

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Ecole doctorale : Biologie Santé

Année 2011

Régénération hépatique en conditions normales et pathologiques :

**Analyse des lignages cellulaires
et étude des effets sur la transduction lentivirale.**

THESE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie, Médecine, Santé
Spécialité : Biologie cellulaire

Présentée
Et soutenue publiquement par

Virginie PICHARD

Le 22 septembre 2011, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs : -Dr. GILGENKRANTZ Hélène, Directeur de recherche, Inserm U1016, Paris.

-Dr. PAGES Jean-Christophe, PU-PH, Inserm U966, Tours.

Examineur : -Dr. DUBART-KUPPERSCHMITT, Directeur de recherche, Inserm U972, Paris.

Directeur de thèse : -Dr. FERRY Nicolas, Directeur de recherche, Inserm U948, Nantes.

Co-directeur de thèse : -Dr. PODEVIN Guillaume, Praticien Hospitalier, Angers.

Sommaire

<i>Sommaire</i>	0
<i>Abréviation</i>	4
<i>Table des figures</i>	7
<i>Contexte</i>	9
INTRODUCTION GENERALE	10
1 Structure et fonction du foie	11
1.1 Notion d'anatomie générale.....	11
1.1.1 Quelques particularités d'espèce.....	12
1.1.2 Vascularisation hépatique	12
1.2 Organisation microscopique du foie	14
1.2.1 Notion de lobule hépatique	14
1.2.2 Architecture du parenchyme et principaux types cellulaires	16
1.2.2.1 Les travées de Remak	16
1.2.2.2 L'espace de Disse.....	18
1.2.2.3 Les sinusoides hépatiques	19
1.2.2.4 Espaces portes	21
1.3 Principales fonctions hépatiques.....	21
1.3.1 Fonction de synthèse.....	21
1.3.2 Fonction de stockage.....	22
1.3.3 Fonction d'épuration.....	22
1.3.3.1 Sécrétion biliaire	22
1.3.3.2 La biotransformation.....	23
2 Régénération hépatique en condition normale	24
2.1 Régénération hépatique - généralités	24
2.1.1 Capacité de régénération du foie.....	24
2.1.1.1 A partir des hépatocytes matures	24
2.1.1.2 A partir de cellules souches.....	25
2.1.1 Activité répliquative des hépatocytes.....	27
2.2 Modèles expérimentaux pour l'étude de la régénération du foie en condition non pathologique	28
2.2.1 Hépatectomie partielle	28
2.2.2 Ligature de la branche porte.....	30
2.2.3 Administration d'agents hépatotoxiques	30
2.2.3.1 CCl4.....	30
2.2.3.2 Paracétamol.....	31
2.3 Mécanismes moléculaires lors de la régénération après une hépatectomie partielle.....	31
2.3.1 Phase d'initiation ou «priming»	32
2.3.2 Phase de progression.....	34
2.3.2.1 Hepatocyte growth factor.....	35
2.3.2.2 Récepteur EGFR	36
2.3.2.3 Angiogenèse et régénération hépatique.....	37
2.3.3 Terminaison	38
2.3.4. Autres acteurs impliqués lors de la régénération	40
2.3.4.1 Les micro-RNA et la régénération hépatique.....	40
2.3.4.2 Neurotransmetteurs, xénobiotiques.....	42
2.3.4.3 Les acides biliaires.....	43

3 Cellules souches hépatiques	45
3.1 Cellules souches embryonnaires/foetales.....	45
3.2 Cellules souches adultes	45
3.2.1 Cellules souches adultes extrahépatiques :	46
3.2.1.1 Cellules souches médullaires	46
3.2.1.2 cellules souches du tissu adipeux	51
3.2.2 Cellules souches intrahépatiques	52
3.2.2.1 Les cellules ovales	53
3.2.2.2 Les SHPC (Small Hepatocyte like progenitor cells)	62
4. Transfert de gènes -Généralités	67
4.1 Quelques applications du transfert de gènes dans le domaine de la recherche biomédicale	67
4.1.1 La transgénèse ou thérapie génique germinale	67
4.1.2 La thérapie génique somatique	68
4.1.2.1 Maladie monogénique.....	68
4.1.2.2 Cancer.....	69
4.2 Les outils de transfert de gènes	71
4.2.1 Vecteurs non viraux	72
4.2.2 Vecteur viraux.....	73
4.2.2.1 Les rétrovirus recombinants	73
4.2.2.2 L'adénovirus recombinant.....	77
4.2.2.3 L'Adéno-associated virus.....	80

PARTIE 1 TRANSFERT DE GENES DANS LE FOIE UN OUTILS POUR UNE ETUDE DE LIGNAGE CELLULAIRE DANS DES MODELES DE REGENERATION EN CONDITION PATHOLOGIQUE

Introduction	86
1 Lignage par marquage génétique	86
1.1 Marquage à l'aide de rétrovirus recombinants	87
1.1.1 Chez les rats adultes.....	87
1.1.2 Chez les rats nouveaux nés	88
1.1.3 Chez les rats transgéniques	88
2 Première étude concernant l'origine des SHPCs	88
3 But de notre étude	89
Résultats	92
1 Quelles cellules sont transduites après traitement au CPA/T3?.....	92
2 Modèles expérimentaux	94
Discussion	96

PARTIE 2 TRANSFERT DE GENE DANS LE FOIE A VISEE THERAPEUTIQUE

Partie A : Corrélation entre cycle cellulaire et efficacité de la transduction des hépatocytes par les lentivirus recombinants..... 100

Introduction	101
1. Les oncorétrovirus recombinants : efficacité dans un foie en régénération	102
1.1 Oncorétrovirus dans un foie en régénération	102
1.2 Oncorétrovirus dans un foie quiescent.....	103

1.3 Inconvénients de l'oncorétrovirus recombinants	104
2. Les lentivirus recombinants : une alternative aux oncorétrovirus ?	106
2.1 Le lentivirus moins de risque de mutagenèse insertionnelle	106
2.2 Le lentivirus recombinant infecte des cellules quiescentes	106
2.3 Le lentivirus recombinant : difficulté à infecter certaines cellules quiescentes	107
2.4 Le lentivirus recombinant et transduction des hépatocytes quiescents	108
Résultats 1	109
Résultats 2	110
1. Validation de notre modèle : étude de la ploïdie	111
2. Transduction hépatocytaire	112
Discussion	114
 Partie B : Régulation ciblée de l'expression de gènes par des miRNA	119
Introduction	120
Résultats	125
Discussion	127
 BILAN GÉNÉRAL ET PERSPECTIVES	130
BIBLIOGRAPHIE	133

Abréviation

2-AAF : 2-acétylaminofluorène
hAAT : human α -1-antitrypsine
AAV : Adeno-associated virus
ADN : acide désoxyribonucléique
AFP : alpha-foetoprotéine
AR : amphiréguline
ARN : acide ribonucléique
ATSCs : adipose tissue stromal cells
BAF: barrier-to-autointegration factor
BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine
Brm : Brahma
CAR: constitutive androstane receptor
CCl4:tetrachlorure de carbone
CDE: choline-deficient, ethionine-supplemented diet
CDK: cyclin-dependent kinase
C/EBP: α CCAAT/enhancer-binding proteins
CHC: carcinoma hépatocellulaire
CK : cytokératine
CMH : majeur d'histocompatibilité
CPA : acétate de cyprotérone
CYP:cytochrome P450
DAPM : 4,4-diaminodiphenylmethane
DDC: 3.5-diethoxycarbonyl-1.4-dihydro-collidine
DEN: diéthylnitrosamide
DGCR8: DiGeorge syndrome critical region gene 8
EGF: epidermal growth factor
ENV: envelope
EpCAM: epithelial cell adhesion molecule
ERK: extracellular regulated kinase
FAH : fumaryl acétoacétate hydrolase
FANC: Fanconi anemia group C

FGF: fibroblast growth factors
 FoxM1B: Forkhead box M1B
 FXR: farnesoid X receptor
 GAG: group specific antigen
 GFP: green fluorescent protein
 GST-P: glutathione S-transférase placentaire
 HB-EGF: heparin-binding EGF-like growth factor
 HDAC: histones désacétylases
 HGF: hepatocyte growth factor
 HP1 : Heterochromatine protein
 HSV : herpes simplex virus
 ICAM: intercellular adhesion molecule
 IL : interleukine
 INF- γ : interféron γ
 IPS: induced pluripotent stem cell
 ITR : inverted terminal repeat
 JNK: jun N-terminal kinase
 Kb: kilobase
 KID: kidney ischemia and developmentary regulated gene 1
 KRAB: Kruppel-associated Box
 LEC: Long-Evans Cinnamon
 LIF: leukemia inhibitory factor
 LMO-2: LIM domain only-2
 LP1: lipopolysaccharide
 LTR: long terminal repeat
 MLV : rétrovirus leucémogènes murins
 mTTR: murin transthyretin
 NAPQI: N-acétyl-p-benzoquinoneimine
 NEF: negative regulatory factor
 NF κ B: nuclear-factor kappa-light-chain-enhancer of activated Bb cells
 nls: nuclear localisation signal
 NuRD: Nucleosome Remodeling and Deacetylating
 NTBC: 2-(2-nitro-4-trifluoro-methylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione
 MAPK: mitogen-activated protein kinase

OSM: oncostatine M
 PBS: primer binding site
 PEPCK : phosphoénol pyruvate carboxykinase
 PIC : complexe de préintégration
 PIN 1: peptidyl prolyl-isomerase
 PlGF: Placental growth factor.
 POL : polymérase
 PPT : polypurine tract
 Pv : particule virale
 Rb: retinoblastoma
 REV: Regulation of expression of viral proteins
 RISC: rna-induced silencing complex
 RPE65: retinal pigment epithelium 65
 rTetR: reverse Tetracycline repressor protein.
 SCID: déficit immunitaire combiné severe
 SH: small hepatocyte
 SHPC: small hepatocyte-like progenitor cells
 STAT3: signal transduced and activator of transcription 3
 T3: triiodothyronine
 Tat: transactivator of transcription
 TetR: Tetracycline repressor protein
 TGF: transforming growth factor
 TIF-1: Transcriptional Intermediary Factor 1
 TLR: toll like receptor
 TNF- α :tumor necrosis factor α
 TWEAK: TNF-like weak inducer of apoptosis
 UGT1A1 : UDP-glucuronosyltransferase de type 1
 HIV: human immunodeficiency virus
 VEGF: vascular endothelial cell growth factor
 VIF: virion infectivity factor
 VPU: Viral protein u
 VPR: Viral protein r
 VSVG: glycoprotein from vesicular stomatitis virus
 WPRE: woodchuck post regulatory element

Table des figures

Figure 1. A-Anatomie générale du foie humain. B- Anatomie du foie de rat	11
Figure 2. A-Vascularisation du foie B-Segmentation du foie selon Couinaud	13
Figure 3. Description du lobule hépatique -Représentation schématisque	14
Figure 4. Représentation de l'acinus.....	15
Figure 5. Polyploïdisation pendant la croissance du foie.....	18
Figure 6. Architecture du parenchyme et principaux types cellulaires.	20
Figure 7. Lignage des cellules SOX9.....	26
Figure 8. Cinétique de régénération après hépatectomie partielle chez le rat	29
Figure 9. Les différentes phases de la régénération après hépatectomie partielle.....	32
Figure 10. Phase d'initiation	34
Figure 11. Récepteur EGFR.....	37
Figure 12. Phase de terminaison	39
Figure 13. Biogénèse des miRNA.	41
Figure 14. Prolifération hépatocytaire	44
Figure 15. Système Cre lox pour détecter les phénomènes de fusion cellulaire.	49
Figure 16. Le canal de Hering.....	52
Figure 17. Repeuplement du foie de souris FAH ^{-/-} par des cellules ovales Rosa26.....	60
Figure 18. La rétroarsine	62
Figure 19. Protéines du cycle cellulaire exprimées après traitement à la rétroarsine ou chez des rats non traités.	64
Figure 20. Marquage BrdU et index mitotique chez des rats hépatectomisés traités ou non à la rétroarsine.....	65
Figure 21. Essais cliniques de thérapie génique en 2010.	69
Figure 22. Cycle répliatif simplifié des retroviridae.	74
Figure 23. Génome du HIV-1 (A) et du provirus (B).	75
Figure 24 . Génome de l'adénovirus.....	78
Figure 25. Génome de l'AAV sauvage	80
Figure 26. Proportion de cellules exprimant la β -galactosidase au cours de la régénération hépatique dans un modèle retrorsine.....	89
Figure 27. Origine et devenir des cellules ovales et des SHPCs.....	91
Figure 28. Modèles expérimentaux.....	95
Figure 29. Blocage des cellules an G1/S et infection avec un oncorétrovirus	105

