

ARCAM?241022

Certificat d'analyse

Clone caractérisé :	ARCAM?241022 clone 10
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 :	ARCAM?241022 ; PBMC
Pathologie :	Ataxie cérébelleuse autosomique récessive (ARCA)
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 :	3,16% (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% CO ₂ , >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 ARCAM?2410522 clone 10

Description du test	Méthode	Résultats attendus	Résultats
Test de décongélation	Observation microscope	Au moins 30% 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	Différenciation dirigée 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. Utilisation de StemMACS™ Trilineage Differentiation kit, Miltenyi Biotec; cat# 130-115-660.
3. MycoStrip™-Mycoplasma Detection Kit, InvivoGen; cat# rep-mysnc-100.

** 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

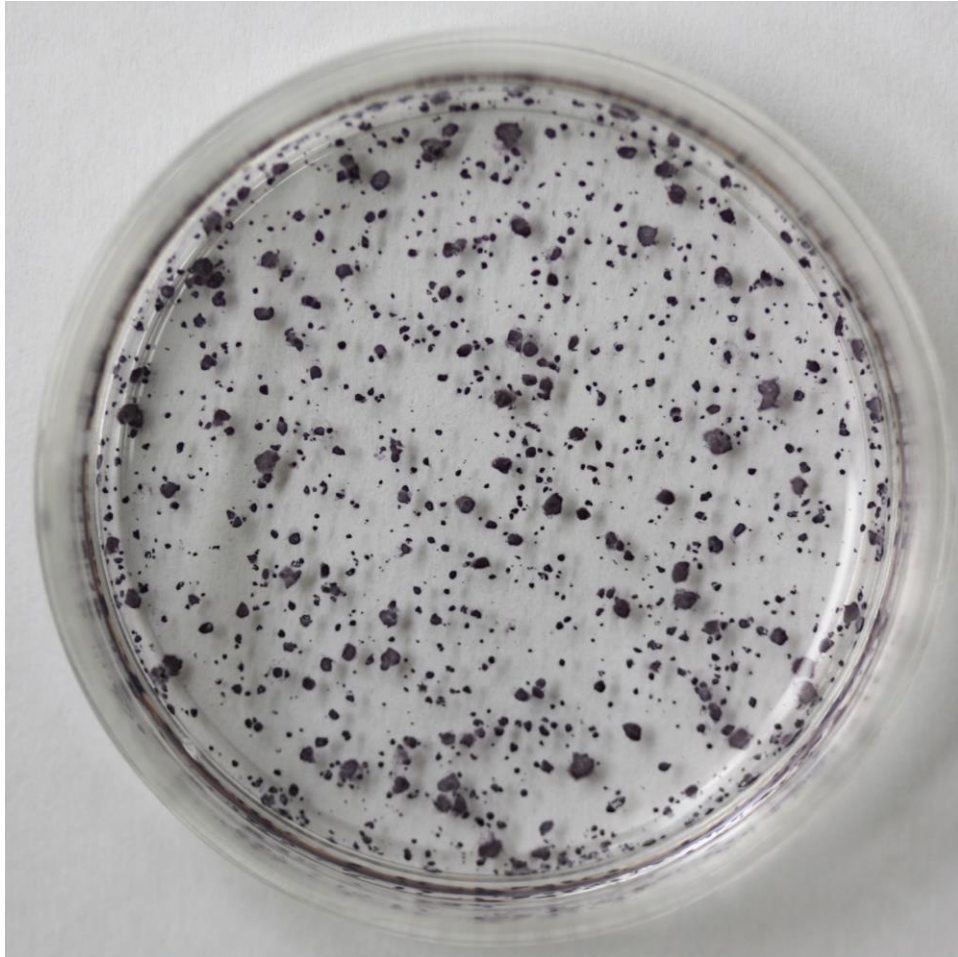


Figure 1 : Fixation et coloration à l'alkaline phosphatase des clones d'iPSCs obtenus durant la reprogrammation au virus du Sendai. Un total de 60 000 cellules transduites ont été ensemencées dans un 35mm. Les clones positifs à l'alkaline phosphatase ont été comptés avec ImageJ.

