

Title: Creating an Open Science Repository of ARSACS hiPSCs
PI: Nicolas Dupré, **Collaborator:** François Gros-Louis

Preliminary report on the progression of the project.

Establishing a collection of biobanked cells with different mutations for research is a *sine qua non* condition to the realization of *in vitro* experiments to strengthen fundamental research and facilitate translational research. Indeed, it can be used to develop innovative in vitro models to screen potential drugs, to check whether the efficacy of potential therapeutics is not dependent on specific mutation and to determine whether a specific pathogenic mechanism can be generalized to different genetic backgrounds as inter-individual variability may influence the efficacy of drugs. We have proposed to create an accessible repository of ARSACS hiPSCs reprogrammed with the Sendai virus method in order to significantly increase the availability of research resources in the best interest of patients and investigators. The plan was to create a repository with at least **9 ARSACS** hiPSC cell lines (3 different mutations and 3 different patients per mutation) including the hiPSCs cell lines already available (Drs. Berthod and McPherson), **1 Friedreich** patient and **1 ARCA-1 (SYNE-1)** patient that will be needed to control future experiments and validate results.

The aim of the project was to reprogram into iPSC at least 3 patient-derived cell line per mutation to control for possible inter-individual heterogeneity. Of particular interest, we were able to recruit and reprogram 5 patient-derived iPSC lines bearing the Quebec mutation (homo C.6594delT). This will be a valuable resource to depict inter-individual heterogeneity often observed amongst patients.

As of today, a total of 7 hiPSC cell lines are available out the 11 that were originally planned (Table 1). This includes 5 cell lines derived from different individuals bearing the homo C.6594delT, 1 cell line bearing the C.9284dupC, and 1 ARCA-1 (*SYNE-1*) cell line c.15705 12A> G. We also initiated the reprogramming of additional cell lines and, within the next few months, 3 additional hiPSCs cell lines will be available to share in the repository: 1 cell line derived from an individual bearing the heterozygous c.4205A> T and c.5836T> C genetic variant, 1 cell line from an individual bearing the heterozygous 6594delT/5254 genetic variant, and 1 cell line from an individual bearing a 1 x 90–1300 GAA repeat expansion in the *FTX* gene (Friedreich's ataxia). These iPSCs are actually being characterized to confirm the expression of pluripotency markers as well as to confirm that each generated iPSC lines are free of aberrant chromosomal rearrangement. We will soon recruit our last participant and get a sample from 1 ARSACS patient. We already approached a patient bearing the homozygote c.9497-9498delTT (p.F3166X) mutation, who's has verbally consented to participate in the project. To complete the project, we therefore request a one-year no cost extension, which will allow us to finalize the reprogramming and characterization of all planned hiPSCs, as well as to send them to the CBIG biorepository for sharing with the scientific community.

As you can see in the following reports, all iPSC lines passed our characterization test for the expression of pluripotency markers (immunofluorescence, RT-PCR and FACS). All lines also presented normal karyotypes, differentiated into all 3 germ layers derived cells, as well as to be free of mycoplasma and of Sendai virus, as well as to.

Title : Creating an Open Science Repository of ARSACS hiPSCs

PI : Nicolas Dupré, **Collaborator :** François Gros-Louis

Table 1: Summary on the progression of the project

According to the initial grant proposal		Progression - recruitment of research participants and reprogramming of biobanked cells into hiPSCs					
Diagnostic of the participant	Number of hiPSC cell lines to be biobanked in the repository	Number of participants for whom cells were isolated to perform hiPSC reprogramming	Mutation	Note	hiPSC reprogramming completed	hiPSC report ready and available	Ongoing hiPSC reprogramming
ARSACS (mutation 1)	3	5	homo c.6594delT	Most frequent Quebec mutation	5	3	
ARSACS (mutation 2)	3	1	hetero c.4205A>T and c.5836T>C			1	1
ARSACS (mutation 3)	3	1	homo c.9284dupC	Reprogrammed by P. McPherson	1		
ARSACS (mutation 4)		1	Hétérozygote 6594delT /5254				1
Friedreich hiPSCs	1	1	1 x 90-1300 GAA repeat expansion				1
Syne-1 hiPSCs	1	1	c.15705-12A>G		1		
Total	11	10			7	4	3

Characterization for cell line ARSACS SK.01A

Characterized clone:	ARSACS SK.01A-10
Description:	Human Induced Pluripotent Stem Cells
Consent status	Research only; not consented for distribution
Depositor name and institution:	Dr Peter McPherson, Montreal Neurological Institute and Hospital
Parental name and description:	ARSACS SK.01A; Skin fibroblasts
Pathology:	autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay
Donor information	Female
Reprogramming method:	Sendai viral expression of Oct4, Sox 2, Klf4 and c-Myc genes
Thaw recommendations:	One vial should be thaw into 1 or 2 wells of a 35mm with 10µM of Rock Inhibitor Y-27632
Culture conditions:	Media: mTeSR™1 (StemCell Technologies; 05850) Matrix: Matrigel™ hESC-Qualified Matrix (Corning; 08-774-552) Passage: EDTA (0,5mM, AMBION™ ; AM92600G) Environment: 37°C, 5% CO2, >95% RH

Cells distributed by iPSC Québec are intended for research purposes only and are not intended for use in humans.

Appropriate biosafety precautions should be followed when working with these cells. The end user is responsible for ensuring that the cells are handled and stored in an appropriate manner. iPSC Québec is not responsible for damages or injuries that may result from the use of these cells.

