

ARSM47280521

Certificat d'analyse

Clone caractérisé :	ARSM47280521 clone 7
Description :	Cellules souches humaines induites à la pluripotence
Statut juridique :	Pour la recherche seulement. Non commercialisable.
Chercheur requérant :	Dr François Gros-Louis
Institution :	CMDGT/LOEX
Cellules d'origine et description :	ARSM47280521 ; Fibroblastes
Pathologie :	L'ataxie récessive spastique de Charlevoix-Saguenay (ARSACS)
Information sur le donneur :	Homme
Méthode de reprogrammation :	Expression des gènes Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc via le virus de Sendai
% d'efficacité de reprogrammation :	2.98% (Figure 1)
Recommandation pour la décongélation	Un cryovial dans 2 pétris de 35mm + 10µM de <i>Rock Inhibitor</i> Y-27632 ou CEPT ¹
Conditions de cultures :	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% CO2, >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 ARSM47280521 clone 7

Description du test	Méthode	Résultats attendus	Résultats
Test de décongélation	Observation microscope	Au moins 50% de confluence après 3 jours de culture	Réussi (Figure 2)
Expression de protéines associées à la pluripotence	Immunofluorescence	Majorité des cellules exprimant les marqueurs intracellulaires (NANOG, POU5F1) et ceux de surfaces (TRA-1-81, SSEA4)	Réussi (Figure 3)
Quantification de protéines associées à la pluripotence¹	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)
Quantification de l'expression des gènes spécifiques à la pluripotence	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)
Différenciation dans les 3 feuillets embryonnaires	Corps embryoides spontanés et hPSC Scordcard™ Panel ²	Surexpression de gènes associés aux 3 feuillets embryonnaires	Réussi (Figure 6)
Détection des mycoplasmes³	MycStrip™	Mycoplasmes non détectés	Réussi
Détection du génome viral du Sendai	RT-PCR	Aucune détection après 2 mois de culture	Positif**
Empreinte génétique	Microsatellites	Identiques à la lignée cellulaire d'origine	Réussi (Tableau 2)
Caryotypage	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. Tsanlov, Am, *et al.*, A qPCR scorecard quantifies the differentiation potential of human pluripotent stem cells, *Nat Biotechnol*, (2015), 33:1182-92.

3. MycoStrip™-Mycoplasma Detection Kit, InvivoGen; cat# rep-mysnc-100.

Ça se découvre ici.

Centre de recherche du CHU de Québec-Université Laval
1401, 18^e rue, Québec, Canada, G1J 1Z4 • 418 525-4444

** Nous observons la persistance du virus de Sendai dans cette lignée iPSC par RT-PCR.

En effet, une expression résiduelle des facteurs de reprogrammation est observée pour ce clone spécifique dérivé de la lignée iPSC. Le RT-PCR est fait sur de l'ADNc isolé de ce clone cultivé à passage 8, encore considéré comme étant à bas passage. Il arrive parfois qu'il y ait une expression résiduelle à bas passage. Il est suggéré de cultiver les cellules à 38°C-39°C pendant 5 jours afin d'éliminer cette expression et la persistance du virus de Sendai dans les cultures. Ci-joint, le manuel du [Cytotune](#) : regardez les pages 48 à 50 pour plus de plus amples informations.

