

Traduction :

Biologie cellulaire unique



ISSN: 2168-9431

Article de recherche

Normalisation des méthodes de récolte des cellules souches mésenchymateuses turbineuses humaines à partir de tissus chirurgicaux.

Bo-Hye Kim 1 , Mi-Ran Kim 1 , Sung Soo Kim 2 , Min Sub Kim 1 , et Jihong Kim 1 , [2*](#)

1Kim Sung Soo Clinique ORL ARCO, Anyang-Si, Kyunggi-Do, Corée

2LBCO Sensorineural, Anyang-Si, Kyunggi-Do, Corée

Auteur correspondant :

Jihong Kim MD , Kim Sung Soo ARCO Clinique ORL ,Anyang -Si, Kyunggi-Do, ARCO
Laboratoire Sensorineural Anyang-Si, Kyunggi-Do, Corée

Tél : 81314572995

E-mail : duke111@naver.com

Date de réception: 28 mars 2017

Date d'acceptation acceptée: 14 avril 2017

Date de publication: 17 avril 2017

Référence: Kim B, Kim M, Kim S, Kim M, Kim J (2017) .Normalisation des méthodes de récolte pour les cellules souches mésenchymateuses humaines des cornets à partir de tissu chirurgical. *Cellule unique Biol* 6:160. doi: 10.4172 / 2168-9431.1000160

Droit d'auteur: © 2017 Kim B, et al.

Il s'agit d'un article en libre accès distribué sous la licence d'attribution Creative Commons, permettant l'utilisation, la distribution et la reproduction sans restriction sur tout support, à condition que l'auteur et la source d'origine soient crédités.

Abstrait

En accord avec de nombreux cas de maladie, la recherche sur les cellules souches est devenue une étude importante. Cellule souche mésenchymateuse (MSC) est l'un des matériaux représentatifs de la recherche sur les cellules souches.

Les CSM sont des cellules progénitrices multipotentes qui peuvent se différencier en divers types de cellules, notamment les ostéocytes, les adipocytes, les chondrocytes, les myocytes, les cellules stromales et les neurones. Les CSM proviennent de moelle osseuse , de cordon ombilical, de sang de cordon ombilical, de graisse et d'autres organes du corps.

Parmi eux, le cartilage inférieur humain et le cartilage nasal inférieur sont de bons matériaux pour l' extraction des MSC. Pour l'extraction des CSM, nous avons utilisé le protocole d'extraction MSC du laboratoire neurosensoriel ARCO.

Afin d'identifier les MSC extraits, l'immunofluorescence sur les marqueurs de surface cellulaire CD90 et CD73 (ou CD105) des MSC a été réalisée en utilisant le kit de phénotypage MSC (Miltenyi Biotec, Allemagne). Les CSMh dérivées du cornet inférieur et du cartilage septal nasal ont montré des résultats positifs.

En outre, d'autres études ont besoin d'une analyse comparative des cellules cibles différenciées de nos MSCs.

Mots clés

Cellule souche mésenchymateuse; HMSC; Cornet ; Cartilage septal.

Introduction

Cellules souches mésenchymateuses sont des cellules progénitrices rares et multipotentes qui peuvent se différencier en ostéocytes, adipocytes, chondrocytes, myocytes, cardiomyocytes, fibroblastes, myofibroblastes, cellules épithéliales et neurones.

Les cellules souches mésenchymateuses ont été dérivées de la moelle osseuse, du tissu adipeux, du cordon ombilical, du sang du cordon ombilical et d'autres organes du corps.

Mais ces procédures sont très invasives et difficiles à maîtriser. Le cornet inférieur humain apparaît clairement dans la vue chirurgicale pour les spécialistes ORL et peut être un excellent site donneur potentiel pour les cellules souches mésenchymateuses.

De nombreux médecins ont signalé que les cellules souches mésenchymateuses du cornet ont plusieurs avantages par rapport aux autres cellules souches.

