

# ARCAF65300421

## Certificat d'analyse

---

<b>Clone caractérisé :</b>	ARCAF65300421 clone 2
<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>	ARCAF65300421 ; PBMC
<b>Pathologie :</b>	Ataxie de Beauce
<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>	N.D.
<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 ARCAF65300421clone 2

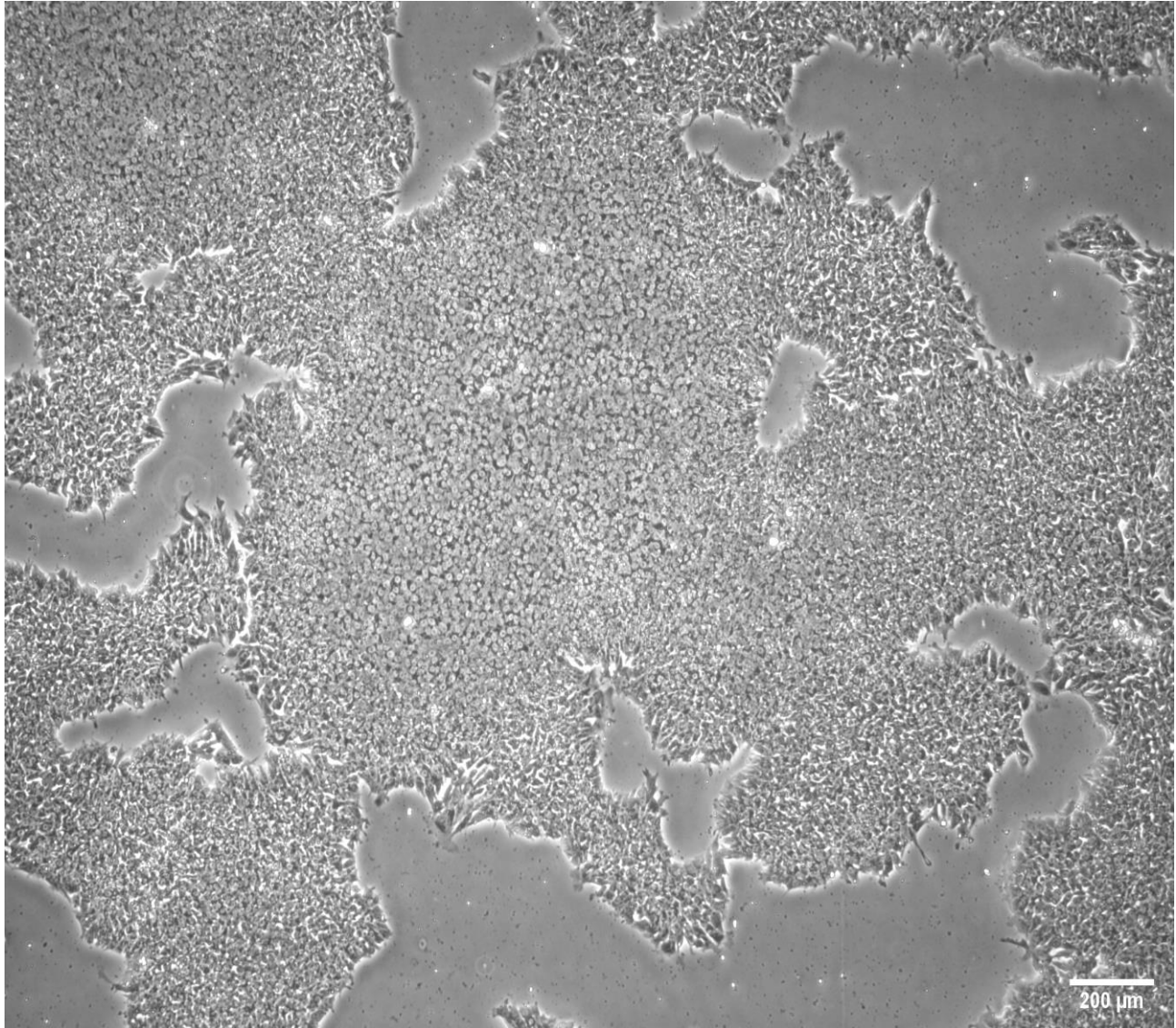
Description du test	Méthode	Résultats attendus	Résultats
<b>Test de décongélation</b>	Observation microscope	Au moins 50% de confluence après 3 jours de culture	Réussi (Figure 1)
<b>Expression de protéines associées à la pluripotence</b>	Immunofluorescence	Majorité des cellules exprimant les marqueurs intracellulaires (NANOG, POU5F1) et ceux de surfaces (TRA-1-81, SSEA4)	Réussi (Figure 2)
<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 3)
<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 4)
<b>Différenciation dans les 3 feuillets embryonnaires</b>	Différenciation dirigée <sup>2</sup>	Surexpression de gènes associés aux 3 feuillets embryonnaires	Réussi (Figure 5)
<b>Détection des mycoplasmes<sup>3</sup></b>	PCR	Mycoplasmes non détectés	Réussi
<b>Détection du génome viral du Sendai</b>	RT-PCR	Aucune détection après 2 mois de culture	Positif **
<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	<b>Anormal</b> (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. Utilisation de StemMACS™ Trilineage Differentiation kit, Miltenyi Biotec; cat# 130-115-660.
3. Venor@GeM Mycoplasma OneStep, Cedarlane, cat# 11-8100