Alkaline Phosphatase

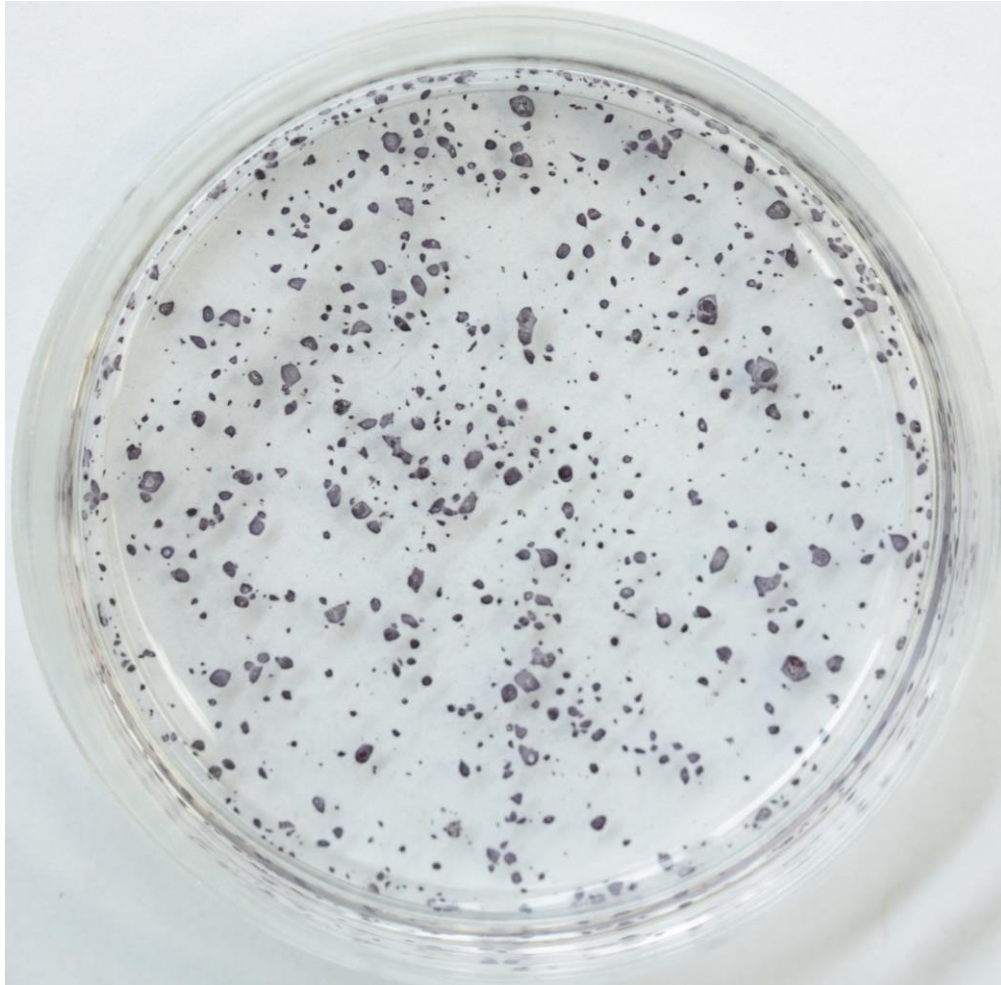


Figure 1 : Fixation et coloration à l'alkaline phosphatase des clones d'iPSCs obtenus durant la reprogrammation au virus du Sendai. Un total de 25 000 cellules transduites ont été ensemencées dans un 35mm. Les clones positifs à l'alkaline phosphatase ont été comptés avec ImageJ.

