

ARSF29170521

Certificat d'analyse

Clone caractérisé :	ARSF29170521 clone 1
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 :	ARSF29170521 ; PBMC
Pathologie :	L'ataxie récessive spastique de Charlevoix-Saguenay (ARSACS)
Information sur le donneur :	Femme
Méthode de reprogrammation :	Expression des gènes Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc via le virus de Sendai
% d'efficacité de reprogrammation :	N.D.
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 ARSF29170521 clone 1

Description du test	Méthode	Résultats attendus	Résultats
Test de décongélation	Observation microscope	Au moins 50% de confluence après 3 jours de culture	Réussi (Figure 1)
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 2)
Quantification de protéines associées à la pluripotence¹	Cytométrie en flux	Marqueurs de surface SSEA4 \geq 70% TRA-1-60 \geq 70% TRA-1-81 \geq 70% Marqueurs intracellulaires NANOG \geq 50% SOX2 \geq 70% POU5F1 \geq 70%	Réussi (Figure 3)
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 4)
Différenciation dans les 3 feuillets embryonnaires	Corps embryoïdes spontanés et hPSC Scordcard™ Panel ²	Surexpression de gènes associés aux 3 feuillets embryonnaires	Réussi (Figure 5)
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 6)

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.

Observation microscope

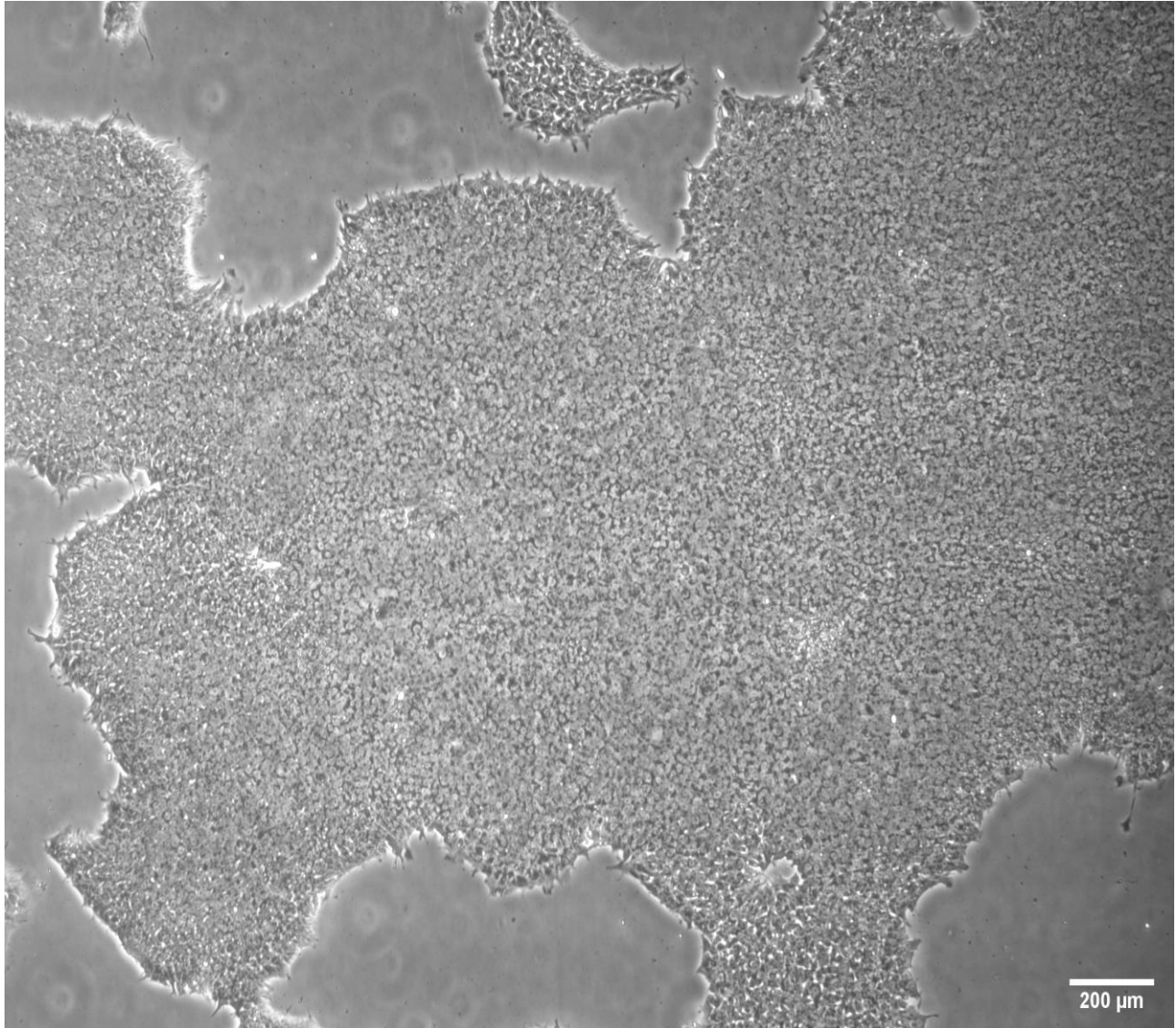
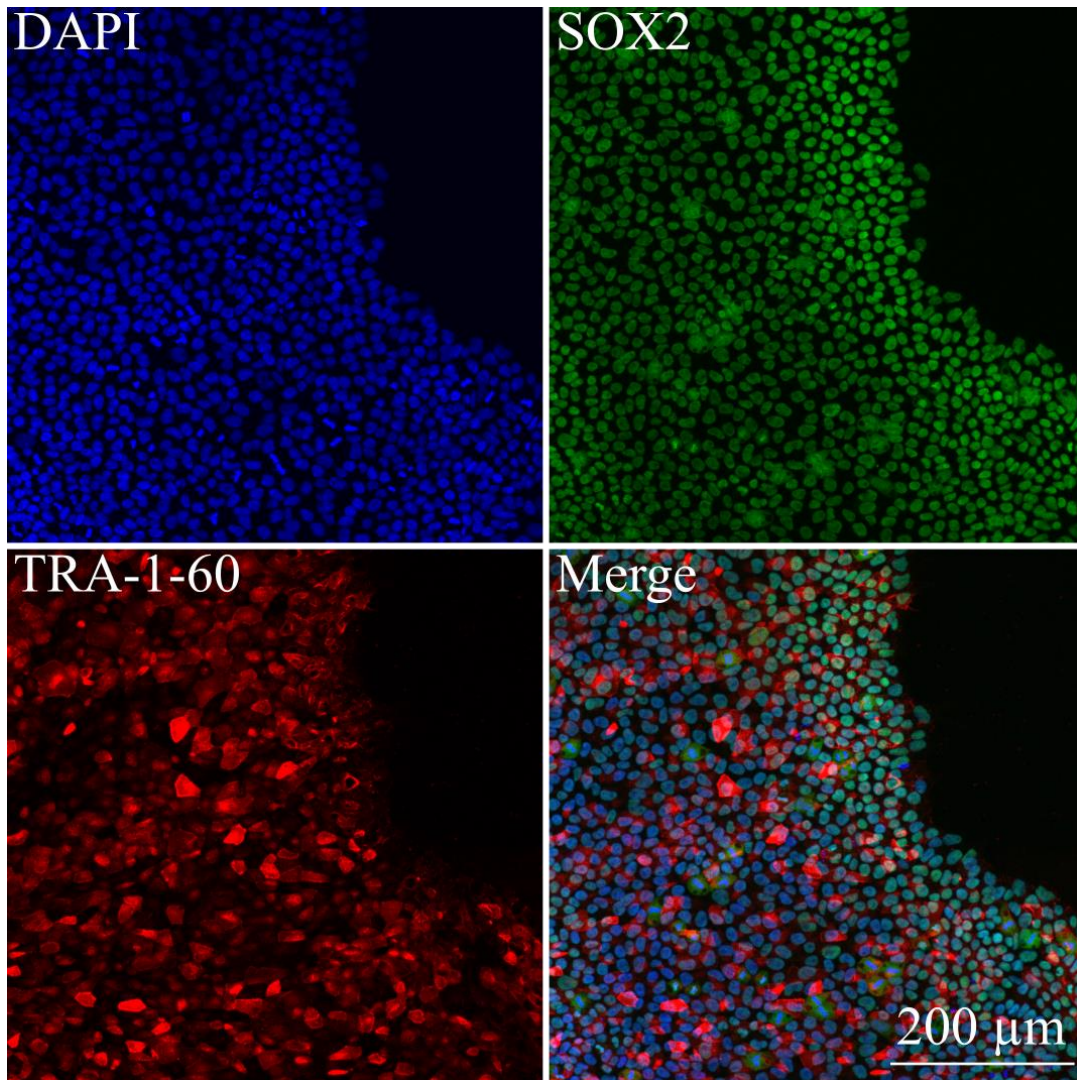


Figure 1: Morphologie des iPSC ARSF29170521-1 ; 3 jours suivant la décongélation.

