules souches embryonnaires humaines dans le sérum défini - libre milieu dépourvu d'animaux - des produits dérivés.Biotechnol Bioeng 91 (6), 688 - 98 (2005).
8. MA, Chen, KY, Naumova, AV, Muskheli, V., Fugate Laflamme, JA, Dupras, SK, Reinecke, H., Xu, C. et al.Cardiomyocytes dérivés de cellules souches embryonnaires humaines dans le pro - les facteurs de survie améliorer la fonction de coeurs de rats infarcis.Nat Biotech 25 (9), 1015 - 24 (2007).

Pour les produits complémentaires ou des renseignements techniques, veuillez visitez le site www.corning.com/Lifesciences ou composez le 1.800.492.1110. En dehors des Etats-Unis, veuillez appelez le 978.442.2200.