

# ARSF5011122

## Certificat d'analyse

---

<b>Clone caractérisé :</b>	ARSF5011122 clone 25
<b>Description :</b>	Cellules souches humaines induites à la pluripotence
<b>Statut juridique :</b>	Pour la recherche seulement. Non commercialisable.
<b>Chercheur requérant :</b>	Dr François Gros-Louis
<b>Institution :</b>	CMDGT/LOEX
<b>Cellules d'origine et description :</b>	ARSF5011122 ; PBMC
<b>Pathologie :</b>	Ataxie récessive spastique de Charlevoix-Saguenay (ARSACS)
<b>Information sur le donneur :</b>	Femme
<b>Méthode de reprogrammation :</b>	Expression des gènes Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc via le virus de Sendai
<b>% d'efficacité de reprogrammation :</b>	0,51% (Figure 1)
<b>Recommandation pour la décongélation</b>	Un cryovial dans 2 pétris de 35mm + 10µM de <i>Rock Inhibitor</i> Y-27632 ou CEPT <sup>1</sup>
<b>Conditions de cultures :</b>	Milieu : mTeSR™ Plus (StemCell Technologies; 05826) Matrice : Matrigel™ hESC-Qualified Matrix (Corning; 08-774-552) Passage : à l'EDTA (0,5mM, Invitrogen; AM9260G) Environnement : 37°C, 5% CO <sub>2</sub> , >95% RH

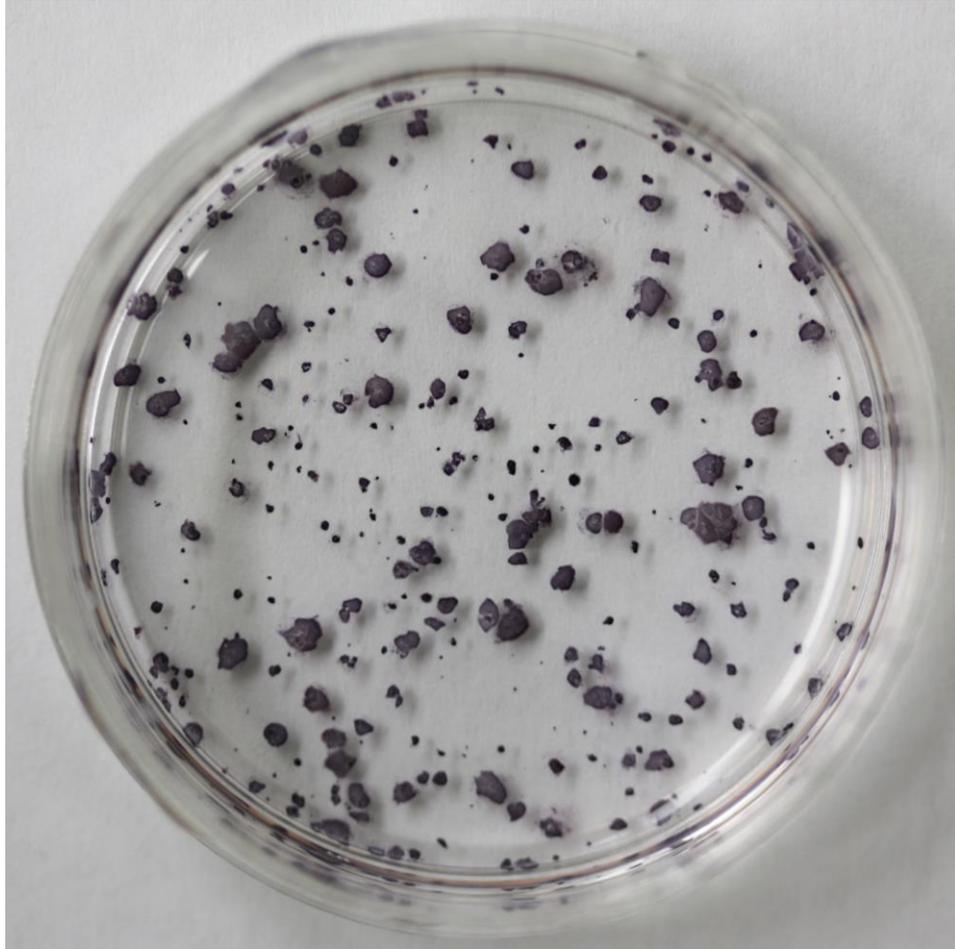
1. Chen Y, Tristan CA, Chen L, Jovanovic VM, Malley C, Chu PH, et al. A versatile polypharmacology platform promotes cytoprotection and viability of human pluripotent and differentiated cells. Nat Methods. 2021.

