

Règles de fonctionnement du plateau technique AniRa-Vectorologie

1. Présentation et mission du plateau

Le plateau AniRa-Vectorologie offre un savoir-faire technologique dans le domaine de la production de vecteurs lentiviraux destinés au transfert stable et efficace de séquences nucléiques (gène, ADNc, Sh/miARN) dans des lignées cellulaires, des cellules primaires difficilement transfectables (cellules souches, ...) ou chez un organisme entier. Ce système de transfert est utilisé dans de nombreux domaines de la recherche fondamentale ou clinique. Les applications sont multiples et l'utilisation de ces vecteurs s'est progressivement étendue aux champs de la thérapie génique, de l'immunothérapie, de la vaccinologie, de la transgénèse et de la virologie.

AniRa-Vectorologie est intégrée dans la plateforme régionale AniRa labélisée IBiSA, membre de l'Infrastructure de Recherche nationale [Celphédia](#).

La plateforme de vectorologie offre une expertise, la production de lots de vecteurs rétro et lentiviraux bien caractérisés et prêts à l'emploi en confinement C2, réalisée dans le respect strict des conditions de biosécurité édictées par le comité d'expertise des utilisations confinées d'OGM (confinement L2 ou L3 pour la production) selon une chartre d'utilisation des services propre à la plateforme de vectorologie. La principale activité de la plateforme de vectorologie est la production de vecteurs sur la base de MLV, HIV-1 ou SIV.

Plus spécifiquement :

- Un conseil dans le choix des vecteurs, pour le clonage de gènes d'intérêt et pour le niveau de biosécurité des vecteurs.
- La production de vecteurs pour la surexpression de gènes endogènes ou l'expression ectopique d'un gène dans une lignée cellulaire.
- La production de vecteurs pour le KO de gènes par des vecteurs codant des shRNAs dirigés contre l'ARN du gène d'intérêt.
- La production de vecteurs de régulation d'expression de gènes ou conditionnant le KO de l'expression de gènes par des lentivecteurs inducibles.
- La production de vecteurs de niveaux de confinement C2 ou C3, ainsi que la titration par FACS (basée sur l'expression d'une protéine rapportrice), par sélection avec un antibiotique et par Q-PCR.
- La formation en production de vecteurs sur demande individuelle et à titre exceptionnel.
- Un service de lentigénèse : le plateau est impliqué dans le service de transgénèse lentivirale afin de générer des souris transgéniques.

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) ou un vecteur fourni par l'utilisateur.

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 :

Par infection de cellules HEK293T suivie d'une des révélations suivantes :

- Détection par cytométrie en flux (FACS), du vecteur grâce à un gène rapporteur codant pour un fluorochrome (GFP, mRFP, mKate, ...),
- Sélection avec un antibiotique (puromycine, néomycine, zéomycine, ...) grâce à un gène de résistance présent dans le vecteur.
- Quantification du nombre de copies de génome intégrées par QPCR (si les séquences rétrovirales sont compatibles avec nos conditions).

2. Organisation du plateau

a. Le personnel

L'équipe technique du laboratoire AniRA-Vectorologie est constituée de :
Caroline COSTA-FEJOZ, (U1111), Responsable du plateau technique
Didier NEGRE, (U1111)
Gisèle FROMENT, (US8-UAR3444)

b. Conseil scientifique (ou Comité Utilisateurs)

Son comité scientifique est composé de :
Floriane FUSIL, CIRI (équipe O. Thaunat)
Didier NEGRE, CIRI (équipe FL. Cosset)
Anne-Laure MATHIEU, CIRI (équipe T. Walzer)

La mission de ce comité est de conseiller le responsable du plateau technique sur les questions scientifiques, de faire remonter les besoins des demandeurs de leurs unités et d'échanger sur les orientations du plateau technique.

c. Locaux et équipements

Le plateau technique AniRA-Vectorologie est situé sur le site de l'ENS de Lyon
Il est hébergé par le CIRI (Centre International de Recherche en Infectiologie) U1111/UMR5308 INSERM-CNRS-UCBL dans l'équipe EVIR située au rez de chaussée du M5 (ex LR5) de l'ENS de Lyon Site Monod :
Ecole Normale Supérieure de Lyon
Batiment M5
Equipe EVIR
9 rue du Vercors
69007 Lyon

d. Agréments d'utilisation confinée d'organisme génétiquement modifiés

Le laboratoire AniRA-Vectorologie possède les agréments d'utilisation confinée d'organisme génétiquement modifiés du Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche et de l'innovation. Le personnel est donc habilité à manipuler des OGM.

Le demandeur doit obligatoirement fournir au personnel du plateau technique son numéro d'agrément OGM avec une date de validité (< 5 ans). Aucune demande sans ce numéro d'agrément valide ne sera prise en compte.

Pour chaque demande de production de particules virales, le plateau de vectorologie a obligation de déclarer votre demande auprès du Comité d'expertise des utilisations confinées d'OGM (CEUCO).

3. Règles de fonctionnement

a. Contact

Caroline COSTA-FEJOZ, Responsable du plateau technique

Tel : 04 72 72 87 31

Mail : caroline.costa@ens-lyon.fr

Pour toute demande de production de vecteurs, merci de télécharger le fichier de demande de productions, le compléter et renvoyer au contact suivant : plateau.vectorologie@ens-lyon.fr

b. Accès

Les utilisateurs n'ont pas accès au plateau technique AniRA-Vectorologie qui est situé dans le laboratoire de l'équipe EVIR manipulant des MOT.