Table 1: Characterization of ARSACS SK.01A-10

Test description	Method	Expected Result	Result																																																
Expression of pluripotency-associated proteins	Immunofluorescence	The majority of the cells are positive for expression intracellular markers (Nanog, Oct4), and of surface markers (TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA4)	Positive fluorescence signals obtained using all antibodies (Figure 1)																																																
Gene expression of pluripotency markers	RT-PCR	PCR amplified fragment present on agarose gel	<table> <thead> <tr> <th>Gene</th> <th>Result</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Oct4</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>Nanog</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>Dnm3tb</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>hTERT</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>Rex1</td> <td>+</td> </tr> </tbody> </table>	Gene	Result	Oct4	+	Nanog	+	Dnm3tb	+	hTERT	+	Rex1	+																																				
Gene	Result																																																		
Oct4	+																																																		
Nanog	+																																																		
Dnm3tb	+																																																		
hTERT	+																																																		
Rex1	+																																																		
Germ layer differentiation	EB formation followed by RT-PCR analysis (After 16 days of differentiation)	PCR amplified fragment present on agarose gel	<table> <thead> <tr> <th>Gene</th> <th>Result</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Pax6</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>Ectoderm</td> <td>b-tubulin</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td></td> <td>NCAM</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>Sox17</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>Endoderm</td> <td>AFP</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Gata4</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>Msx1</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>Mesoderm</td> <td>Gata2</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td></td> <td>PECAM</td> <td>+</td> </tr> </tbody> </table>	Gene	Result	Pax6	+	Ectoderm	b-tubulin	+		NCAM	+	Sox17	+	Endoderm	AFP	+		Gata4	+	Msx1	+	Mesoderm	Gata2	+		PECAM	+																						
Gene	Result																																																		
Pax6	+																																																		
Ectoderm	b-tubulin	+																																																	
	NCAM	+																																																	
Sox17	+																																																		
Endoderm	AFP	+																																																	
	Gata4	+																																																	
Msx1	+																																																		
Mesoderm	Gata2	+																																																	
	PECAM	+																																																	
Mycoplasma	Detection by PCR ¹	None detected	None detected																																																
DNA fingerprint²	STR : profiling of 15 STR regions and Amelogenin for gender determination	Both parental cells and iPS cells have the same STR profile	<p>iPSC ARSACS SK.01A-10 is identical to ARSACS SK.01A fibroblasts</p> <table> <tbody> <tr> <td>Amel</td> <td>X</td> <td></td> <td>D18S51</td> <td>15</td> <td>16</td> </tr> <tr> <td>vWA</td> <td>16</td> <td>18</td> <td>Penta E</td> <td>7</td> <td>11</td> </tr> <tr> <td>D8S1179</td> <td>12</td> <td>14</td> <td>D5S818</td> <td>10</td> <td>11</td> </tr> <tr> <td>TPOX</td> <td>8</td> <td>11</td> <td>D13S317</td> <td>12</td> <td></td> </tr> <tr> <td>FGA</td> <td>23</td> <td>27</td> <td>D7S820</td> <td>8</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td>D3S1358</td> <td>15</td> <td>17</td> <td>D16S539</td> <td>12</td> <td>13</td> </tr> <tr> <td>THO1</td> <td>9</td> <td>9.3</td> <td>CSF1PO</td> <td>10</td> <td>13</td> </tr> <tr> <td>D21S11</td> <td>29</td> <td>30</td> <td>Penta D</td> <td>11</td> <td>14</td> </tr> </tbody> </table>	Amel	X		D18S51	15	16	vWA	16	18	Penta E	7	11	D8S1179	12	14	D5S818	10	11	TPOX	8	11	D13S317	12		FGA	23	27	D7S820	8	12	D3S1358	15	17	D16S539	12	13	THO1	9	9.3	CSF1PO	10	13	D21S11	29	30	Penta D	11	14
Amel	X		D18S51	15	16																																														
vWA	16	18	Penta E	7	11																																														
D8S1179	12	14	D5S818	10	11																																														
TPOX	8	11	D13S317	12																																															
FGA	23	27	D7S820	8	12																																														
D3S1358	15	17	D16S539	12	13																																														
THO1	9	9.3	CSF1PO	10	13																																														
D21S11	29	30	Penta D	11	14																																														
Karyotype²	array Comparative Genomic Hybridization (<i>aCGH</i>) ³	No deletion or amplification greater than 5Mb; consistent with a normal karyotype	Normal Karyotype (passage 6)																																																
Post-Thaw Viability	Stereomicroscope	At least 10% of confluence	More than 50% of confluence recovered within 3 days																																																
Detection of Sendai virus genome and transgenes	RT-PCR	Vector-free iPS cells after 2 months of culture	<table> <thead> <tr> <th>Gene</th> <th>Result</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>SeV</td> <td>++; low expression⁴</td> </tr> <tr> <td>KOS</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Klf4</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>c-Myc</td> <td>++; very low expression⁴</td> </tr> </tbody> </table>	Gene	Result	SeV	++; low expression ⁴	KOS	-	Klf4	-	c-Myc	++; very low expression ⁴																																						
Gene	Result																																																		
SeV	++; low expression ⁴																																																		
KOS	-																																																		
Klf4	-																																																		
c-Myc	++; very low expression ⁴																																																		

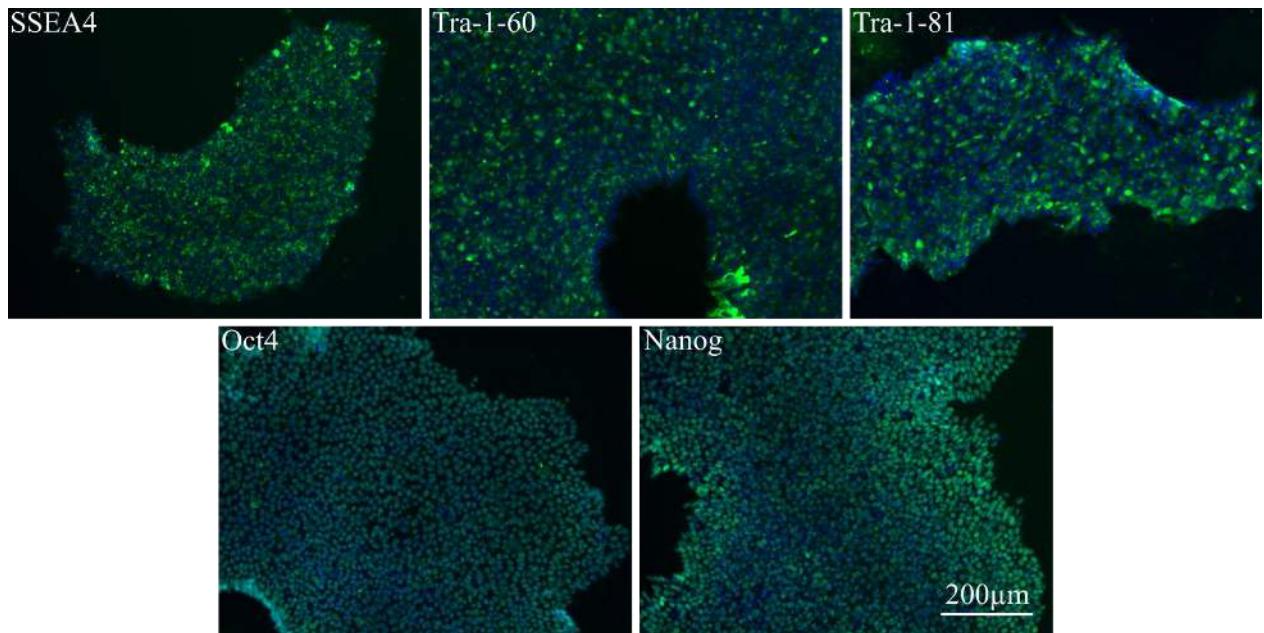
¹ Venor®GeM Mycoplasma PCR Detection Kit, Cederlane, cat# 11-1100

² These analysis were performed by Cell Line Genetics Inc

³ Elliott, A. M., Hohenstein Elliott, K. M., Kammescheidt, A. (2010). High Resolution Array-CGH Characterization of Human Stem Cells Using a Stem Cell Focused Microarray. *Mol Biotechnol*, 46, 234–242.

