

# IMMUNOPHÉNOLOGIE

## Des souris et des hommes... Et leurs gènes

Et si l'avenir thérapeutique de l'homme, c'était la souris ? C'est en tout cas le parti pris du centre d'immunophénomique (♀) de Marseille-Luminy. Ici, on crée des souris génétiquement modifiées pour, entre autres, tester leur réaction immunitaire face à des agents infectieux. Visite de ce nouveau centre qui fête sa première année.



© REPORTAGE PHOTO : FRANÇOIS GUÉNÉ/INSERM

Dans le massif des calanques de Marseille, le long d'une route qui serpente à travers le parc de Luminy, un nouveau bâtiment accueille les visiteurs : 3 500 m<sup>2</sup> abritant du matériel de haute technicité, bientôt 50 000 souris et une quarantaine de chercheurs, ingénieurs et techniciens. Bienvenue au Centre d'immunophénomique (Ciphe), inauguré en décembre 2012, et qui sur le point de fêter sa première année. Mais il existait déjà dans la tête de son directeur, Bernard Malissen (♂), depuis 2007. Sa raison d'être ? Créer de façon standardisée des modèles murins destinés à l'étude du système immunitaire.

**Bernard Malissen**  
immunologiste, à l'origine du Ciphe

« Maintenant que le génome humain est séquencé, il s'agit de le traiter massivement et d'identifier la fonction de chacun des gènes », explique-t-il. La proximité génétique de la souris et de l'homme fait du petit mammifère un modèle particulièrement approprié pour la recherche sur les maladies touchant l'être humain. L'idée est simple : pour chacun des gènes, créer une souris qui en soit dépourvue. Et observer ce qui se passe. « C'est un peu comme avec une voiture, si on enlève une pièce, on voit tout de suite si elle peut continuer à rouler ou pas. Mais le problème peut aussi se révéler tardivement si c'est la roue de secours qui a été supprimée... »

### Création d'une souris

Pour créer une souris, comment s'y prend-on ? C'est très facile... ou presque, si l'on en croit Frédéric Fiore (♂), responsable du service Ingénierie génétique. Des cellules souches embryonnaires de souris sont modifiées

génétiquement grâce à un vecteur (♀), puis elles sont mises en culture avant d'être micro-injectées dans un blastocyste, un embryon de quelques cellules. Celui-ci est ensuite implanté dans une souris pseudogestante (♀). Si la chance est de la partie, certains souriceaux seront porteurs de la modification génétique souhaitée au niveau de leurs cellules reproductrices. Il ne reste alors plus qu'à les croiser – naturellement – pour obtenir des souris porteuses de

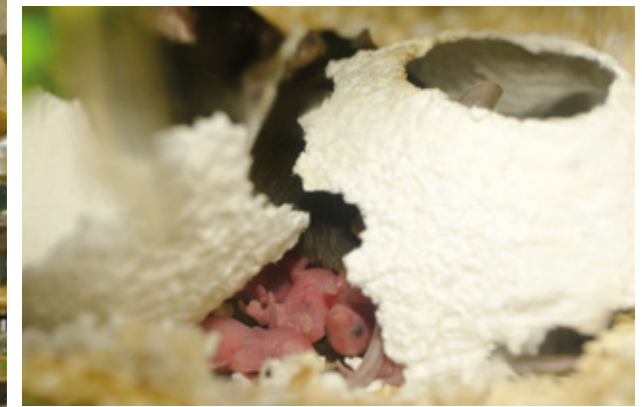
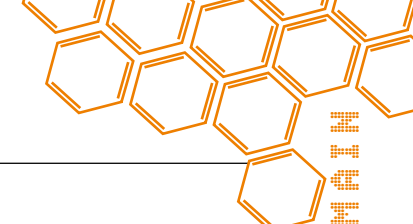


Vider la litière sale des cages, c'est le rôle du robot-laveur, dont Victor Pierrini, technicien laverie, surveille le bon fonctionnement.

### Immuno-phénomique

Elle vise à capturer, par des approches standardisées et massivement parallèles, l'état fonctionnel de l'ensemble des cellules qui composent le système immunitaire.

