PHCbi

LiCellMo™

Note d'application

À des fins de recherche uniquement

Contrôle du taux métabolique des cellules CSPi indifférenciées et analyse de l'expression des marqueurs de différenciation

Introduction

La reprogrammation des cellules somatiques en cellules souches pluripotentes induites (CSPi) nécessite un passage de la principale voie métabolique de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) à la glycolyse.[1) 2)] Ce changement métabolique survient à un stade précoce de la reprogrammation, avant l'auto-renouvellement et l'expression des gènes de pluripotence, et les CSPi indifférenciées présentent un métabolisme glycolytique significativement plus important que les cellules somatiques.[3)] On peut donc supposer une relation étroite entre la pluripotence et la glycolyse.

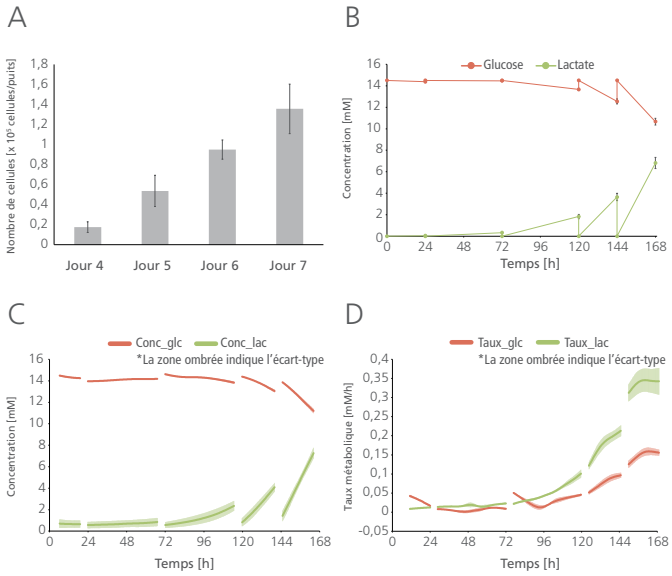
L'état des CSPi indifférenciées constituant un facteur majeur influençant la qualité et l'efficacité des processus ultérieurs tels que la congélation en stock et l'induction de la différenciation, il est essentiel de comprendre l'état de constante évolution des cellules afin de réaliser les opérations de culture au moment le plus opportun. Dans la culture cellulaire en général, les jugements qualitatifs reposent souvent sur l'expérience du praticien, ce qui pose un problème pour garantir une qualité uniforme. Une méthode d'évaluation quantitative de l'état des cellules consiste à évaluer le métabolisme cellulaire à travers le milieu de culture.[4)] Toutefois, il est impossible d'obtenir une compréhension précise de l'état des cellules en effectuant des échantillonnages plusieurs fois par jour. Bien qu'il existe des méthodes d'évaluation utilisant un échantillonnage automatisé, il est difficile de les appliquer aux cultures dans des plaques multi-puits utilisées dans les laboratoires. C'est pourquoi PHCbi a mis au point l'analyseur métabolique de cellules vivantes, qui, grâce à une surveillance en ligne, peut mesurer en continu les concentrations de glucose et de lactate dans le milieu de culture sur des plaques courantes de 24 puits disponibles dans le commerce. Cela permet de quantifier les changements d'état des cellules au fil du temps.

Méthode

Des CSPi 1231A3 (le HPS0381 a été fourni par le RIKEN BRC par l'intermédiaire du National BioResource Project du MEXT, Japon) ont été cultivées pendant 7 jours (168 h) sur des plaques de 24 puits, conformément au protocole standard,[5)] et les concentrations de glucose et de lactate ont été mesurées en continu à l'aide de l'analyseur métabolique de cellules vivantes. Le milieu de culture était StemFit® AK02N (Ajinomoto Healthy Supply). Le Y-27632 a été ajouté à 24 heures après la culture de passage, et le milieu de culture a été remplacé à 24, 72, 120 et 144 heures. Le milieu a été collecté à chaque remplacement, et les concentrations en glucose et en lactate ont été mesurées par colorimétrie. L'état des cellules a fait l'objet d'une évaluation par qRT-PCR pour mesurer les niveaux d'expression des marqueurs indifférenciés (NANOG, OCT3/4) et différenciés (PAX6 dans l'ectoderme, Brachyury dans le mésoderme, GATA4 dans l'endoderme).

Résultat 1

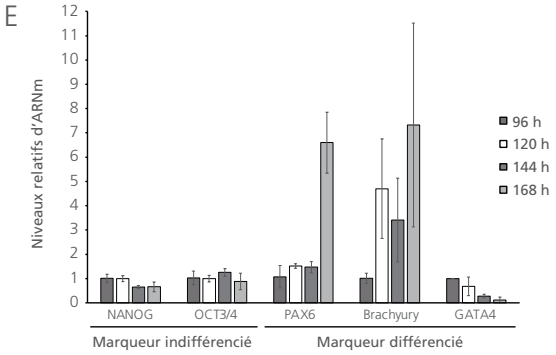
Les cellules ont continué à croître pendant les 7 jours de culture (Fig. A). Les mesures colorimétriques du milieu recueilli lors de son remplacement ont montré que la concentration en glucose diminuait avec le temps et que la concentration en lactate augmentait (Fig. B). Les mesures continues effectuées à l'aide de l'analyseur métabolique de cellules vivantes ont permis de visualiser les changements continus des concentrations de glucose et de lactate d'une manière qui n'aurait pas été possible avec des mesures effectuées lors du remplacement du milieu (Fig. C). En outre, la comparaison des mesures de concentration obtenues à partir du capteur électrochimique de l'analyseur métabolique de cellules vivantes et des mesures colorimétriques de concentration du milieu prélevé lors de son remplacement a montré que les mesures de concentration de glucose dans la plage de 1-27 mM divergeaient de -2 à +4 %, et que les mesures de concentration de lactate dans la plage de 1-15 mM divergeaient de +11 à +18 %. Cela a permis de conclure que la précision était suffisante. Le taux de consommation de glucose et le taux de production de lactate ont été calculés à partir des données de mesure continue de la concentration. Les résultats ont révélé qu'il existait un point à partir duquel l'augmentation se transformait en une diminution à 130 h, après le remplacement du milieu à 120 h, et à 155 h, après le remplacement du milieu à 144 h (Fig. D).



