

FARF56

Certificat d'analyse

Clone caractérisé :	FARF56-4
Description :	Cellules souches humaines induites à la pluripotence
Statut juridique :	Pour la recherche seulement. Non commercialisable.
Chercheur requérant et institution :	Dr François Berthod, LOEX/CMDGT
Cellules d'origine et description :	FARF56; Fibroblastes
Pathologie :	Ataxie Récessive Spastique Autosomique 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
Recommandation pour la décongélation :	Un cryovial dans 1 pétri (20% et moins) ou 2 pétris (plus de 20%) de 35mm + 10µM de <i>Rock Inhibitor</i> Y-27632
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

Figure 1: Morphologie des iPSC FARF56-4 après 3 jours suivant la décongélation (barre = 200µm)

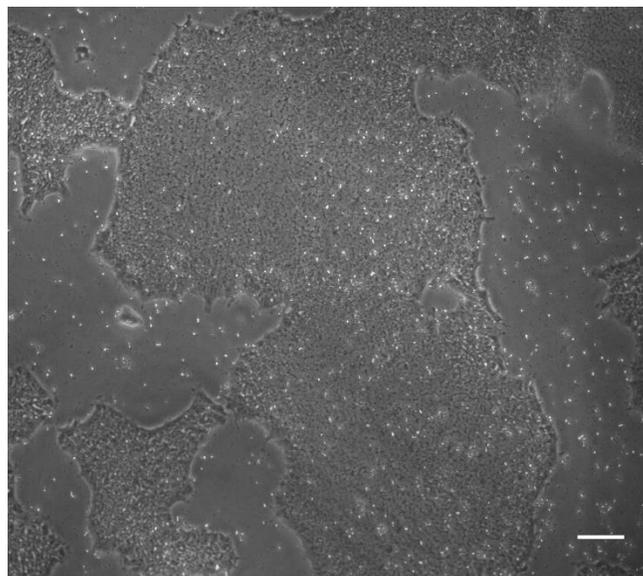


Tableau n°1 : Caractérisation du clone FARSF56-4

Description du test	Méthode	Résultats attendus	Résultats																														
Expression de protéines associées à la pluripotence	Immunofluorescence	Majorité des cellules exprimant les marqueurs intracellulaires (NANOG, OCT4) et ceux de surfaces (TRA-1-81, SSEA4)	Fluorescence positive avec tous les anticorps (Figure 1)																														
Quantification de protéines associées à la pluripotence	Analyse par cytométrie de flux	Plus de 70% ¹ d'expression pour les 2 marqueurs de surfaces TRA-1-60 et TRA-1-81	TRA-1-60 et TRA-1-81 = 98,92% (Figure 2)																														
Expression de gènes reliés à la pluripotence	Analyse par RT-PCR	Présence d'une bande vérifiée sur gel d'agarose.	<table border="0"> <thead> <tr> <th>Gènes</th> <th>Résultats</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>OCT4</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>NANOG</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>DNMT3B</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>TERT</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>REXO1</td> <td>+</td> </tr> </tbody> </table>	Gènes	Résultats	OCT4	+	NANOG	+	DNMT3B	+	TERT	+	REXO1	+																		
Gènes	Résultats																																
OCT4	+																																
NANOG	+																																
DNMT3B	+																																
TERT	+																																
REXO1	+																																
Différenciation dans les trois feuillet embryonnaires	Formation de corps embryoïdes spontanés et l'analyse par hPSC Scorecard™ Panel ² (Après 14 jours de différenciation)	Score négatif pour l'auto-renouvellement et score positif pour les 3 feuillet	<table border="0"> <tbody> <tr> <td>Auto-renouvellement</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Ectoderme</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>Endoderme</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>Mesoderme</td> <td>+</td> </tr> </tbody> </table> (Figure 3)	Auto-renouvellement	-	Ectoderme	+	Endoderme	+	Mesoderme	+																						
Auto-renouvellement	-																																
Ectoderme	+																																
Endoderme	+																																
Mesoderme	+																																
Test de détection des Mycoplasmes	Détection par PCR ³	Mycoplasmes non détectés	Non détectés dans les cultures primaires																														
Empreinte génétique par Short Tandem Repeat (STR) Analysis ⁴	Analyse de 9 STR et de l'amelogenin pour la détermination du sexe	Identiques à la lignée cellulaire d'origine	FARSF56-4 est identique à l'échantillon parental des fibroblastes FARSF56 <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Amel</td> <td>X</td> <td>X</td> <td>D5S818</td> <td>11</td> <td>13</td> </tr> <tr> <td>CSF1PO</td> <td>10</td> <td>11</td> <td>D7S820</td> <td>8</td> <td>13</td> </tr> <tr> <td>D13S317</td> <td>12</td> <td>141</td> <td>TH01</td> <td>8</td> <td></td> </tr> <tr> <td>D16S539</td> <td>11</td> <td>12</td> <td>TPOX</td> <td>8</td> <td></td> </tr> <tr> <td>D21S11</td> <td>29</td> <td>30</td> <td>vWA</td> <td>14</td> <td>19</td> </tr> </tbody> </table>	Amel	X	X	D5S818	11	13	CSF1PO	10	11	D7S820	8	13	D13S317	12	141	TH01	8		D16S539	11	12	TPOX	8		D21S11	29	30	vWA	14	19
Amel	X	X	D5S818	11	13																												
CSF1PO	10	11	D7S820	8	13																												
D13S317	12	141	TH01	8																													
D16S539	11	12	TPOX	8																													
D21S11	29	30	vWA	14	19																												
Caryotypage ⁴	Caryotype moléculaire avec CytoScan™ HD ⁵	Aucun gain ou perte de plus de 5Mb	Caryotype normal à passage 5																														
Test de décongélation	Stéréomicroscope	Au moins 10% de confluence	90% de confluence après 3 jours de culture																														
Test de détection du génome viral du Sendai	Analyse par RT-PCR	Aucune détection des gènes viraux après 2 mois de culture.	<table border="0"> <thead> <tr> <th>Gènes</th> <th>Résultats</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>SeV</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>KOS</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Klf4</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>c-Myc</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table>	Gènes	Résultats	SeV	-	KOS	-	Klf4	-	c-Myc	-																				
Gènes	Résultats																																
SeV	-																																
KOS	-																																
Klf4	-																																
c-Myc	-																																