Par exemple, les cellules souches mésenchymateuses ont été utilisées avec succès pour la transplantation autologue pour un infarctus du myocarde,

un traumatisme médullaire, anomalie de lésion de l'hippocampe et maladie de Parkinson chez des animaux. Ces cellules fournissent d'excellents résultats pour « réparer » le système nerveux et les tissus endommagés.

Plusieurs études rapportent des résultats des applications des cellules souches mésenchymateuses de la muqueuse olfactive nasale (OM-CSM). Mais les OMCSM ont certaines limites, telles que les risques élevés d'infection, de rareté et de dommages lors des procédures d'extraction.

Contrairement à l'OM-MSc, les cellules souches mésenchymateuses humaines turbinées (hTMSc) montrent plus de flexibilité dans l'extraction et la culture, la résistance à l'infection et peut-être extrait en grand nombre.

Dans cette étude, nous avons étudié la présence de hTMScs dans le tissu du cornet inférieur prélevé lors d'interventions chirurgicales (turbinectomie inférieure chez les patients atteints de rhinite hypertrophique chronique).

Nous avons adopté la turbinectomie totale comme technique chirurgicale puisque cette chirurgie semble « améliorer la respiration et avoir de bons résultats chirurgicaux ». Nous avons caractérisé l'évolution naturelle et la multiplicité de ces cellules dans les conditions spécifiques que nous employons.

Enfin, nous avons comparé les cellules extraites suivant notre technique avec celles publiées dans des rapports décrivant l'extraction de la muqueuse turbinée partiellement.

Cette étude décrit donc les résultats préliminaires de l'induction de l'iPSC, de la différenciation neurale et de la récupération de l'ouïe en utilisant des cellules souches.

Matériaux et méthodes

Stock de tissus humains

Des échantillons de tissus ont été prélevés dans le cornet inférieur de la cavité nasale. De plus, le cartilage septal a été récolté par septoplastie.

Toutes les biopsies ont été effectuées en vertu de l'accord de « ligne directrice du laboratoire et consentement éclairé ».

Des amygdales palatines et des polypes nasaux ont été prélevés au cours de la chirurgie nasale. Les échantillons recueillis sont les suivants: 29 cornets inférieurs (bilatéraux) (**Figure 1**), 7 cartilages septaux nasaux (unilatéraux), 1 amygdale palatine (bilatérale) et 3 polypes (unilatéraux) (**Tableau 1**).



Figure 1: Human inferior turbinate acquired from total inferior turbinectomy surgery (length=2.8 cm).

Figure 1: cornet inférieur humain acquis à partir d'une chirurgie de turbinectomie totale inférieure (longueur = 2,8 cm).

| Patient No. | Sample No. | Age | Sex | Tissue | Patient No. | Sample No. | Age | Sex | Tissue |
|-------------|------------|-----|-----|------------------|-------------|------------|-----|-----|------------------|
| | 1-IT | 40 | M | Cornet inférieur | 17 | 17-IT | 57 | M | Cornet inférieur |
| 1 | 1-P | | | Polype | 18 | 18-IT | 51 | M | Cornet inférieur |

| Patient No. | N ^o d'échantillon | Âge | Sexe | Tissu | Patient No. | N ^o d'échantillon | Âge | Sexe | Tissu |
|-------------|------------------------------|-----|------|------------------|-------------|------------------------------|-----|------|------------------|
| 2 | 2-IT | 18 | M | Cornet inférieur | 19 | 19-IT | 45 | M | Cornet inférieur |
| 3 | 3-IT | 31 | F | Cornet inférieur | 20 | 20-IT | 29 | M | Cornet inférieur |
| 4 | 4-IT | 45 | F | Cornet inférieur | 21 | 21-IT | 48 | F | Cornet inférieur |
| 5 | 5-IT | 33 | M | Cornet inférieur | 22 | 22-IT | 30 | M | Cornet inférieur |
| 6 | 6-P | 53 | M | Polype | 22-C | | | | cartilage |
| 7 | 7-IT | 46 | M | Cornet inférieur | 23 | 23-IT | 54 | F | Cornet inférieur |
| | 7-P | | | Polype | 24 | 24-IT | 2 | F | Corne |