Tableau 1: Caractérisation du clone ARSF50111122 clone 25

Description du test	Méthode	Résultats attendus	Résultats
<b>Test de décongélation</b>	Observation microscope	Au moins 30% de confluence après 3 jours de culture	Réussi (Figure 2)
<b>Expression de protéines associées à la pluripotence</b>	Immunofluorescence	Majorité des cellules exprimant les marqueurs intracellulaires (NANOG, POU5F1) et ceux de surfaces (TRA-1-81, SSEA4)	Réussi (Figure 3)
<b>Quantification de protéines associées à la pluripotence<sup>1</sup></b>	Cytométrie en flux	Marqueurs de surface SSEA4 ≥ 70% TRA-1-60 ≥ 70% TRA-1-81 ≥ 70% Marqueurs intracellulaires NANOG ≥ 50% SOX2 ≥ 70% POU5F1 ≥ 70%	Réussi (Figure 4)
<b>Quantification de l'expression des gènes spécifiques à la pluripotence</b>	RT-qPCR	Expression positive pour les 9 gènes suivants : <i>DNMT3B, TERT, ZFP42, TDGF1, UTF1, LIN28A, GDF3, DPP5A</i> et <i>FOXD3</i> .	Réussi (Figure 5)
<b>Différenciation dans les 3 feuillets embryonnaires</b>	Différenciation dirigée <sup>2</sup>	Surexpression de gènes associés aux 3 feuillets embryonnaires	Réussi (Figure 6)
<b>Détection des mycoplasmes<sup>3</sup></b>	MycStrip™	Mycoplasmes non détectés	Réussi
<b>Détection du génome viral du Sendai</b>	RT-PCR	Aucune détection après 2 mois de culture	Réussi
<b>Empreinte génétique</b>	Microsatellites	Identiques à la lignée cellulaire d'origine	Réussi (Tableau 2)
<b>Caryotypage</b>	Caryotype moléculaire avec Karyostat+™	Aucun gain ou perte	Normal (Figure 7)

