



Quantification du nombre de copies intégrées de vecteur lentiviral par ddPCR

- Régis Gayon, Responsable groupes Vecteurs et Modèles Cellulaires

your gene transfer partner



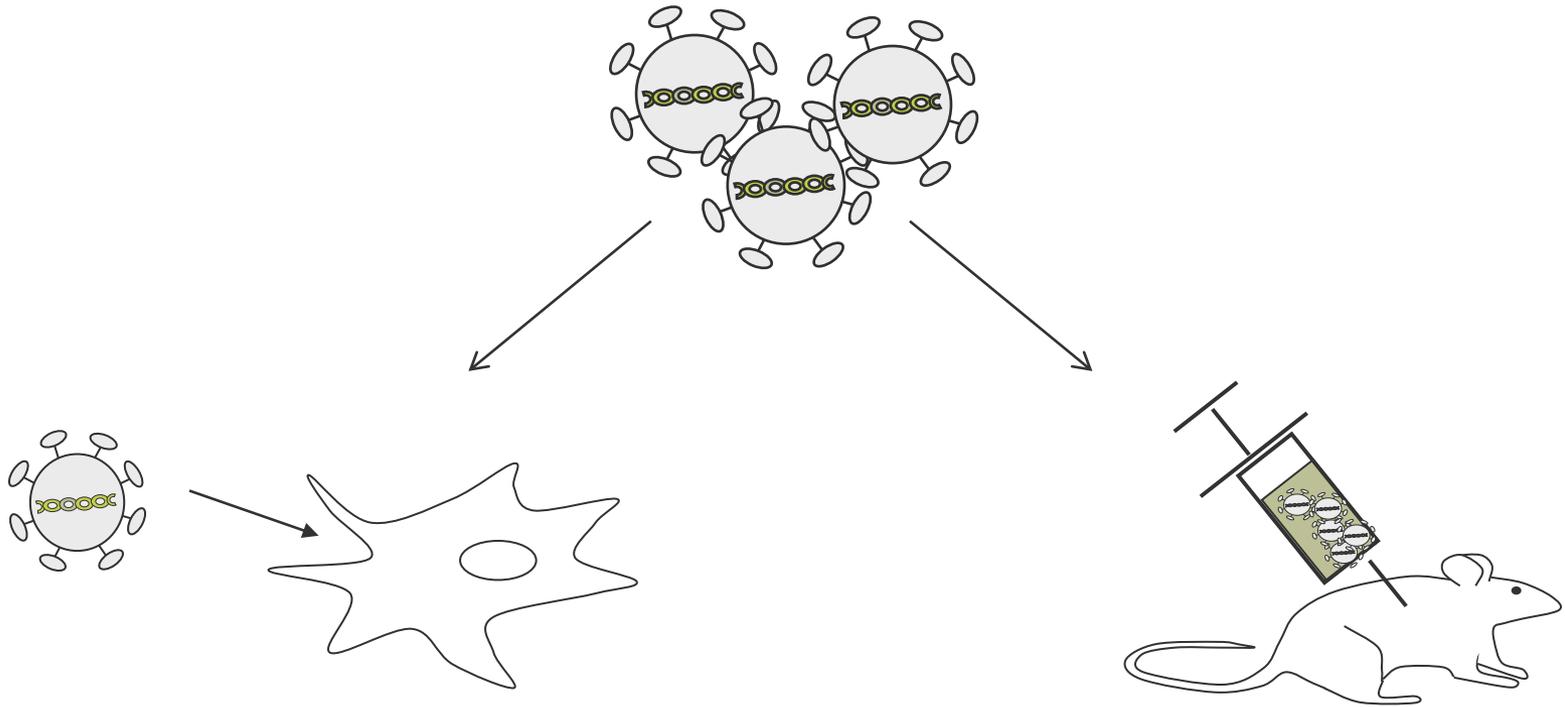
VECTALYS

> Objectifs de Vectalys et intérêts pour la ddPCR

your gene transfer partner

Présentation Vectalys

Production d'outils de transfert de gènes pour cellules de mammifères : Vecteurs viraux dérivés du HIV ou du MoMLV