⁴ The time needed to derive vector-free iPSCs may vary depending on culture and passage conditions. (User Guide: CytoTune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit)

Figure 1: Expression of pluripotency-associated proteins



Laurie Martineau

February 21, 2017

Laurie Martineau, MSc
Manager

Date

[Handwritten signature]

February 21, 2017

Jack Puymirat, MD, Ph.D.
Director

Date

FARSF56

Certificat d'analyse

Clone caractérisé :	FARSF56-4
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 :	FARSM56; Fibroblastes
Pathologie :	Ataxie Récressive 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 Sendaï
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 Y-27632</i>
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 FARSF56-4 après 3 jours suivant la décongélation (barre = 200µm)

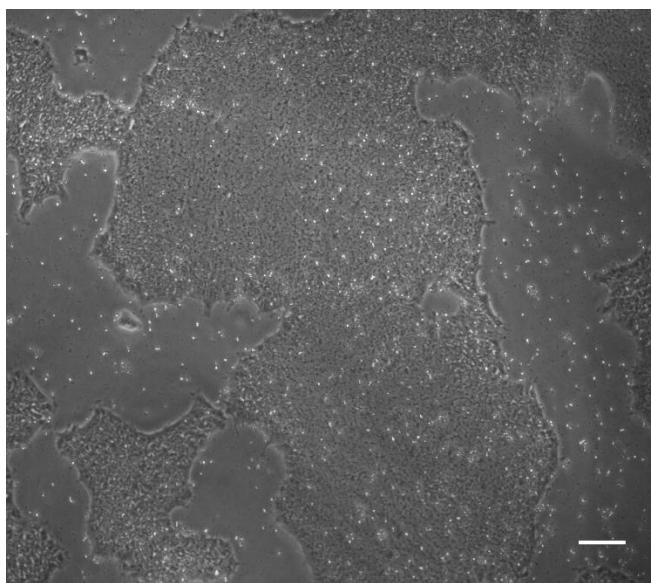


Tableau n°1 : Caractérisation du clone FARSF56-4

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 vérifié sur gel d'agarose.	<table> <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 feuillets embryonnaires	Formation de corps embryoides 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 feuillets	<table> <thead> <tr> <th>Auto-renouvellement</th> <th>-</th> </tr> <tr> <th>Ectoderme</th> <th>+</th> </tr> <tr> <th>Endoderme</th> <th>+</th> </tr> <tr> <th>Mesoderme</th> <th>+</th> </tr> </thead> </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) Analysis⁴	Analyse de 9 STR et de l'amelogenin pour la détermination du sexe	Identiques à la lignée cellulaire d'origine	<p>FARSF56-4 est identique à l'échantillon parental des fibroblastes FARSF56</p> <table> <thead> <tr> <th></th> <th>X</th> <th>X</th> <th>D5S818</th> <th>11</th> <th>13</th> </tr> </thead> <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>		X	X	D5S818	11	13	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
	X	X	D5S818	11	13																																		
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																																		
Caryotypage⁴	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> <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

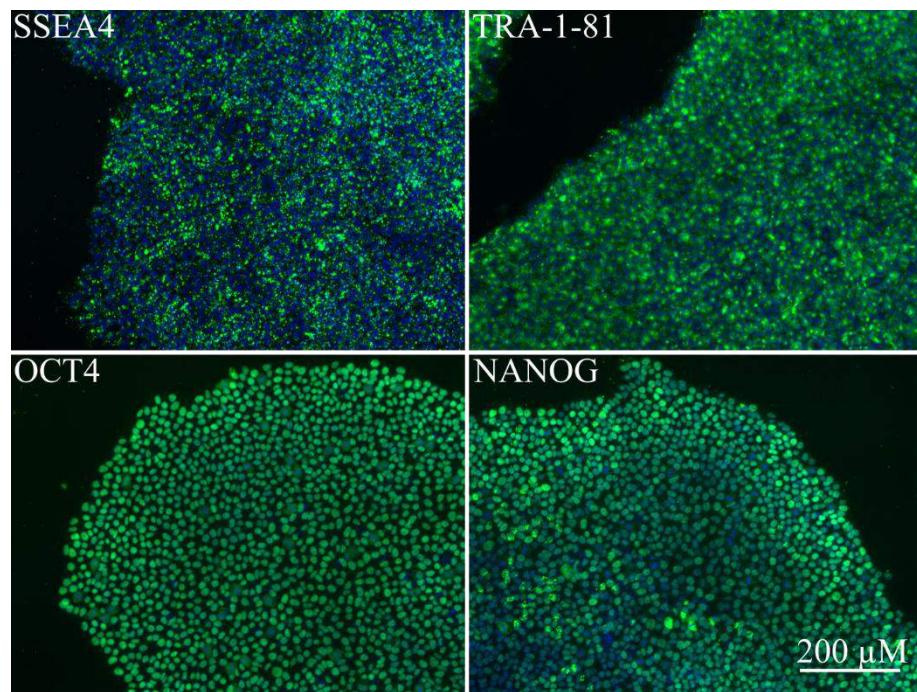


Figure 3: Expression de protéines associées à la pluripotence par cytométrie de flux

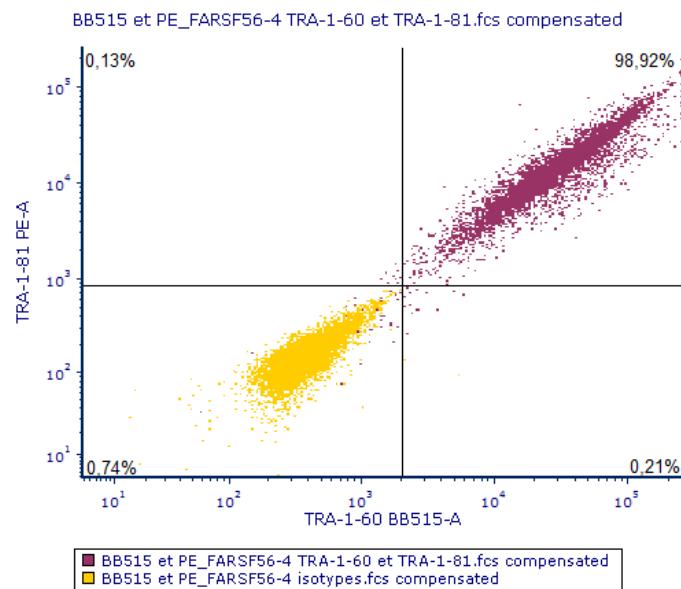
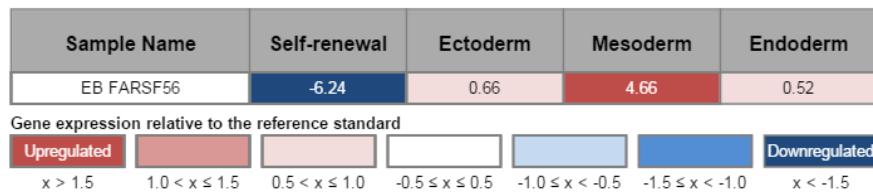