Figure 30. Détermination de la surface de chaque noyau des hépatocytes des rats du groupe 1 et 2	111
Figure 31. Détermination de la ploïdie des hépatocytes des rats du groupe 1 et 2.	112
Figure 32. (A) Taux de transduction après injection lentivirale ou oncorétrovirale. Marquage immunohistochimique anti-GFP : (B) injection lentiviral post hépatectomie + rétroirsine (C) injection lentivirale post hépatectomie (x200).....	113
Figure 33. Effet du blocage en G2 sur l'infection lentivirale ou oncorétrovirale	116
Figure 34. Schémas des systèmes tet off et tet on.	121
Figure 35. Système tetR KRAB.....	122
Figure 36. Répression des gènes par KRAB via des phénomènes épigénétiques	123
Figure 37. Régulation du gène de la GFP sous forme épisomale	124

Contexte

Depuis plus d'une dizaine d'années, au sein du groupe de recherche dirigé par N. Ferry, nous développons des projets de recherche fondamentaux et cliniques dans le domaine de l'hépatologie et du transfert de gènes à l'aide de vecteurs recombinants. Notre volonté étant de faire de la recherche translationnelle et de générer des thérapies nouvelles, nous avons donc développé des stratégies de thérapie cellulaire et génique autour de pathologies comme le cancer du foie, et les maladies hépatiques héréditaires.

Nous avons par exemple mené des études de lignages cellulaires au cours de la cancérogenèse hépatique en utilisant les techniques de marquage des cellules *in vivo* à l'aide de vecteurs recombinants, le but étant de mieux connaître l'importance des différents types cellulaires dans la carcinogenèse et d'expliquer l'origine cellulaire des carcinomes hépatocellulaires. Un autre de nos axes de travail a été de développer des stratégies de transfert de gènes à l'aide de vecteurs viraux pour le traitement de maladies métaboliques héréditaires hépatiques comme la maladie de Crigler-Najjar de type I. Dans un premier temps nous avons utilisé principalement des vecteurs rétroviraux murins recombinants, puis nous avons développé des stratégies avec d'autres vecteurs comme l'AAV, (adeno-associated virus) ce qui nous a permis de débiter une étude préclinique d'un essai Européen de thérapie génique pour la maladie de Crigler Najjar de type 1.

Les travaux exposés dans ce manuscrit sont le fruit de ces trois dernières années de recherche. Ces projets, dont les maitres mots sont « Régénération hépatique et transfert de gènes » s'inscrivent en cohérence avec les travaux auxquels j'ai participé antérieurement et que je cite dans ce manuscrit. Ces études ayant des retombées dans le domaine fondamental ou dans le domaine des biothérapies, notamment la thérapie génique ont eu pour objet :

- d'une part de mieux caractériser les populations cellulaires participant à la régénération hépatique en condition pathologique,
- et d'autre part, d'évaluer l'efficacité de la transduction des hépatocytes par des lentivirus recombinants lors de la régénération hépatique.

INTRODUCTION GENERALE

1 Structure et fonction du foie

1.1 Notion d'anatomie générale

Chez l'homme le foie est un organe impair asymétrique. Il est situé dans le quart supérieur droit de l'abdomen juste au-dessus du duodénum. Il est le plus volumineux des viscères humains. Son poids est d'environ 1500 grammes (à l'autopsie) mais il contient en plus 800 à 900 grammes de sang chez le vivant. Il représente environ deux pour cent du poids corporel. Le foie est entouré par une capsule conjonctive, la capsule de Glisson, qui s'invagine dans le parenchyme hépatique permettant de déterminer des lobes. L'anatomie de surface du foie humain le divise en 4 lobes, 2 lobes accessoires et deux lobes principaux (le lobe droit est très volumineux séparé du lobe gauche par le ligament falciforme). Chez l'homme le foie est dit unifié car les lobes sont accolés. (Figure 1A).

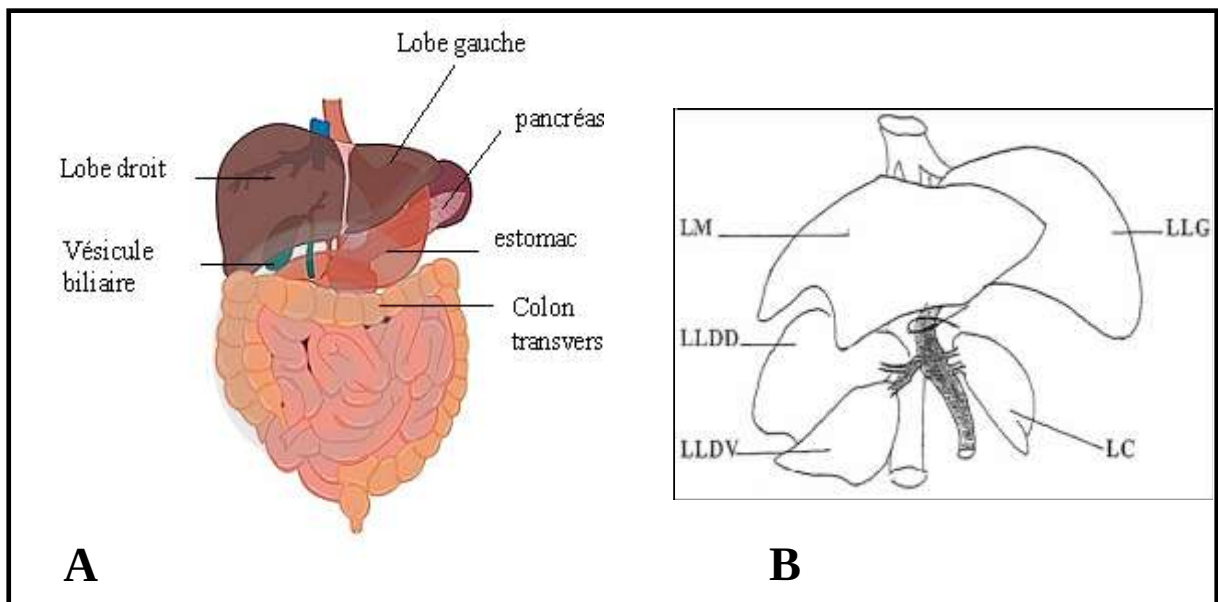


Figure 1. A-Anatomie générale du foie humain. B- Anatomie du foie de rat. LM : lobe médian ; LLG : lobe latéral gauche ; LLDD : lobe latéral droit dorsal ; LLDV : lobe latéral droit ventral ; LC : lobe caudé.

(Effet de la ligature portale partielle sur la régénération hépatique chez le rat, Lorand et al. Ann Chir 2000 Éditions scientifiques et médicales Elsevier).

1.1.1 Quelques particularités d'espèce

Il est essentiel de préciser qu'il existe des particularités anatomiques du foie en fonction des espèces. Ces spécificités concernent essentiellement la taille et la lobation du foie. La taille du foie est proportionnellement plus volumineuse chez les carnivores que chez les herbivores. En ce qui concerne la lobation du foie, il faut savoir qu'elle est plus accentuée chez certains animaux comme les carnivores ou les glires. Ainsi par exemple le foie de rat dit "lobé" est composé de 4 lobes anatomiques indépendants (Figure 1B). Une autre particularité cette fois ci concernant « l'environnement » du foie, est la présence ou non de la vésicule biliaire. En effet, chez certains animaux, le stockage de la bile n'est pas nécessaire et la vésicule peut faire défaut. C'est par exemple le cas chez le rat ou le hamster.

1.1.2 Vascularisation hépatique

Quelques mots concernant la vascularisation du foie sont indispensables pour comprendre l'organisation générale du parenchyme hépatique. C'est au niveau du hile, sur la face inférieure du foie, que pénètrent et/ou sortent les vaisseaux sanguins et les canaux biliaires.

Le foie présente deux systèmes vasculaires afférents :

- La veine porte (75% du sang afférent) draine le sang veineux provenant du tube digestif et de la rate, puis se ramifie en veinules.
- L'artère hépatique (25% du sang afférent) provenant de l'aorte se ramifie en artérioles.

La vascularisation efférente est représentée par la confluence des veines centrolobulaires en veines sus-hépatiques qui rejoignent la veine cave inférieure. (Figure 2A).

Les canalicules biliaires, transportant la bile sécrétée au pôle apical des hépatocytes, convergent pour former les canaux biliaires qui vont rejoindre la vésicule biliaire. Le transport de la bile a donc une direction opposée au flux sanguin.

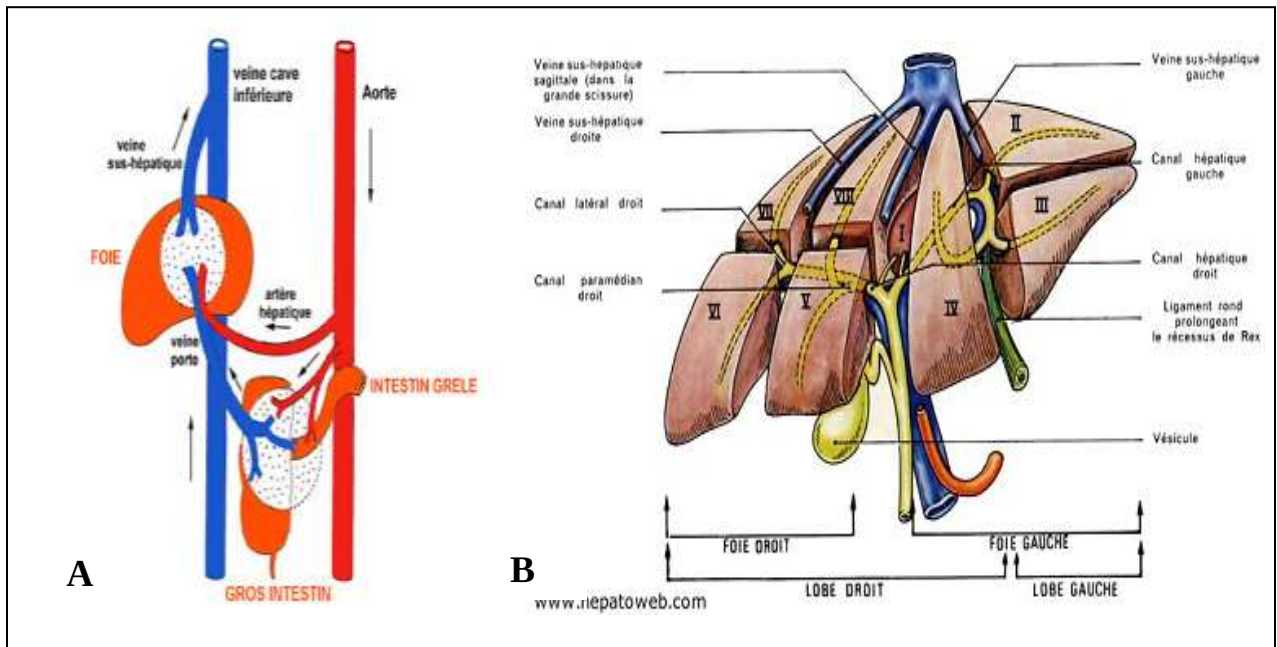


Figure 2: A-Vascularisation du foie B-Segmentation du foie selon Couinaud.