Création de modèles cellulaires

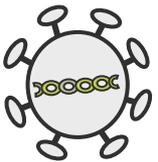
Création de modèles animaux

Propriétés des vecteurs lenti et rétro-viraux

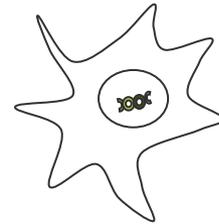
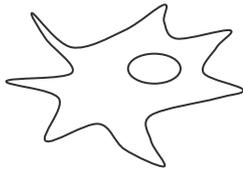
- ✓ Intégratif (site d'intégration aléatoire, nombre d'intégration fonction de la dose de vecteurs)
- ✓ Expression stable du transgène
- ✓ Création de modèles cellulaires et animaux très rapides, sans besoin d'antibiotique
- ✓ Très haute efficacité de transfert de gènes sur cellules immortalisées, primaires et cellules souches

Variation du nb de copies/cell fonction de la dose de

vecteurs

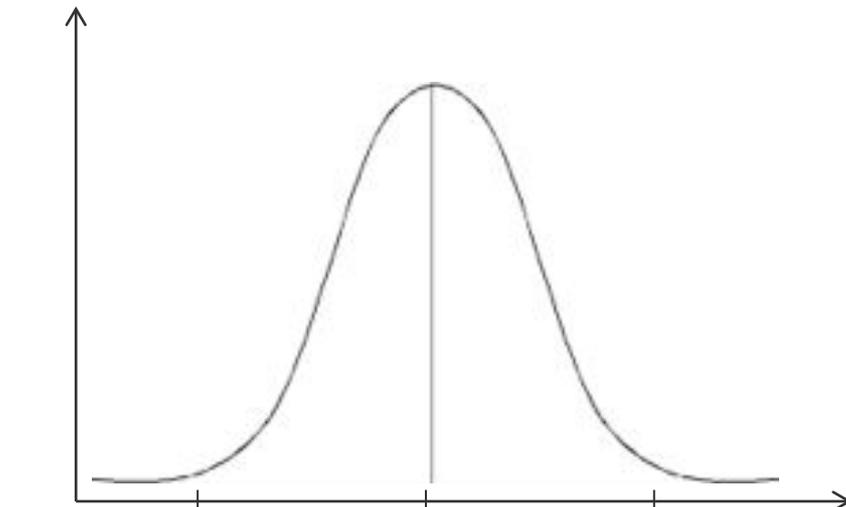


+



Population polyclonale portant de 0 à X copies transgène/cell

Qté Cells



Nb copies intégrées/génome

Dose de vecteurs/cell

5	0	2	4
10	0	4	8
20	1	5	50
40	1	10	50
100	1	20	60

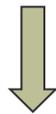
Intérêts de la ddPCR

1- Quantification du CNV en fonction de la dose de vecteurs :

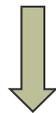
- Plus besoin de gamme
- Meilleure reproductibilité
- Echelle de détection plus large

2- Détection d'évènements rares :