Figure n°3 : Résultats du *hPSC Scorecard™ panel*

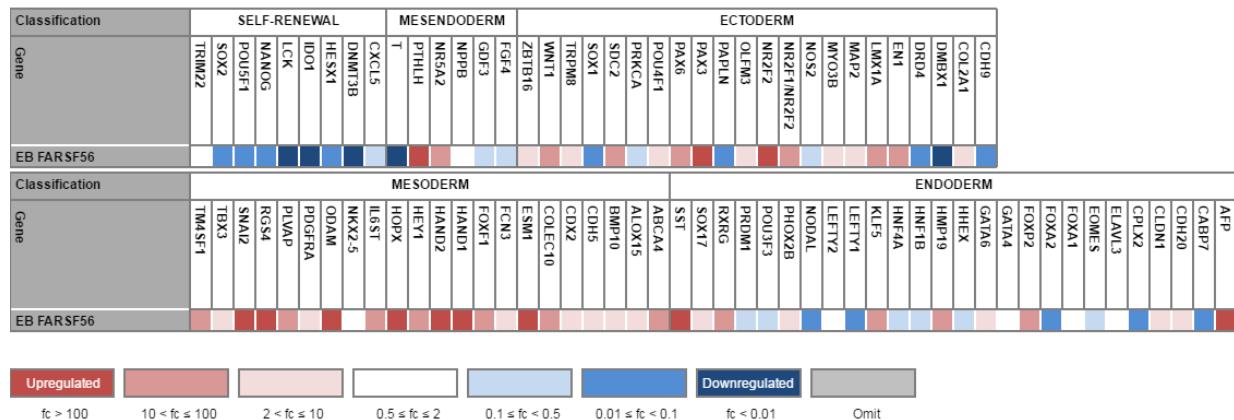
a) Scores

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



b) Expression génique

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



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.

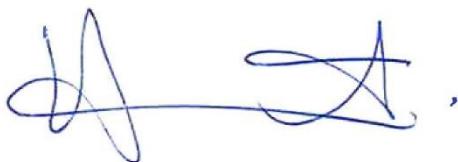
Approuvé par :



Laurie Martineau, MSc
Responsable de la plateforme

Le 13 février 2020

Date



Jack Puymirat, MD, Ph.D.
Directeur

Le 13 février 2020

Date

FARSM50

Certificat d'analyse

Clone caractérisé :	FARSM50-5
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 :	FARSM50; Fibroblastes
Pathologie :	Ataxie Récressive Spastique Autosomique 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 Sendaï
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 Y-27632</i>
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 FARSM50-5 après 3 jours suivant la décongélation (barre = 200µm)

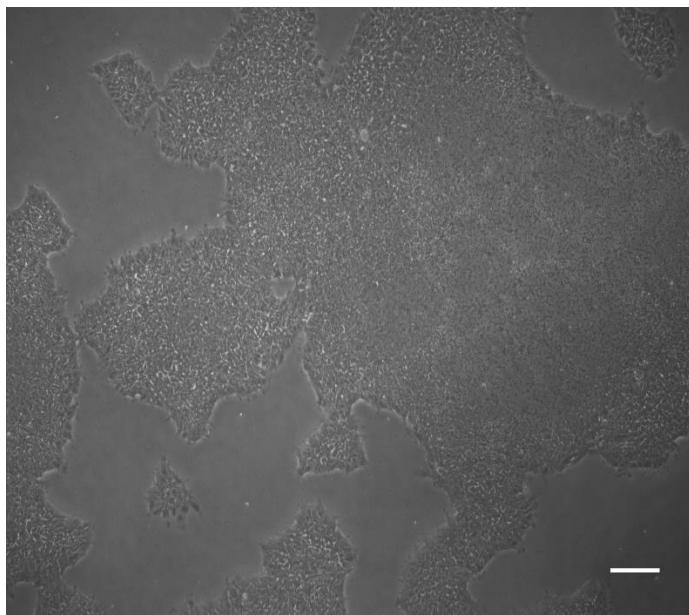


Tableau 1: Caractérisation du clone FASRM50-5

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 2)																														
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 = 97,08% (Figure 3)																														
Expression de gènes reliés à la pluripotence	Analyse par RT-PCR	Présence d'une bande vérifié sur gel d'agarose.	<table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <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 feuillets embryonnaires	Formation de corps embryoides 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 feuillets	<table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <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> </table> (Tableau 2)	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) Analysis⁴	Analyse de 9 STR et de l'amelogenin pour la détermination du sexe	Identiques à la lignée cellulaire d'origine	FARSM50-5 est identique à l'échantillon parental des fibroblastes FARSM50 <table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th></th> <th>X</th> <th>Y</th> <th></th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Amel</td> <td></td> <td></td> <td>D5S818</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td>CSF1PO</td> <td>11</td> <td></td> <td>D7S820</td> <td>11</td> </tr> <tr> <td>D13S317</td> <td>11</td> <td>13</td> <td>TH01</td> <td>6 9,3</td> </tr> <tr> <td>D16S539</td> <td>11</td> <td></td> <td>TPOX</td> <td>8 11</td> </tr> <tr> <td>D21S11</td> <td>29</td> <td>31</td> <td>vWA</td> <td>16 17</td> </tr> </tbody> </table>		X	Y			Amel			D5S818	12	CSF1PO	11		D7S820	11	D13S317	11	13	TH01	6 9,3	D16S539	11		TPOX	8 11	D21S11	29	31	vWA	16 17
	X	Y																															
Amel			D5S818	12																													
CSF1PO	11		D7S820	11																													
D13S317	11	13	TH01	6 9,3																													
D16S539	11		TPOX	8 11																													
D21S11	29	31	vWA	16 17																													
Caryotypage⁴	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 (Figure 1)																														
Test de détection du génome viral du Sendai	Analyse par RT-PCR	Aucune détection des gènes viraux après 2 mois de culture.	<table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <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