| Patient No. | N ^o d'échantillon | Âge | Sexe | Tissu | Patient No. | N ^o d'échantillon | Âge | Sexe | Tissu |
|-------------|------------------------------|-----|------|------------------|-------------|------------------------------|-----|------|------------------|
| | | | | | | | 7 | | cornet inférieur |
| 8 | 8-IT | 56 | M | Cornet inférieur | 25 | 25-IT | 21 | M | Cornet inférieur |
| 9 | 9-IT | 31 | M | Cornet inférieur | 26 | 26-IT | 20 | M | Cornet inférieur |
| | 9-T | | | Amygdale | | 26-C | | | cartilage |
| dix | 10-IT | 51 | F | Cornet inférieur | 27 | 27-IT | 27 | M | Cornet inférieur |
| 11 | 11-IT | 27 | M | Cornet inférieur | 28 | 28-IT | 23 | M | Cornet inférieur |
| 12 | 12-IT | 43 | M | Cornet inférieur | | 28-C | | | cartilage |

| Patient No. | N° d'échantillon | Âge | Sexe | Tissu | Patient No. | N° d'échantillon | Âge | Sexe | Tissu |
|-------------|------------------|-----|------|------------------|-------------|------------------|-----|------|------------------|
| | | | | ur | | | | | ge |
| 13 | 13-IT | 21 | M | Cornet inférieur | 29 | 29-IT | 52 | M | Cornet inférieur |
| 14 | 14-IT | 63 | M | Cornet inférieur | | 29-C | | | cartilage |
| 15 | 15-IT | 43 | M | Cornet inférieur | 30 | 30-IT | 49 | M | Cornet inférieur |
| | 15-C | | | cartilage | | 30-C | | | cartilage |
| 16 | 16-IT | 20 | F | Cornet inférieur | | | | | |
| | 16-C | | | cartilage | | | | | |

Tableau 1: Détails des échantillons prélevés pour cette étude. Isolement des hTMSC à partir des tissus

Des échantillons de tissus de patients ont été lavés 4 fois en utilisant 2 x antibiotique-antimycosique (Biowest, France) dans du DPBS (Biowest, France). Après lavage, les échantillons de tissu ont été découpés en morceaux de 3 mm x 3 mm.

Pour isoler les hTMSC du tissu (constitué d'os, de tissu mou, de muqueuse et de sang), les échantillons ont été placés dans une culturecollagencée de 35 mm.plat et recouvert d'une lamelle de verre stérilisée.

Nous avons utilisé le milieu Eagle modifié par Dulbecco (DMEM, Biowest, France) contenant 10% de sérum foetal bovin (FBS, Biowest, France) et 1 solution antibiotique-antimycosique comme milieu de culture.

Les petits échantillons de tissus ont été incubés à 37 dans une atmosphère de 5% de CO₂. Les milieux de culture ont été changés une fois tous les 2 à 3 jours.

Après 4 semaines, les hTMSC ont été détachées en utilisant 1 ml de solution de trypsine-EDTA à 0,05%. Les hTMSC isolés ont été passage entre 4 à 8 fois pour la caractérisation et la reprogrammation iPSC.

Caractérisation des hTMSC par immunofluorescence

L'analyse par immunofluorescence pour détecter les marqueurs de surface cellulaire CD90 et CD73 (ou CD105) a été réalisée en utilisant le kit de phénotypage MSC (Miltenyi Biotec, Allemagne). Brièvement, après la récolte et le dénombrement des cellules, la suspension cellulaire a été centrifugée à 300 xg pendant 10 minutes.