- Utilisation de vecteurs viraux non intégratifs



Intégration résiduelle d'environ 1/4000



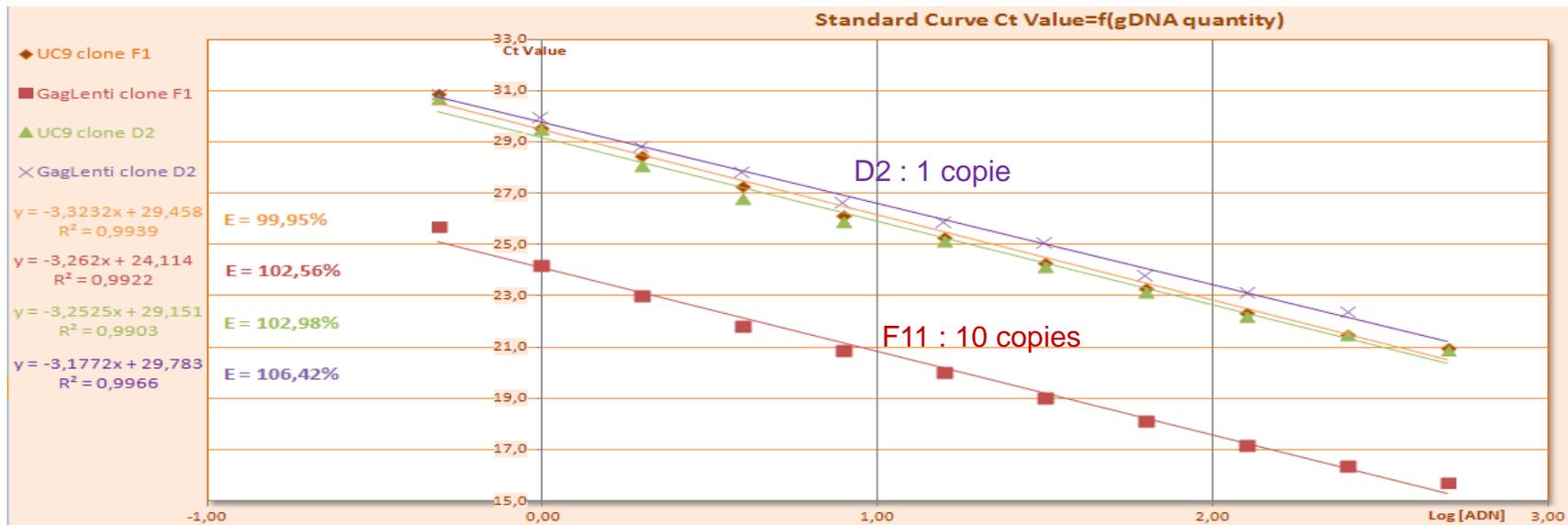
ddPCR : + sensible, qté matrice réduite

QUANTIFICATION NB COPIES PAR QPCR

> Utilisation de 2 clones cellulaires :