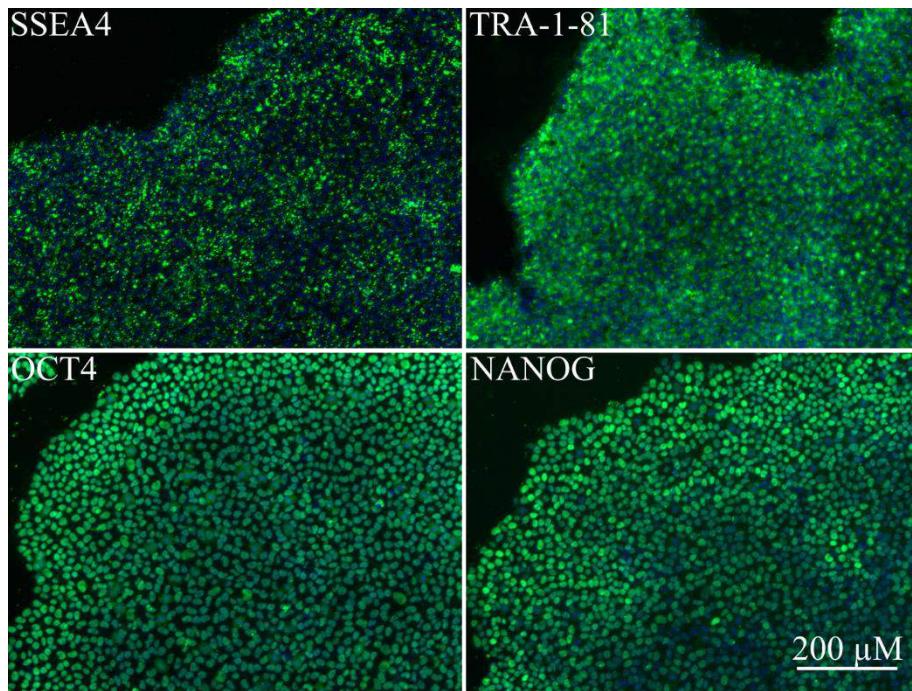


Figure 3: Expression de protéines associées à la pluripotence par cytométrie de flux

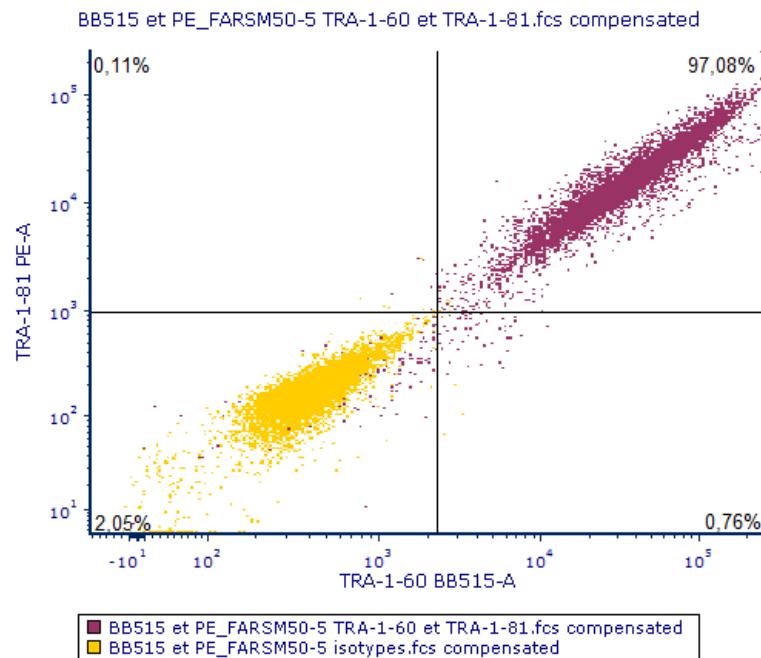
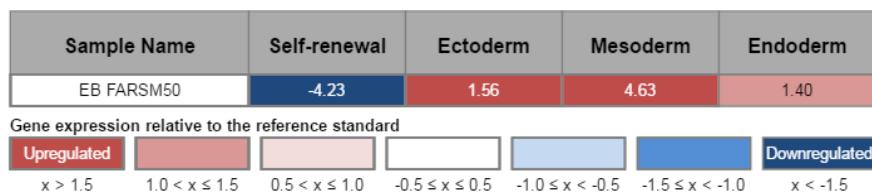


Tableau 2 : Résultats du *TaqMan™ hPSC Scorecard™*

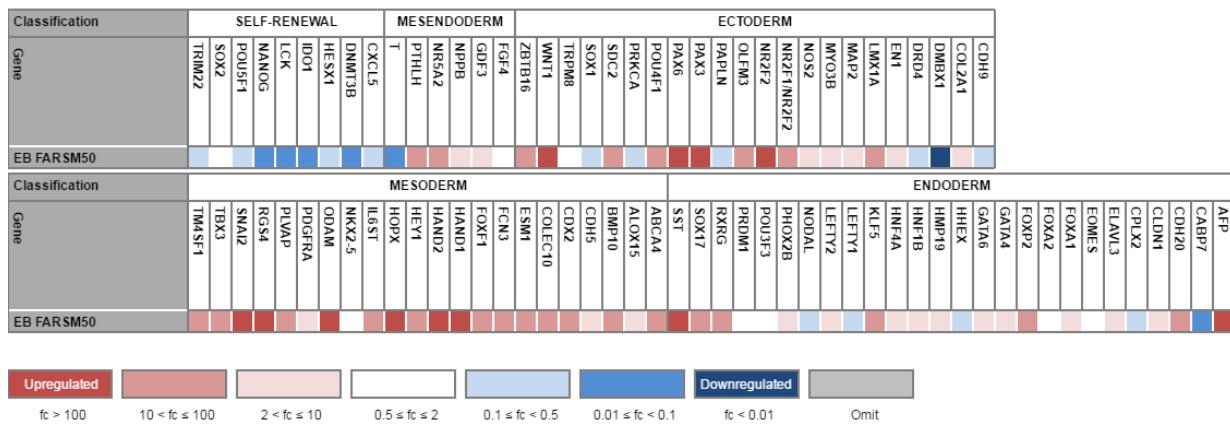
a) Scores

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



b) Expression génique

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



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

ARSM42081221

Certificat d'analyse

Clone caractérisé :	ARSM42 clone 23
Description :	Cellules souches humaines induites à la pluripotence
Statut juridique :	Pour la recherche seulement. Non commercialisable.
Chercheur requérant :	Dr Francois Gros-Louis
Institution :	CMDGT/LOEX
Cellules d'origine et description :	ARSM42081221, fibroblastes
Pathologie :	Ataxie récessive spastique autosomique 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 Sendaï
% d'efficacité de reprogrammation :	3,56% (Figure 1)
Recommandation pour la décongélation	Un cryovial dans 2 pétris de 35mm + 10µM de <i>Rock Inhibitor Y-27632</i> 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 ARSM42 clone 23

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 10 gènes suivants : <i>DNMT3B, TERT, ZFP42, TDGF1, UTF1, LIN28A, FGF4, GDF3, DPP5A et FOXD3.</i>	Réussi (Figure 5)
Différenciation dans les 3 feuillets embryonnaires	Corps embryoïdes spontanés et hPSC Scordcard™ Panel ²	Surexpression de gènes associés aux 3 feuillets embryonnaires	Réussi (Figure 6)
Détection des mycoplasmes³	PCR	Mycoplasmes non détectés	Réussi
Détection du génome viral du Sendai	RT-PCR	Aucune détection après 2 mois de culture	Réussi
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. Venor®GeM Mycoplasma OneStep, Cedarlane, cat# 11-8100

Ça se découvre ici.

Alkaline Phospatase



Figure 1 : Fixation et coloration à l'alkaline phosphatase des clones d'iPSCs 21 jours suivant la transduction au virus du Sendai. Un total de 25 000 cellules transductées ont été ensemencées dans un 35mm. Les clones positifs à l'alkaline phosphatase ont été comptés avec ImageJ.