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

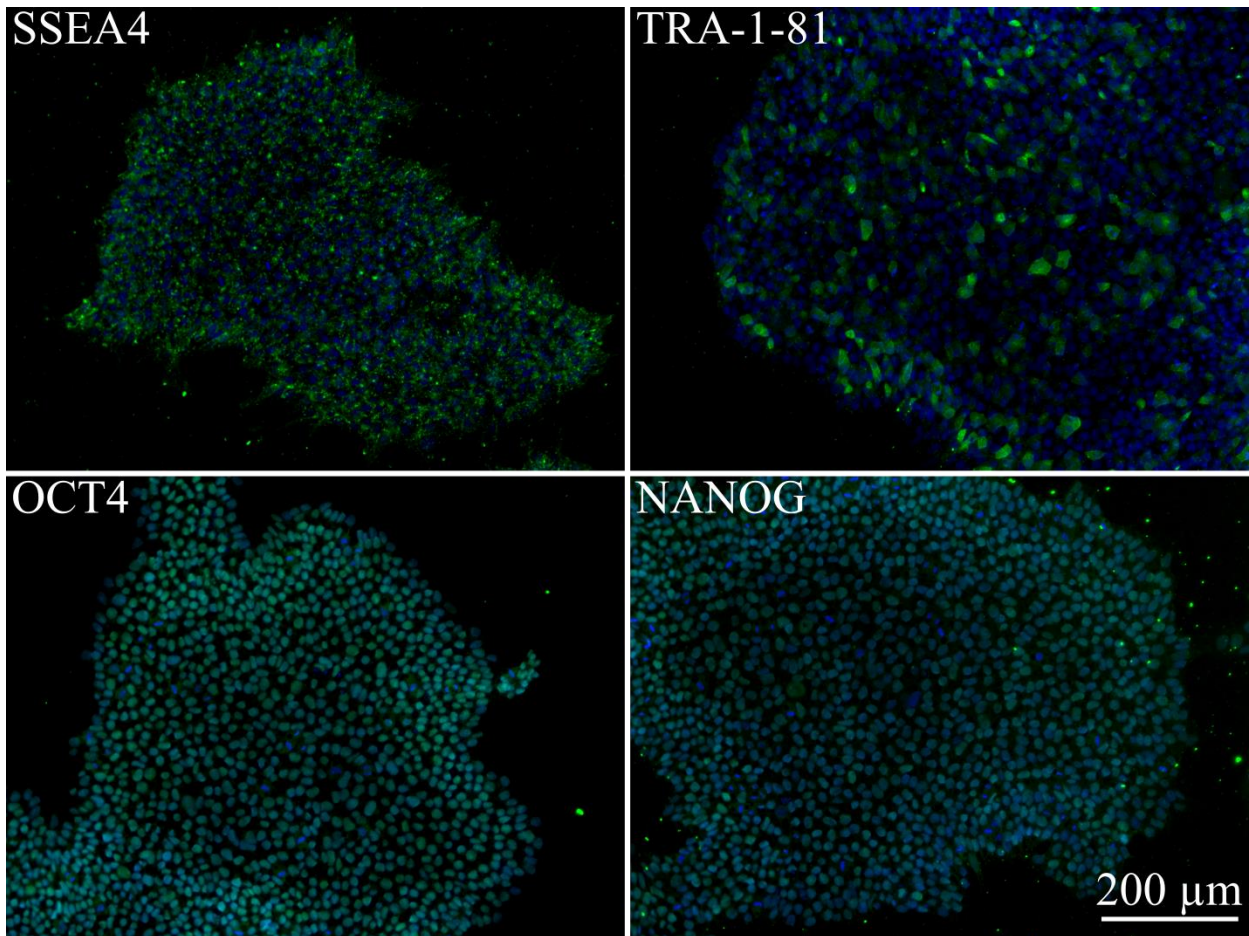
En effet, une expression résiduelle des facteurs de reprogrammation est observée pour ce clone spécifique dérivé de la lignée iPSC. Le RT-PCR est fait sur de l'ADNc isolé de ce clone cultivé à passage 8, encore considéré comme étant à bas passage. Il arrive parfois qu'il y ait une expression résiduelle 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



