

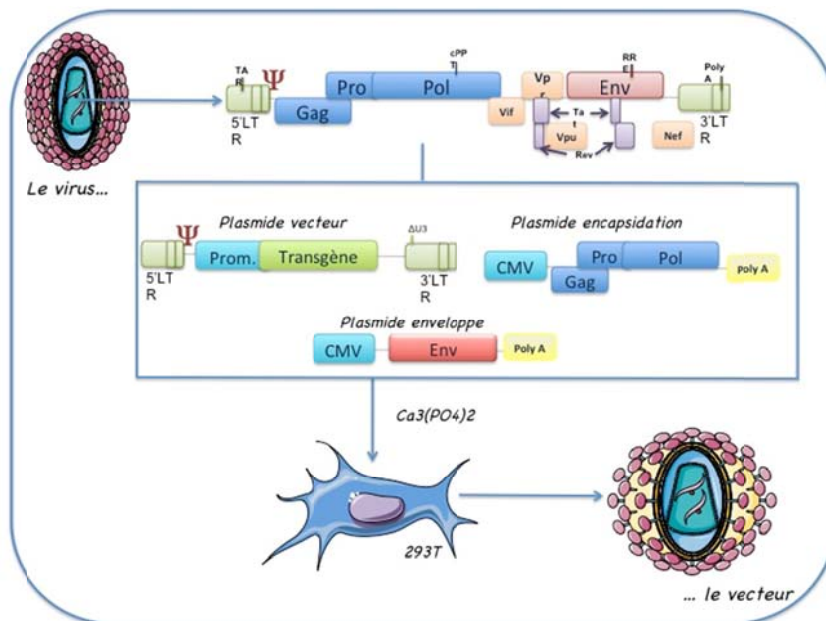
AniRA Vectorologie



Production de lots de vecteurs rétroviraux (MLV, HIV-1 et SIV) en confinement L2 ou L3 :

La production des vecteurs lentiviraux est réalisée par tri-transfection en suivant la méthode de transfection au phosphate de calcium, dans une lignée de cellules embryonnaires de rein (293T). Les trois plasmides utilisés codent respectivement pour:

- La glycoprotéine d'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire (VSVG).
- Les protéines de structures et enzymatiques du virus (gag+pol).
- Le vecteur viral codant pour un gène rapporteur (GFP).



Différentes enveloppes peuvent être utilisées :

Par défaut nous utilisons VSV-G comme enveloppe, mais d'autres pseudotypes peuvent être utilisés :

- VSV-G : Virus de la Stomatite Vésiculaire - Tropisme large dont l'humain (Pantropique).
- MLV-E : Tropisme limité au rats et aux souris (Ecotrope)
- MLV-A : Rétrovirus de Leucémie Murine (Amphotrope)
- RD114/TR : Rétrovirus endogène de chat muté avec la queue cytoplasmique de MLV-A (TR)*
- GALV/TR : Virus de Leucémie du Singe Gibbon muté avec la queue cytoplasmique de MLV-A (TR)*
- De nouvelles enveloppes sont en cours d'étude : exemple : BaenV: Virus endogène de Babouin*

*(préférence Hématopoïétique)

Echelle de production :

Production non concentrée en boîte de diamètre 10 cm : soit 5 ml de virions non concentrés

Production concentrée 100X : 10 boîtes de diamètre 10 cm : soit 550 µl de virions concentrés

Le nombre de boîtes est modulable en fonction de la demande du client.

Concentration de virions :

Après transfection, le surnageant viral est récolté, filtré et concentré par ultra centrifugation +/- coussin de sucrose ou par ultrafiltration (Vivaspin). Les virions concentrés sont repris par défaut au 1/100ème dans du PBS + 1% glycérol sauf avis contraire.

Titration de particules virales infectieuses :