Observation microscope

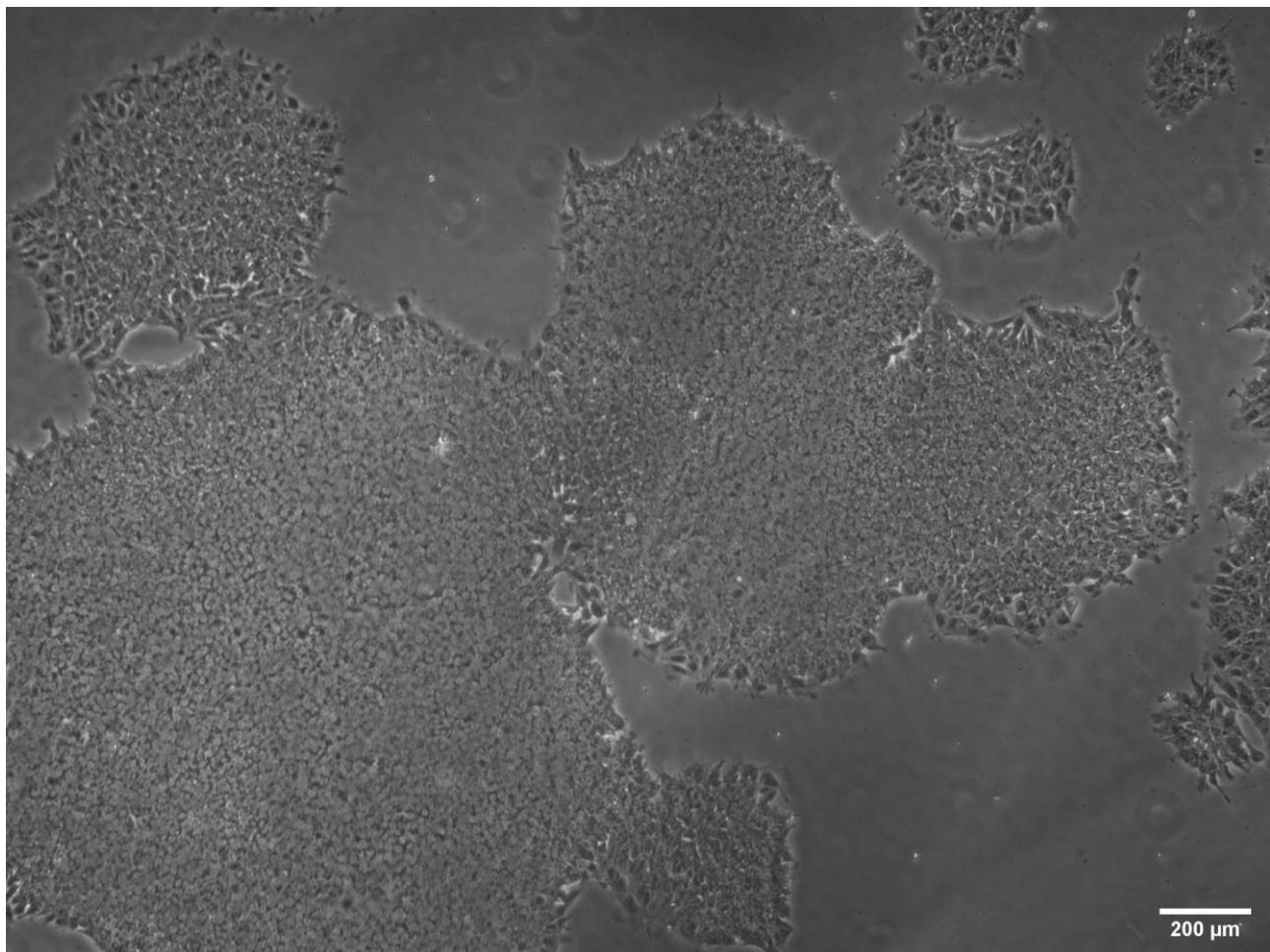


Figure 2: Morphologie des iPSC ARSM42 clone 23; 3 jours suivant la décongélation.