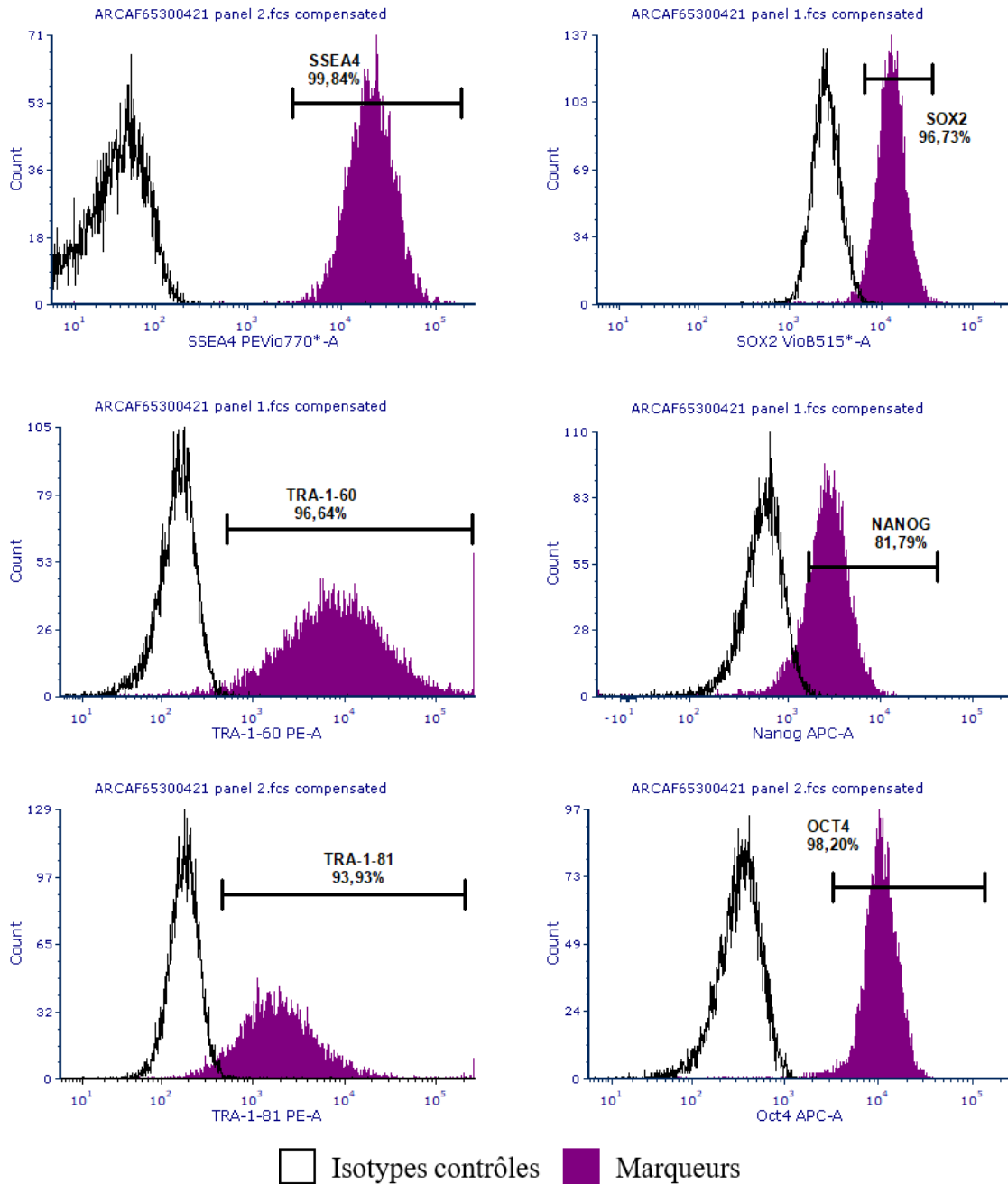
**Figure 1:** Morphologie des iPSC ARCAF65300421-2 ; 3 jours suivant la décongélation.