Observation microscope

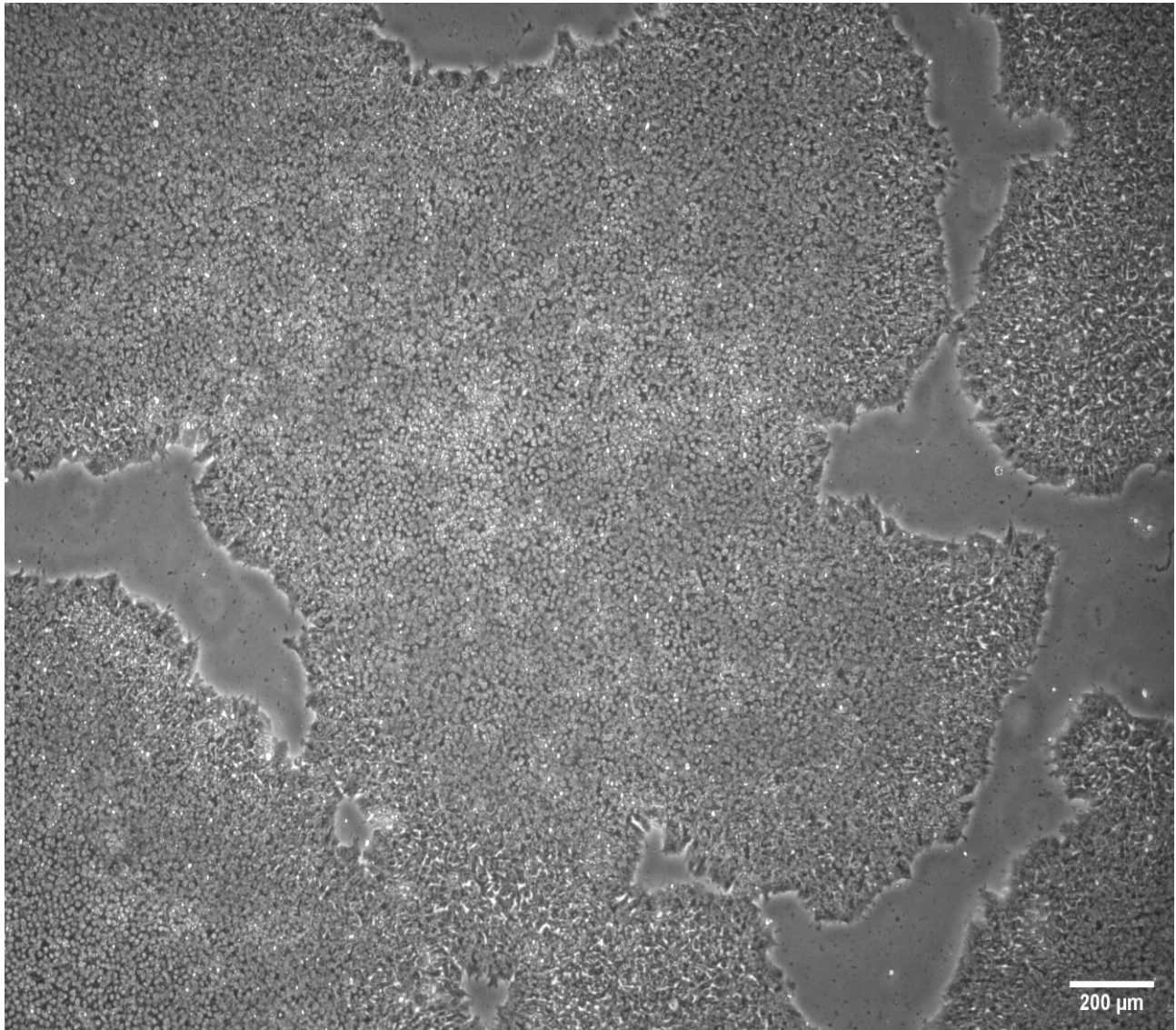