Le surnageant a été complètement éliminé et le culot cellulaire a été remis en suspension dans 100 ul de tampon (PBS contenant 10% de FBS et 2 mM d'EDTA). Ensuite, 10 ul de cocktail de phénotypage MSC (1:11) ont été ajoutés aux cellules.

L'échantillon a été bien mélangé et incubé pendant 10 min à l'obscurité à 4 ° C. Les cellules colorées ont ensuite été lavées avec 1 ml de tampon et centrifugées à 300 xg pendant 10 minutes.

Le surnageant a été rejeté et le culot cellulaire a été remis en suspension dans 100 ul de tampon. Une fluorescence correspondant à CD90 et CD73 (ou CD105) a été observée au microscope (EVOS XL, Thermo Fisher).

Résultats

Isolement des CSM

Pour l'isolement des CSMh, des échantillons de tissus prélevés chirurgicalement ont été incubés immédiatement après une turbinectomie inférieure.

Puisque notre laboratoire est situé au 3e étage de l'hôpital, alors que la salle d'opération est située au 4e étage, la plupart des échantillons ont été incubés pendant moins de 30 minutes.

Comme les CSMh provenaient de divers tissus tels que le cornet inférieur, le cartilage nasal, l'amygdale et le polype nasal, le premier stade de différenciation était observable après 7 jours d'incubation (**Figure 2**).



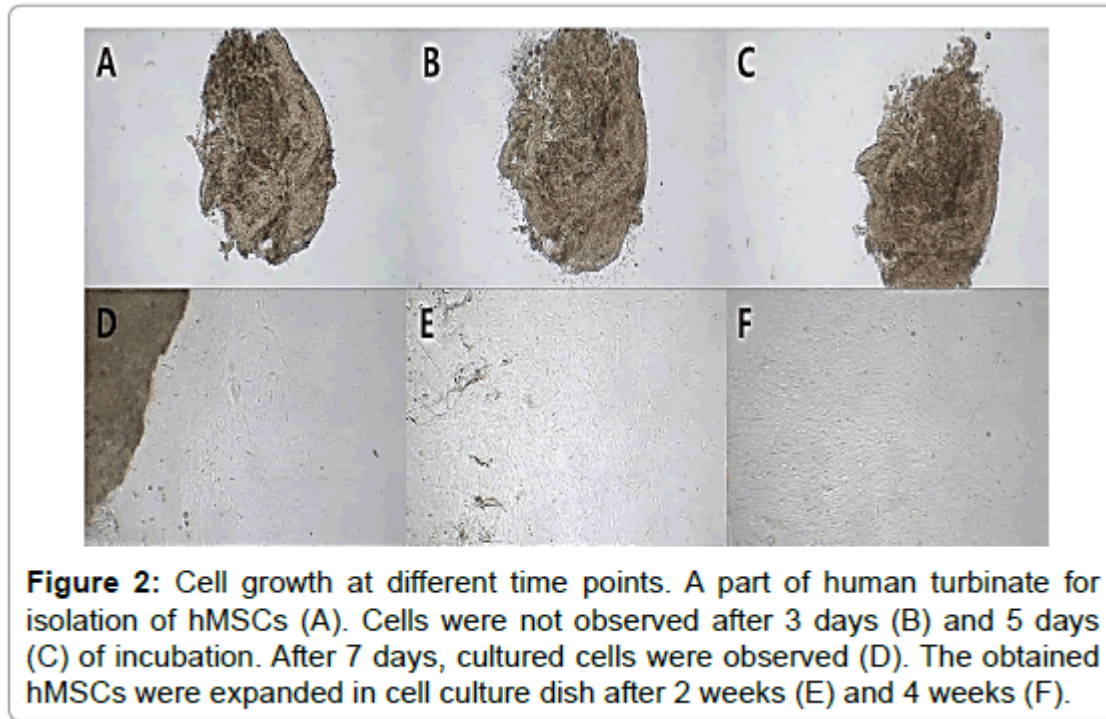


Figure 2: Cell growth at different time points. A part of human turbinate for isolation of hMSCs (A). Cells were not observed after 3 days (B) and 5 days (C) of incubation. After 7 days, cultured cells were observed (D). The obtained hMSCs were expanded in cell culture dish after 2 weeks (E) and 4 weeks (F).