Immunofluorescence



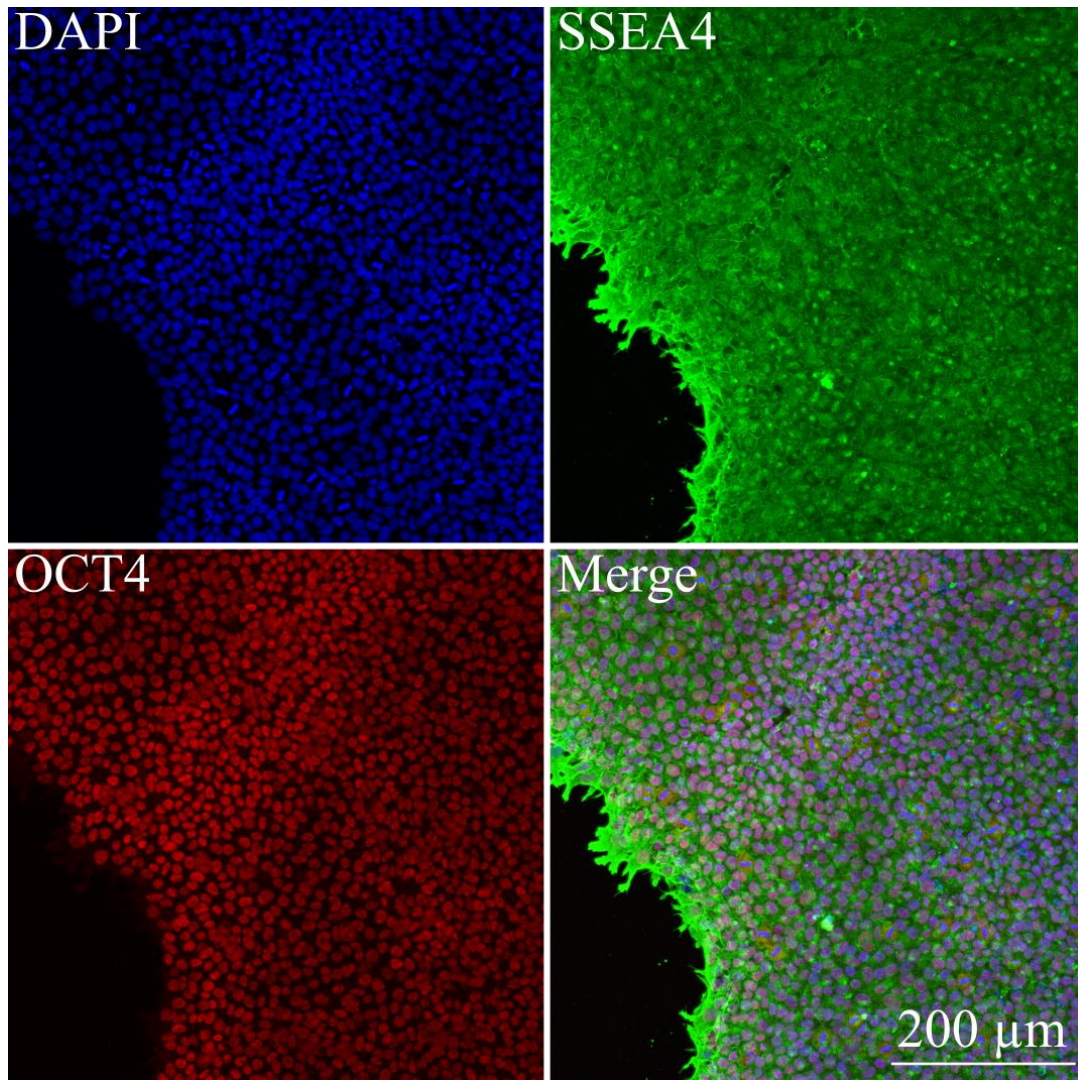


Figure 2: Expression de 4 protéines associées à la pluripotence par immunofluorescence. Les noyaux sont représentés par le DAPI.