Observation microscope

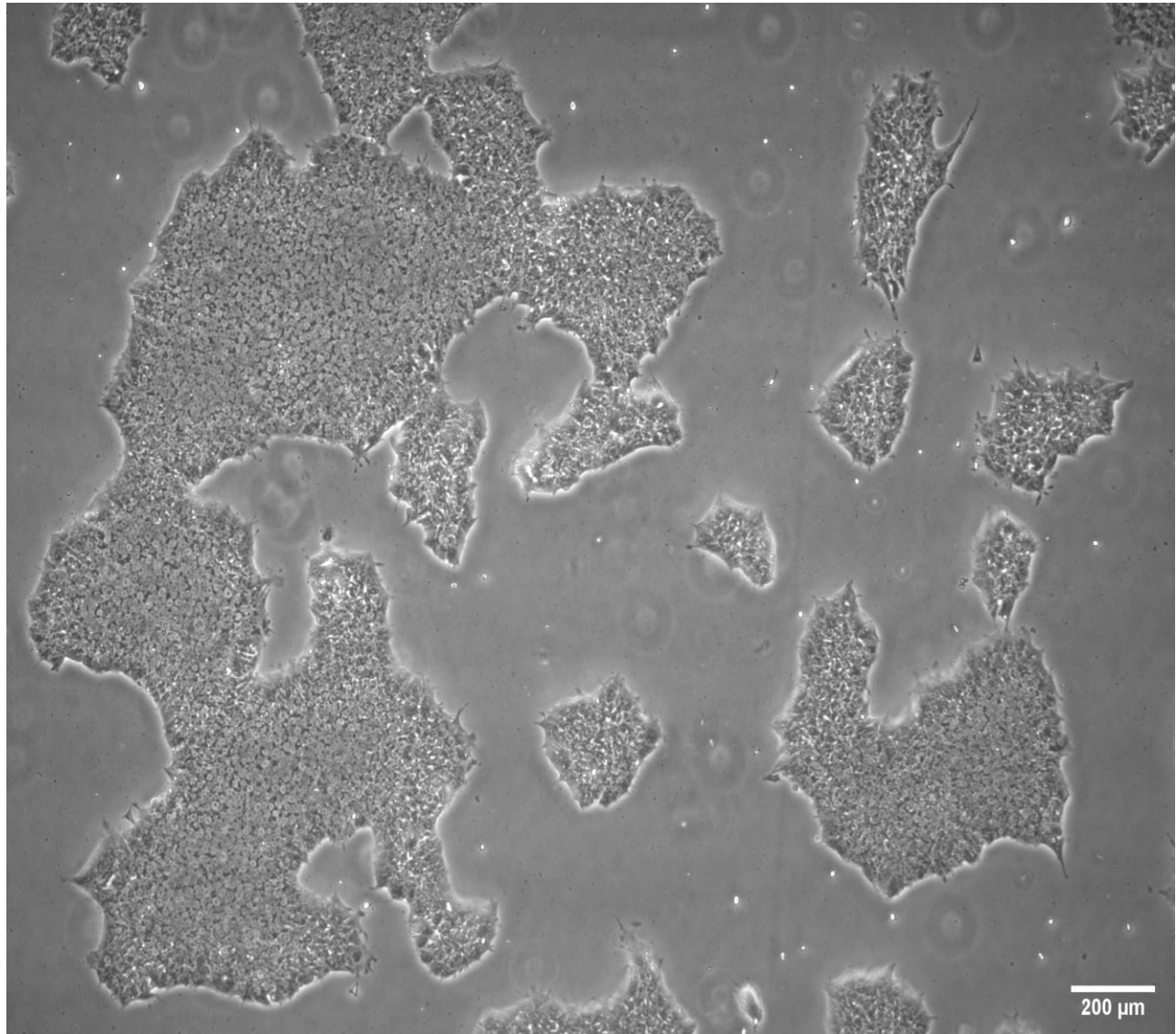