Figure 2: Croissance cellulaire à différents moments. Une partie du cornet humain pour l'isolement des CSMh (A). Les cellules n'ont pas été observées après 3 jours (B) et 5 jours (C) d'incubation. Après 7 jours, des cellules cultivées ont été observées (D). Les CSMh obtenues ont été développées dans une boîte de culture cellulaire après 2 semaines (E) et 4 semaines (F).

Aux stades initiaux de la culture, les cellules entourant les tissus tels que les cornets, les amygdales et les polypes nasaux ont été façonnées différemment des CSM, tandis que les cellules étalées étaient semblables aux CSM. Notamment, les cellules du cartilage nasal ressemblaient à des CSM depuis le début. Après 4 semaines de culture, les cellules dérivées des tissus de l'échantillon ont été récoltées à partir des boîtes de culture, en utilisant une solution de trypsine-EDTA à 0,05%, et soumises à un passage. Les hMSC passés ont formé des colonies comme le montre la [figure3](#).

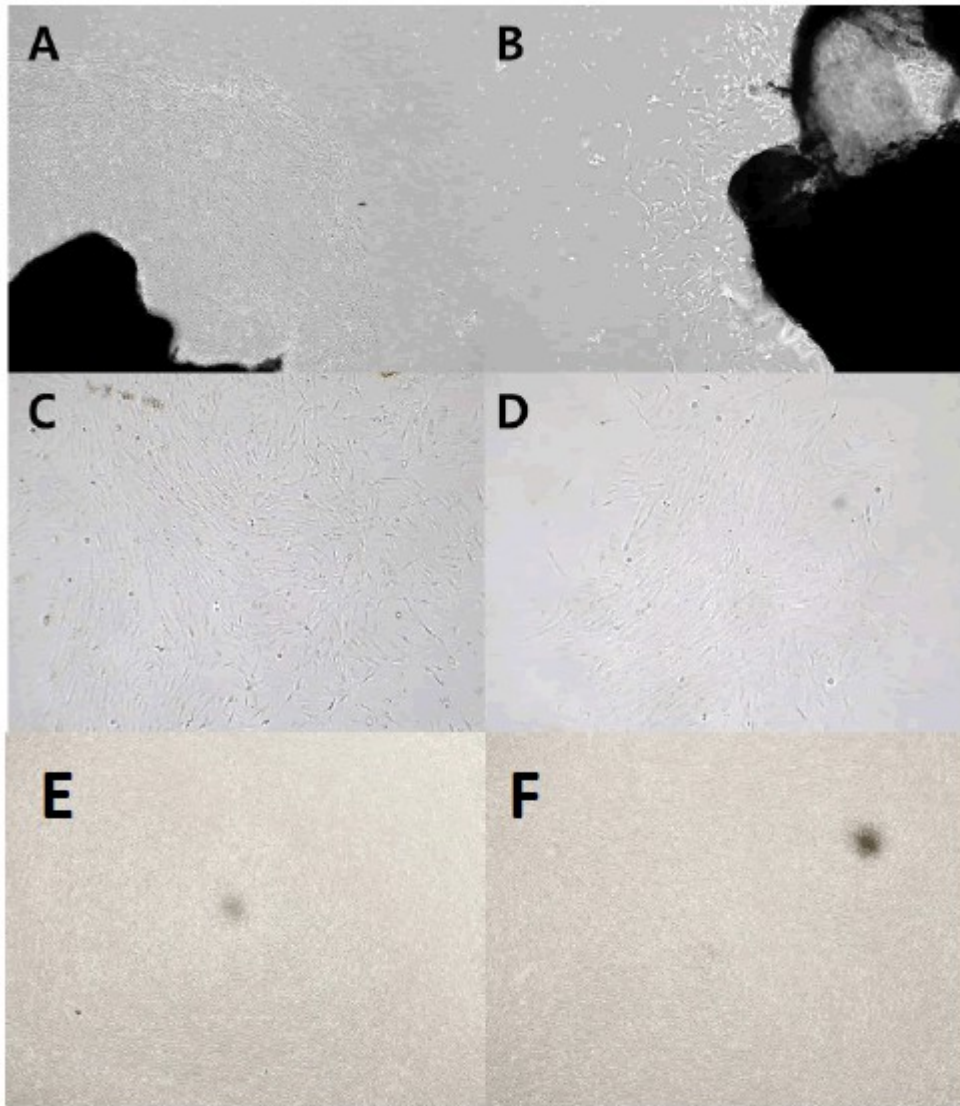


Figure 3: Morphology of cells derived from tissues. A. Cells derived from inferior turbinate after 7 days. These cells were differently shaped than MSCs. B. Cells derived from nasal cartilage of same donor after 7 days. C. After 20 days of culturing, cells resembled MSCs. D. Colony of hMSCs in culture.

Figure 3: Morphologie des cellules dérivées des tissus. A. Cellules dérivées du cornet inférieur après 7 jours. Ces cellules avaient une forme différente de celle des MSC. B.

Cellules dérivées du cartilage nasal du même donneur après 7 jours. Après 20 jours de culture, les cellules ressemblaient à des CSM. D. Colonie de CSM en culture.

Caractérisation des CSMh isolées

La coloration par immunofluorescence des CSMh pour les marqueurs de surface cellulaire tels que CD73, CD90 et CD105 a été réalisée pour la caractérisation.

Le résultat de l'immunocoloration a révélé que les cellules dérivées du cornet interne étaient positives pour CD73 et CD90 (**Figure 4**), qui est un phénotype caractéristique des CSM.

Les résultats positifs ont également été observés pour des cellules dérivées d'autres tissus tels que le cartilage nasal, les amygdales et le polype nasal.

Ces résultats suggèrent que les cellules dérivées du cornet inférieur, du cartilage septal nasal, de l'amygdale palatine et du polype nasal étaient en effet des CSMh.