Pour définir les modalités de dépôt des échantillons, les utilisateurs doivent contacter le responsable ou le personnel du plateau technique AniRA-Vectorologie.

c. Personnes autorisées et formation

Sur le site de l'ENS de Lyon, pour les académiques lyonnais, l'accès régulier au site Monod est soumis à l'obtention de badges délivrés par le service des badges de l'ENS (assistance.badges@ens-lyon.fr), la condition initiale étant que le demandeur existe dans la base de données du personnel de l'ENS (à faire réaliser par votre gestionnaire).

L'accès au site de l'ENS Monod nécessite l'obtention de 2 badges :

- 1 badge bleu : pour l'entrée sur le site.
- 1 badge blanc : pour l'entrée au bâtiment M5.

Si vous n'avez pas de badge ENS :

1) la gestionnaire de votre unité doit contacter la présidence de l'ENS (veronique.queste@ens-lyon.fr) pour vous inscrire sur le logiciel STELLA.

2) la gestionnaire de votre unité doit contacter Julie Alex (julie.alex@ens-lyon.fr) pour demander un accès plateau.

3) Julie Alex vous enverra un mail vous indiquant comment récupérer vos badges auprès du service badge de l'ENS.

Si vous avez un badge ENS : commencez la procédure au point 2).

Les demandeurs ne possédant pas de badge doivent se présenter à l'accueil Monod (M1) au 46, allée d'Italie 69007 LYON.

Pour l'ENS de Lyon, la plage horaire de travail est 7h30 – 19h30, du lundi au vendredi, hors jours fériés.

Les prestations étant réalisées par le personnel du plateau technique AniRA-Vectorologie, il n'y a pas de formation dispensée aux utilisateurs.

d. Responsabilité utilisateur

Pour toute demande de production de vecteurs, le demandeur doit remplir une demande, lire les règles de fonctionnement du plateau et signer l'engagement du demandeur (formulaire point g.).

Le demandeur s'engage à citer ou à remercier la plateforme de Vectorologie dans ses articles, abstracts et autres communications scientifiques et à transmettre les références de toute publication ayant utilisés les services du laboratoire de Vectorologie.

e. Engagement PT

Le personnel du laboratoire s'engage à informer les demandeurs des problèmes techniques survenus au cours de la production de leurs vecteurs.

Il s'engage également à assurer un service de qualité auprès des demandeurs : contrôle régulier des cellules productrices, contrôle interne de production, discussions et échanges.

g. Engagement utilisateur (formulaire) : Ci-dessous

Plateforme de Vectorologie
Plateforme AniRA labellisée IbiSA
Agrément OGM: N° 9961 & 9955
ENGAGEMENT DU DEMANDEUR



Nom et Prénom du responsable de l'équipe :

Nom et Prénom du demandeur :

L'accès aux services de la Plateforme de Vectorologie implique l'adhésion du demandeur aux conditions suivantes :

Pour les OGM : Le **Numéro d'agrément OGM** avec une date de validité (< 5 ans) est **Obligatoire**. Le dossier soumis auprès du comité d'expertise des utilisations confinées d'OGM (CEUCO) pour obtenir les autorisations réglementaires pour mener à bien les recherches avec les virus produits.

Aucune demande sans ce numéro d'agrément valide ne sera prise en compte.

Pour toute demande de production de particules virales, le plateau de Vectorologie a obligation de déclarer votre demande de vecteur ainsi que votre numéro d'agrément auprès du CEUCO.

- Fournir une **carte détaillée** de chaque vecteur avec ses éléments fonctionnels **en version électronique** (cette carte est obligatoire pour la déclaration de votre production auprès du CEUCO) ainsi que le **nom du gène formellement identifiable dans une base de données**.

- Pour toute préparation, les ADN devront arriver une semaine avant la date prévue.

ADN de qualité maxiprep (Macherey-Nagel, Qiagen...) endo-free inutile, resuspendu dans H₂O.
Proscrire les groupements de minipreps.

Les échantillons d'ADN doivent être identifiés correctement avec :

- Le **nom du vecteur lisible**
- Le **nom du demandeur** de la production et
- La **concentration exacte** (de préférence à 1µg/µl)

☛ **Aucune demande de production ne sera prise en compte sans :**

- Le **formulaire de demande** (entièrement rempli sous word) envoyé par mail
- La **description du vecteur avec sa carte** détaillée (version électronique pour le CEUCO)
- Le **N° d'agrément OGM**
- Le **nom du gène formellement identifiable dans** une base de données.

- Les produits livrés sont exclusivement destinés à un usage de recherche, et seront utilisés uniquement dans des locaux appropriés et sous la responsabilité du demandeur.

Si nécessaire, les produits seront expédiés par un transporteur agréé pour les substances infectieuses à la norme UN3373.

- Les facturations sont établies 2 fois par an (juillet et janvier) par le service financier de la SFR.

Toute production effectuée fonctionnelle ou non sera systématiquement facturée au tarif en vigueur.

- Le demandeur s'engage à citer ou à remercier la plateforme de Vectorologie dans ses articles, abstracts et autres communications scientifiques et à transmettre les références de toute publication ayant utilisés les services du laboratoire de Vectorologie.

Je reconnais avoir lu les règles de fonctionnement du plateau de Vectorologie et je m'engage à les respecter

Date :

Signature du demandeur : précédée de la mention « lu et approuvé »