- Clone D2 : 1 copie intégrée
- Clone F11 : 10 copies intégrées

qPCR Vectalys : Gammes étalon : 0.5 à 500ng

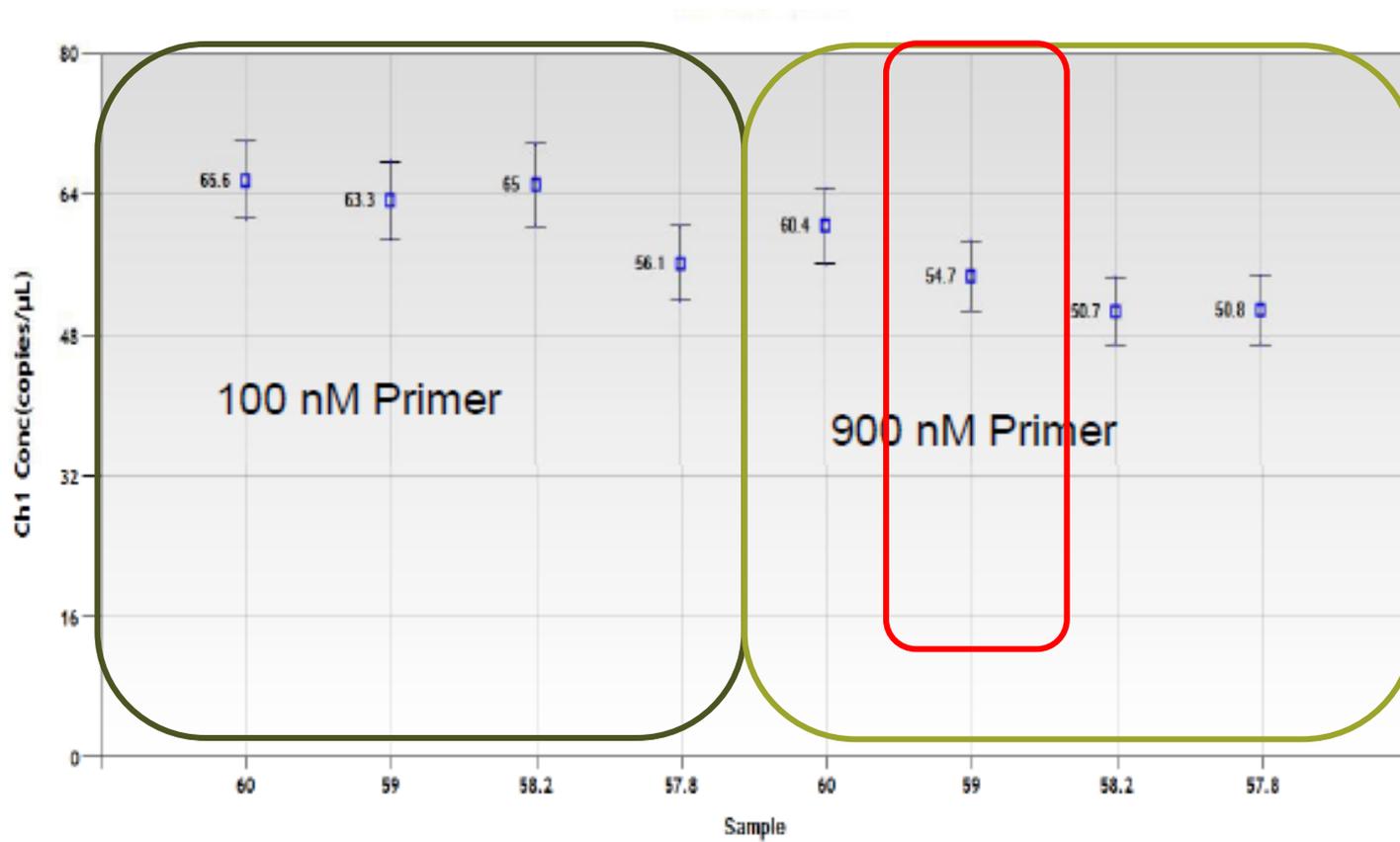


gDNA	Gène de ménage		Gag Lenti	
	Clone F1	Clone D2	Clone F1	Clone D2
R ²	0.9939	0.9903	0.9922	0.9966
Linearity	500 to 0.49 ng			
E	99.95%	102.98%	102.56	106.42
Conformity	OK	OK	OK	OK