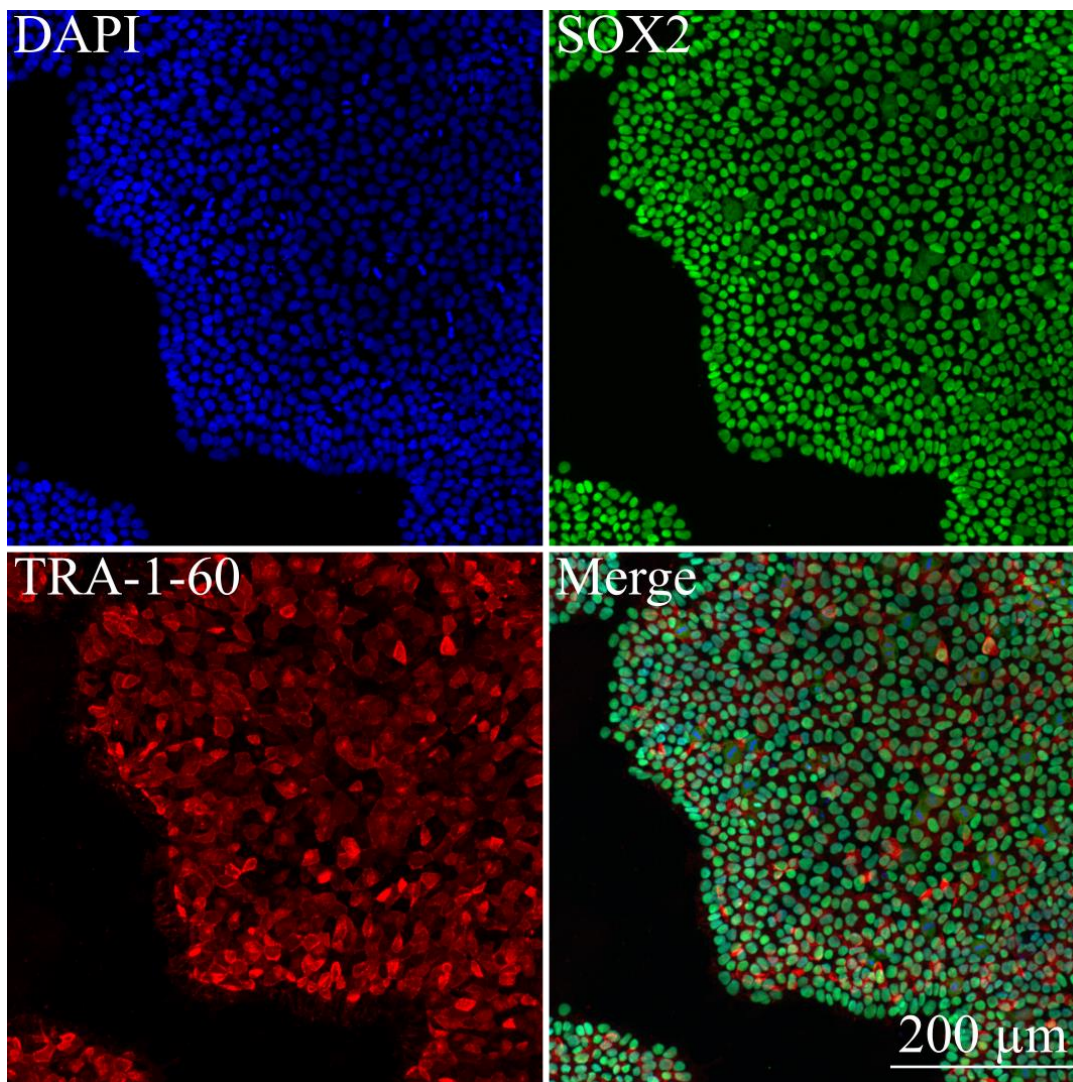