- ♣ Bernard Malissen : unité 1104 Inserm/ CNRS - Aix-Marseille Université, Centre d'immunologie de Marseille-Luminy, US 12 Ciphe
- ♣ Frédéric Fiore : US 12 Inserm, Ciphe
- ♣ Nicolas Lévy : unité 910 Inserm - Aix-Marseille Université



Bientôt 50 000 souris dans l'animalerie dirigée par Anne Gillet. Pour faciliter leur gestion, elles sont hébergées dans des cages rangées sur des portoirs style bibliothèque. À droite, des souriceaux d'un jour

**Vecteur**

Molécule d'ADN qui permet la propagation de séquence génétique d'intérêt

**Femelle pseudogestante**

Femelle accouplée avec un mâle stérile pour déclencher le programme hormonal d'une grossesse

**Nucléotide**

Molécule de base de l'ADN

la mutation dans toutes leurs cellules. « Il faut entre 12 et 16 mois, selon la complexité du modèle, pour livrer une lignée de souris correspondant à la demande », précise Frédéric Fiore. En 2013, le Centre a enregistré près de quarante commandes de prestations pour générer des lignées de souris pour des clients extérieurs et en a produit une trentaine dans le cadre de l'infrastructure de biotechnologies Phenomin (voir encadré).

**Un hébergement sécurisé**

Car le Ciphe est à la fois partenaire d'un programme international et une unité de service qui assure la production de mutations pour des demandes individuelles : « Nous répondons à la commande de laboratoires extérieurs qui souhaitent obtenir des mutations plus précises, comme le remplacement d'un nucléotide [A] par un autre. » Cela a été le cas de Nicolas Lévy (☞), de l'unité Inserm Génétique médicale et génomique fonctionnelle. Après avoir identifié le gène responsable de la progéria, maladie qui entraîne un vieillissement prématuré, il a pu tester une thérapie ciblée sur des souris modèles créées au Ciphe, alors que le Centre n'avait pas encore intégré ses locaux.



Les souris qui viennent de l'extérieur n'ont pas forcément le statut sanitaire requis (SOPF, *Specific and Opportunistic Pathogen Free*). En pratiquant des fécondations *in vitro* et

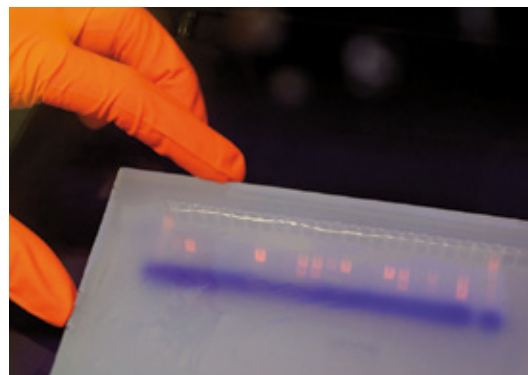
l'implantation des embryons dans des mères porteuses maintenues dans des espaces confinés, Amandine Sansoni veille à obtenir des souriceaux exempts de pathogènes.

© REPORTAGE PHOTO : FRANÇOIS GUÉNÉT/INSERM

## National, européen et international

Unique en son genre, le Ciphe n'est pas pour autant seul. Avec l'Institut clinique de la souris (ICS) d'Ilkirch (ingénierie génétique et caractérisation phénotypique) et le laboratoire orléanais TransGenèse et archivage d'animaux modèles (TAAM, élevage, imagerie, ingénierie génétique), il constitue l'infrastructure en santé et biotechnologie Phenomin, sorte de guichet unique à l'attention de la communauté française de recherche pour l'utilisation de modèles murins. À eux trois, les établissements créent des souris modèles, et les hébergent, établissent les cartes phénotypiques, les distribuent et même les archivent, sous forme de gamètes et d'embryons congelés. Leurs clients ? Autant les laboratoires académiques de recherche que ceux des industriels pharmaceutiques. Lauréate des Investissements d'avenir, Phenomin fait aussi partie de l'infrastructure européenne « Infrarfrontier » et du consortium international de phénotypage de souris (IMPC) pour construire une véritable encyclopédie de la fonction des gènes chez ce petit mammifère.