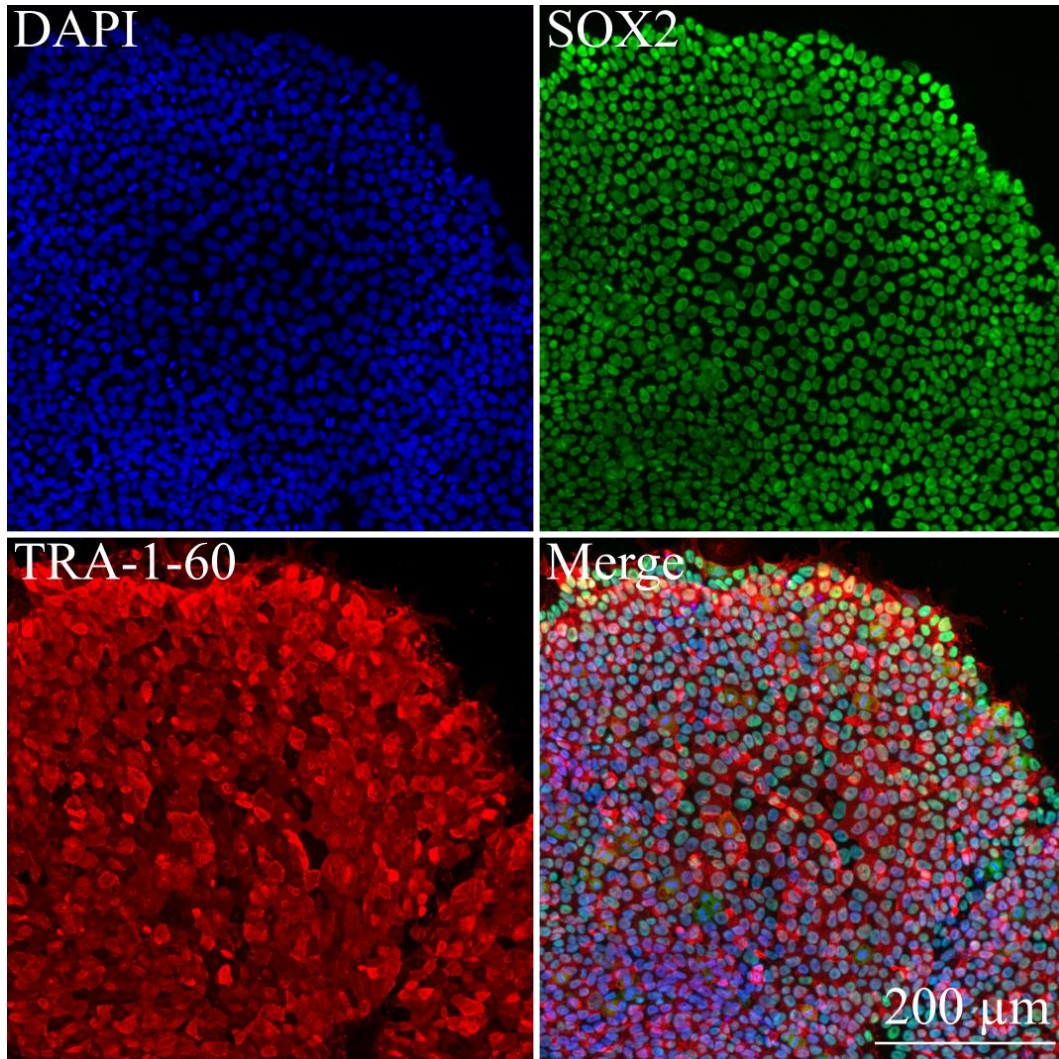