03

Résultat 2

L'analyse de l'expression génétique a été effectuée à 96 h, 120 h, 144 h et 168 h pour évaluer les cellules au cours de la seconde moitié de la culture, lorsque le taux de consommation de glucose et le taux de production de lactate sont réduits (Fig. E). On n'a constaté aucun changement dans l'expression de NANOG ou OCT3/4, qui sont des marqueurs de CSPi indifférenciés, alors que l'on a observé une augmentation de l'expression de PAX6 et Brachyury, qui sont des marqueurs de différenciation précoce. L'expression de GATA4 a diminué.



Discussion

Dans le cadre de cette expérience, les CSPi ont été cultivées selon le protocole de culture standard pendant 7 jours. Comme les cellules ont continué à proliférer au cours des 7 jours, le taux de consommation de glucose et de production de lactate a diminué, ce que l'on peut interpréter comme une diminution du taux de consommation de glucose et de production de lactate par cellule. Ce résultat suggère que la glycolyse est inhibée à 130 h et 155 h après le début de la culture. La glycolyse est plus active dans les CSPi que dans les cellules somatiques. Toutefois, on a signalé que la glycolyse est inhibée dans les CSPi dans lesquelles la différenciation est induite par l'acide rétinoïque.[6] Par ailleurs, on a également signalé que les CSPi cultivées dans un milieu sans bFGF et induites à se différencier spontanément ne montrent aucune diminution de l'expression des marqueurs d'indifférenciation et une augmentation de l'expression des marqueurs de différenciation précoce.[7] Ainsi, étant donné qu'il existe une relation étroite entre la pluripotence des CSPi et la glycolyse, il pourrait exister une corrélation entre la tendance à l'inhibition de la glycolyse et l'expression accrue des marqueurs de différenciation précoce au cours de la dernière phase de la culture.

Conclusion

L'analyseur métabolique des cellules vivantes permet de mesurer en continu la concentration en glucose et en lactate pendant la culture dans une plaque multi-puits. Ce dispositif a permis de visualiser les changements au niveau de la glycolyse des CSPi entre deux remplacements de milieu, ce qui était impossible avec la méthode conventionnelle consistant à prélever des échantillons plusieurs fois par jour. En outre, les résultats de la mesure de la concentration en continu se sont révélés d'une précision équivalente aux résultats de la mesure par la méthode habituelle de la colorimétrie.

Nous estimons que les variations du taux de consommation de glucose et du taux de production de lactate, comme marqueurs quantitatifs des changements d'état qui se produisent dans les cellules, permettront de formuler des jugements objectifs, ce qui garantira également la production de cellules de haute qualité.

Références

1) Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Brief Report Hypoxia Enhances the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. Stem Cell. 2009;5(3):237-241.

2) Zhou W, Choi M, Margineantu D, et al. HIF1 a induced switch from bivalent to exclusively glycolytic metabolism during ESC-to-EpiSC / hESC transition. EMBO J. 2012;31(9):2103-2116.

3) Folmes CDL, Nelson TJ, Martinez-fernandez A, et al. Somatic Oxidative Bioenergetics Transitions into Pluripotency-Dependent Glycolysis to Facilitate Nuclear Reprogramming. Cell Metab. 2011;14(2):264-271.

4) Lees JG, Rathjen J, Sheedy JR, Gardner DK, Harvey AJ. Distinct profiles of human embryonic stem cell metabolism and mitochondria identified by oxygen. Reproduction. 2015;150(4):367-382.

5) Nakagawa M, Taniguchi Y, Senda S, et al. A novel efficient feeder-Free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. Sci Rep. 2014;4:1-7.

6) Gu W, Gaeta X, Sahakyan A, et al. Glycolytic Metabolism Plays a Functional Role in Regulating Human Pluripotent Stem Cell State. Stem Cell. 2016;19(4):476-490.

7) Moussaieff A, Rouleau M, Aberdam D, et al. Glycolysis-Mediated Changes in Acetyl-CoA and Histone Acetylation Control the Early Differentiation of Embryonic Stem Cells. Cell Metab. Published online 2015:392-402.

*Les données sont le résultat de la vérification par PHC et ne constituent pas une garantie des données des clients.

PHC Europe
A Member of PHC Group

Eikdonk 1 | 4825 AZ Breda | Netherlands
T: +31 (0) 76 543 3833 | biomedical.nl@eu.phchd.com

www.phchd.com/eu/biomedical

Version : 291124