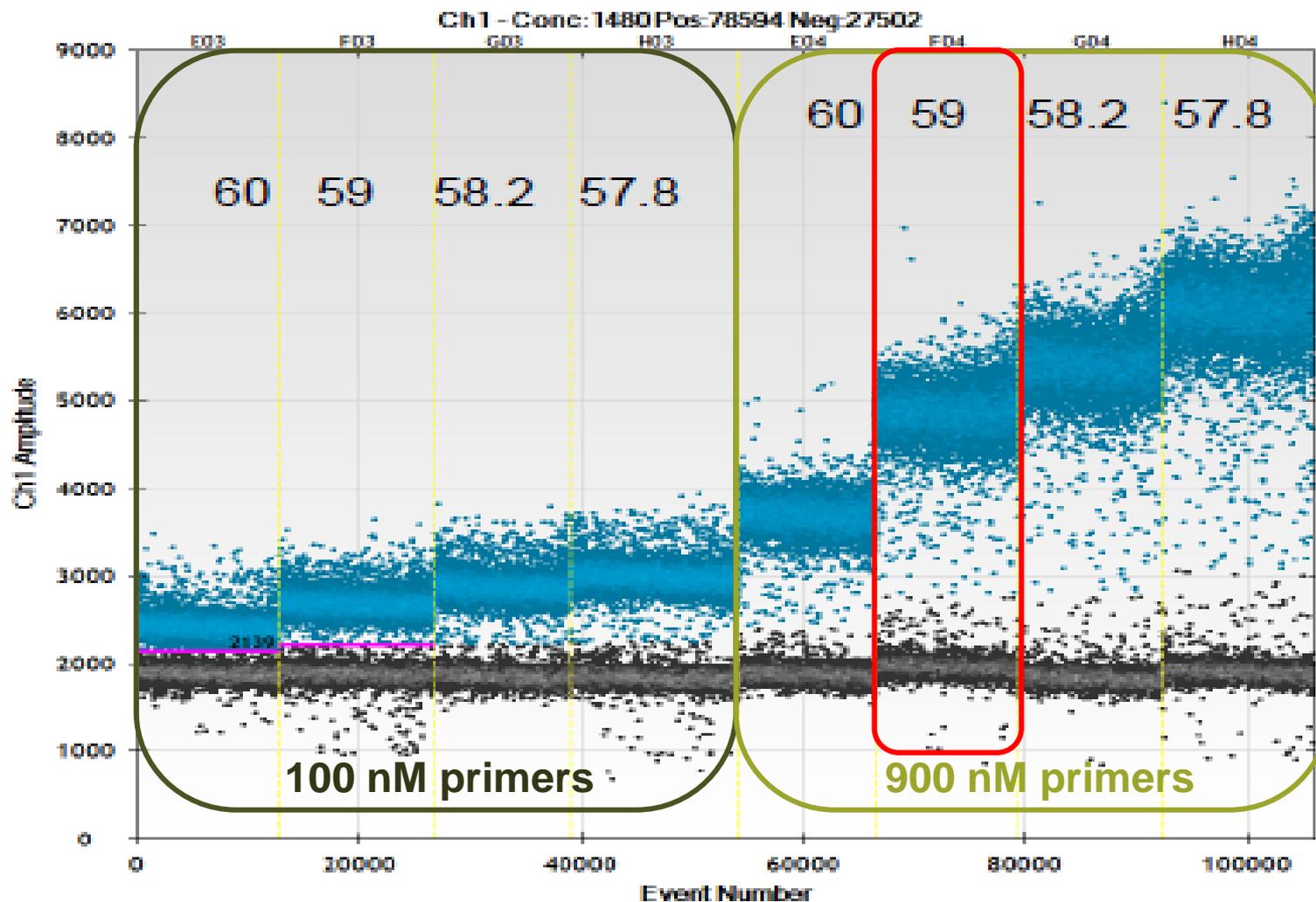
DROPLET DIGITAL PCR TEST¹

- > Gradient de température sur clones 1 et 10 copies/génome
- > Gradient de température selon deux concentrations d'oligos : 100 vs 900nM