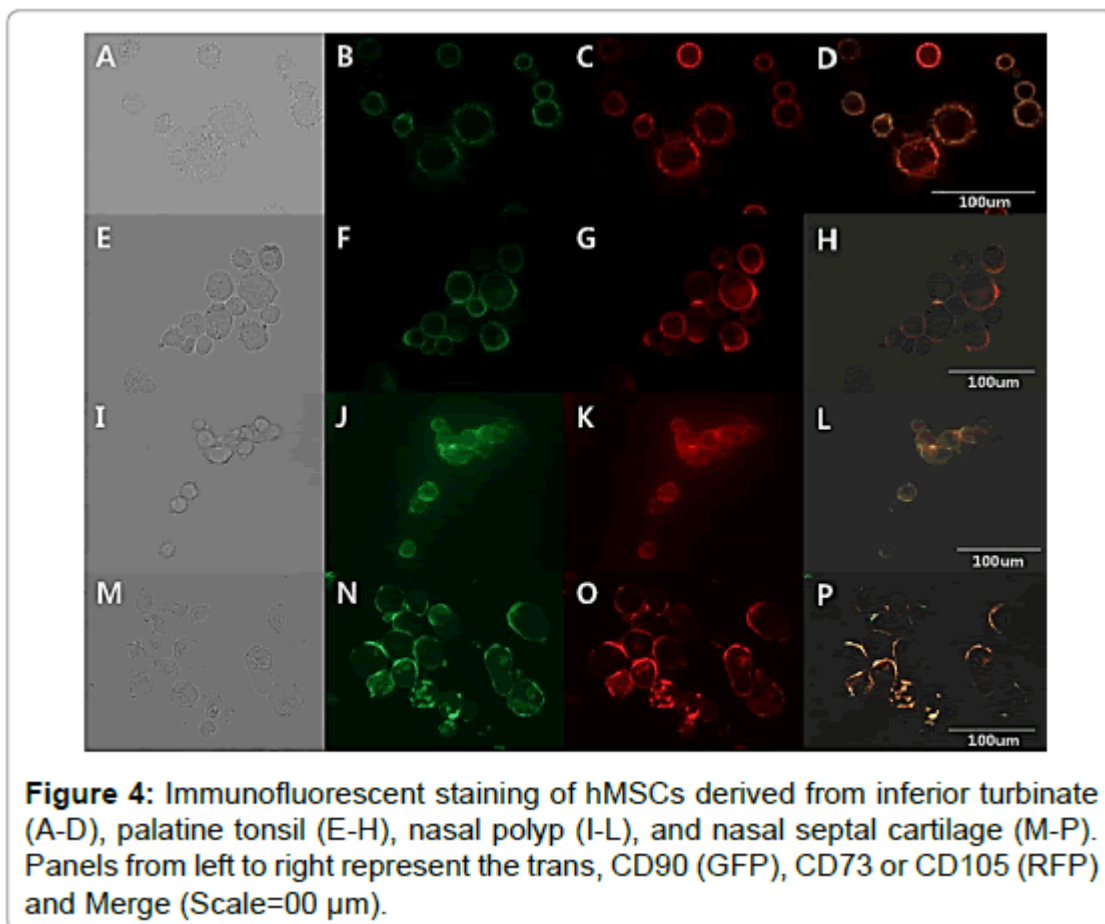


Figure 4: Coloration immunofluorescente des CSMh dérivés du cornet inférieur (DA), de l'amygdale palatine (EH), du polype nasal (IL) et du cartilage septal nasal (MP).

Les panneaux de gauche à droite représentent les trans, CD90 (GFP), CD73 ou CD105 (RFP) et Merge (Echelle = 00 μm).

Comparaison avec les méthodes conventionnelles d'extraction

des CSMh

Nous avons trouvé qu'il y avait des différences significatives entre la méthode appliquée par nous pour extraire des CSM dans cette étude et d'autres études publiées qui traitent de l'extraction de CSM de sources humaines et animales.

La plupart des procédures publiées extraient seulement une petite quantité de tissu de l'organe mère, alors que nous avons extrait une quantité considérable de tissu du site donneur dans cette étude.

De plus, bien que nous n'ayons pas pu trouver l'intervalle de temps exact entre les procédures d'extraction et l'incubation dans les études publiées, cet intervalle de temps est probablement compris entre 3 et 24 h, contrairement à pas plus de 30 min dans notre étude.

Discussion

Bien que les cellules des tissus cutanés soient considérées comme de bons candidats pour l'induction de CSPi, les HTSMC présentent plusieurs avantages par rapport aux fibroblastes dermiques humains, tels qu'une facilité d'accès et moins de complications (saignement moindre, anomalie du site donneur et disponibilité des tissus) [1].

De plus, les hTMSC ont des caractéristiques uniques telles qu'une accessibilité aisée, des taux de différenciation élevés et un bon taux de survie [2]. Dans cette étude, nous avons essayé d'optimiser l'extraction des hTMSC pour l'étude de l'induction de l'iPSC et de la différenciation neuronale à partir des tissus prélevés dans la cavité nasale pendant les procédures chirurgicales.

De nombreux chercheurs ont signalé la présence de muqueuse olfactive dans les hTMSC, provenant du nerf olfactif, c.-à-d.1 (nerf crânien numéro 1), qui est le seul nerf crânien exposé. Exposé, le nerf olfactif est un organe très vulnérable et les lésions de ce nerf entraînent une hyposmie et une anosmie chez un grand nombre de patients.