La distribution en divers territoires des vaisseaux sanguins et des conduits biliaires, détermine la segmentation hépatique. Selon la classification de Couinaud, populaire surtout en Asie et en Europe, le foie humain peut se partager en huit segments qui correspondent à la répartition des ramifications du réseau porte et sus-hépatique. Chaque segment possède son propre système de vascularisation et de drainage biliaire (Figure 2B). Ainsi, plusieurs régions du foie, indépendantes dans leur fonctionnement, peuvent être enlevées sans compromettre le fonctionnement du parenchyme restant.

Le système circulatoire hépatique est indispensable pour comprendre l'organisation générale du parenchyme hépatique, mais aussi la structure microscopique du foie, comportant de véritables unités microcirculatoires.

1.2 Organisation microscopique du foie

1.2.1 Notion de lobule hépatique

Le foie humain est composé d'unités structurales microscopiques appelées lobules hépatiques. Les lobules hépatiques sont des structures hexagonales, centrés par une veine centrolobulaire (branche de la veine sus hépatique) et limités en périphérie par les espaces portes, ou espaces de kiernan. Au niveau de chaque espace porte on peut trouver la triade portale, composée des ramifications de la veine porte, de l'artère hépatique, et du canal biliaire. Le sang des veinules et artérioles se mélange et circule dans les capillaires sinusoides qui convergent vers la veine centrolobulaire assurant ainsi la vascularisation du lobule. La bile secrétée par les hépatocytes dans les canalicules biliaires est acheminée dans le sens opposé de la circulation sanguine jusque dans les canaux biliaires se trouvant dans l'espace porte. Il faut noter qu'il existe une zone de jonction entre la partie terminale des canalicules biliaires et des canaux biliaires appelée canal de Héring. A l'intérieur du lobule, les hépatocytes sont disposés en travées (travées de Remak), et convergent de l'espace porte vers la veine centrolobulaire. (Figure 3).

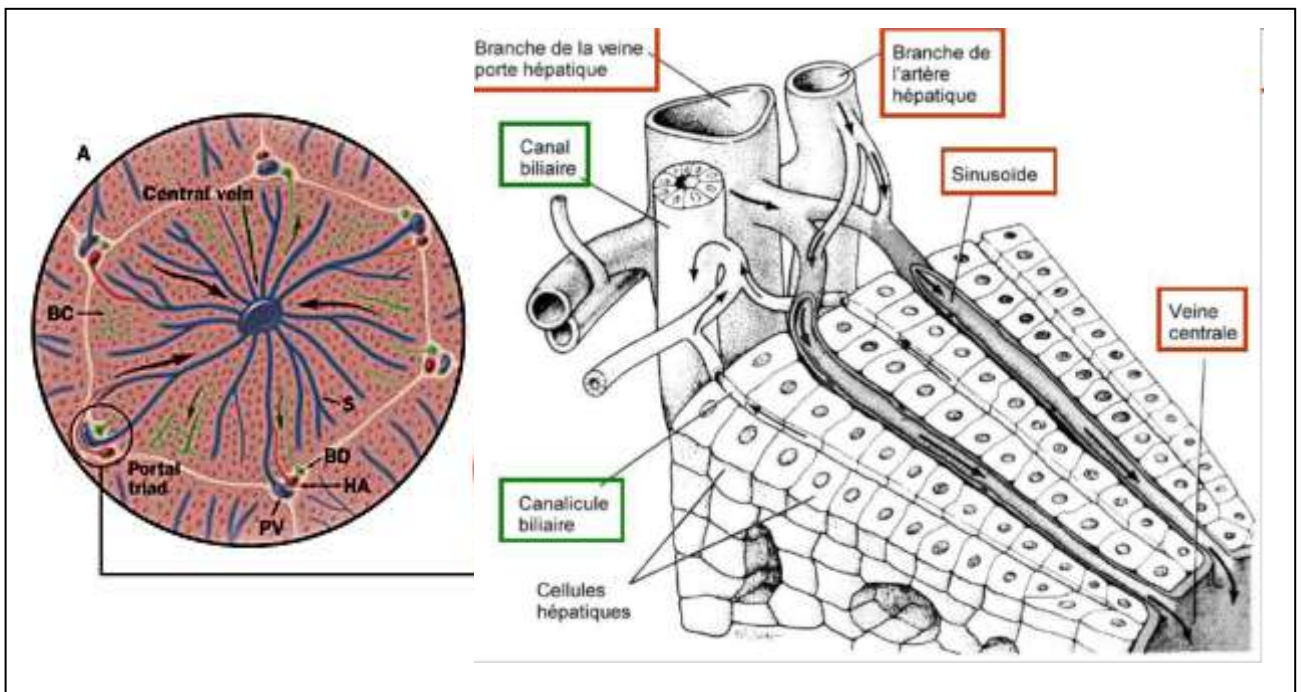


Figure 3- Description du lobule hépatique -Représentation schématique.

Le lobule est considéré comme l'unité anatomique du parenchyme, néanmoins, il correspond mal à la réalité fonctionnelle du tissu hépatique. En effet, les sinusoides ne naissent pas à la périphérie des espaces portes mais à la périphérie des lobules hépatiques, à partir de vaisseaux issus des veines portes, décrits sous le nom de branches terminales. Une des principales conséquences de cette architecture complexe est que la région du parenchyme hépatique recevant les concentrations sanguines les plus élevées en oxygène, en nutriments et en médiateurs d'origine intestinale n'est pas la région située autour de l'espace porte, mais la périphérie du lobule, où naissent la plupart des sinusoides. C'est en se basant sur ces données que Rappaport a proposé une nouvelle conception de l'organisation fonctionnelle du tissu hépatique, celle de l'acinus (Rappaport, A. M. *et al.*, 1954). Il s'agit d'une structure parenchymateuse hépatique dont le centre est un espace porte et la périphérie une veine centrolobulaire (Figure 4). Il est divisé arbitrairement en trois zones pour tenir compte des différences d'oxygénation qui existent dans le lobule : la zone III étant située autour des veines centrolobulaires, pauvre en oxygène, alors la zone I située autour des vaisseaux afférents périportaux, reçoit un sang riche en nutriments et oxygène.

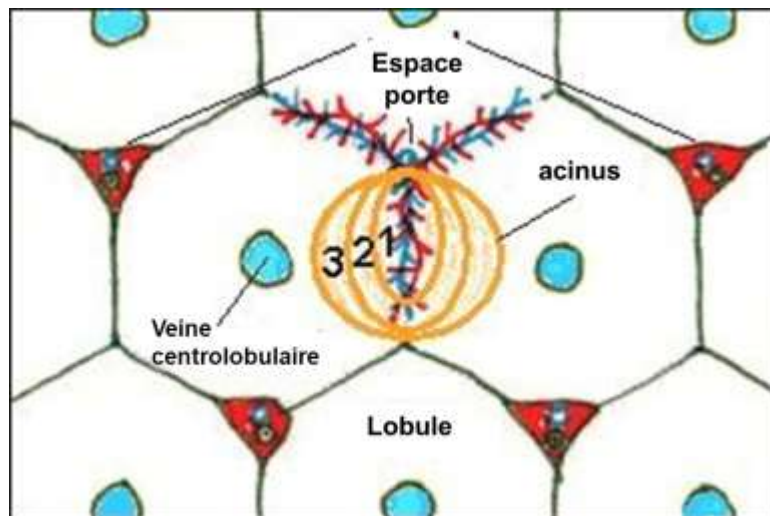


Figure 4. Représentation de l'acinus
(www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/liver/histo_acinus).

Les hépatocytes présentent une hétérogénéité morphologique, biochimique et fonctionnelle selon leur localisation dans les différentes zones du lobule hépatique. On observe par exemple un gradient de taille des hépatocytes le long de l'acinus. Il existe aussi une zonation métabolique due aux différentes activités métaboliques des hépatocytes en fonction de leur position au sein de l'acinus lui-même défini par la direction du flux sanguin (Gebhardt, R., 1992) (Jungermann, K. & Kietzmann, T., 1996). Ainsi, la zone périportale est spécialisée dans le métabolisme oxydatif, la néoglucogenèse, le catabolisme des acides gras et acides aminés, ainsi que la synthèse de cholestérol. Au contraire, la zone périveineuse assure préférentiellement la glycolyse, la synthèse des acides gras, des fonctions de biotransformation des xénobiotiques, et la formation de la bile (Burke, Z. D. & Tosh, D., 2006) (Oinonen, T. & Lindros, K. O., 1998). Les mécanismes moléculaires à l'origine de cette zonation restent incompris. Cependant des études assez récentes montrent que certaines voies de signalisation, (par exemple la voie Wnt/ β -caténine), pourraient réguler les programmes géniques des compartiments périveineux et périportaux responsables de cette zonation métabolique (Benhamouche, S. *et al.*, 2006) (Burke, Z. D. *et al.*, 2009).

1.2.2 Architecture du parenchyme et principaux types cellulaires (Figure 6)

1.2.2.1 Les travées de Remak

Les **hépatocytes** représentent environ 60% des cellules hépatiques et forment des travées séparées par les sinusoides. Les hépatocytes sont de forme polyédrique d'environ 20×30µm. Chaque hépatocyte est en contact latéralement avec d'autres hépatocytes, par contre à sa base l'hépatocyte est en contact avec le plasma situé dans l'espace de Disse.

Les hépatocytes sont polarisés et on distingue deux pôles :

- un **pôle biliaire** entre deux hépatocytes qui délimite le canalicule biliaire dans lequel la bile est sécrétée.

- un **pôle vasculaire** au contact de l'espace de Disse, permettant notamment l'entrée des nutriments dans les hépatocytes et la sécrétion protéique dans le sang.

Les hépatocytes sont riches en organites de toutes sortes (mitochondries, réticulum endoplasmique, lysosomes, peroxysomes, complexe golgien) ce qui leur permet d'assurer de nombreuses fonctions métaboliques.

Les hépatocytes ont la particularité de posséder un ou plusieurs noyaux eux-mêmes diploïdes ou non et de ce fait présentant des contenus en ADN différents. La polyploïdisation d'une cellule diploïde se déroule ainsi : tout d'abord, elle réplique son ADN puis effectue un cycle de division originale puisque la mitose a bien lieu mais par contre elle est suivie d'une cytokinèse incomplète empêchant la cellule de se séparer en deux (Margall-Ducos, G. *et al.*, 2007). Ceci conduit ainsi à la formation d'une cellule binucléée possédant deux noyaux diploïdes ($2 \times 2n$). Cette cellule peut alors se diviser pour donner deux cellules tétraploïdes mononucléées, ou se diviser anormalement par mitose sans cytokinèse et former des cellules $2 \times 4n$.