Immunofluorescence

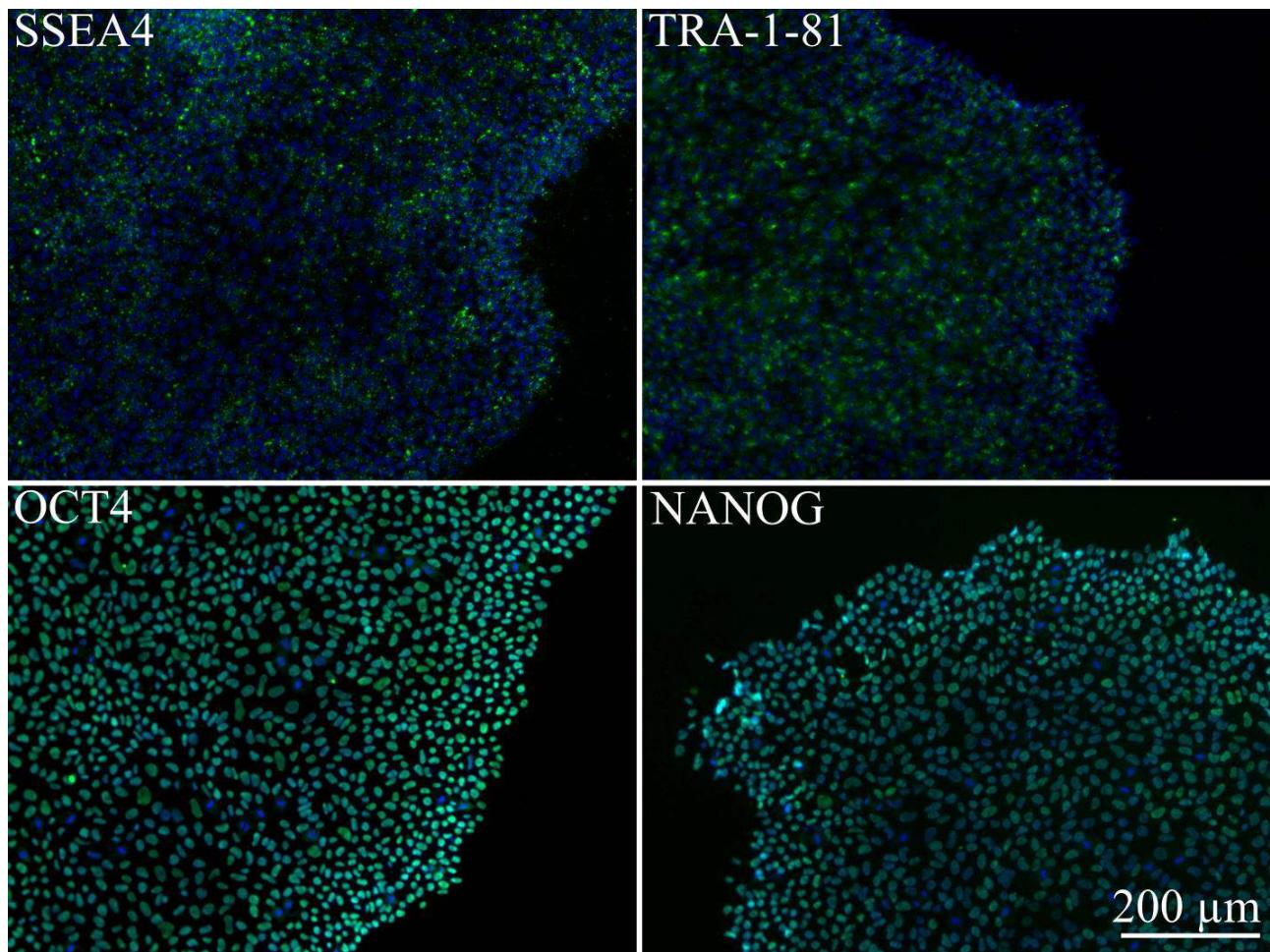


Figure 3: Expression de 4 protéines (vert) associées à la pluripotence par immunofluorescence. Les noyaux sont représentés par le DAPI (bleu).

Cytométrie en flux

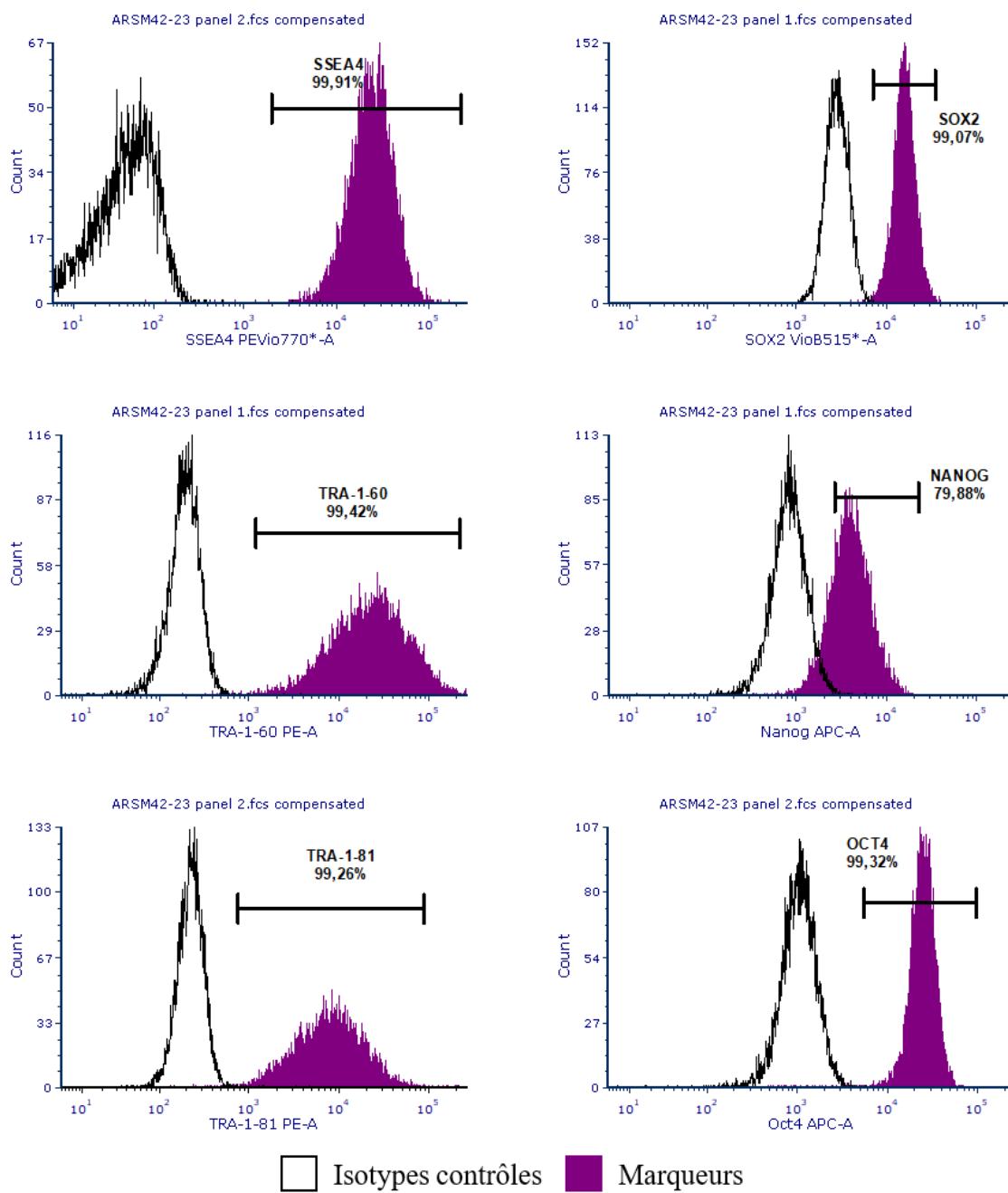


Figure 4: Expression de protéines associées à la pluripotence par cytométrie en flux des iPSC ARSM42 clone 23.

Ça se découvre ici.

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

RT-qPCR

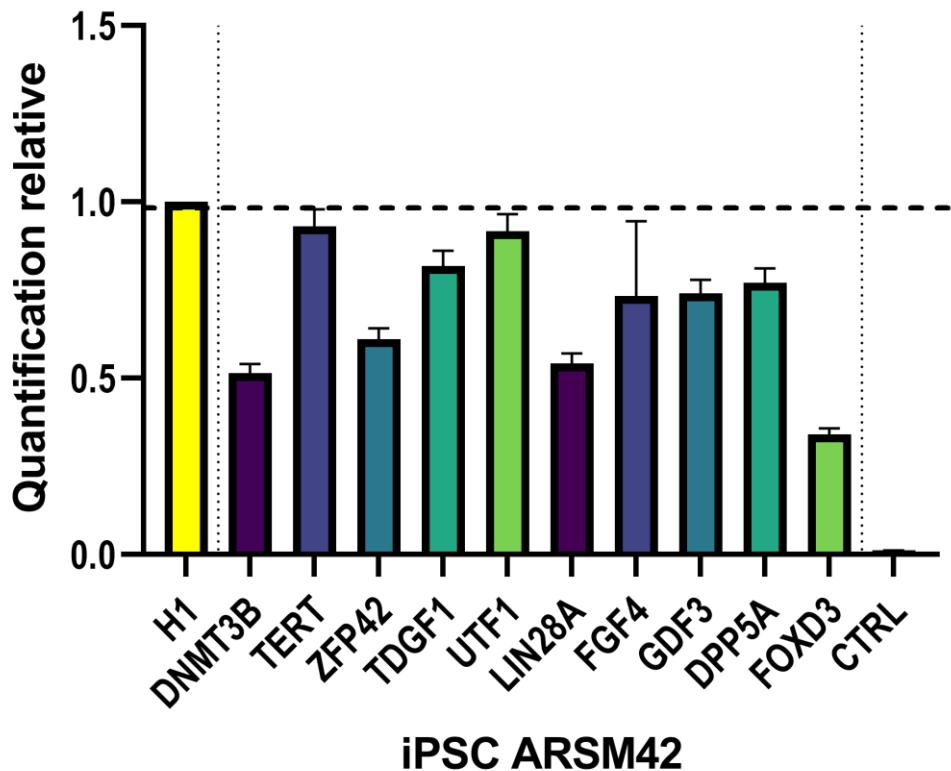
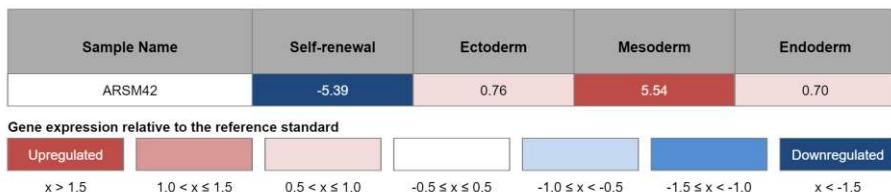