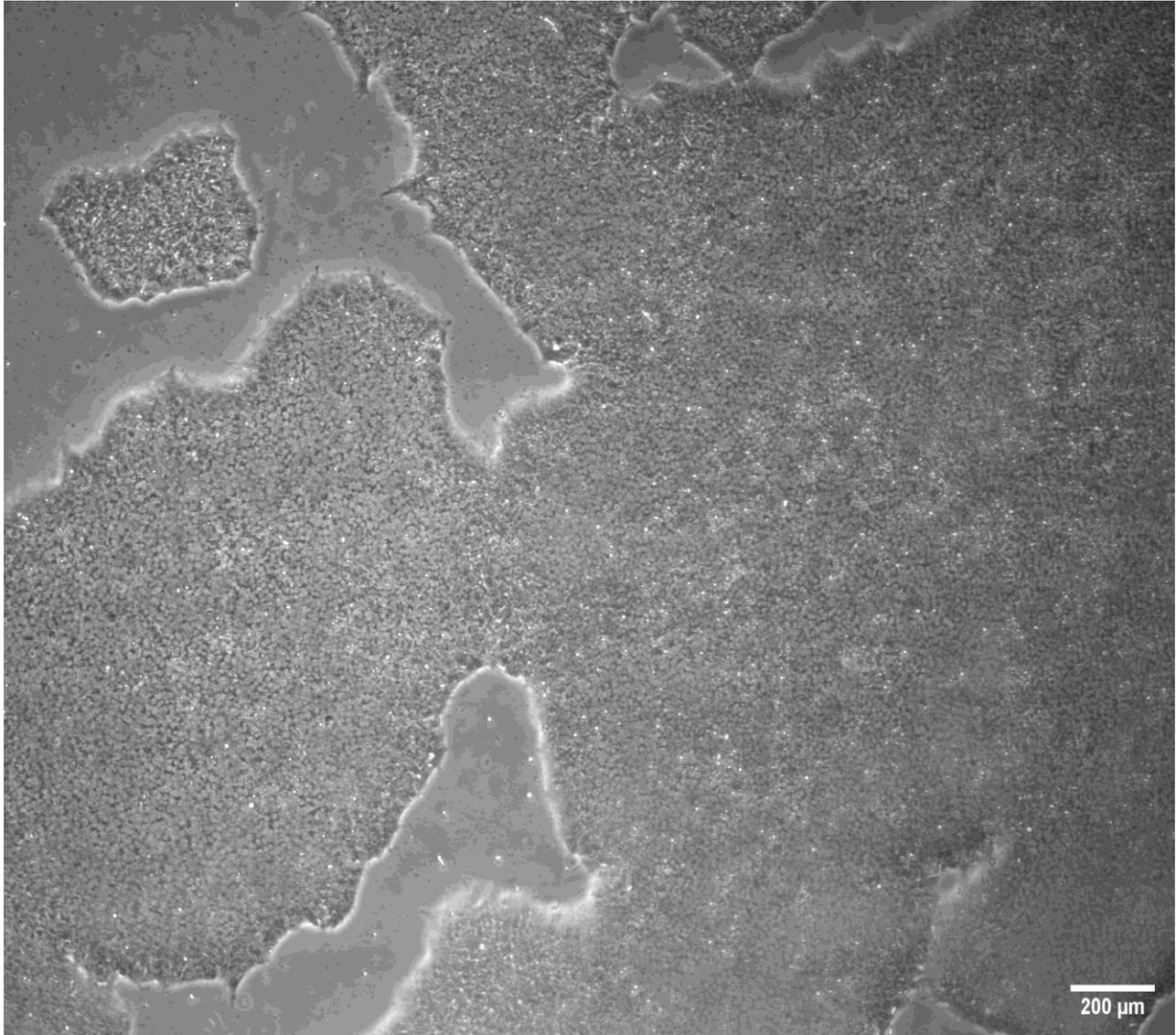
1. Baghbaderani, BA, *et al.*, Detailed Characterization of Human Induced Pluripotent Stem Cells Manufactured for Therapeutic Applications, *Stem Cell Rev and Rep*, (2016), 12:394–420.
2. Utilisation de StemMACS™ Trilineage Differentiation kit, Miltenyi Biotec; cat# 130-115-660.
3. MycoStrip™-Mycoplasma Detection Kit, InvivoGen; cat# rep-mysnc-100.