Figure 2: Morphologie des iPSC ARCAM?241022 clone 10 ; 4 jours suivant la décongélation.

Immunofluorescence



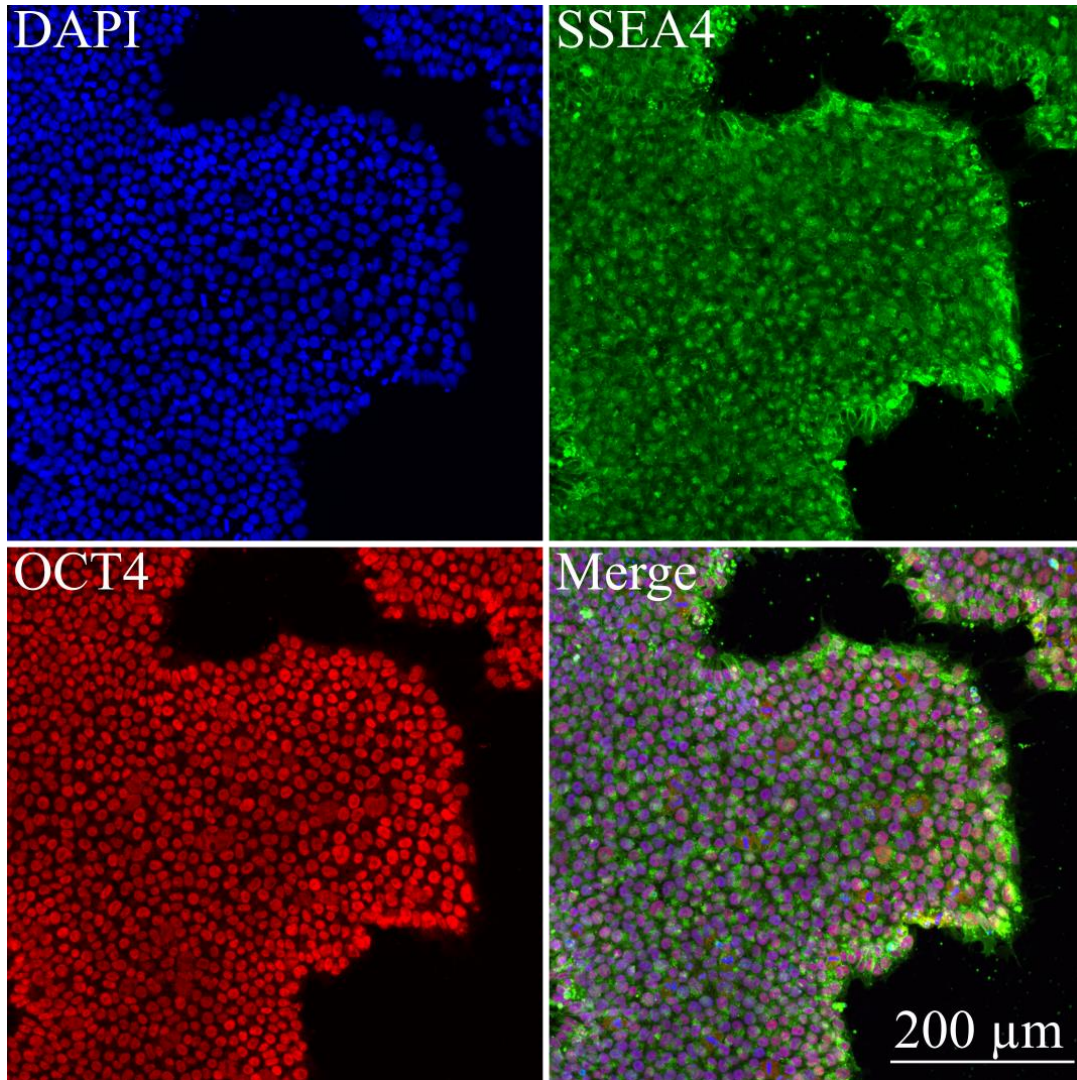


Figure 3: Expression de 4 protéines associées à la pluripotence par immunofluorescence. Les noyaux sont représentés par le DAPI.