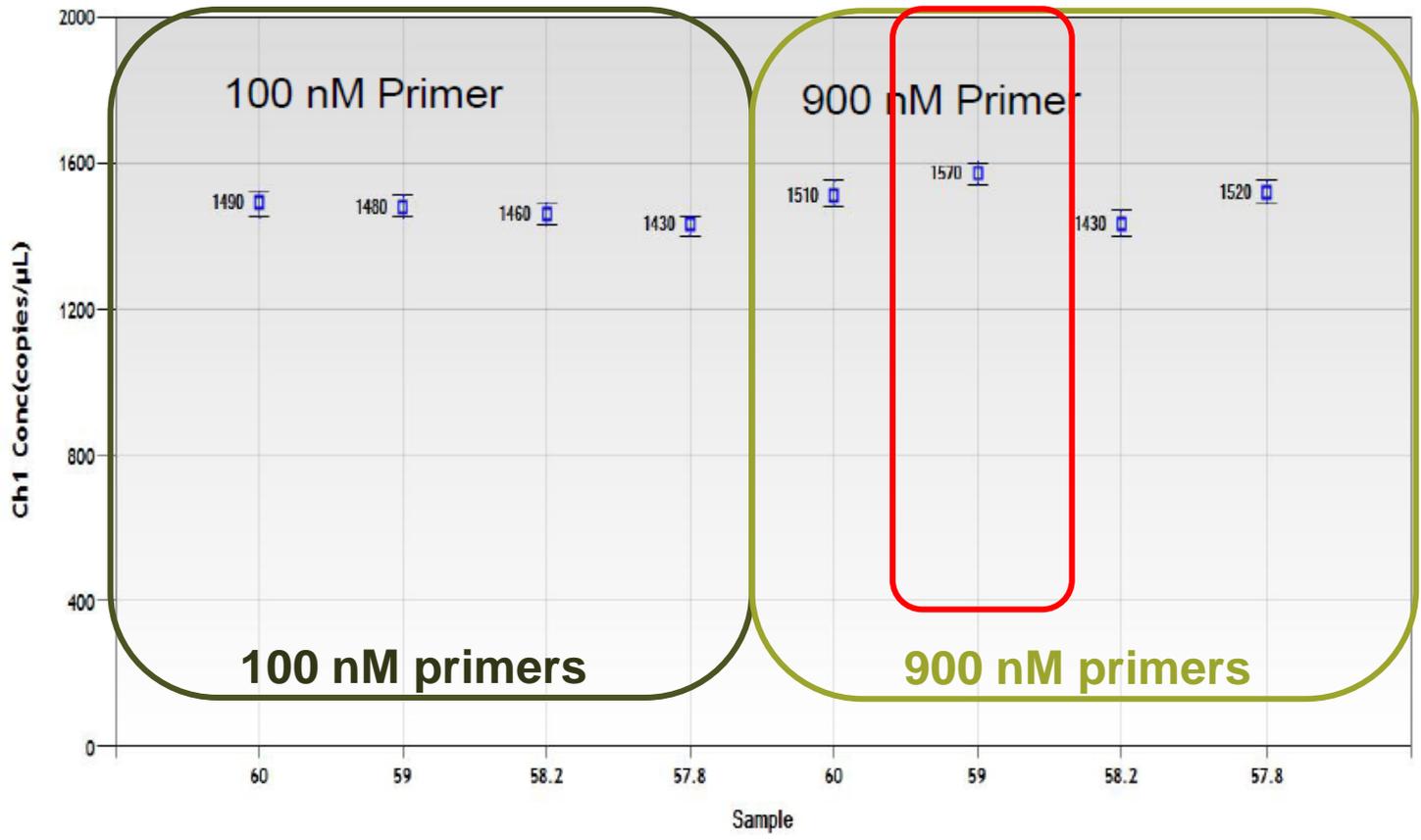
Gradient de T° sur clone 1 copie/génome



Gradient de T° sur clone 10 copies/génome



Gradient de T° sur clone 10 copies/génome



Conclusions 1

Quelque soit le nombre de copie à détecter/génome :

- » Hybridation à 59°C
- » 900 nM primers, 250 nM sonde

Pour 1 copie/génome :

- » 30 ng/puits
- » 54.7 copies/ μ L

Pour 10 copies/génome :