Chez le rat nouveau né, le foie est constitué d'hépatocytes diploïdes (mononucléés $2n$) alors que chez le rongeur adulte, 25% des hépatocytes sont diploïdes, 70% sont tétraploïdes (binucléés $2 \times 2n$, ou mononucléés $4n$) et 5% sont octoploïdes (binucléés $2 \times 4n$ ou mononucléés $8n$). C'est après le sevrage que la fréquence d'hépatocytes tétraploïdes (binucléés $2 \times 2n$ ou mononucléés $4n$), puis octoploïdes (binucléés $2 \times 4n$ ou mononucléés $8n$) augmente brutalement marquant en quelque sorte la différenciation terminale des hépatocytes (Figure 5). En effet des travaux récents démontrent que lors du développement post-natal du foie, le sevrage influence directement l'initiation des événements de cytokinèse incomplète (Celton-Morizur, S. *et al.*, 2010). Cette équipe n'a observé aucun événement de cytokinèse incomplète chez des rats de 19 jours non sevrés. Par contre, chez des rats de 19 jours sevrés précocement à 15 jours la formation d'hépatocytes tétraploïdes $2 \times 2n$ débute. Cette équipe propose que la modulation du signal insulinique au moment du sevrage induit des variations importantes dans la genèse du contingent tétraploïde $2 \times 2n$. En effet, l'injection d'insuline stimule le développement d'hépatocytes tétraploïdes et à l'inverse, la diminution du taux d'insuline par un agent diabétogène ralentie la polyploïdisation.

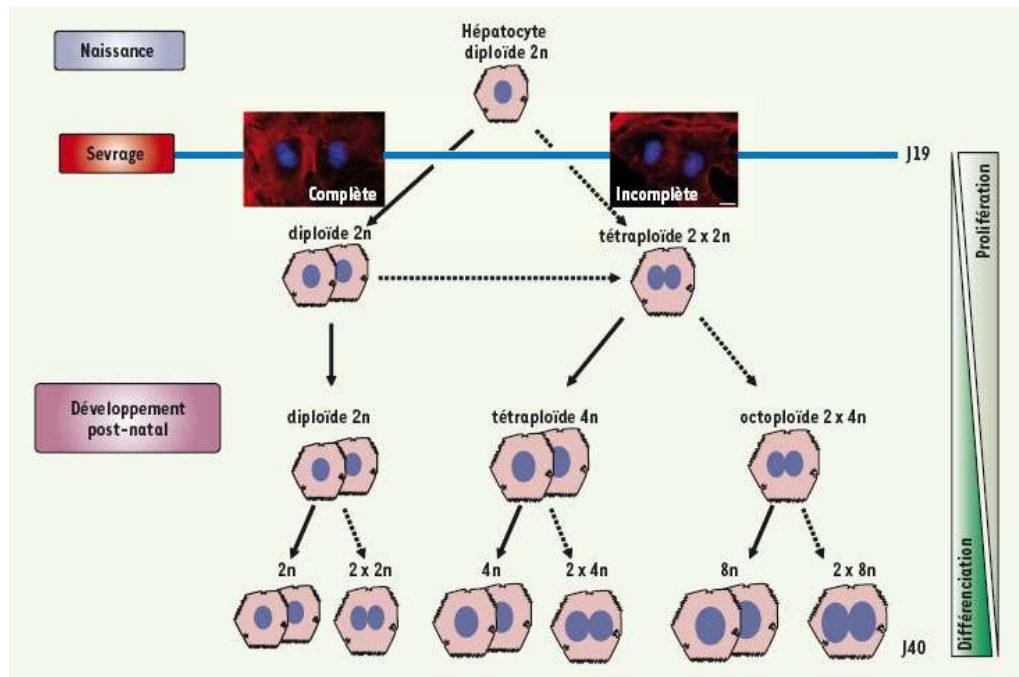


Figure 5. Polyploïdisation pendant la croissance du foie (Celton-Morizur, S. *et al.*, 2010).

1.2.2.2 L'espace de Disse

Il existe un espace virtuel entre les hépatocytes et les sinusoides appelé espace de Disse. Cet espace contient **des cellules étoilées (cellules de Ito)** entourées de la matrice extracellulaire. La matrice extracellulaire est constituée d'un assemblage complexe de macromolécules réparties en quatre groupes : les collagènes, les glycoprotéines, l'élastine et les protéoglycanes. Les cellules étoilées du foie représentent environ 5% des cellules hépatiques et sont réparties de façon uniforme au sein de l'acinus. Ces cellules sont les principales cellules de stockage de la vitamine A sous forme estérifiée dans des gouttelettes lipidiques. Ces cellules jouent un rôle important lors des lésions hépatiques, puisque les réactions inflammatoires activent et différencient les cellules étoilées en myofibroblastes,

qui migrent au niveau des lésions et provoquent des changements qualitatifs et quantitatifs de la matrice extracellulaire afin de permettre la restructuration de celle-ci. Une activation des cellules étoilées lors de lésions chroniques conduit à l'accumulation excessive de matrice (fibrose hépatique). Enfin, ces cellules participent à la régulation du flux sanguin sinusoidal grâce à leur propriété contractile.

1.2.2.3 Les sinusoides hépatiques

Les sinusoides hépatiques sont des capillaires fenestrés délimités par des **cellules endothéliales** qui représentent environ 20% des cellules hépatiques. Ces fenestrations facilitent les échanges bidirectionnels entre le sang et les hépatocytes. Les cellules endothéliales jouent ainsi un rôle de tamis ou de filtre mais sont aussi capables de transférer des molécules par endocytose. Le nombre et la taille des fenestrations, mesurés par microscopie électronique à transmission, varient selon la localisation dans l'acinus mais surtout en fonction des espèces. Ainsi par exemple le diamètre moyen des fenestrations chez l'homme est de 107 nm, alors qu'il est de 141 nm chez la souris C57BL/6 et 150 nm chez le rat Sprague dawley (Jacobs, F. *et al.*, 2010). Le nombre de fenestrations peut aussi varier selon les individus de la même espèce notamment lors de certaines pathologies hépatiques. Par exemple lors du développement de fibrose hépatique certaines modifications phénotypiques des cellules endothéliales entraînent la perte des fenestrations (Neubauer, K. *et al.*, 2001). Les cellules endothéliales ont de multiples fonctions, elles interviennent par exemple dans la synthèse de la matrice extracellulaire, ou bien dans la production de vasorégulateurs tels que le monoxyde d'azote. Enfin ces cellules ont un rôle important lors des réactions immunitaires. En effet, afin de recruter les cellules du système immunitaire, les cellules endothéliales sont capables de produire des médiateurs de l'inflammation (IL6, IL1), et d'exprimer des protéines membranaires d'adhésion (ICAM pour intercellular adhesion molecule). De plus, elles expriment de façon constitutive les molécules de classe II du CMH leur permettant de présenter des peptides antigéniques. Enfin elles joueraient aussi un rôle dans la tolérance hépatique périphérique en participant à l'apoptose des lymphocytes T activés (Karrar, A. *et al.*, 2007).

Les sinusoides contiennent également des **cellules de Küpffer** représentant environ 15% des cellules hépatiques. Ces macrophages localisés préférentiellement le long des parois des sinusoides, entre les cellules endothéliales, dérivent de progéniteurs hématopoïétiques. Grâce à leur capacité phagocytaire considérable, les cellules de küpffer permettent l'élimination des particules étrangères comme les parasites, les bactéries, les débris de cellules mortes, ainsi que tous les produits inutilisables par l'organisme. Elles interviennent très tôt lors des processus inflammatoires en produisant de l'IL12 et IL18 qui activent les cellules cytotoxiques (NK et NKT) présentes en grande nombre dans le foie. Tout comme les cellules endothéliales, les cellules de küpffer expriment les molécules nécessaires à l'adhésion des lymphocytes T et à la reconnaissance d'antigènes, et produisent des molécules costimulatrices et des cytokines inflammatoires (IL-1, IL-6, INF- α , du TNF- α et TGF- β).

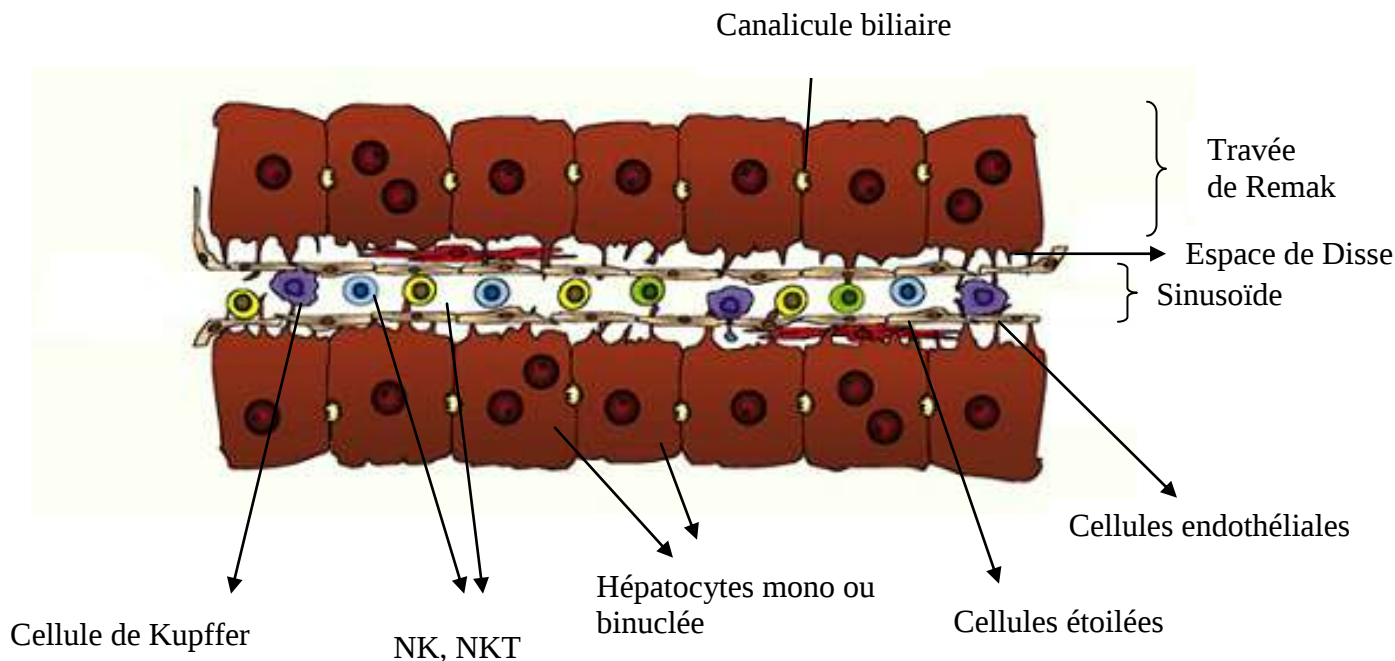


Figure 6. Architecture du parenchyme et principaux types cellulaires (médecine science nov 2007 vol 13 n 11 le foie un organe du système immunitaire).

1.2.2.4 *Espaces portes*

On trouve aussi dans le foie des cellules épithéliales biliaires ou cholangiocytes formant les canaux biliaires drainant la bile. Ces cellules représentent environ 5% des cellules hépatiques et dérivent du même progéniteur que l'hépatocyte, l'hépatoblaste.

1.3 Principales fonctions hépatiques

Le foie est l'organe fonctionnellement le plus varié de l'organisme. C'est une glande à la fois exocrine et endocrine qui assure des fonctions de synthèse, de stockage, et d'épuration. Ces fonctions sont le plus souvent vitales. En voici quelques exemples.

1.3.1 Fonction de synthèse

Tout d'abord, le foie est un régulateur de la concentration de glucose dans le plasma. Durant la phase d'absorption, l'insuline, hormone hypoglycémiante, favorise le stockage du glucose absorbé principalement par les cellules périveineuses et stocké sous forme de glycogène. Lorsque le stock de glucose est renouvelé, le glucose est métabolisé en lactate par la voie de la glycolyse. En situation d'hypoglycémie, le foie procède à la dégradation du stock de glycogène en molécules de glucose. C'est le glucagon et l'adrénaline, hormones hyperglycémiantes, qui en favorisant la glycogénolyse et en inhibant la glycogénogénèse, libère du glucose dans le sang. Pendant des périodes de jeûne prolongées, le cortisol favorisant la production de glucose à partir de substrats non glucidiques tel le lactate. (néoglucogénèse). La néoglucogénèse nécessite de l'énergie du métabolisme oxydatif et est accomplie dans la zone périportale riche en oxygène. A l'inverse la glycolyse est un processus libérant de l'énergie et est localisée en zone périveineuse pauvre en oxygène (Jungermann, K. & Kietzmann, T., 1996).