Figure 2: Morphologie des iPSC ARSM47280521-7 ; 4 jours suivant la décongélation.

Immunofluorescence



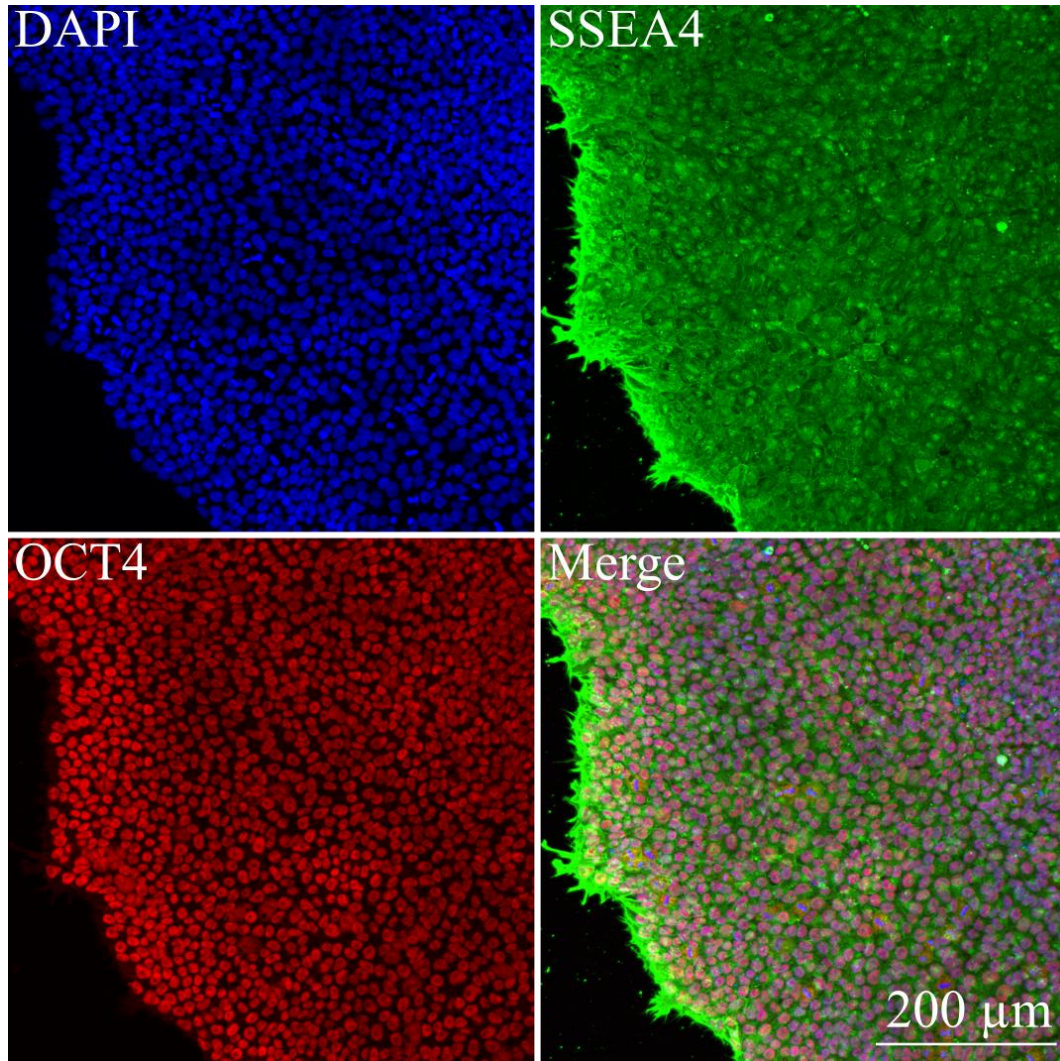


Figure 3: Expression de 4 protéines associées à la pluripotence par immunofluorescence. Les noyaux sont représentés par le DAPI.