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. Venor@GeM Mycoplasma PCR Detection Kit, Cederlane, cat# 11-1100

4. Ces analyses ont été effectuées par le laboratoire Génome Québec.

5. ThermoFisher Scientific

Figure 2: Expression de protéines associées à la pluripotence par immunofluorescence

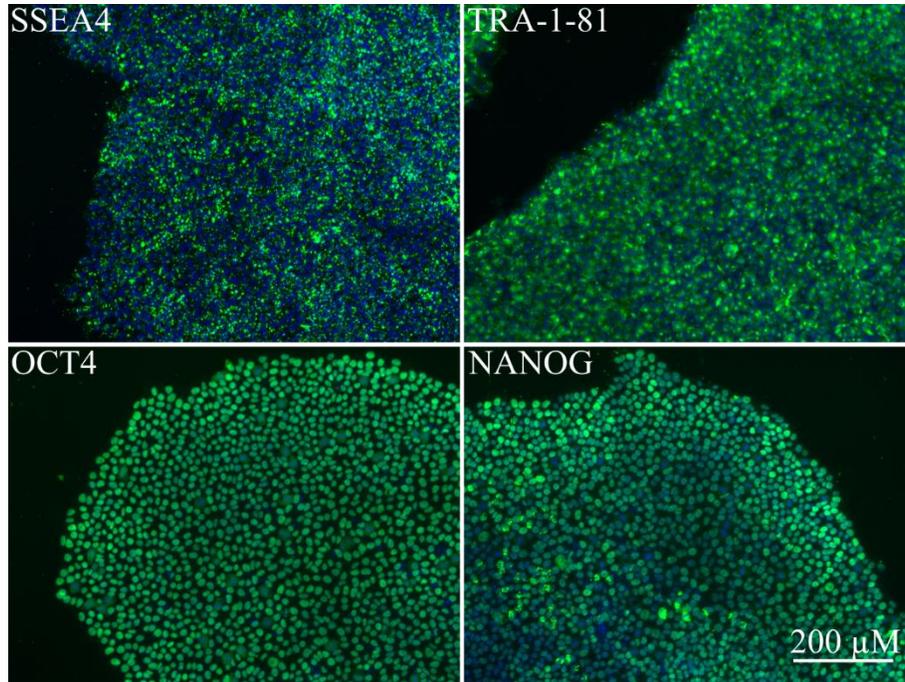
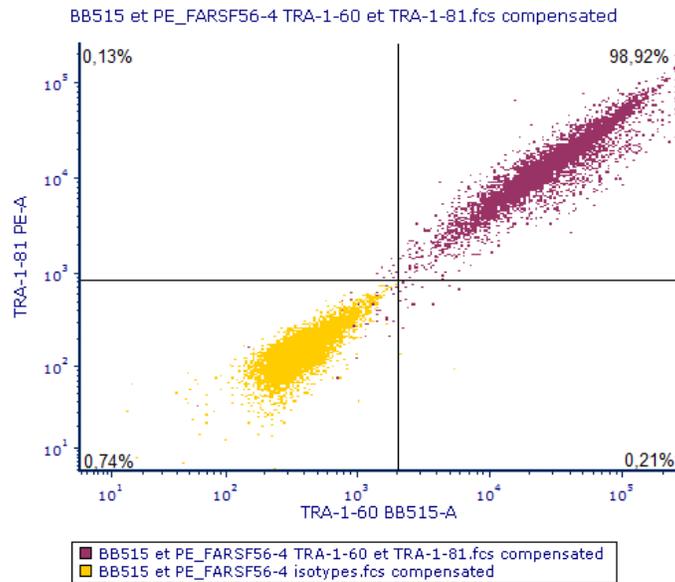


Figure 3: Expression de protéines associées à la pluripotence par cytométrie de flux



Note :

Les cellules distribuées par la plateforme iPSC 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 iPSC 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

Le 13 février 2020

Date



Jack Puymirat, MD, Ph.D.
Directeur

Le 13 février 2020

Date