Cytométrie en flux

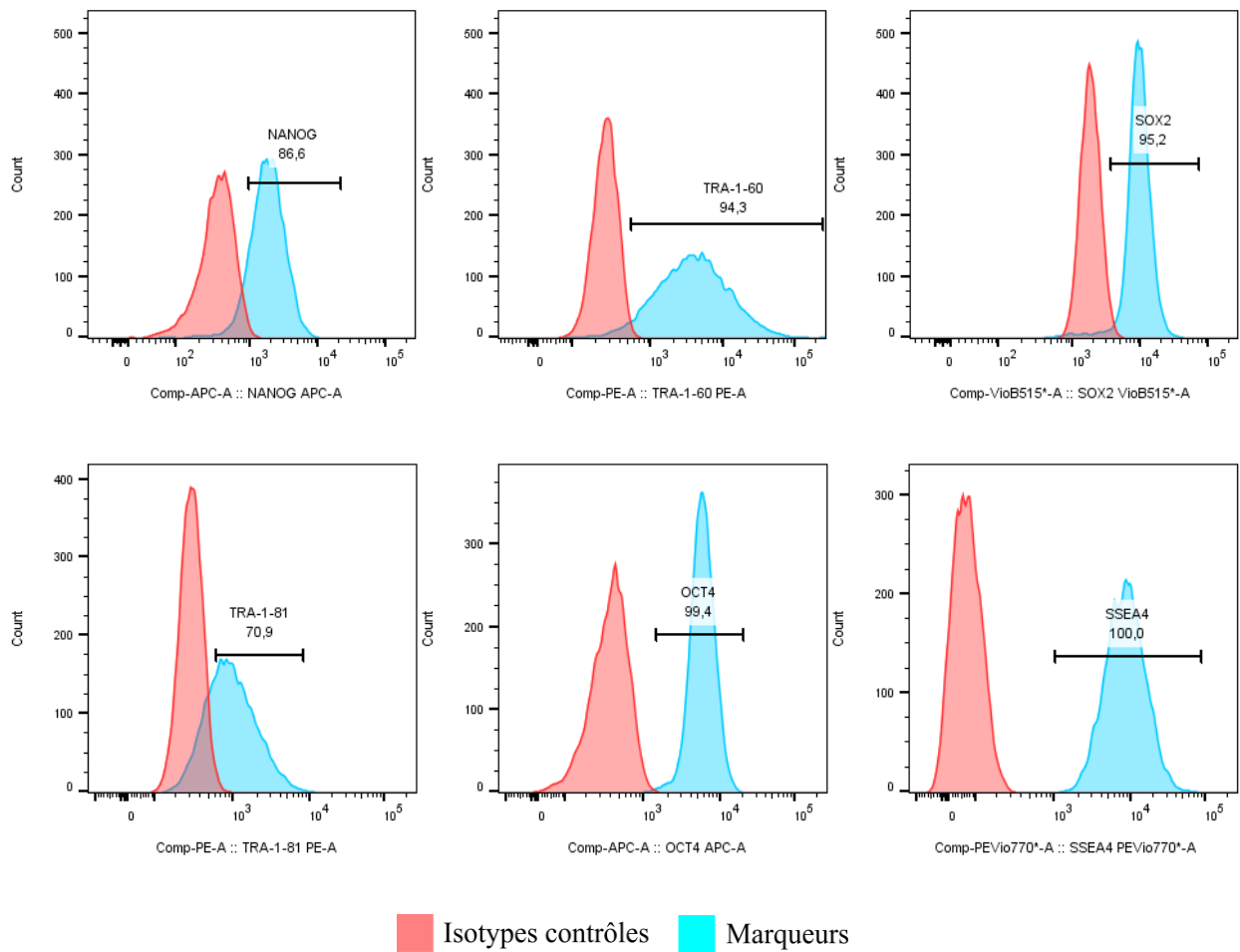


Figure 4: Expression de protéines associées à la pluripotence par cytométrie en flux des iPS ARCA?241022 clone 10.