Cytométrie en flux

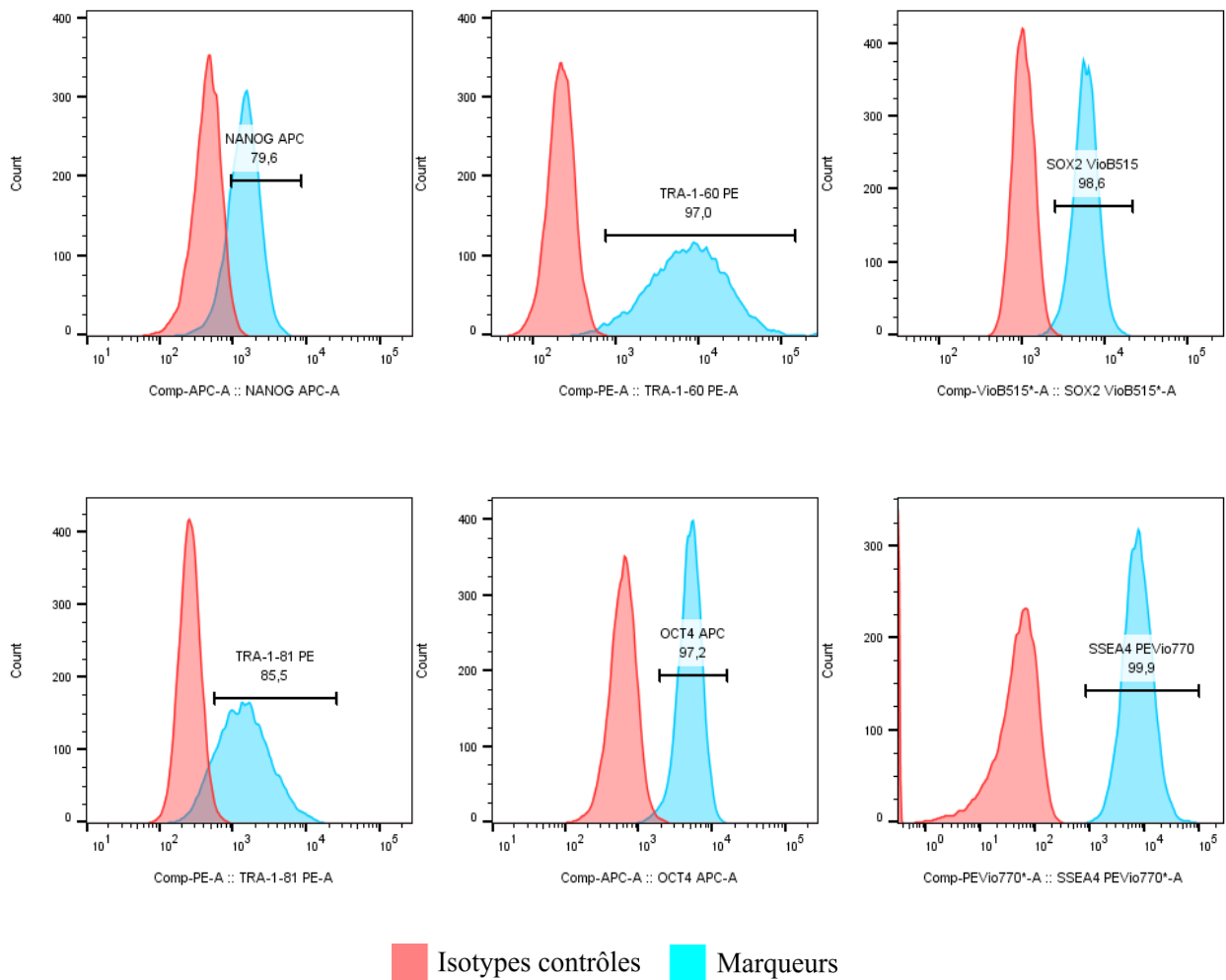


Figure 4: Expression de protéines associées à la pluripotence par cytométrie en flux des iPSC ARSM47280521 clone 7.