Figure 5 : Expression relative en fonction de cellules souches embryonnaires H1. Les résultats ont été normalisés avec 2 gènes de références : *GAPDH* et *C1orf43*. Les cellules parentales des iPSC ont été sélectionnées comme contrôle négatif (CTRL).

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.

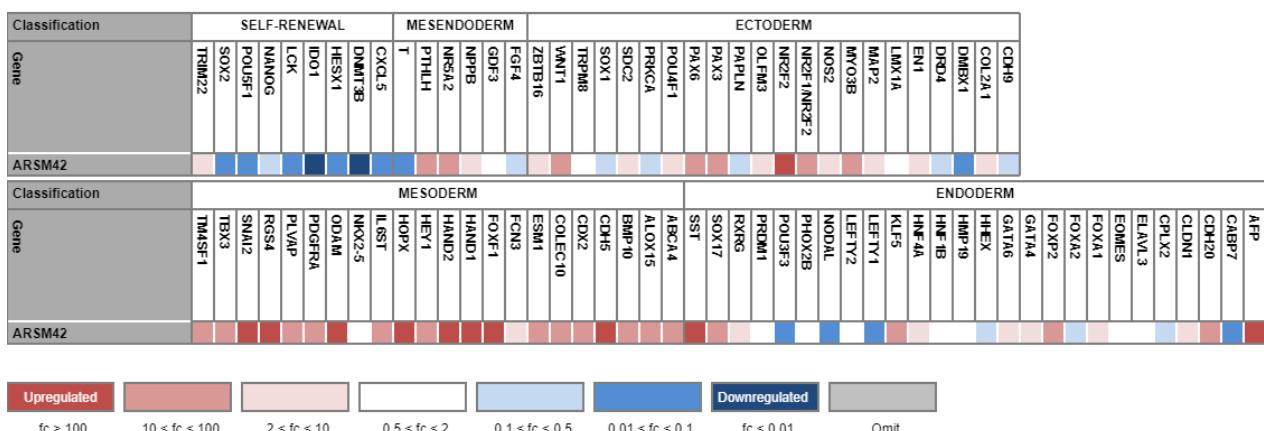


Figure 6 : a) Score et b) changement de l'expression génique de gènes des 3 feuillets embryonnaires en fonction d'un groupe de 23 lignées de cellules souches pluripotentes non différenciées. Les corps embryonnaires ont été différenciés pendant 14 jours.

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.

	Fibroblastes ARSM42081221		iPSC ARSM42 clone 23	
	X	Y	X	Y
AMEL	X	Y	X	Y
CSF1PO	11	12	11	12
D13S317	12		12	
D16S539	9	13	9	13
D21S11	28	31	28	31
D5S818	11		11	
D7S820	11		11	
TH01	6	8	6	8
TPOX	8	11	8	11
vWA	18		18	

Karyostat+

KaryoStat+ Results: KS-11557 (iPSC ARSM42 cl. 23)

1. KaryoStat+ analysis of KS-11557 revealed the sample originated from a male individual
2. No chromosomal aberrations were found when comparing against the reference dataset (Figure 5)

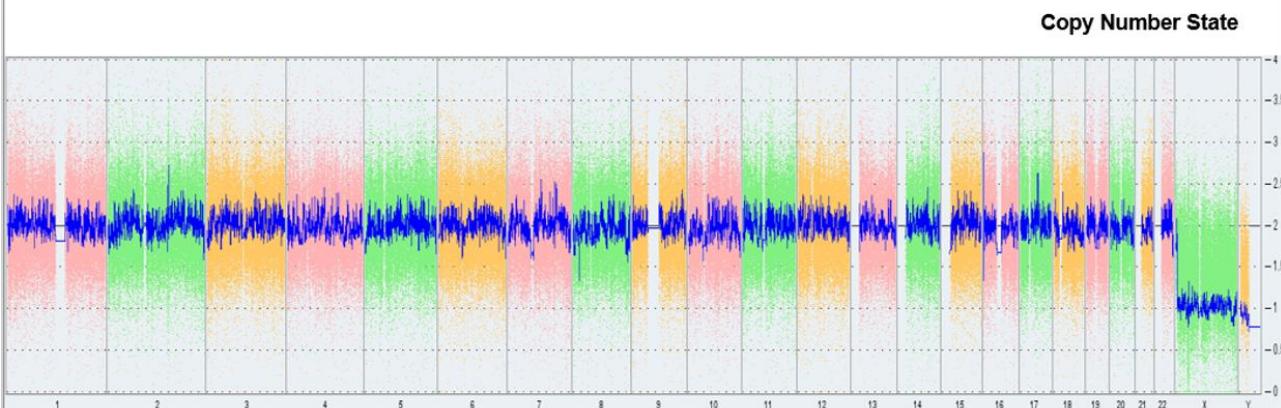


Figure 5: Whole genome view. The whole genome view displays all somatic and sex chromosomes in one frame with high level copy number. The smooth signal plot (right y-axis) is the smoothing of the log2 ratios which depict the signal intensities of probes on the microarray. A value of 2 represents a normal 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).*

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

8 Proprietary & Confidential

ThermoFisher
SCIENTIFIC

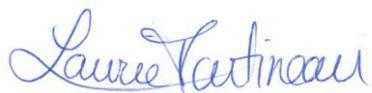
Figure 7 : Caryotype des iPSC ARSM42 clone 23 à P5. Ces résultats ont été générés par ThermoFisher Scientific. Résolution de > 1Mb.

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

Le 05-05-2022

Date



François Gros-Louis, Ph.D.
Directeur

Le 05-05-2022

Date