Bien que les hTMSC soient des candidats prometteurs pour l'induction de l'iPSC ou comme cellules donneuses pour de tels patients, seules quelques études utilisant des

hTMSC ont été rapportées [1,3].Le faible taux de succès de la différenciation des cellules souches et de l'induction de CSPi est un obstacle important auquel nous sommes actuellement confrontés.

Notre étude peut aider à résoudre ce problème, car en utilisant des hTMSCs pour la reprogrammation, il est possible d'obtenir les caractéristiques uniques des cellules neuronales et de résoudre le problème de nerf [régénération](#).Cela peut être dû au fait que les cellules olfactives sécrètent des matériaux uniques qui favorisent la différenciation neuronale [4].

Depuis la découverte des CSPi par Takahashi et al.[5], de nombreux chercheurs ont exploré les possibilités d'auto-renouvellement et de régénération de l'iPSC, des cellules souches embryonnaires et des cellules souches adultes, en utilisant la technologie TMSC [6-8].

En effet, Takahashi et al.non seulement introduit la technique iPSC mais aussi la différenciation neuronale dans leur étude [5].Les différentes méthodes actuellement employées dans ce domaine ont chacune leur propre avantage et inconvénient et sont les «cibles» d'une étude active par les chercheurs sur les cellules souches.Nous sommes d'avis que, indépendamment de ces handicaps, il est crucial de trouver un receveur optimal de cellules souches.

Les techniques de reprogrammation cellulaire peuvent en effet fournir un traitement pour des maladies difficiles à gérer, telles que les troubles allergiques [9].Enfin, nous suggérons que notre technique d'extraction et de culture de hTMSC et les données présentées dans cette étude fourniront une méthode efficace pour l'extraction de cellules souches.

Les références (traduction)

- 1.Ono M, Y Hamada, Y Horiuchi, Matsuo-Takasaki M, Imoto Y, et al. (2012)[Génération de cellules souches pluripotentes induites à partir de cellules épithéliales nasales humaines en utilisant un vecteur virus sendai.PLoS ONE 7: e42855.](#)
- 2.Hwang SH, Parc SH, Choi J, Lee DC, Oh JH, et al (2014).[Caractéristiques des cellules souches mésenchymateuses provenant du cornet inférieur bilatéral chez les humains présentant une déviation septale nasale.PLoS ONE 9: e100219.](#)

3. Ashley A, Christopher NM, Jason D, Gurijit K, Khurana H, et al. (2016). Cultiver les cellules épithéliales nasales primaires des enfants et reprogrammer en cellules souches pluripotentes induites J Vis Exp 109.
4. Ge L, Jiang M, D Duan, Wang Z, Qi L, et al. (2016) Secretome de la cellule souche mésenchymateuse muqueuse olfactive une cellule souche à potentiel multiple. Stem Cell Int 2016: 1243659.
5. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, et al. (2007) Induction de cellules souches pluripotentes à partir de fibroblastes humains adultes par des facteurs définis. Cellule 131: 861-872.
6. Kwon JS, Kim SW, Kwon DY, Park SH, Fils AR, et al. (2014) Différenciation ostéogénique *in vivo* de cellules souches mésenchymateuses humaines turbinées dans un hydrogel injectable *in situ*. Biomatériaux 35: 5337-5346.
7. Hou J, Moccia J, Riedel M (2015) épithélium Airway et ses cellules souches et progénitrices spécifiques à la région Technologies des cellules souches Inc.
8. Meirelles LS, Chagastelles PC, Nardi NB (2006). Les cellules souches mésenchymateuses résident dans pratiquement tous les organes et tissus post-natals J Cell Sci 119: 2204-2213.
9. Sun YQ, Deng MX, He J, Zeng QX, Wen W, et al. (2012) Les cellules souches mésenchymateuses dérivées de cellules souches pluripotentes humaines préviennent l'inflammation allergique des voies aériennes chez la souris Cellules souches 30: 2692-2699.