- » 15 ng/puits
- » 1570 copies/ μ L



Détection OK

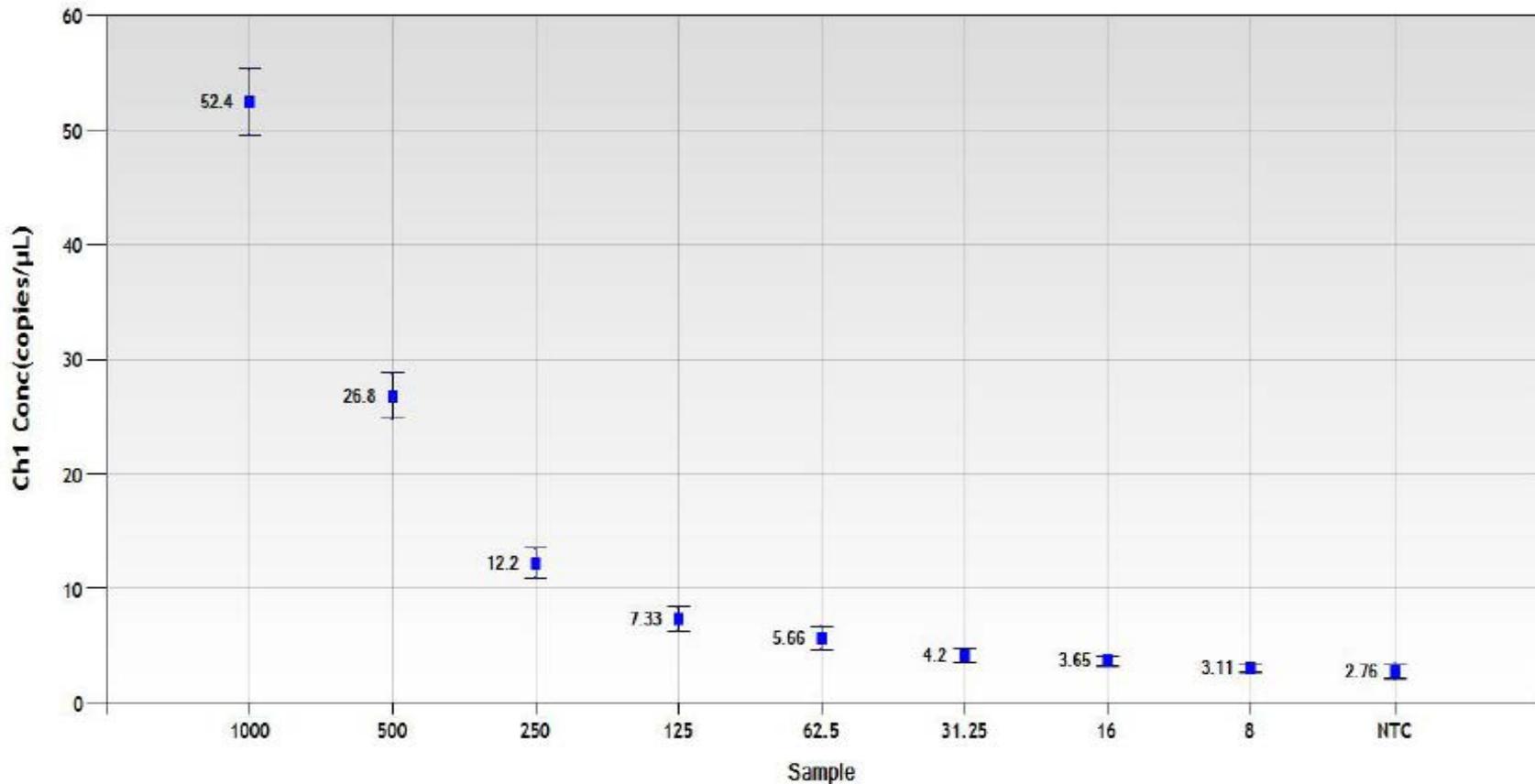
DROPLET DIGITAL PCR TEST2

> Détection d'évènements rares

- Mise au point sur ADNg clone 1 copie/génome dilué dans l'eau
- Mise au point sur ADNg clone 1 copie/génome dilué dans ADNg NT