## Alkaline Phosphatase



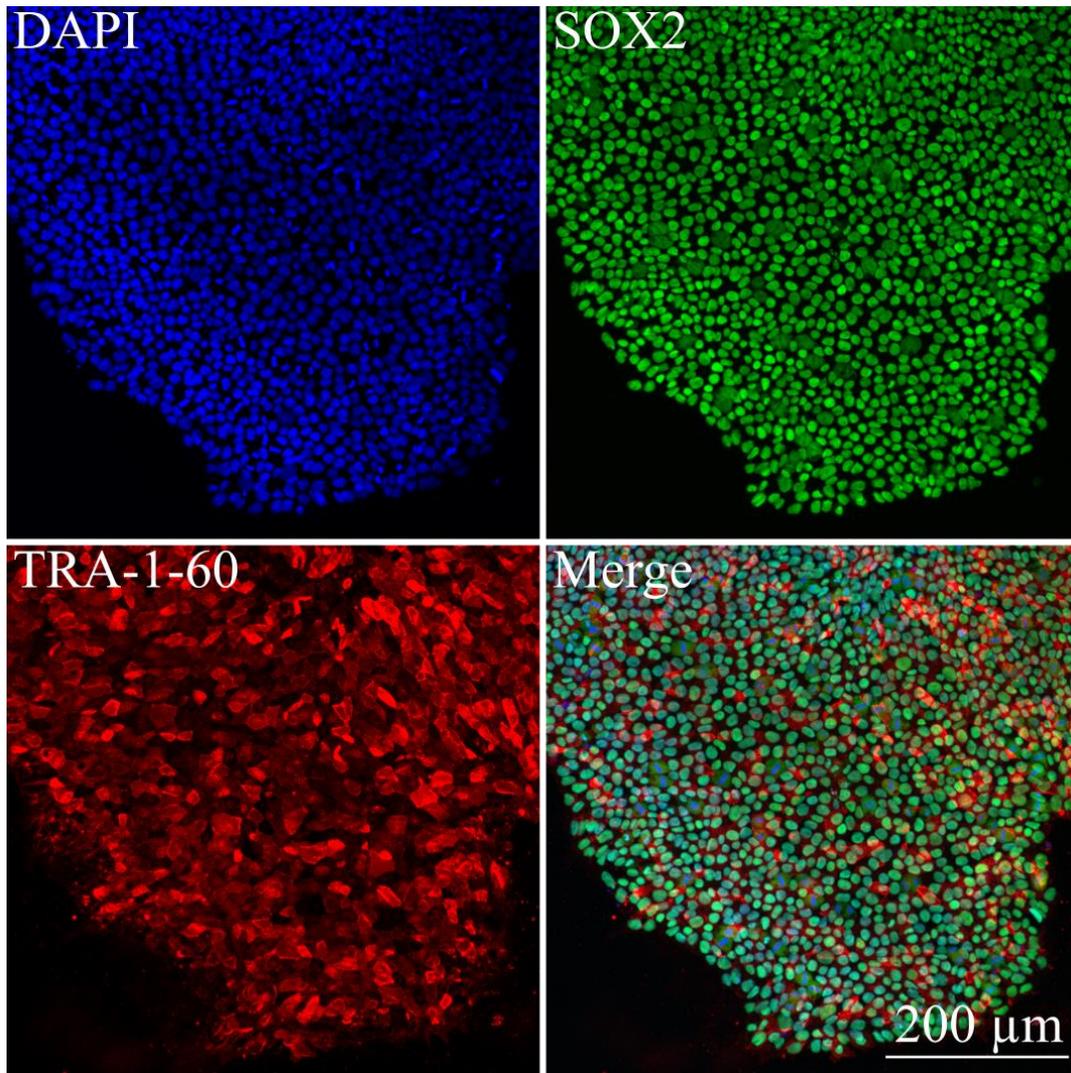
**Figure 1** : Fixation et coloration à l'alkaline phosphatase des clones d'iPSCs obtenus durant la reprogrammation au virus du Sendaï. Un total de 60 000 cellules transduites ont été ensemencées dans un 35mm. Les clones positifs à l'alkaline phosphatase ont été comptés avec ImageJ.