Le foie joue aussi un rôle essentiel dans le métabolisme des lipides. Pendant la phase d'absorption, les acides gras sont principalement utilisés pour reconstituer les réserves de triglycérides du tissu adipeux. Les acides gras sont retrouvés sous forme de

chylomicrons solubles et sont hydrolysés par les lipases principalement au niveau du muscle et du tissu adipeux. Dans le tissu adipeux, les triglycérides sont stockés. Les acides gras résiduels sont alors recaptés par le foie pour être transformés sous forme de VLDL-triglycérides avant d'être stockés dans les adipocytes. Les acides gras peuvent aussi être synthétisés à partir de glucose : la lipogénèse a lieu essentiellement dans le foie dans le cas d'alimentation riche en sucres ou dans les pathologies telles que le diabète. Pendant la phase post-absortive, les acides gras sont libérés des réserves adipeuses et une partie est oxydée par le foie pour la production d'énergie. En cas de phase post absorptive prolongée, ils peuvent être également transformés en corps cétoniques.

Enfin, le foie en utilisant les acides aminés apportés par voie portale synthétise aussi une grande partie des protéines circulantes comme l'albumine, les protéines de l'inflammation et les facteurs de la coagulation (fibrinogène, prothrombine et facteurs V, VII, IX et X).

1.3.2 Fonction de stockage

Une autre fonction importante du foie est le stockage de certaines molécules comme par exemple la vitamine B12 ou le fer, essentiels pour une érythropoïèse normal.

1.3.3 Fonction d'épuration

1.3.3.1 Sécrétion biliaire

La bile composée essentiellement d'eau, d'acides biliaires, de cholestérol, de phospholipides et de bilirubine est sécrétée par le foie. Elle est produite constamment par le foie, stockée dans la vésicule biliaire, puis excrétée rapidement par le canal cholédoque. La bile nécessaire à la digestion et à l'absorption des graisses alimentaires est une voie d'excrétion du cholestérol, des pigments biliaires (bilirubine conjuguée par exemple) et de xénobiotiques divers (métaux, morphine etc ...).

1.3.3.2 *La biotransformation*

La détoxification des xénobiotiques est assurée par des systèmes enzymatiques et comporte principalement deux phases. Les réactions de phase I rendent la molécule plus hydrophile, donc favorisent son élimination. Ce sont le plus souvent des réactions d'oxydation qui font surtout intervenir des monooxygénases à cytochrome P450 (ou CYP ou P450). Les monooxygénases à cytochrome P450 sont des complexes multi enzymatiques localisés essentiellement dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes. Les CYP interviennent essentiellement dans le métabolisme des xénobiotiques, des acides gras et dérivés, dans la synthèse des acides biliaires, dans la synthèse et le catabolisme des hormones et des vitamines. Les CYP sont des protéines constituées d'une hémoprotéine porteuse d'un atome de fer à l'état oxydé, d'une apoprotéine liée à l'hème, d'enzymes réductrices (NADPH cytochrome P450 réductase), et d'un phospholipide qui assure la cohésion du complexe. Ces complexes fonctionnent selon un cycle catalytique au cours duquel l'atome de fer de l'hème passe par différents degrés d'oxydation pour aboutir à l'incorporation d'un atome d'oxygène dans le substrat. La phase II conjugue la molécule obtenue après la phase I, avec des accepteurs cellulaires (glucuronides, glutathions...), ce qui permet la formation d'un composé hydrosoluble, excrété par la voie urinaire ou la voie biliaire.

2 Régénération hépatique en condition normale

2.1 Régénération hépatique - généralités

La régénération est la reconstitution morphologique et fonctionnelle d'une partie vivante qui a été détruite. C'est finalement une notion assez courante dans le règne du vivant : la plante qu'on coupe repousse, des parties du corps sont capables d'être régénérées aussi bien chez des organismes simples (comme l'hydre) mais aussi chez les vertébrés comme la salamandre, le lézard, le poisson zèbre modèle de prédilection des spécialistes de la biologie du développement (Poss, K. D. *et al.*, 2002). Chez l'homme, on a déjà observé qu'une phalange sectionnée chez un enfant en bas âge pouvait se reconstituer mais ce phénomène reste exceptionnel (Illingworth, C. M., 1974). Par contre, certains tissus ou organes humains se renouvellent en permanence c'est le cas par exemple de l'épithélium intestinal, de l'épiderme, ou du système hématopoïétique. D'autres tissus comme les tissus musculaires ont la capacité de régénérer après une lésion, ou un stress musculaire. Le renouvellement ou la réparation cellulaire de ces tissus est possible grâce à la présence de cellules souches adultes, cellules indifférenciées multipotentes et capables de se différencier mais aussi de s'autorenouveler. (Boonen, K. J. & Post, M. J., 2008) (Moore, K. A. & Lemischka, I. R., 2006).

2.1.1 Capacité de régénération du foie

2.1.1.1 A partir des hépatocytes matures

Il est connu depuis fort longtemps que le foie possède une puissante capacité régénérative. Mais contrairement à tous les autres tissus ou organes de l'organisme, le foie est capable de réguler sa taille et sa masse à partir de ses propres cellules différenciées. C'est le cas par exemple après une hépatectomie partielle : le foie développe une hyperplasie compensatrice afin de rétablir sa masse initiale optimale par rapport au poids corporel. Une fois la masse hépatique rétablie la prolifération s'arrête. Certains auteurs avaient montré qu'après une hépatectomie partielle, la synthèse d'ADN était prédominante

dans les hépatocytes périveineux, puis que ces hépatocytes migraient le long de l'axe porto-central (Zajicek, G. *et al.*, 1985). Le modèle de «streaming liver» avait été remis en cause via une étude de lignage cellulaire par transfert rétroviral du gène de la β -galactosidase. Des hépatocytes avaient été marqués après hépatectomie partielle puis comptabilisés et localisés. Trois jours après l'infection rétrovirale, les hépatocytes marqués étaient prédominants dans les zones périportales et médiolobulaires. 15 mois après l'infection, les cellules marquées avaient proliféré mais leur position le long de l'axe porto-central n'avait pas été modifiée (Bralet, M. P. *et al.*, 1994).

2.1.1.2 A partir de cellules souches

En condition non pathologique

La durée de vie d'un hépatocytes est estimée à 200 jours chez le rongeur. Depuis très longtemps, on pensait que lors de la régénération physiologique du foie, le renouvellement des hépatocytes s'effectuait à partir des hépatocytes matures comme c'est le cas après une hépatectomie partielle. Cependant très récemment une étude a montré l'implication de cellules hépatiques progénitrices dans différents modèles de régénération hépatique ainsi que lors de la croissance physiologique (Furuyama, K. *et al.* 2011). Cette équipe a réalisé un lignage cellulaire hépatique des cellules Sox9⁺ (marqueur potentiel de précurseurs exprimé par les cellules des canaux biliaires). Pour réaliser le lignage, ils ont utilisé des souris doubles transgéniques Sox9-IRES-CreERT2 (Cre recombinase inducible par le tamoxifène) et Rosa26R, porteuses d'une cassette β -galactosidase dont l'expression est activable par l'action de la Cre. En présence d'une seule dose de tamoxifène la recombinase creERT2 est active et vient libérer le gène rapporteur LacZ, qui s'exprime alors spécifiquement dans les cellules sox9⁺.

Chez la souris de 4 semaines 99% des cellules Sox9⁺ étaient localisées dans les cellules des canaux biliaires (Figure 7). Progressivement au cours de la croissance physiologique de la souris, ils ont pu observer une augmentation du nombre d'hépatocytes sox9⁺ dans le parenchyme suggérant fortement que les hépatocytes néoformés proviennent de progéniteurs hépatiques puis migrent de la région périportale à la zone centrolobulaire.

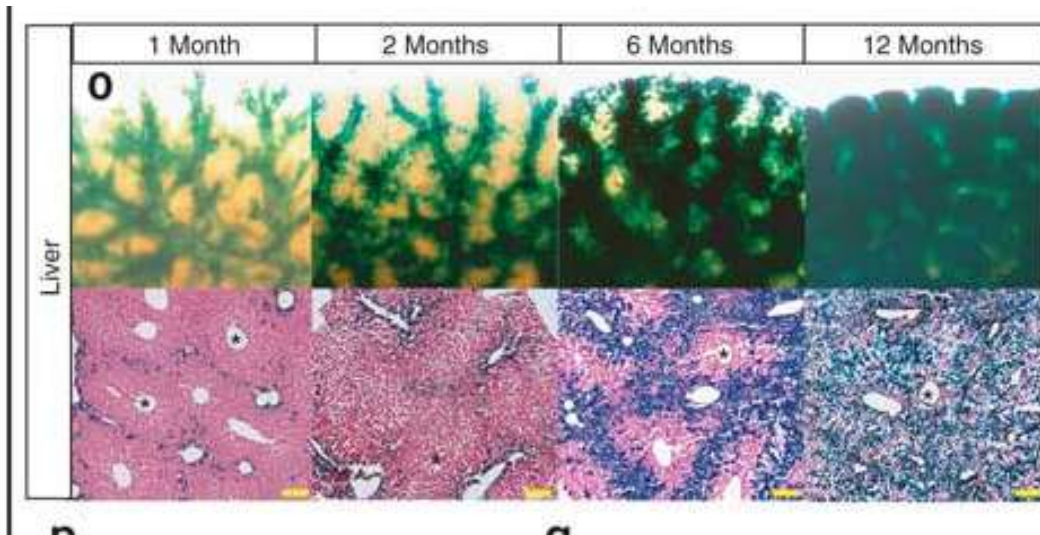


Figure 7. Lignage des cellules SOX9. (Furuyama, K. *et al.* 2011)

Dans cette étude, ce phénomène est aussi observé suite à la régénération après lésion au CCl₄. Par contre, après hépatectomie partielle, la contribution du progéniteur sox9⁺ est faible. Cet article conteste donc un dogme établi depuis longtemps : lors de la croissance physiologique du foie, ou après certaines lésions hépatiques, le foie régulerait sa taille et sa masse à partir de progéniteurs et non pas à partir de ses propres hépatocytes. Des études complémentaires viendront sans doute confirmer ou non ces résultats.

Régénération en condition pathologique

Une autre voie de régénération concerne la régénération en condition pathologique. Lorsque les hépatocytes sont dans l'incapacité de proliférer d'autres types cellulaires considérés comme des progéniteurs adultes peuvent réguler la masse et la taille du foie. Ceci sera détaillé dans la partie 3 de l'introduction.