Cytométrie en flux

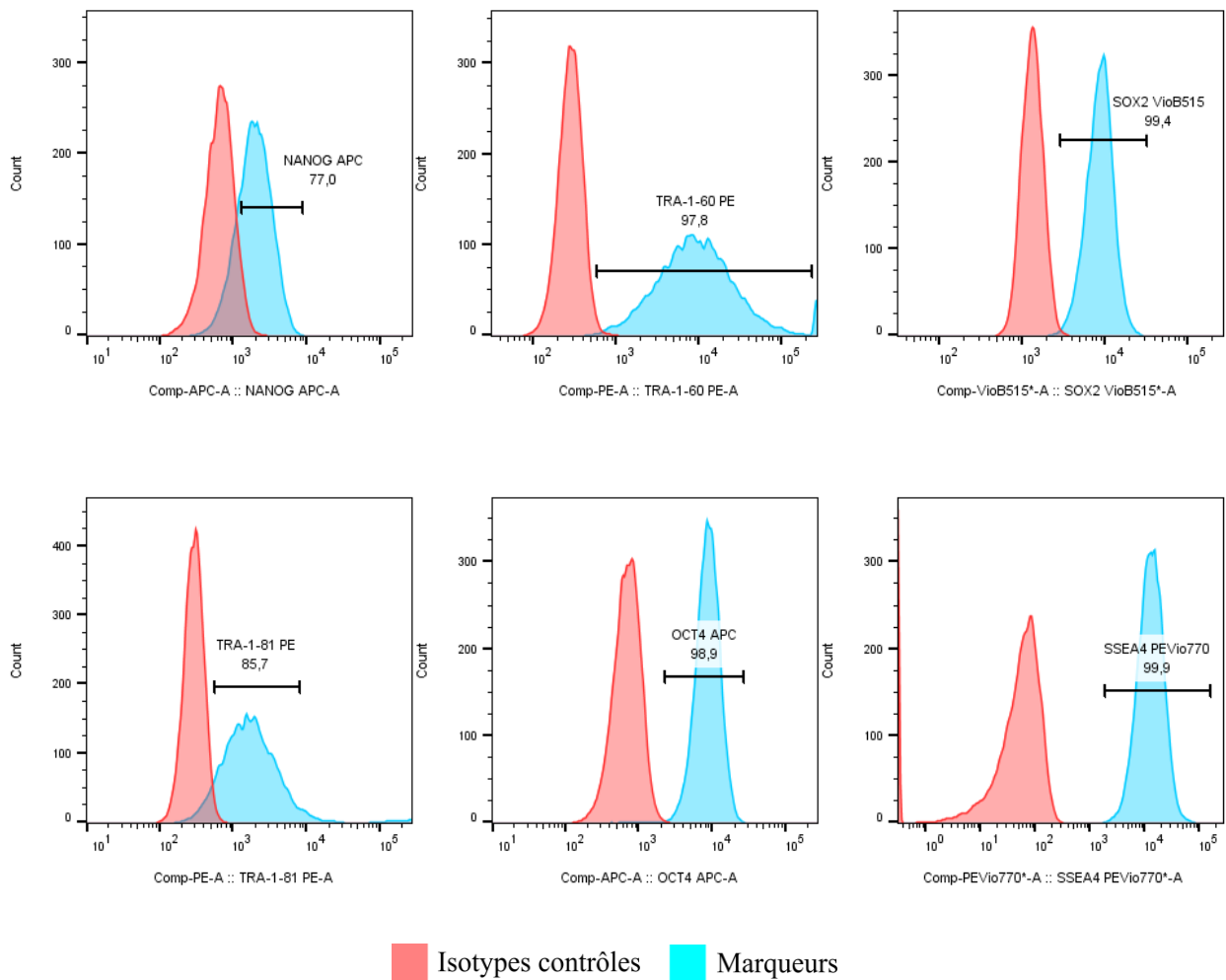


Figure 3: Expression de protéines associées à la pluripotence par cytométrie en flux des iPSC ARSF29170521 clone 1.