## Immunofluorescence



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

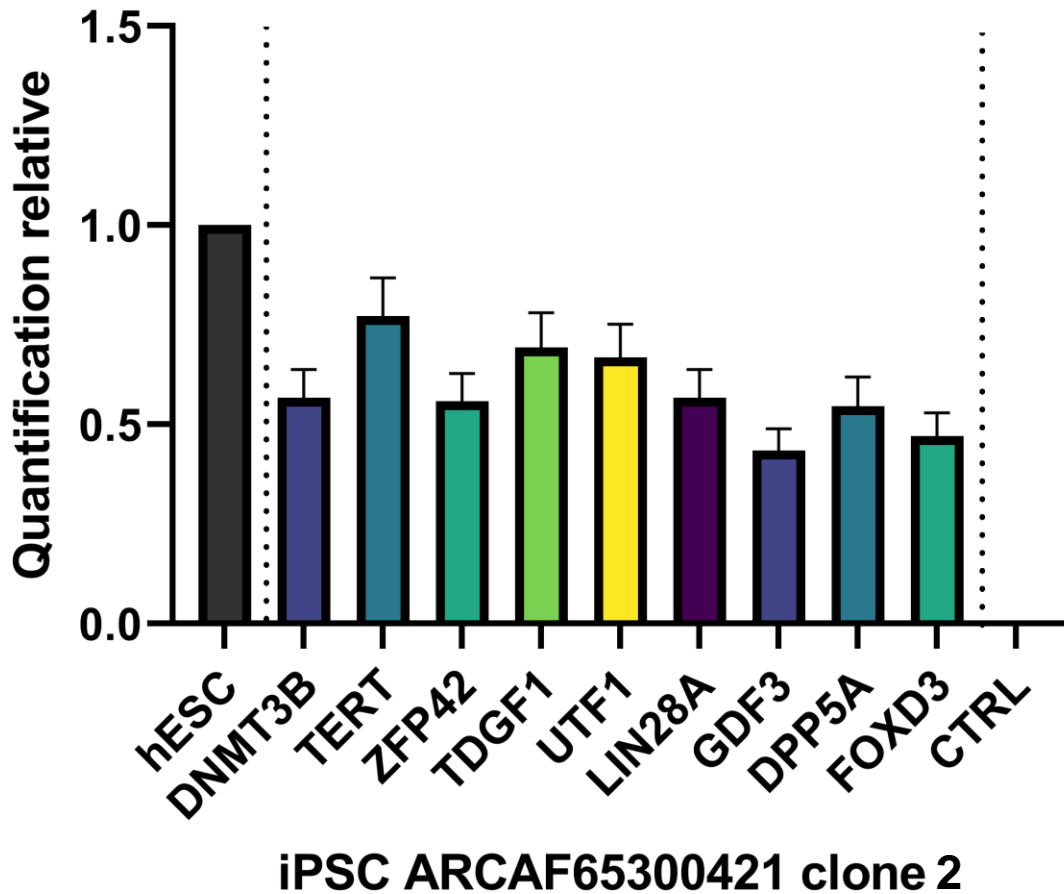
## Cytométrie en flux



**Figure 3:** Expression de protéines associées à la pluripotence par cytométrie en flux des iPSC ARCAF65300421 clone 2.

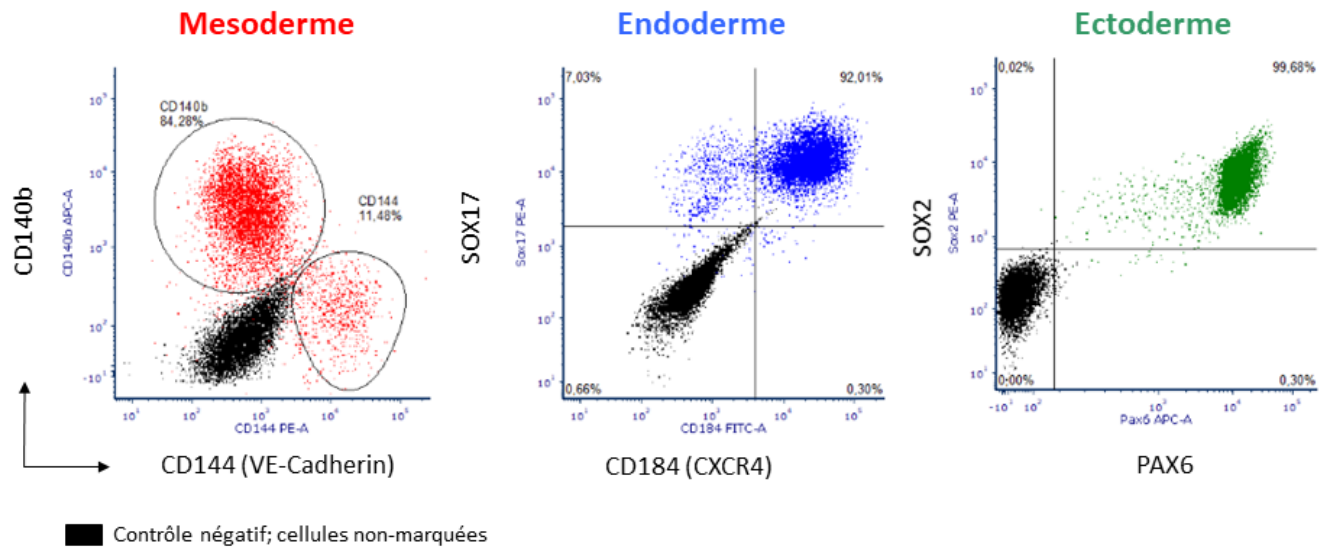
**Ça se découvre ici.**

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).

## Différentiation dirigée dans les 3 feuillets



**Figure 5** : Cytométrie en flux des iPSC ARCAF65300421 clone 2 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 pour les iPSC seulement, car il n'y avait pas assez de cellules parentales au départ. Ces résultats ont été générés par Génome Québec.

	<b>PBMC</b> <b>ARCAF65300421</b>		<b>iPSC</b> <b>ARCAF65300421</b> <b>clone 2</b>	
<b>AMEL</b>	X		X	
<b>CSF1PO</b>	9	10	9	10
<b>D13S317</b>	12		12	
<b>D16S539</b>	11	12	11	12
<b>D21S11</b>	29	31.2	29	31.2
<b>D5S818</b>	9	13	9	13
<b>D7S820</b>	10	11	10	11
<b>TH01</b>	9		9	
<b>TPOX</b>	8	12	8	12