Toutes les lignées produites sont hébergées au sein même du Centre. Lanimalerie, le domaine d'Anne Gillet (☛), occupe tout le sous-sol. Pour le moment, seuls 3 981 petits muridés sont enregistrés. « *Mais nous pourrions en accueillir jusqu'à 50 000 !* », prévoit la responsable. Pour leur rendre visite, combinaison de coton non tissé, charlotte, masque, chaussons de protection et gants sont de rigueur. Dans les couloirs ou à l'entrée des sas conduisant aux salles, des affichettes rappellent les procédures à suivre pour éviter les contaminations. Car l'une des spécialités du Ciphe, c'est l'analyse du système immunitaire : il serait donc malvenu qu'un pathogène non contrôlé vienne fausser les expériences.



Comment savoir si une souris possède la mutation requise ? En lui prélevant un petit bout de queue et en analysant l'ADN de ses cellules. Coupés par des enzymes,

les fragments d'ADN migrent en fonction de leur poids sous l'action d'un champ électrique dans un gel d'agarose. L'observation sous lumière UV permet de les visualiser.

## Le passage au laser

C'est à l'étage du dessus que Marie Malissen (☛), responsable du module d'Immunophénotypage, Hervé Luche (☛), responsable R&D, et Pierre Grenot (☛), responsable des équipements, caractérisent l'état fonctionnel du système immunitaire des souris, exposées

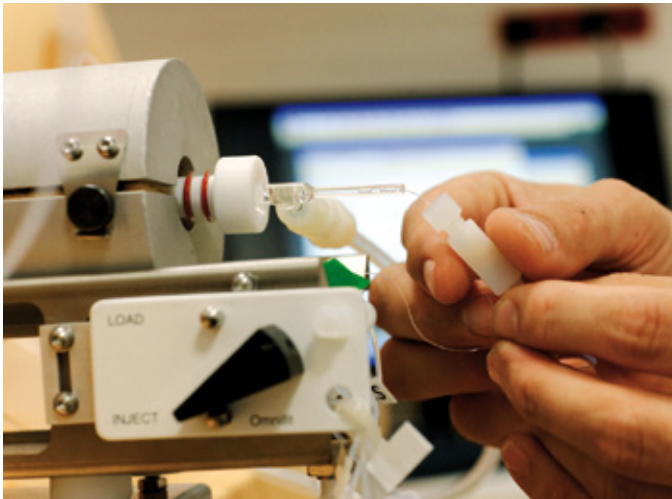
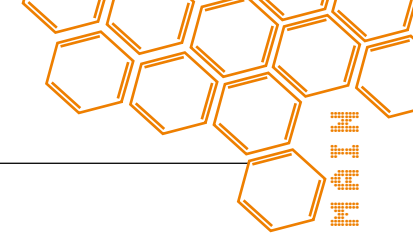
à tel ou tel pathogène. Ce qui revient à analyser les cellules sanguines contenues dans la rate ou les ganglions. Leur arme ? La cytométrie en flux. Cette technique permet de faire défiler les cellules étudiées à grande vitesse dans le faisceau d'un laser. Celles-ci sont mises en présence d'anticorps, spécifiques de telle ou telle protéine exprimée à la surface de leur membrane. Lorsqu'une cellule passe devant le laser, la lumière réémise par les marqueurs fluorescents couplés aux anticorps permet d'indiquer à quelle population elle appartient : lymphocytes B CD4, CD8, granulocytes...

Pierre Grenot dissèque une rate de souris pour l'analyse des cellules immunitaires contenues dans cet organe lymphoïde secondaire, lieu de passage, d'accumulation, et de rencontre des antigènes (☛) et des cellules de l'immunité.



## ☛ Antigène

Molécule reconnue par un anticorps et capable de déclencher une réponse immunitaire



Mise en place de la ligne d'injection des cellules dans le nébulisateur du cytomètre de masse.