RT-qPCR

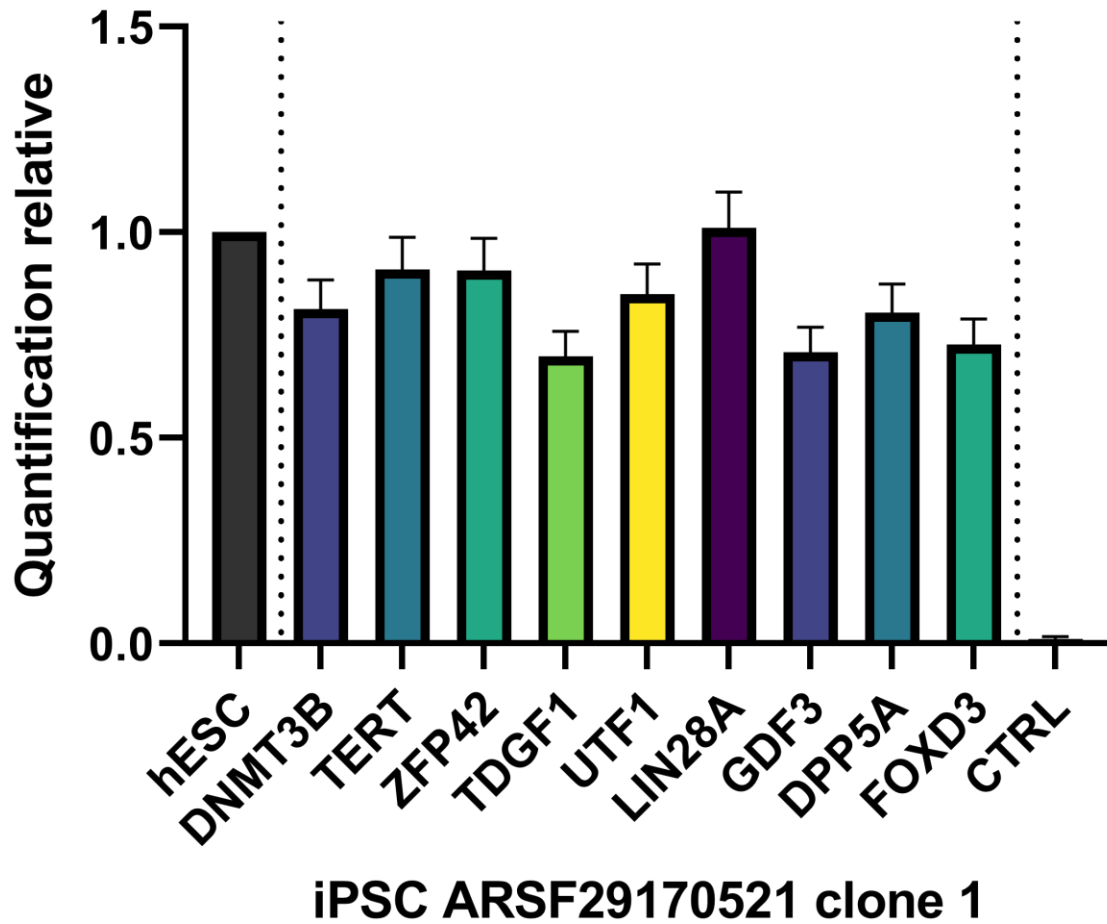


Figure 4 : Expression relative en fonction de cellules souches embryonnaires H1. Les résultats ont été normalisés avec 3 gènes de références : *GAPDH*, *YWHAZ* et *C1orf43*. Les cellules parentales des iPSC ont été sélectionnées comme contrôle négatif (CTRL).

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.

	PBMC ARSF29170521		iPSC ARSF29170521 clone 1	
AMEL	X		X	
CSF1PO	12		12	
D13S317	8	11	8	11
D16S539	11		11	
D21S11	28	29	28	29
D5S818	11		11	
D7S820	11		11	
TH01	9	9,3	9	9,3
TPOX	8	12	8	12
vWA	14	16	14	16

Karyostat+

KaryoStat+ Results: KS-14669 (ARSF29170521)

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.

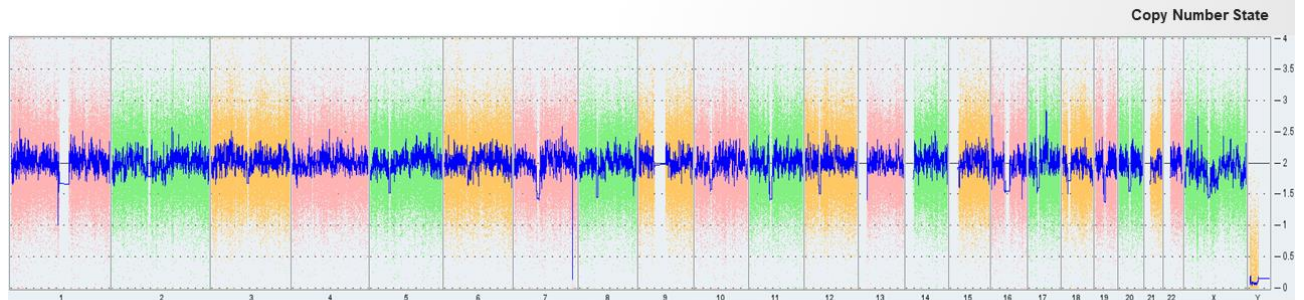


Figure 2: Whole genome view. The whole genome view displays all somatic and sex chromosomes in one frame with high level copy number. The smooth signal plot (right y-axis) is the smoothing of the log₂ ratios which depict the signal intensities of probes on the microarray. A value of 2 represents a normal 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.

6

Figure 6 : Caryotype des iPSC ARSF29170521 clone 1 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

25-04-2023

Date



François Gros-Louis, Ph.D.
Directeur

25-04-2023

Date