2.1.1 Activité répliquative des hépatocytes

Le foie est un organe dit quiescent. En condition non pathologique, la quasi-totalité des hépatocytes se trouvent en phase G0 et le renouvellement cellulaire est très lent puisque la durée de vie d'un hépatocyte est estimée à 200 jours chez le rat et à 400 jours chez l'homme. Ainsi, moins de 0.1% d'hépatocytes en mitose sont observés dans un foie dit quiescent. En revanche, après une perte de la masse hépatique, les hépatocytes ont une importante capacité régénérative. Plusieurs études ont montré que l'hépatocyte avait une faculté d'autorenouvellement très importante (stoker *et al* 1973), (Rhim, J. A. *et al.*, 1995) (Overturf, K. *et al.*, 1997). Certaines expériences ont consisté à étudier la capacité régénérative des hépatocytes suite à des hépatectomies successives chez le rongeur. D'autres études ont montré la capacité régénérative des hépatocytes en les transplantant dans des modèles de repeuplement sélectif comme dans le modèle animal de la tyrosinémie héréditaire de type I. Ce modèle de repeuplement est une souris dont le gène de la fumaryl acétoacétate hydrolase (FAH) a été invalidé par recombinaison génétique. La FAH est l'enzyme terminale du métabolisme de la tyrosine. Son déficit conduit à l'accumulation intracellulaire de fumarylacétoacétate et de son précurseur, le maleylacétoacétate. En l'absence de transplantation hépatique ou de traitement par le 2-(2-nitro-4-trifluorométhylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione (NTBC), un inhibiteur du sentier catabolique de la tyrosine, l'accumulation de ces métabolites conduit à une cytolysse hépatique rapidement mortelle. Dans ce modèle, les hépatocytes normaux ont un avantage sélectif sur les hépatocytes porteurs de la mutation constitutionnelle. Ainsi chez ces souris FAH^{-/-} Overturf et al. ont montré la capacité clonogénique a priori illimitée de l'hépatocyte murin. Une de ces études a consisté à greffer 10000 hépatocytes β -gal⁺ qui ont suffi à repeupler complètement le foie de souris FAH^{-/-}. Ce modèle a permis de démontrer que chaque hépatocyte transplanté pouvait se diviser au moins 70 fois (Overturf, K. *et al.*, 1997).

L'activité répliquative des hépatocytes est très importante mais diminue au cours du temps (Timchenko, N. A. *et al.*, 1998). On observe chez les rongeurs âgés un niveau anormalement élevé d'un complexe protéique de haut poids moléculaire composé du facteur de transcription C/EBP α (CCAAT/Enhancer-Binding Proteins), et des protéines E2F4, Rb et Brahma (Brm). Ce complexe jouerait un rôle crucial dans le maintien de la

quiescence des hépatocytes en inhibant notamment des facteurs essentiels à la progression du cycle cellulaire comme FoxM1b (Wang, H. *et al.*, 2001). Des études assez récentes ont montré qu'un facteur contenu dans l'hormone de croissance, déplacerait C/EBP α de son association avec Brm, via des modifications épigénétiques, ce qui permettrait l'expression de facteurs essentiels à la progression du cycle cellulaire. La diminution de l'activité répliquative des hépatocytes serait donc corrélée à la diminution de la production d'hormone de croissance liée à l'âge (Conboy, I. M. *et al.*, 2005) (Wang, G. L. *et al.*, 2007).

La diminution de l'activité répliquative des hépatocytes pourrait aussi être liée au raccourcissement des télomères observé chez des sujets âgés, et chez des patients atteints de cirrhose ou CHC (Paradis, V. *et al.*, 2001). Le foie en régénération présente une forte activité télomérase qui est indispensable à la poursuite des divisions cellulaires (Wege, H. *et al.*, 2007). Des souris transgéniques déficientes en télomérase, deviennent particulièrement sensibles au développement de cirrhoses (Rudolph, K. L. *et al.*, 2000). La télomérase a un rôle ambivalent puisqu'elle est à la fois indispensable pour la poursuite des divisions cellulaires et donc aussi pour la croissance tumorale mais présente un rôle protecteur vis-à-vis de l'induction de tumeurs (la conservation des télomères longs évite par exemple l'instabilité du génome, d'éventuelles fusions chromosomiques, facteurs potentiels pour l'induction tumorale).

2.2 Modèles expérimentaux pour l'étude de la régénération du foie en condition non pathologique

Afin d'étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires lors de la régénération hépatique, plusieurs modèles expérimentaux ont été développés chez les rongeurs. En voici quelques exemples.

2.2.1 Hépatectomie partielle

L'hépatectomie partielle a été développée chez le rongeur par Higgins et Anderson en 1931. C'est le modèle expérimental le plus fréquemment utilisé pour l'étude des mécanismes moléculaires de la régénération hépatique. L'hépatectomie partielle des deux

tiers chez le rat consiste à exciser les deux lobes principaux (lobe moyen et lobe latéral gauche). Cette résection entraîne alors une hypertrophie compensatoire des lobes restants. Les premières cellules du foie à proliférer sont les hépatocytes suivis des cellules épithéliales biliaires, des cellules de kuppfer et Ito, puis des cellules endothéliales (Figure 8).

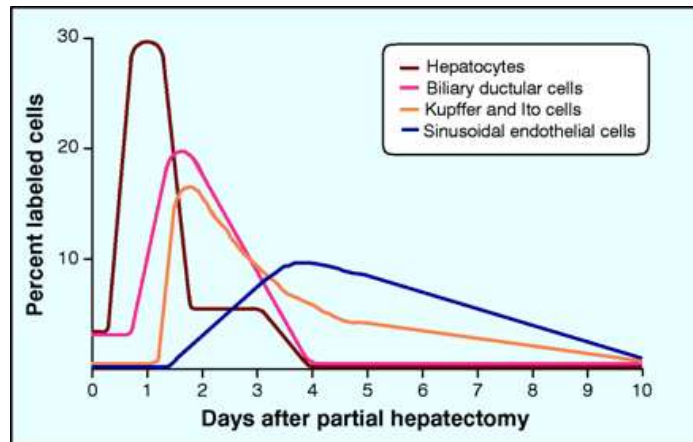


Figure 8. Cinétique de régénération après hépatectomie partielle chez le rat. (Michalopoulos, G.K. 1997)

Chez l'homme le foie retrouve sa taille et sa masse initiale 6 à 20 semaines après hépatectomie selon la pathologie hépatique et le degré d'atteinte du foie (Yamanaka, N. *et al.*, 1993). Chez le rongeur la régénération est plus rapide puisque 10 jours après l'hépatectomie la masse hépatique est restaurée. La cinétique de prolifération hépatocytaire est très variable selon les espèces. En effet, par exemple, chez les rongeurs le pic de synthèse de l'ADN se situe entre 24 et 40 heures après hépatectomie, chez le chien entre 72 et 96 heures (Francavilla, A. *et al.*, 1978), et chez le primate entre 7 et 10 jours (Gaglio, P. J. *et al.*, 2000). Entre deux espèces proches comme le rat et la souris, il peut aussi exister des différences dans la cinétique de régénération. Ainsi chez le rat un pic d'hépatocytes en mitose est observé à 24 heures après hépatectomie (Grisham, J. W., 1962), alors que chez la souris ce pic est décalé à 41 heures post hépatectomie (Yamada, Y. *et al.*, 1997) (Weglarz, T. C. & Sandgren, E. P., 2000).

2.2.2 Ligature de la branche porte

La ligature de la branche portale entraîne une atrophie du lobe ligaturé et une hypertrophie des lobes restants (Lorand, L. *et al.*, 2000). Le pourcentage d'hépatocytes en cycle est cependant moins important qu'après une hépatectomie des deux tiers. En effet, un marquage de la protéine KI67 exprimée au cours des phases G1 à M, montre qu'il y a deux fois plus d'hépatocytes en cycle à 24 et 30 heures après hépatectomie 2/3 qu'après ligature de la branche porte (Lambotte, L. *et al.*, 2000). Cependant le stimulus régénératif entraîné par la ligature de la branche porte est suffisant pour augmenter le rendement de la transplantation d'hépatocytes isolés. Plusieurs études ont montré que l'injection intraportale d'hépatocytes réalisée en association avec une ligature de la branche porte permettait de corriger des déficits métaboliques hépatiques en transplantant un nombre faible de cellules (Ilan, Y. *et al.*, 1997) (Eguchi, S. *et al.*, 1996). Par exemple, Ilan et al. ont montré, que chez des rats Gunn ayant un ictère congénital, une ligature portale partielle 24 heures avant la transplantation de 2 millions d'hépatocytes « sains », permettait d'obtenir une correction de l'ictère comparable à celle observée après injection de 20 millions d'hépatocytes sans ligature portale.

2.2.3 Administration d'agents hépatotoxiques

L'administration de certains agents hépatotoxiques entraîne une régénération hépatique et est utilisée dans de nombreux modèles d'étude.

2.2.3.1 CCl4

Le tétrachlorure de sodium (CCl4) injecté en intrapéritonéal induit une nécrose des hépatocytes centrolobulaires. Il est métabolisé par les cytochromes P450, et entraîne la formation de radicaux libres. L'action des radicaux libres conduit à l'altération des membranes hépatocytaires suite notamment à la peroxydation des lipides des membranes cellulaires. Les dommages s'accompagnent d'une réaction inflammatoire impliquant les cellules de küpffer et les neutrophiles puis une nécrose des hépatocytes centrolobulaires. La compensation s'effectue par les hépatocytes non atteints. Chez le rongeur le pic de d'hépatocytes en prolifération est observé entre 36 and 48 heures après l'injection de CCl4

(Panduro, A. *et al.*, 1986). Le nombre d'hépatocytes transplantés augmente en réponse au signal de régénération par les lésions hépatiques aiguës après traitement au CCl₄ (Yazigi, N. A. *et al.*, 1997) (Gupta, S. *et al.*, 1999). Cependant le CCl₄ est toxique et est surtout connu et utilisé depuis longtemps pour induire des modèles de cirrhoses (Korpassy, B. & Kovacs, K., 1949).

2.2.3.2 Paracétamol

L'intoxication par le paracétamol (ou acétaminophène) entraîne une nécrose des hépatocytes par la formation de radicaux libres et l'activation de cellules de küpffer (Tsuruga, Y. *et al.*, 2008) (Nguyen, T. H. *et al.*, 2005b). En effet, aux doses thérapeutiques, le paracétamol est partiellement conjugué avec le sulfate ou l'acide glucuronique, tandis qu'une partie est métabolisée par le cytochrome P450 en un métabolite actif, la N-acétyl-p-benzoquinoneimine (NAPQI). Aux doses thérapeutiques recommandées, la NAPQI est éliminée par l'organisme grâce à l'action du glutathion, et ne représente aucun danger toxique. Par contre de fortes doses de paracétamol entraînent une saturation du système de conjugaison et par conséquent une nécrose hépatique due à la production de radicaux libres et à l'activation des cellules de küpffer. Ce modèle est utilisé pour créer notamment des insuffisances hépatiques aiguës afin de réaliser des greffes d'hépatocytes (Tsuruga, Y. *et al.*, 2008).

2.3 Mécanismes moléculaires lors de la régénération après une hépatectomie partielle

Les différents modèles de régénération qui viennent d'être cités (liste non exhaustive) présentent des mécanismes moléculaires différents (Tashiro, S., *et al.*, 2009). En effet, contrairement au modèle chirurgical type hépatectomie, les modèles basés sur l'administration d'agents hépatotoxiques sont caractérisés par l'apparition de nécrose et d'inflammation plus ou moins importante ce qui peut entraîner des variations dans les événements moléculaires mis en jeu au cours de la régénération. Enfin chaque modèle possède une cinétique de régénération différente.

L'hépatectomie partielle reste le modèle expérimental le plus utilisé pour étudier les mécanismes moléculaires mis en place lors de la régénération hépatique. C'est en effet un modèle simple à mettre en place et reproductible. Un inconvénient majeur de ce modèle est qu'il ne reflète pas les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la régénération en condition pathologique (Michalopoulos, G. K. *et al.*, 2010).

D'après un modèle proposé par Fausto la régénération hépatique après hépatectomie partielle est un processus multi étape organisé en trois phases distinctes : une phase d'initiation, une phase de progression et une phase d'arrêt de croissance (Fausto, N. *et al.*, 2000) (Figure 9).