RT-qPCR

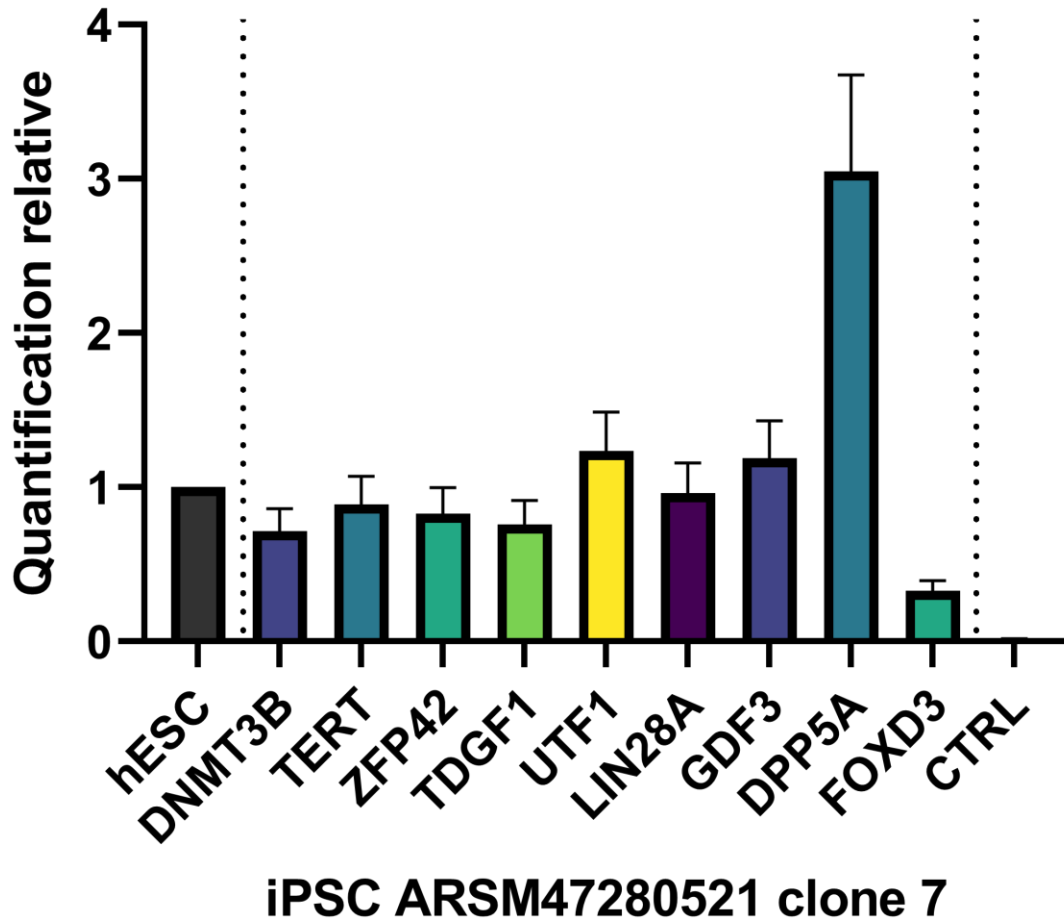
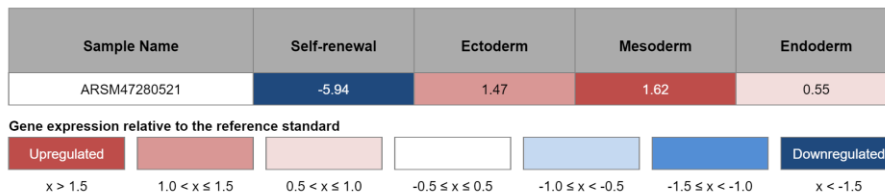


Figure 5 : Expression relative en fonction de cellules souches embryonnaires H1. Les résultats ont été normalisés avec 3 gènes de références : *GAPDH*, *YWHAZ* et *C1orf43*. Les cellules parentales des iPSC ont été sélectionnées comme contrôle négatif (CTRL).

hPSC Scorecard™ Panel

a)

Scores are a statistical comparison of the expression profile of the sample to that of the undifferentiated reference set



b)

Colors correlate to the fold change in expression of the indicated gene relative to the undifferentiated reference set.