<b>vWA</b>	17	18	17	18

## Karyostat+

### Karyostat+ Results: KS-13136 (ARCAF65300421)

ThermoFisher SCIENTIFIC

Chromosome	Type	Cytoband Start	CN State	Size (kbp)
7	Loss	q11.21	1.00	1,634

Table 2. Karyostat+ analysis. Chromosomal aberrations are indicated in the table shown. See supplemental data for more details.

- 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.

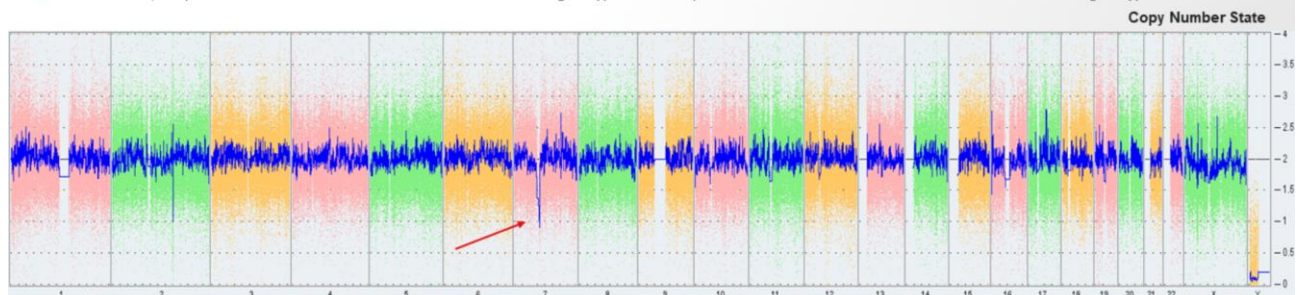


Figure 3: Whole genome view. The whole genome view displays all somatic and sex chromosomes in one frame with high level copy number. The smooth signal plot (right y-axis) is the smoothing of the log2 ratios which depict the signal intensities of probes on the microarray. A value of 2 represents a normal 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.

**Figure 6 :** Caryotype des iPSC ARCAF65300421 clone 2 à P7. 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

24-01-2023

Date



François Gros-Louis, Ph.D.  
Directeur

24-01-2023

Date