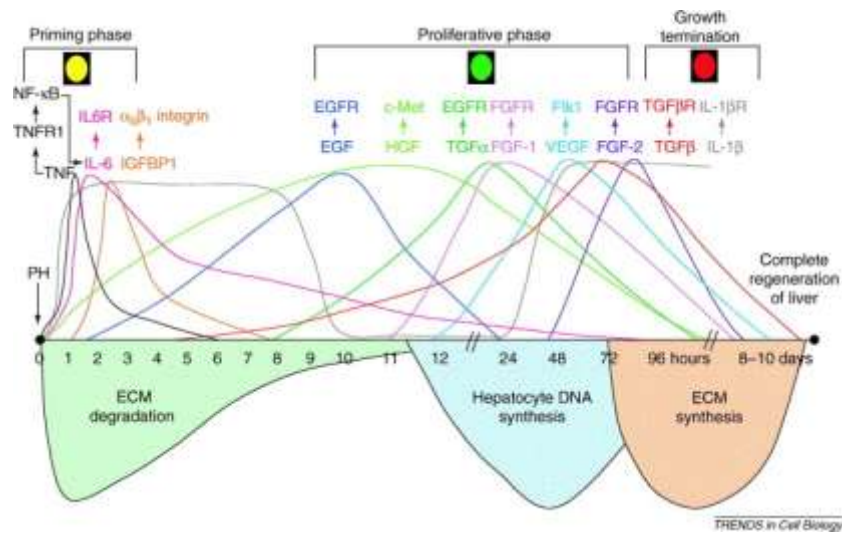


Figure 9. Différentes phases de la regeneration après hépatectomie partielle. (Mohammed, F. F. & Khokha, R., 2005)

2.3.1 Phase d'initiation ou «priming»(Figure 10).

Cette phase d'amorçage correspond à la sortie de quiescence des hépatocytes. Trente minutes après l'hépatectomie partielle des facteurs de transcription tels que NF-κB (Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of Activated B Cells), et STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) sont activés (Cressman, D. E. *et al.*, 1995) (Cressman, D. E. *et al.*, 1994). On observe aussi l'activation des voies ERK (extracellular regulated kinase) et jun sous famille des MAPK (mitogen-activated protein kinase). Ces modifications sont suivies de l'activation de gènes dits précoces. Dans les 4 heures qui

suivent l'hépatectomie, plus d'une centaine de gènes sont surexprimés soit de façon transitoire ou soit tout au long de la régénération (Arai, M. *et al.* 2003). Parmi ces gènes on retrouve des proto-oncogènes (c-fos, c-jun (complexe AP-1), c-myc), des gènes impliqués dans les fonctions métaboliques (PEPCK (Phosphoenolpyruvate carboxykinase), glucose-6 phosphatase), ou dans la prolifération cellulaire comme HGF (Hepatocyte growth factor) ou TGF- α (Transforming growth factor) (Morello, D. *et al.*, 1990).

Deux cytokines, l'interleukine 6 (IL6) et le TNF- α (Tumor necrosis factor), ont un rôle majeur dans la phase d'initiation car ces cytokines activent les facteurs de transcription NF- κ B et STAT-3. Après hépatectomie on observe une augmentation du taux sérique de ces deux cytokines (Akerman, P. *et al.*, 1992). L'inactivation des gènes codant le récepteur 1 du TNF- α entraîne une sévère altération de la synthèse d'ADN après hépatectomie 2/3 et empêche l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et STAT-3 (Yamada, Y. *et al.*, 1997). L'administration d'IL6 aux souris TNFR1^{-/-} permet de corriger le retard dans la régénération hépatique. L'IL6 administrée, active STAT-3 mais pas NF- κ B. Enfin des souris déficientes pour l'IL6 peuvent avoir une régénération hépatique retardée après hépatectomie partielle, et il peut exister chez ces souris un défaut d'activation de STAT-3 (Cressman, D. E. *et al.*, 1996) (Taub, R. *et al.*, 1999).

Ainsi ces différents travaux ont pu mettre en évidence que le TNF- α lié à son récepteur, active la voie NF- κ B dans les cellules de küpffer. Ces dernières produisent alors de l'IL6 qui en se liant au récepteur gp130 entraîne l'activation de STAT-3 dans les hépatocytes. L'IL6 serait responsable de près de 40 % de l'activation des gènes précoces. D'autres membres de la famille de l'IL6 comme l'IL11, le LIF (leukemia inhibitory factor), l'OSM (oncostatine), peuvent activer STAT-3. (Omori, N. *et al.*, 1996).

D'autres mécanismes sont capables de moduler l'action des cytokines IL6 et TNF- α . La voie de signalisation TLR (toll like receptor)/MyD88-dépendante mène à l'activation des facteurs de transcription NF κ B et AP-1 via l'activation de MAP kinases. Les souris déficientes pour MyD88 présentent une altération de la production de TNF- α et d'IL6 après hépatectomie partielle (Seki, E. *et al.*, 2005).

Les protéines du complément pourraient jouer aussi un rôle important lors de l'initiation de la prolifération hépatocytaire. En effet des souris déficientes en protéines du complément C3 et C5 présentent après hépatectomie partielle un défaut de production d'IL6, et de TNF- α (Strey, C. W. *et al.*, 2003) (Mastellos, D. *et al.*, 2001).

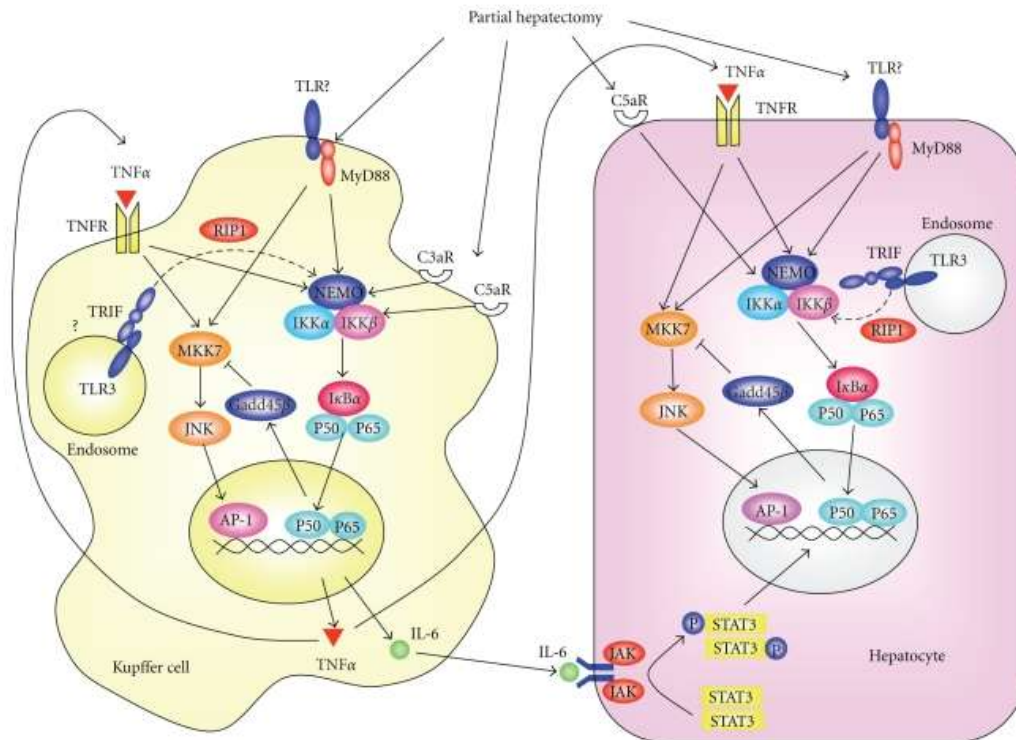


Figure 10. Phase d'initiation. (Iimuro, Y. & Fujimoto, J., 2010)

2.3.2 Phase de progression.

La phase d'initiation (transition G₀-G₁) est donc largement conduite par les cytokines. La progression vers la phase S requiert quant à elle des facteurs de croissance. Les hépatocytes en phase G₁ deviennent sensibles à des facteurs mitogéniques, tels EGF (Epidermal Growth Factor), HGF, ou TGF- α . Ces facteurs de croissance en se liant à leur récepteur à activité tyrosine kinase, vont provoquer une cascade de nombreux signaux

intracellulaires entraînant l'activation de nombreux gènes essentiels notamment pour la progression du cycle cellulaire (comme la cycline D1 ou les cdk, (Cyclin-dependent kinase). Les complexes cdk4/cyclineD et cdk6/cycline E, phosphorylent et inactivent la protéine Rb ("Rétinoblastoma protein"), ce qui a pour effet de libérer les facteurs de transcription E2F qui contrôlent l'expression de gènes nécessaires pour la transition G1/S et pour la progression en S.

2.3.2.1 *Hepatocyte growth factor*

L'HGF dont la principale source dans le foie est la cellule étoilée, est un puissant mitogène à la fois pour les cellules hépatocytaires et biliaires sur lesquelles il agit par l'intermédiaire de son récepteur c-met. L'HGF est synthétisé sous forme d'un précurseur, le pro HGF. L'HGF nécessite un clivage protéolytique pour être activé, ainsi le pro HGF libéré est ensuite clivé sous une forme active par différentes protéases. De nombreuses sérines protéases peuvent cliver l'HGF en une forme active, c'est le cas par exemple de l'HGFA, mais aussi de l'urokinase- type plasminogen activator (upa) activées lors des remodelages de la matrice extracellulaire (Miyazawa, K. *et al.*, 2010) (Naldini, L. *et al.*, 1992).

L'HGF via le récepteur c-met, exprimé sur la plupart des cellules épithéliales et endothéliales, joue un rôle important lors des différentes phases du cycle cellulaire hépatocytaire. HGF est capable d'activer les hépatocytes lors de la phase d'initiation, (Weir, E. *et al.*, 1994). De plus des études ont montré l'importance de l'HGF via son récepteur pour l'entrée en phase G1/S. L'inactivation de c-met, par mutation, ou utilisation d'ARN interférents diminue la phosphorylation de ERK $\frac{1}{2}$ et réprime l'activation de la voie P13-kinase ce qui perturbe la sortie de quiescence des hépatocytes, ainsi que l'entrée en phase S (Borowiak, M. *et al.*, 2004) (Paranjpe, S. *et al.*, 2007). Enfin récemment, il a été montré que l'absence de c-met, retarde la progression dans le cycle cellulaire de la phase G2 à M: en effet l'absence de ERK $\frac{1}{2}$ serait associé à une réduction de la phosphorylation des histones H3 essentiel pour la condensation des chromosomes (Factor, V. M. *et al.*, 2010).

2.3.2.2. Récepteur EGFR (Figure 11).

L'activation du récepteur à l'EGF, l'EGFR, permet de faire progresser les hépatocytes en G1/S. Des souris transgéniques déficientes en EGFR présentent une altération de la régénération hépatique, une mortalité importante après hépatectomie, et une difficulté dans la progression de G1 à S. (Natarajan, A. *et al.*, 2007). Récemment il a été montré qu'en inhibant l'expression d'EGFR avec des ARN interférents, la régénération hépatique était ralentie (Paranjpe, S. *et al.* 2010).