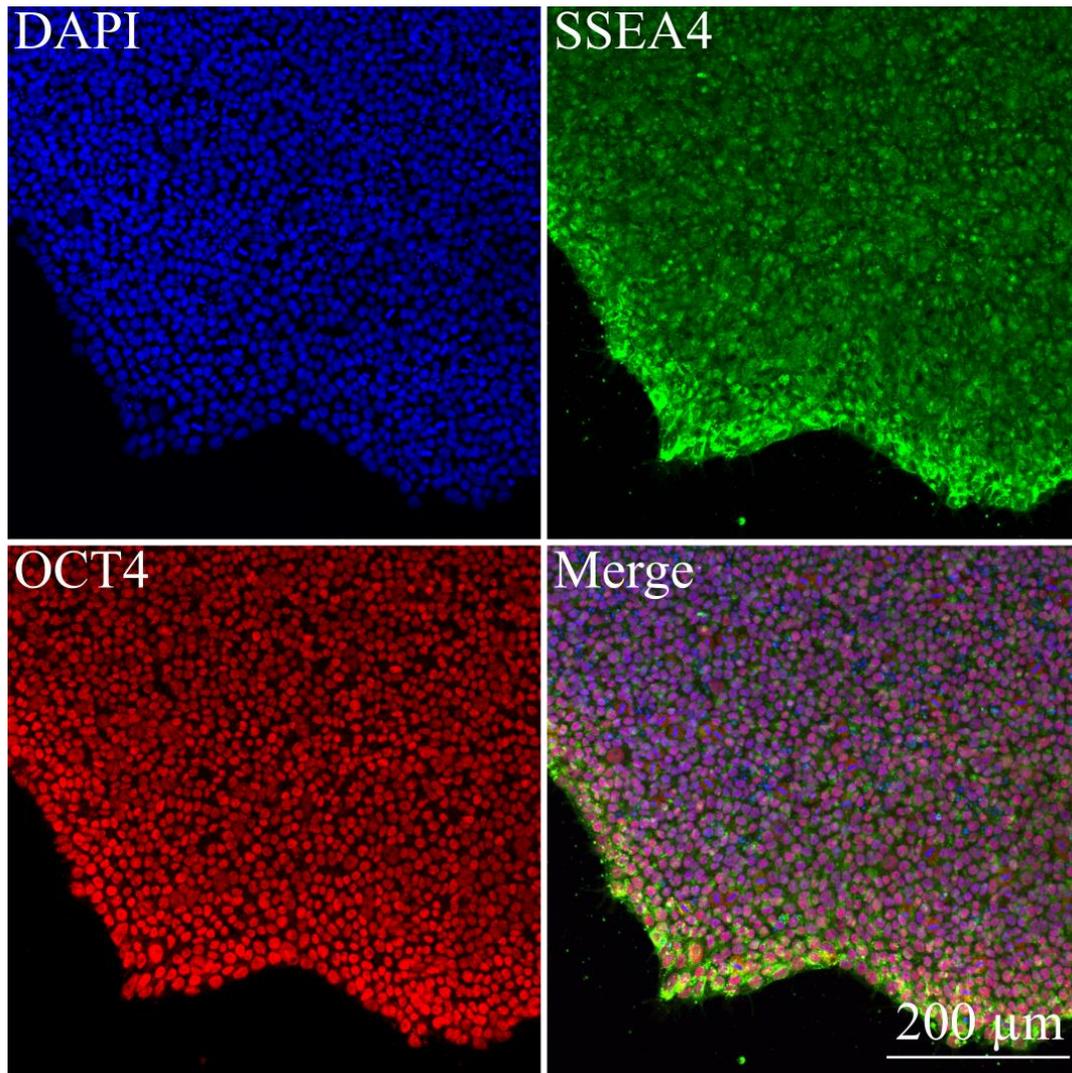
## Observation microscope



**Figure 2:** Morphologie des iPSC ARSF50111122 clone 25 ; 7 jours suivant la décongélation.

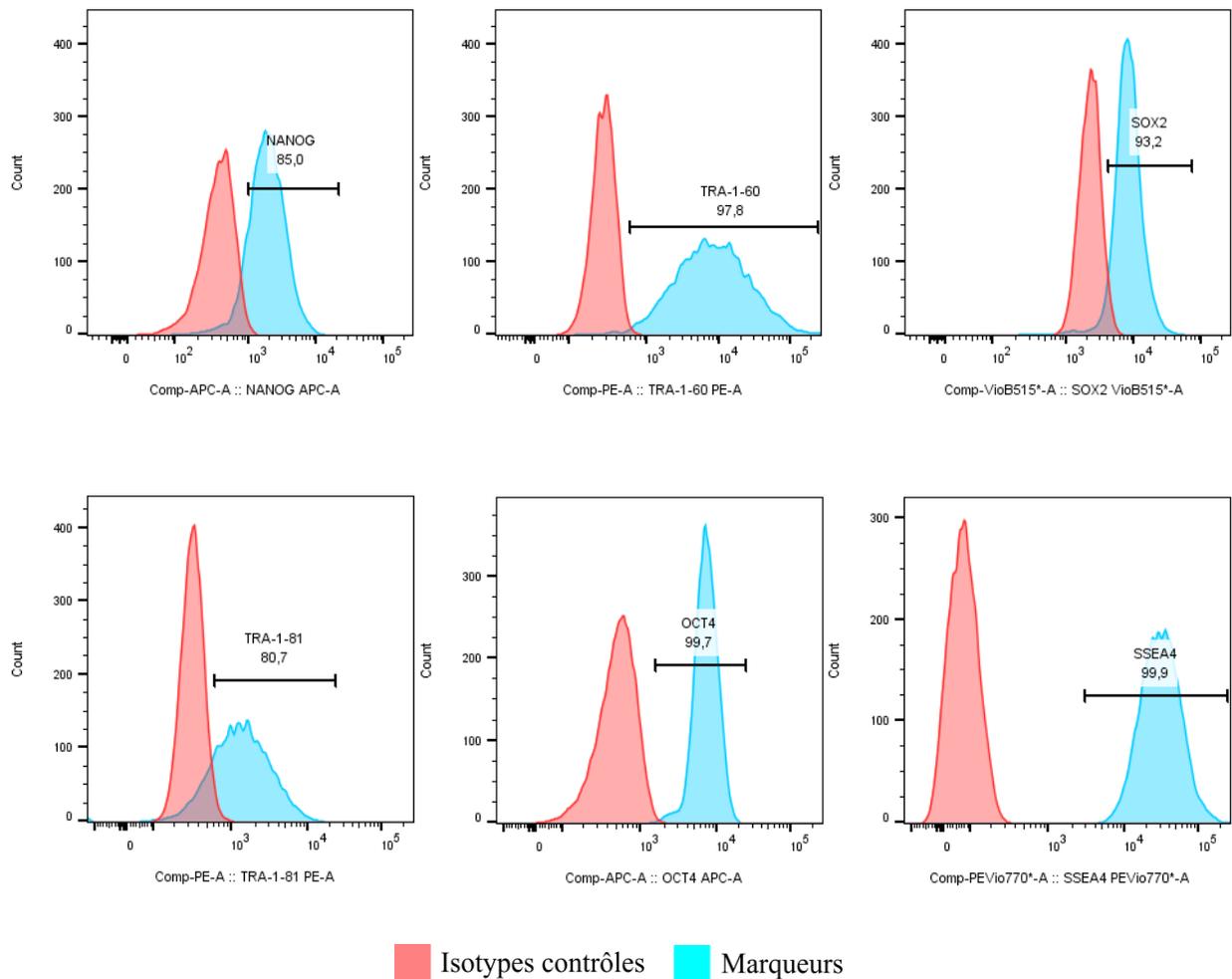
## Immunofluorescence



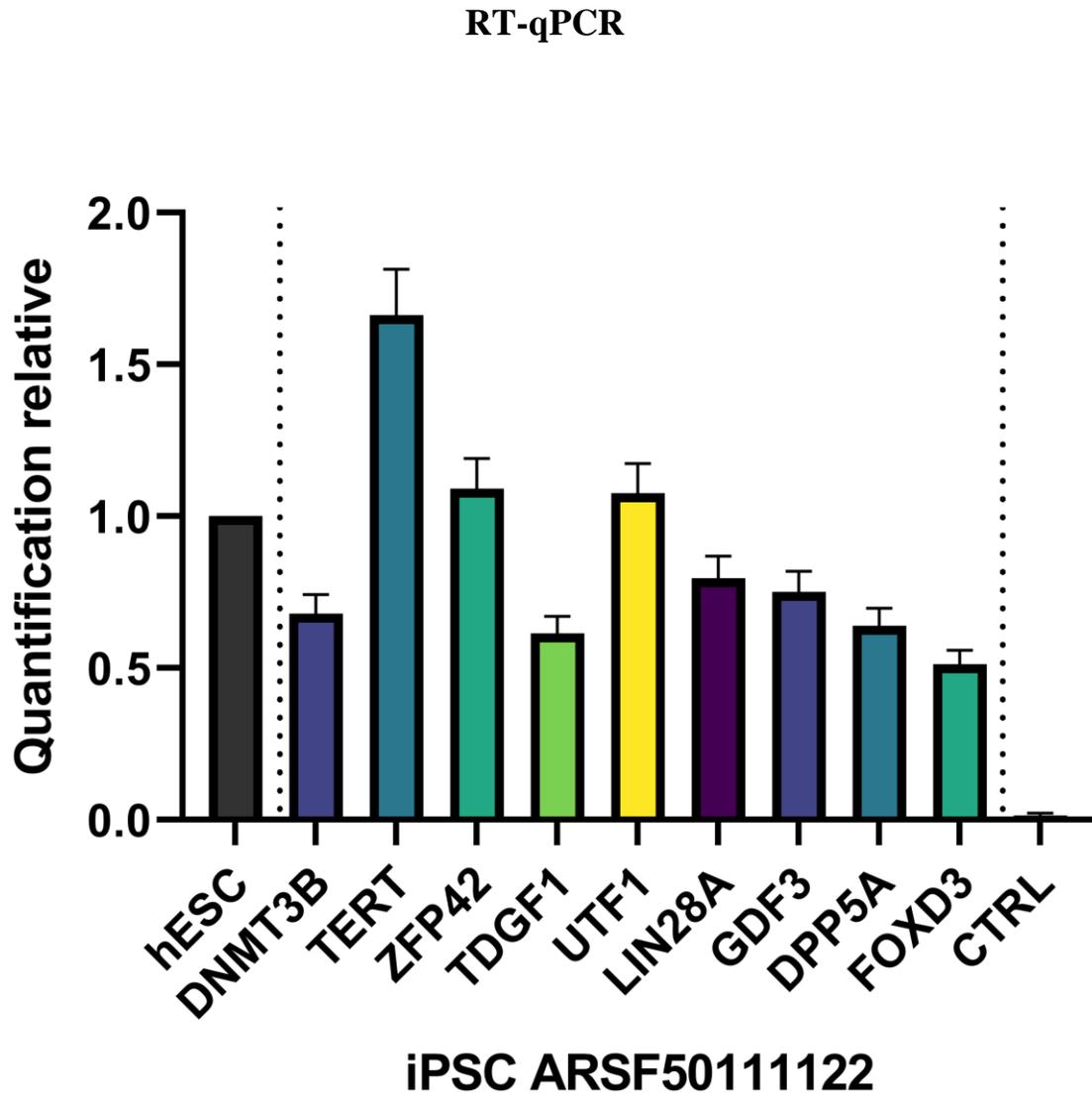