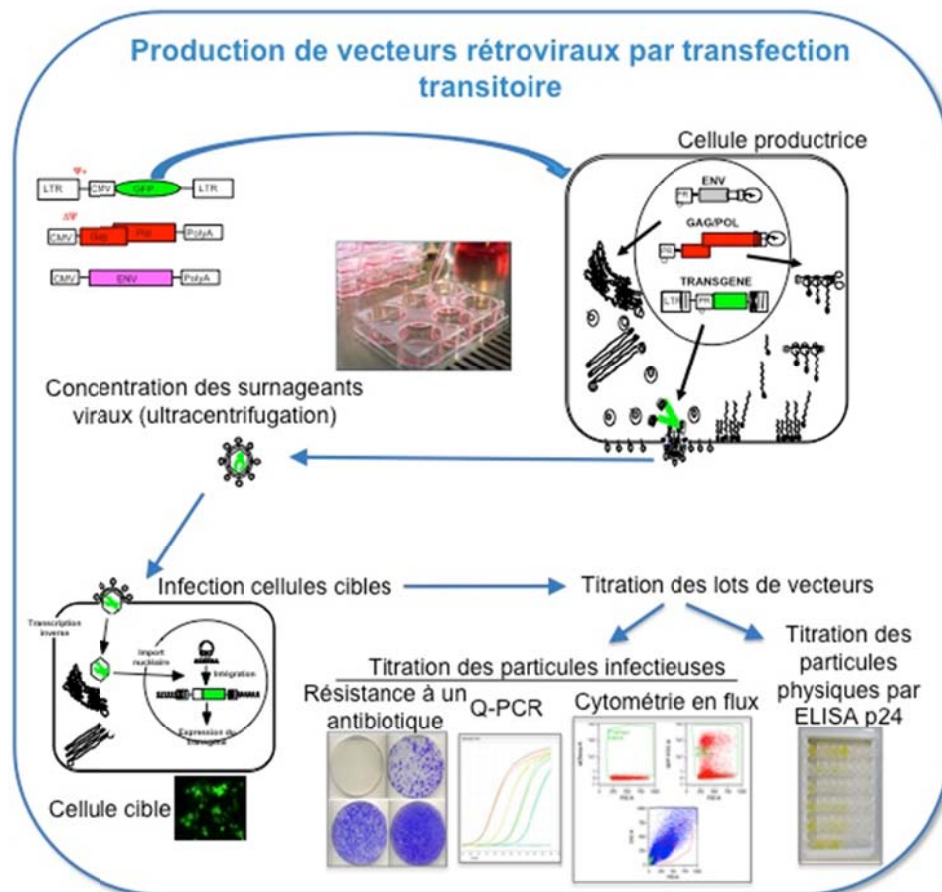
La titration des particules virales infectieuses est réalisée, par un test d'infection de cellules HEK 293T suivie d'une:

* mesure de l'expression un gène rapporteur codant pour un fluorochrome (GFP, mRFP, mKate,...) par cytométrie en flux (FACS)

* sélection avec un antibiotique (puromycine, néomycine, zéomycine,...) grâce à un gène de résistance

* quantification du nombre de copie de génome intégré en Q-PCR (si les séquences rétrovirales sont compatibles avec notre système d'amplification)

Nous proposons une quantification des particules physiques par dosage de la protéine de capsid p24, p27 ou p30 en ELISA



Qualité des productions virales et contrôles :

* La plateforme effectue des contrôles mensuels vérifiant l'absence de mycoplasmes dans les lignées cellulaires de production et de titration.

* Un contrôle hebdomadaire est réalisé sur la production de lentivirus à l'aide de vecteurs test véhiculant la GFP, permettant à la fois un contrôle des réactifs de transfection et la qualité des cellules productrices.

Conditionnement de la production :

Pour une conservation optimale, les vecteurs produits sont aliquotés et congelés à -80°C dès leur production. La titration est effectuée après décongélation d'un aliquote pour se mettre dans les conditions de l'utilisateur.

* Production en 1 boîte non concentrée : aliquotes de 1 ml, volume total 5ml

* Production en 10 boîte concentrées 100X : aliquotes de 50 µl, volume total 550 µl

* Autre conditionnement de production possible sur demande

Si nécessaire et sur demande, pour les productions non concentré le surnageant viral peut être conservé à 4°C.

Livraison :

Sur le site de production, le demandeur viendra chercher sa production virale avec une boîte isotherme et de la carboglace.

En dehors du site de production, la plateforme fera appel à une société agréée pour les substances infectieuses à la norme UN3373. Le virus sera livré dans un triple emballage : 1) tube dans un sachet zipper, 2) sachet Safetybag avec son papier absorbant, 3) boîte isotherme avec carboglace.

Les frais de livraison sont à la charge du demandeur.

Valorisation et reconnaissance des apports technologiques de la plateforme :

Dans le cadre d'une prestation de service, le demandeur ainsi que le responsable scientifique de la structure de recherche s'engagent à citer ou à remercier la plateforme de vectorologie dans ses articles, abstracts et autres communications scientifiques.

Si la contribution de la plateforme a permis l'obtention de résultats essentiels à l'article ou la communication, le demandeur et le responsable de la structure de recherche s'engage à faire cosigner le personnel ayant mené à bien les productions virales.

Merci d'informer la plateforme de toutes communications la concernant. La reconnaissance scientifique est nécessaire à l'évolution de carrière du personnel de la plateforme, et elle est cruciale pour les demandes de postes et l'établissement des demandes de financement.

- **Pour toute demande de production de vecteurs, le demandeur doit remplir une demande et signer la « [Charte d'utilisation des services de la Plateforme de Vectorologie](#) »:**

Aucune demande de production ne sera prise en compte sans :

- Le [Formulaire de demande](#) (entièrement rempli sous format Word) envoyé par mail.
- La description du vecteur avec sa carte détaillée (en version électronique pour soumission au HCB) avec le nom du gène formellement identifiable dans une base de données.
- Le numéro d'agrément OGM / HCB.