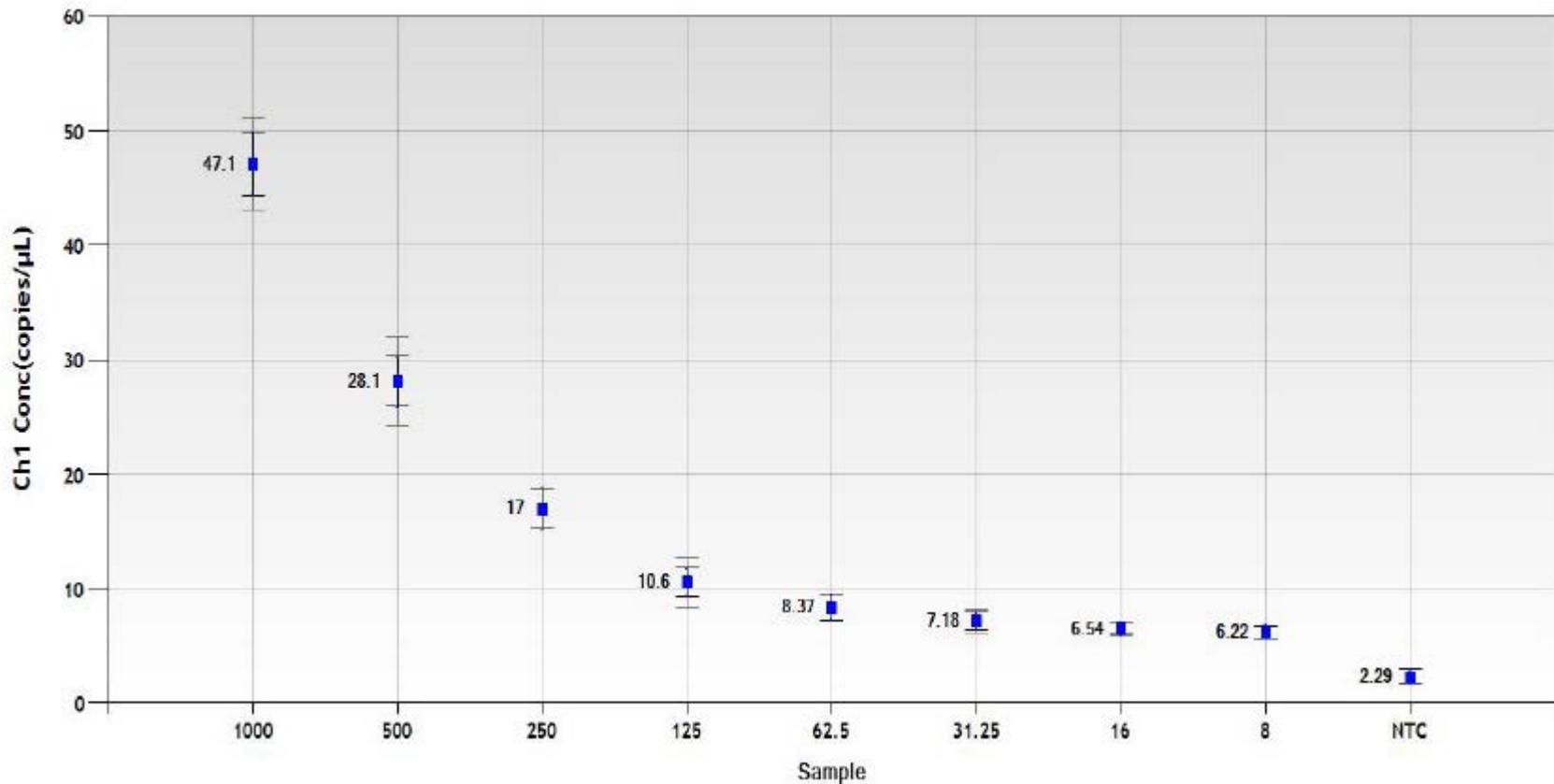
Mise au point sur ADNg clone 1 copie/génomome dilué dans l'eau

Gamme de 1000 copies/rxn (50 copies/ μ L ddPCR rxn) à 8 copies/rxn (0.4 copies/ μ L ddPCR rxn)



Mise au point sur ADNg clone 1 copie/génomme dilué dans ADNg NT

- Gamme de 1000 copies/rxn (50 copies/ μ L ddPCR rxn) à 8 copies/rxn (0.4 copies/ μ L ddPCR rxn)



Conclusions 2

- Résultats comparables entre les deux types de dilution (eau ou ADNg)
- Résultats linéaires de 1000 à 125 copies/rxn
- Résultats non-linéaires <125 copies/rxn, à cause d'une contamination des matrices

Perspectives

- Besoin de quantifier le nombre de copies/génome dans populations cellulaires polyclonales et monoclonales
 - » sans gamme étalon
 - » meilleure reproductibilité
 - » meilleure sensibilité de détection
- | | | |
|---|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> » sans gamme étalon » meilleure reproductibilité » meilleure sensibilité de détection | } | <p>Méthode + rapide
+ sensible
+reproductible</p> |
|---|---|---|
-
- Détection d'évènements rares, pour vecteurs non intégratifs
 - » Poursuivre la mise au point sur les gammes
 - » Passer les échantillons à analyser