**Figure 3:** Expression de 4 protéines associées à la pluripotence par immunofluorescence. Les noyaux sont représentés par le DAPI.

## Cytométrie en flux

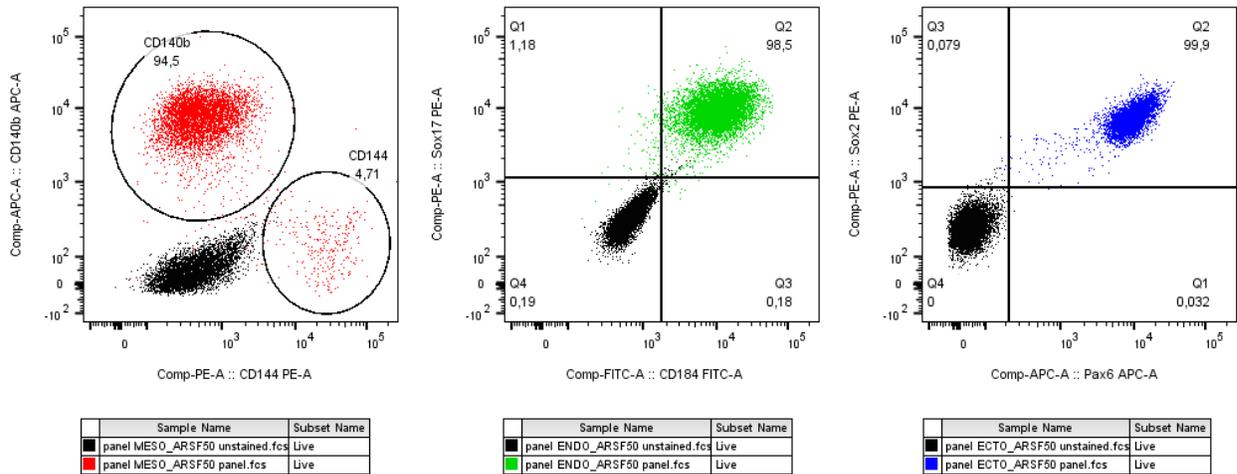


**Figure 4:** Expression de protéines associées à la pluripotence par cytométrie en flux des iPSC ARSF50111122 clone 25.



**Figure 5** : Expression relative en fonction de cellules souches embryonnaires H1. Les résultats ont été normalisés avec 3 gènes de références : *GAPDH*, *YWHAZ* et *C1orf43*. Les cellules parentales des iPSC ont été sélectionnées comme contrôle négatif (CTRL).