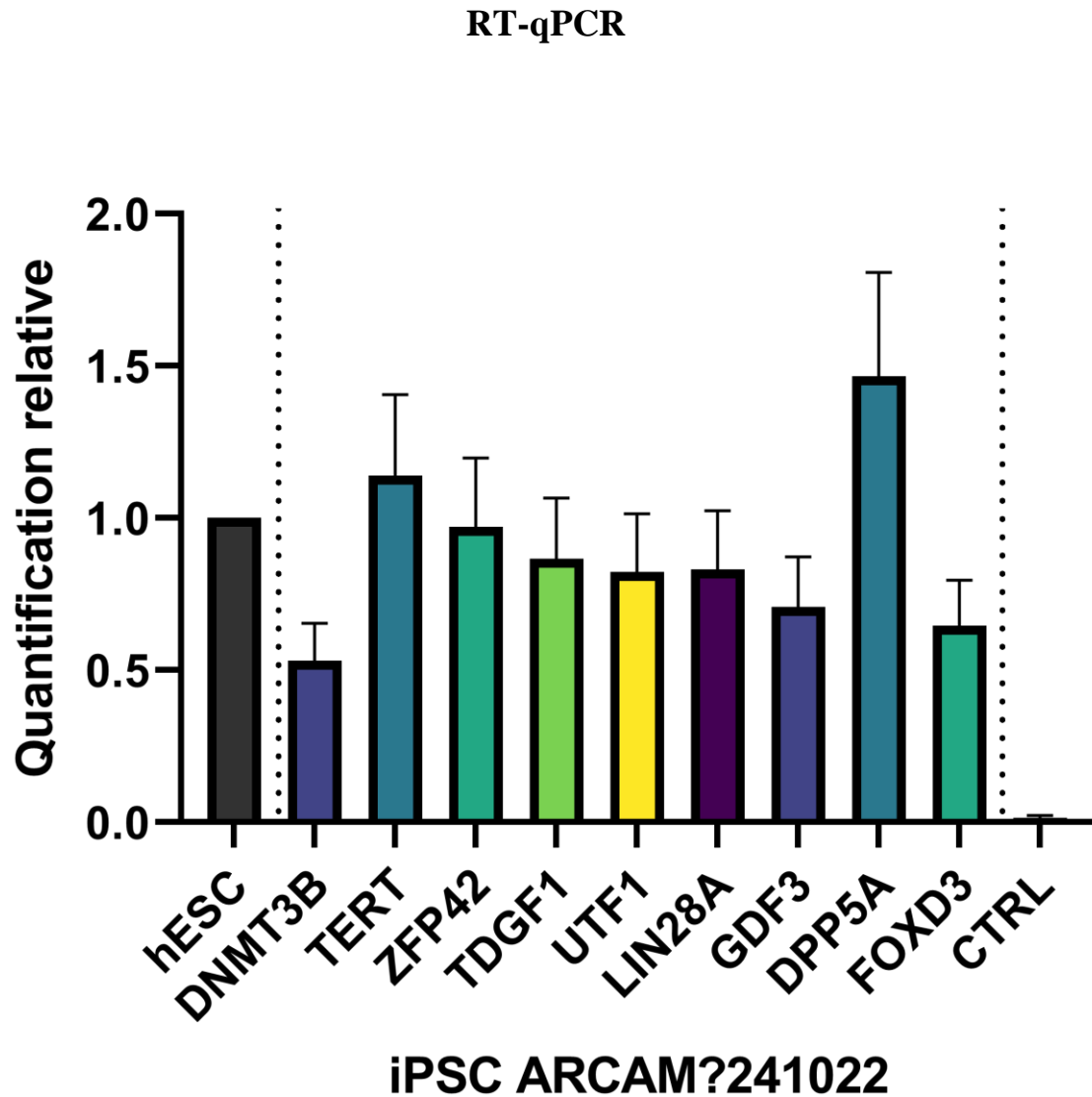


Figure 5 : Expression relative en fonction de cellules souches embryonnaires H1. Les résultats ont été normalisés avec 3 gènes de références : *GAPDH*, *YWHAZ* et *C1orf43*. Les cellules parentales des iPSC ont été sélectionnées comme contrôle négatif (CTRL).

Différentiation dirigée dans les 3 feuilletts

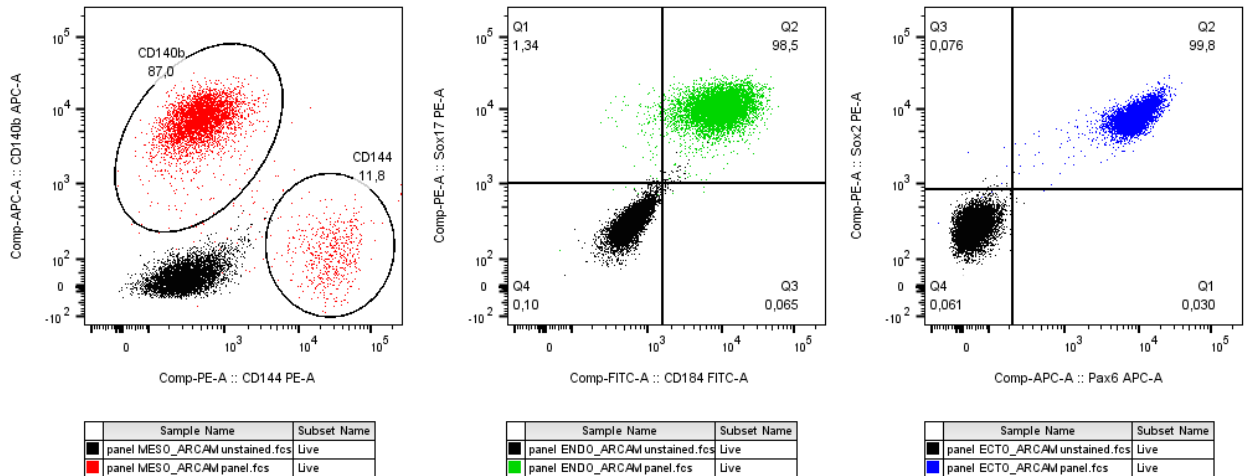


Figure 6 : Cytométrie en flux des iPSC ARCAM?241022 clone 10 après 7 jours de différenciation dirigée en 2D.

