

## **Note pour l'utilisation et la production de vecteurs lentiviraux**

La manipulation des lentivecteurs n'est pas dénuée de risques. Quelques règles d'utilisation sont donc à respecter.

### **Préambule :**

Les manipulateurs ont le devoir de connaître précisément la nature des constructions lentivirales et de transcomplémentation, ainsi que le classement de l'insert cloné dans le lentivecteur qu'ils utilisent.

Les mesures des paragraphes suivants s'appliquent aux vecteurs lentiviraux de deuxième génération, produits à l'aide de plasmides de transcomplémentation dépourvus des gènes régulateurs (VPR, VPU, NEF et VIF) dans les cellules HEK 293T. Les gènes viraux TAT et REV restent exprimés en phase de production. L'élément de vectorisation du transgène ne doit plus contenir de séquences régulatrices de la transcription dans la séquence U3 de la LTR 3' : vecteurs  $\Delta$ U3 ou *SIN*. **Les vecteurs répondant à ces caractéristiques sont de classe C2, le confinement de manipulation sera abordé dans la suite du texte.**

Pour toutes les autres constructions, la production est obligatoirement réalisée dans un local L3 agréé, indépendamment du classement du transgène.

## **Conditions d'utilisation des lentivecteurs, transcomplémentation minimale et SIN:**

1) Tout transgène de type B implique une production et une transduction des cellules cibles dans un laboratoire de type L3 en conformité avec la législation actuelle : agrément, et suivi du L3 ; formation et suivi médical de ses utilisateurs.

Certains transgènes classés *a priori* dans la classe B pourront, sur demande et avec des arguments expérimentaux solides, être reclassés en A par la commission.

La sortie du L3 des cellules transduites sera possible à la suite d'un contrôle :

Les cellules transduites sont cultivées une semaine. Au terme de cette période, le surnageant de la culture des cellules génétiquement modifiées est récolté, centrifugé, pour qu'un test ELISA de détection de la capsidie du HIV ou SIV (CAp24/p25) soit réalisé. Seule l'absence totale de signal par rapport à un contrôle de cellules non transduites autorise la sortie des cellules vers un laboratoire de confinement L2.

Les administrations de cellules transduites à des animaux peuvent être effectuées en animalerie A1.

Pour une administration *in vivo*, les lots de vecteurs devront être qualifiés avant l'administration. La qualification est obtenue par transduction de cellules C8166 puis détection de protéines virales de capsidie, par ELISA, dans les surnageants de culture, après une semaine de culture. Le résultat doit être négatif, l'injection est réalisée dans conditions L2, sous PSM II selon les conditions décrites ci-dessous, la stabulation en conditions A1 peut être envisagée.

Les résultats doivent être consignés dans le cahier de laboratoire.

2) Pour les transgènes de type A, une production des lentivecteurs en L2 est possible sous certaines conditions :

Les vecteurs et les séquences de transcomplémentation doivent correspondre aux conditions données dans le préambule.

Les expérimentations sont réalisées dans un laboratoire confiné L2, comme défini dans le manuel de la CGG, avec quelques précautions supplémentaires.

Le port de gants, d'un masque de protection, ainsi que des vêtements de protection adaptés (casaque fermeture dorsale), spécifiques au L2, sont obligatoires.

Les déchets liquides sont inactivés directement sous la hotte, de type PSM2.

Les déchets solides, après décontamination chimique, sont entreposés dans des conteneurs destinés à ce seul usage, clairement identifiés : manipulateur, laboratoire, date. Ces déchets pourront être autoclavés et seront éliminés par un circuit spécialisé dans la prise en charge des déchets biologiques.

Les deux types de déchets sont éliminés après chaque manipulation.

L'incubateur contenant les cultures doit être identifié, et son usage restreint.

Le volume de lentivecteur préparé ne peut excéder 200 mL de surnageant brut non purifié et non concentré. **En l'absence d'un matériel d'ultracentrifugation dans le laboratoire L2 de production, le ou les lentivecteurs produits sont alors utilisés directement après filtration sur membrane ou clarification.**

Pour toute application excédant ces volumes, une manipulation en laboratoire L3 est requise. Les transductions peuvent être réalisées en L2.

3) Pour les lentivecteurs exprimant un ou plusieurs ARN interférent (shRNA) :

Les lentivecteurs ciblant un oncogène, un anti-oncogène, un gène pro-apoptotique ou anti-apoptotique, sont considérés comme des transgènes de type B et relèvent donc des règles relatives données en 1. Les banques de shRNA sont considérées comme des inserts de type B. Les sh ciblant des gènes d'autres espèces que l'Homme, peuvent être déclassés si l'homologie de séquence de ces orthologues est faible.

Pour les ARN interférents ciblant les autres types de gènes, de structure par exemple, les recommandations sont identiques à celles s'appliquant aux transgènes de type A.

En cas d'incertitudes vis-à-vis du classement du gène, ou de gène de fonction inconnue, il est nécessaire d'effectuer les expérimentations en laboratoire L3. Sur demande et avec des arguments expérimentaux solides, les inserts pourront être reclassés en A par la commission.

Plasmide de transcomplémentation Structure du vecteur	Type d'insert	Production	Classement	Cellules transduites	Modèle animal	
					Cellules	<i>In Vivo</i>
Séquences de transcomplémentation exprimant les gènes accessoires (VIF, VPU, VPR et NEF)	A ou B	L3	GIIC3L3	L3 Jusqu'à vérification ELISA de l'absence de particules puis L2	A1*	A2
Séquences de transcomplémentation n'exprimant pas les gènes accessoires (VIF, VPU, VPR et NEF) Vecteur SIN ( $\Delta$ U3)	A	L2	GIIC2L2	L2	A1	A2
	A	L3 plus de 200 mL*	GIIC2L3	L2	A1	A2
	B	L3	GIIC2L3	L3 puis L2 quand il n'y a plus de particules infectieuses après transduction	A1*	A2 puis A1
	shRNA « oncogène » Banque non caractérisée	L3	GIIC2L3	L2	A1	A2
	shRNA	L2	GIIC2L2	L2	A1	A2

\* : après le passage des cellules en L2

CGG - Juin 2007