## Différentiation dirigée dans les 3 feuillets



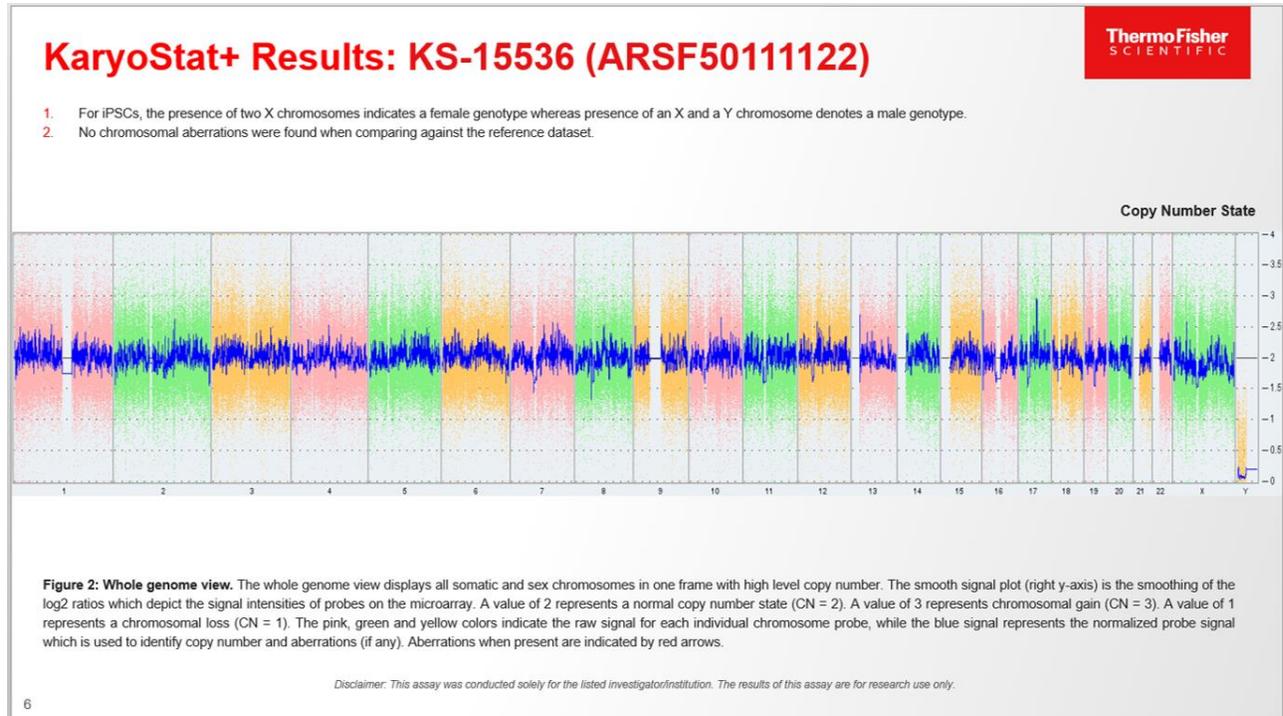
**Figure 6 :** Cytométrie en flux des iPSC ARSF50111122 clone 25 après 7 jours de différenciation dirigée en 2D.

## Microsatellites

**Tableau 2 :** Résultats de 9 marqueurs de microsatellites et du gène de l'amélogénine pour la détermination du sexe des échantillons. Ces résultats ont été générés par Génome Québec.

	<b>PBMC ARSF50111122</b>		<b>iPSC ARSF50111122 clone 25</b>	
<b>AMEL</b>	X		X	
<b>CSF1PO</b>	11	12	11	12
<b>D13S317</b>	11	12	11	12
<b>D16S539</b>	12	14	12	14
<b>D21S11</b>	28	30	28	30
<b>D5S818</b>	12	14	12	14
<b>D7S820</b>	10	11	10	11
<b>TH01</b>	6		6	
<b>TPOX</b>	11		11	
<b>vWA</b>	16		16	

## Karyostat+



**Figure 7 :** Caryotype des iPSC ARSF5011122 clone 25 à P4. Ces résultats ont été générés par ThermoFisher Scientific. Résolution de > 1Mb.

**Avertissements:**

Les cellules distribuées par la plateforme de production de cellules souches du CRCHU de Québec sont destinées à l'utilisation en recherche fondamentale et ne sont pas destinées à l'utilisation chez l'humain.

Des mesures de biosécurité adéquates doivent être suivies afin de travailler avec ces cellules. L'utilisateur final est le seul responsable de s'assurer que ces cellules sont manipulées et entreposées de manières appropriées. La plateforme de production de cellules souches du CRCHU de Québec n'est pas responsable des dommages ou blessures qui pourraient résulter de l'utilisation de ces cellules.

Approuvé par :



\_\_\_\_\_  
Laurie Martineau, MSc  
Responsable de la plateforme

01-06-2023

\_\_\_\_\_  
Date



\_\_\_\_\_  
François Gros-Louis, Ph.D.  
Directeur

01-06-2023

\_\_\_\_\_  
Date