Ici, Hervé Luche explique l'intérêt d'un outil de *clusterisation* : il permet de mettre en évidence les

variations immunologiques entre deux groupes de souris au sein d'une même population.

Un des enjeux de l'immunophénotypage : présenter les résultats des analyses de façon claire.

### Un labo de sécurité niveau 3

Depuis peu, l'équipe a fait l'acquisition d'un cytomètre de masse qui suscite son enthousiasme : « Avec le cytomètre en flux, on peut prendre en compte jusqu'à 18 paramètres. Le cytomètre de masse, lui, peut en analyser jusqu'à 50 », insiste Hervé Luche. Dans cette machine à l'originale couleur orange saumoné, les cellules défilent à la vitesse de 1 000 par seconde, et les anticorps, étiquetés cette fois avec des métaux rares, sont identifiés par un spectromètre de masse. « Cette technique d'analyse permet de détecter

et d'identifier des molécules par mesure de la masse de l'atome auquel est lié l'anticorps », explique Marie Malissen. Au sein de l'unité de service, la R&D n'est pas absente : pour rester dans la course à la technologie et optimiser le temps de traitement, les membres du module Immunophénotypage standardisent les manipulations, mettent au point des combinaisons d'anticorps et marqueurs fluorescents qui font la spécificité du Ciphe...



© REPORTAGE PHOTO : FRANÇOIS QUÉNÉ/INSERM

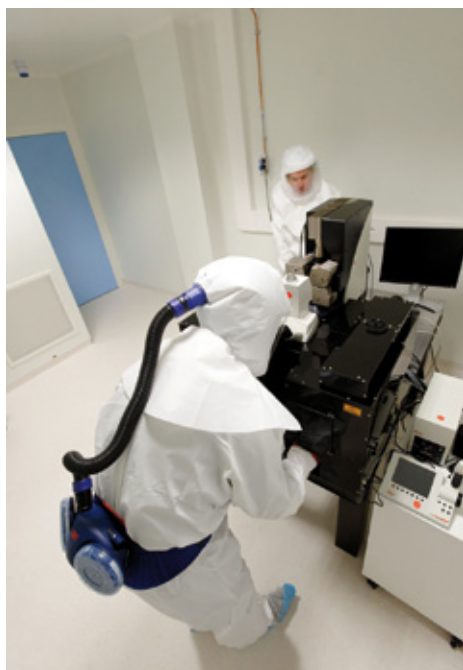
Très bientôt, le laboratoire de sécurité biologique de niveau 3 (BSL3 pour *BioSafetyLevel 3*), correspondant à l'utilisation d'agents biologiques hautement pathogènes pour l'homme, sera opérationnel et disposera des autorisations réglementaires nécessaires à son activité. « Les lignées de souris pourront alors être soumises à des tests infectieux et examinées en toute sécurité dans des zones confinées », assurent Philippe Hoest (☛) et Jean-Pierre Gorvel (☛), les responsables, respectivement Sécurité et Sûreté biologique et scientifique, de la plateforme BSL3. Nul doute que ces chercheurs passionnés participeront à élucider la complexité du système immunitaire, offrant des perspectives thérapeutiques d'envergure. ■

Julie Coquart

Philippe Hoest explique la gestion sans faille du traitement d'air pour maintenir le niveau 3 de sécurité biologique. Un « étage » technique court ainsi sous tout le bâtiment, où chaque gaine et circuit sont clairement identifiés.

☛ Anne Gillet, Philippe Hoest, Hervé Luche, Pierre Grenot : US 12 Inserm, Ciphe

☛ Jean-Pierre Gorvel et Marie Malissen : unité 1104 Inserm/CNRS - Aix-Marseille Université, Centre d'immunologie de Marseille-Luminy, US 12 Ciphe



L'installation d'un microscope biphotonique - pour suivre de manière dynamique les événements moléculaires à l'intérieur d'une cellule vivante - en milieu BSL3 est une première. Pour faciliter sa maintenance, il a été installé en deux parties : le tableau de pilotage, avec les bancs laser, dans une zone non classée, et la partie observation en salle blanche (moins de 352 000 particules de 0,5 µm/m<sup>3</sup> d'air).