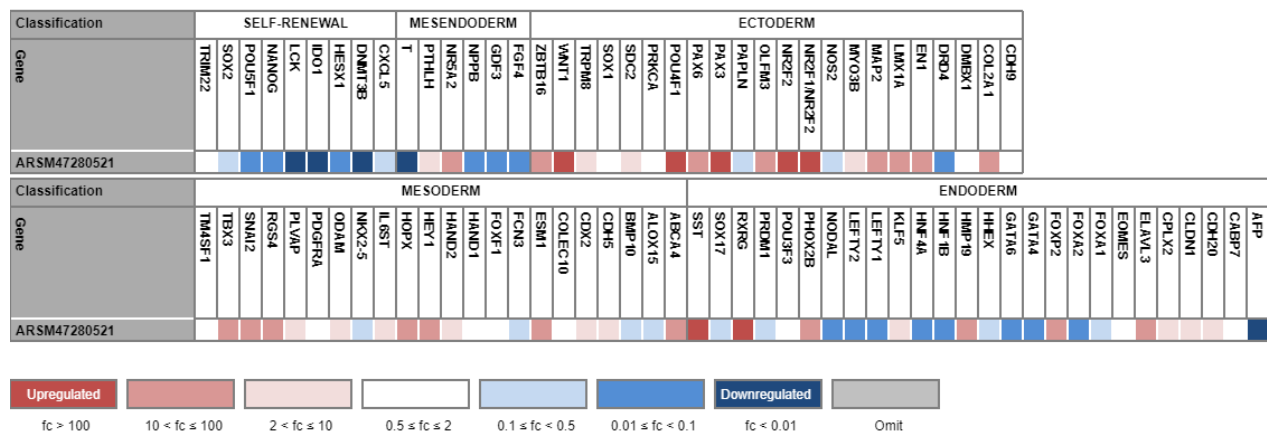


Figure 6 : a) Score et b) changement de l'expression génique de gènes des 3 feuillet embryonnaires en fonction d'un groupe de 23 lignées de cellules souches pluripotentes non différenciées. Les corps embryonnaires ont été différenciés en suspension pendant 23 jours.

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.

	Fibro ARSM47280521		iPSC ARSM47280521 clone 7	
AMEL	X	Y	X	Y
CSF1PO	11	12	11	12
D13S317	12		12	
D16S539	13		13	
D21S11	28	30	28	30
D5S818	12	14	12	14
D7S820	9	11	9	11
TH01	8	9	8	9
TPOX	8	11	8	11
vWA	14	18	14	18

Karyostat+

KaryoStat+ Results: KS-14671 (ARSM47280521)

ThermoFisher
SCIENTIFIC

1. For iPSCs, the presence of two X chromosomes indicates a female genotype whereas presence of an X and a Y chromosome denotes a male genotype.
2. No chromosomal aberrations were found when comparing against the reference dataset.

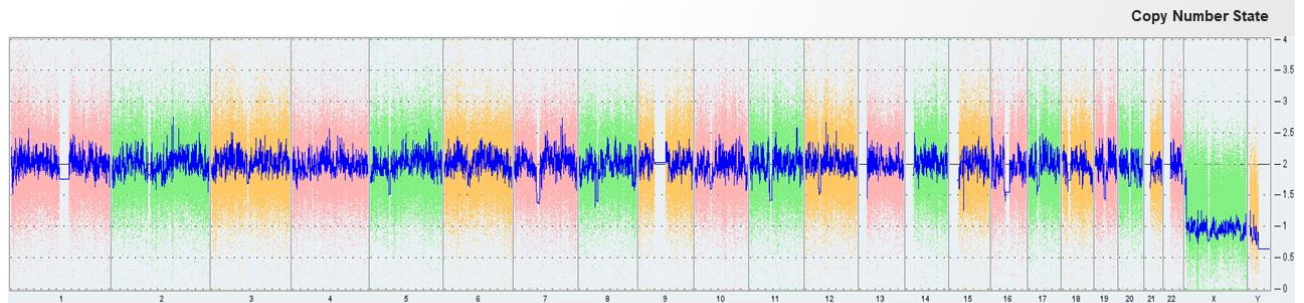


Figure 4: Whole genome view. The whole genome view displays all somatic and sex chromosomes in one frame with high level copy number. The smooth signal plot (right y-axis) is the smoothing of the log2 ratios which depict the signal intensities of probes on the microarray. A value of 2 represents a normal copy number state (CN = 2). A value of 3 represents chromosomal gain (CN = 3). A value of 1 represents a chromosomal loss (CN = 1). The pink, green and yellow colors indicate the raw signal for each individual chromosome probe, while the blue signal represents the normalized probe signal which is used to identify copy number and aberrations (if any). Aberrations when present are indicated by red arrows.

Disclaimer: This assay was conducted solely for the listed investigator/institution. The results of this assay are for research use only.

8

Figure 7 : Caryotype des iPSC ARSM47280521 clone 7 à P6. 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

25-04-2023

Date



François Gros-Louis, Ph.D.
Directeur

25-04-2023

Date