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.

	PBMC ARCAM?241022		iPSC ARCAM?241022 clone 10	
AMEL	X	Y	X	Y
CSF1PO	11	12	11	12
D13S317	8		8	
D16S539	9	12	9	12
D21S11	28		28	
D5S818	11	13	11	13
D7S820	8	13	8	13
TH01	6	7	6	7
TPOX	11		11	
vWA	16	17	16	17

Karyostat+

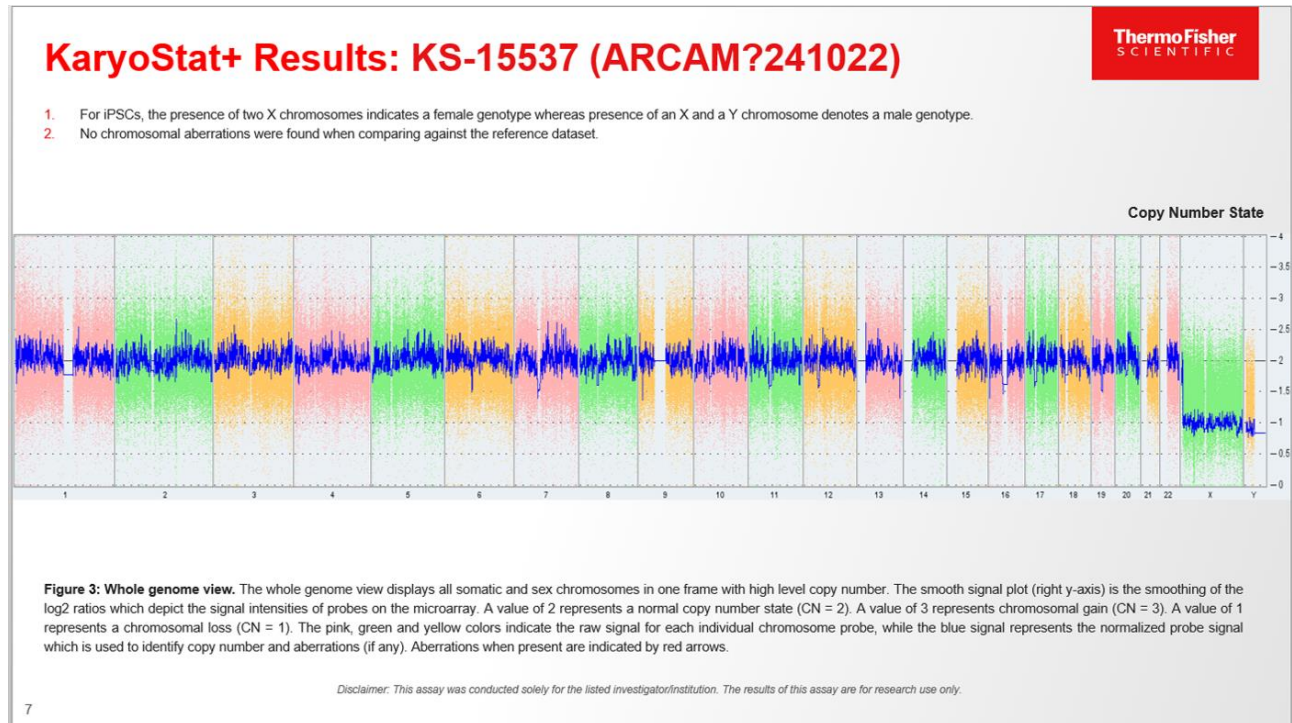


Figure 7 : Caryotype des iPSC ARCAM?241022 clone 10 à P4. Ces résultats ont été générés par ThermoFisher Scientific. Résolution de > 1Mb.

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