Parmi les différents ligands de l'EGFR, 4 sont connus pour stimuler la prolifération hépatocytaires : **EGF**, **TGF- α** , l'**amphiréguline** (AR), et l'**HB-GF** (heparin binding EGF-like growth factor). Les ligands sont sous forme de précurseurs ancrés à la membrane et nécessitent un clivage par des métalloprotéases pour être actifs (Argast, G. M. *et al.*, 2004) (Lee, D. C. *et al.*, 2003). L'**EGF**, produit essentiellement par le duodénum et les glandes salivaires, agit de façon endocrine sur les hépatocytes. Des études ont montré qu'après ablation des glandes salivaires, la régénération hépatique était fortement diminuée (Lambotte, L. *et al.*, 1997). L'EGF interviendrait en fin de phase d'initiation. Le **TGF- α** , produit par les hépatocytes, interviendrait plus tardivement mais aurait un faible rôle lors de la régénération hépatique. En effet, des souris déficientes pour le **TGF- α** présentent une faible altération de la régénération après hépatectomie (Hayashi, H. *et al.*, 2005) (Fujita, J. *et al.*, 2001). L'**amphiréguline**, interviendrait plutôt lors de la phase d'initiation (Berasain, C. *et al.*, 2005).

Les différents ligands à l'EGFR, présentent des fonctions indépendantes lors de la régénération hépatique puisqu'ils activent différentes voies d'activation intracellulaire. Les différentes voies activées dépendent à la fois du ligand et du dimère de récepteur impliqué. En effet, il existe 4 récepteurs monomériques qui se dimérisent ensuite avec un récepteur identique ou différent, ce qui entraîne de nombreuses combinaisons (Figure 11).

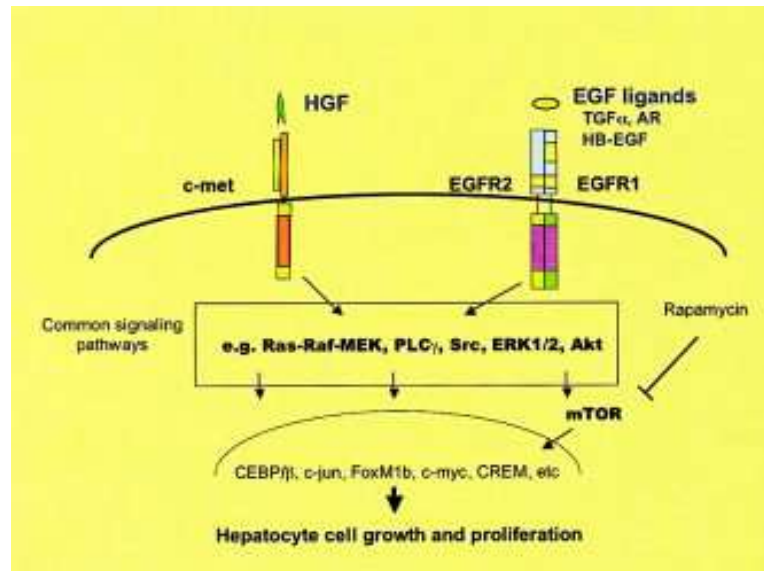


Figure11. Récepteur EGFR

2.3.2.3 Angiogenèse et régénération hépatique

La régénération hépatique implique l'existence d'un processus d'angiogenèse. Celle-ci permet d'assurer le maintien d'une vascularisation correcte des hépatocytes et de reconstituer les interactions structurales et fonctionnelles normales entre vaisseaux et cellules parenchymateuses. Or il existe un couplage entre angiogenèse et régénération. En effet, des études montrent que l'utilisation d'agents anti-angiogéniques comme par exemple l'angiostatine, inhibe la régénération hépatique. D'autres données montrent que les cellules endothéliales jouent un rôle essentiel lors de la régénération hépatique (Drixler, T. A. *et al.*, 2002) (Greene, A. K. *et al.*, 2003). Le **VEGF** (Vascular Endothelial Cell Growth Factor), et différents régulateurs de l'angiogenèse comme le **FGF** (Fibroblast growth factors), semblent jouer un rôle important lors de la régénération hépatique.

Le **VEGF** est considéré comme le régulateur essentiel des processus angiogéniques. Les récepteurs spécifiques du VEGF sont au nombre de 2 : VEGF-R1 et VEGF-R2. Le VEGF est capable de stimuler, via son récepteur VEGF-R1, la libération d'HGF par les cellules endothéliales sinusoïdales (Le Couter, J. *et al.*, 2003). Des études ont montré qu'en bloquant le VEGF avec des anticorps neutralisant, il existait une diminution de la prolifération hépatocytaire après hépatectomie chez le rat (Bockhorn, M. *et al.*, 2007b) (Van Buren, G., 2nd *et al.*, 2008). Enfin, très récemment, une équipe a démontré que le

VEGF en libérant des facteurs pro angiogéniques, comme le HGF ou WNT2 pourrait aussi jouer un rôle clé lors de la phase d'initiation (Ding, B. S. *et al.* 2010). De la même façon, un autre facteur angiogénique PlGF (Placental growth factor) ayant pour récepteur VEGF-R1, pourrait lui aussi intervenir lors de la phase d'initiation (Vanheule, E. *et al.* 2011).

Ces études montrent donc que l'angiogénèse participe à la régénération hépatique lors de la phase de croissance mais aussi lors de la phase de «priming». D'autres médiateurs possédant des effets angiogéniques proches de ceux du VEGF, comme le FGF-2 (fibroblast growth factor) pourraient participer à la régénération. Des études montrent qu'en inactivant FGFR, récepteur à FGF, la régénération hépatique est diminuée après hépatectomie, avec un blocage en phase G1 tardive. (Steiling, H. *et al.*, 2003).

Certains agents connus pour être mitogènes pourraient avoir un rôle lors de la régénération hépatique via le processus angiogénique. C'est le cas de l'hormone Tri-iodothyronine (T3), connue pour être un mitogène hépatique, mais dont le mécanisme d'action reste indéterminé (Francavilla, A. *et al.*, 1994a) (Pibiri, M. *et al.*, 2001). Il pourrait exercer son action en stimulant l'expression de VEGF (Bockhorn, M. *et al.*, 2007a).

2.3.3 Terminaison

Lorsque la masse et la fonction hépatique sont restaurées, le mécanisme de régénération s'arrête. Ce qui est assez extraordinaire, c'est que le foie est capable d'adapter sa masse à son nouvel environnement. Ainsi, par exemple des études ont montré que la transplantation de foie d'un donneur de petite taille chez un receveur de plus grande taille est suivie par une prolifération des hépatocytes jusqu'à ce que le foie retrouve une masse identique à la masse d'origine du foie du receveur. Ceci a été démontré chez le rat, le chien, mais aussi chez l'homme, (Francavilla, A. *et al.*, 1994b) (Kam, I. *et al.*, 1987) (Van Thiel, D. H. *et al.*, 1987).

Des facteurs sont connus pour assurer l'arrêt de la prolifération hépatocytaire. Il s'agit du TGF- β et de l'activin.

Dans le foie, le **TGF- β** est produit par les cellules étoilées et exerce un effet anti prolifératif sur les hépatocytes. Cette cytokine est activée par des protéases (notamment des

métalloprotéases), puis se lie à ses récepteurs (TGF- β R de type I et II) afin d'activer les voies Smads qui permettent notamment la transcription de gènes inhibiteurs de kinases (Moustakas, A. & Heldin, C. H., 2009) (Figure 12). Des souris transgénique déficientes en un récepteur TGF- β R de type 2 présentent après hépatectomie une masse hépatique plus importante que chez les souris sauvages (Romero-Gallo, J. *et al.*, 2005) (Oe, S. *et al.*, 2004).

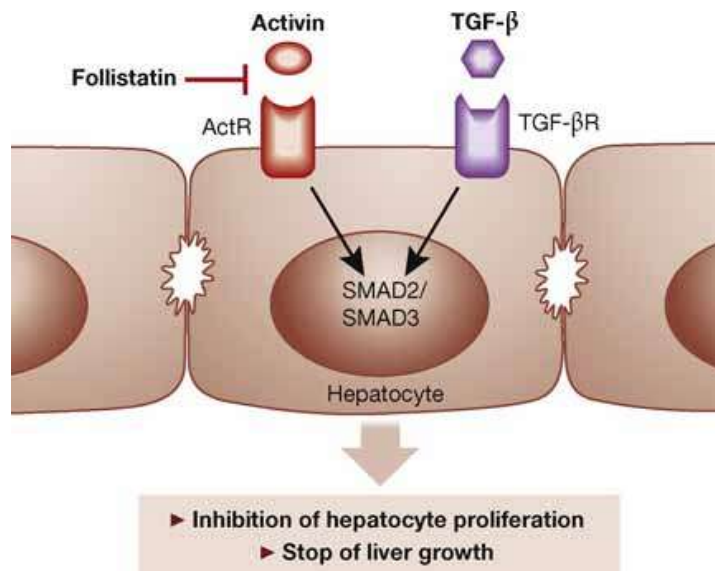


Figure 12. Phase de terminaison. (Bohm, F. *et al.* 2010).

L'**activin A**, membre de la super famille des TGF- β active les voies SMAD cependant l'activin possède son propre récepteur (ActR). Le rôle de l'**activin A** dans le processus de l'arrêt de la prolifération a été démontré in vivo. Un antagoniste de l'activin, la follistatine, a été administré chez des rats après hépatectomie. Cinq jours après l'hépatectomie, les rats traités avaient une prolifération hépatocytaire accélérée et une masse hépatique plus importante que les rats contrôles (Kogure, K. *et al.*, 1995).

D'autres facteurs seraient aussi impliqués dans le processus de terminaison c'est par exemple le cas de l'**IL1** secrétée par les cellules de küpffer ou les cellules étoilées. L'administration d'IL1 diminue la prolifération hépatocytaire après hépatectomie, (Boulton, R. *et al.*, 1997). Au contraire l'administration de l'antagoniste IL1Ra permet d'améliorer la prolifération hépatocytaire après des lésions hépatiques créées par le CCl4 (Zhu, R. Z. *et al.* 2010). Les mécanismes d'action de l'IL1 sont encore mal compris (Cosgrove, B. D. *et al.*, 2008)

La régénération hépatique après hépatectomie est donc un processus multi-étape, complexe, qui fait intervenir un grand nombre de facteurs de croissance et de cytokines. Ces différents facteurs peuvent intervenir à différentes étapes du processus de régénération. De plus, ces facteurs déclenchent des cascades d'évènements intracellulaires qui n'agissent pas de façon indépendantes les unes avec les autres. Ainsi la perte d'un seul signal n'empêche jamais la régénération complète du foie. L'hépatectomie partielle est le modèle le plus simple pour étudier les mécanismes de régénération hépatique, mais ne reflète pas les mécanismes moléculaires de la régénération en condition pathologique.

2.3.4. Autres acteurs impliqués lors de la régénération

2.3.4.1 Les micro-RNA et la régénération hépatique

Au cours de ces dernières années, des scientifiques ont découvert l'implication des microARN dans des cascades de régulation génétique contrôlant le développement, la prolifération cellulaire ou l'apoptose. Les miRNA sont exprimés à partir de gènes transcrits par l'ARN polymérase II, et le produit qui en résulte, appelé pri-miRNA, est clivé dans le noyau par l'enzyme Drosha associée à son cofacteur DGCR8 (Di George syndrome Critical Region gene 8), une RNase de type III, pour produire un précurseur appelé pré-miRNA. Le pré-miRNA est une petite molécule double brin d'environ 70 nucléotides repliée en tige-boucle imparfaite par complémentarité de bases entre la première moitié et la deuxième

moitié de sa séquence. Ces pré-miRNA sont ensuite exportés par l'exportin 5 dans le cytoplasme, où ils sont clivés par Dicer, une RNase de type III cytoplasmique, qui permet l'hydrolyse de la structure boucle et donne alors un petit ARN double-brin appelé « miRNA ». Ce duplexe interagit notamment avec des protéines de la famille Argonaute (Ago) pour former le complexe RISC (RNA-induced silencing complex). Au cours de la formation du RISC il y a passage d'un miRNA db à un miRNA sb. Seul le brin spécifique de l'ARN messager cible du miRNA est gardé. Le complexe ainsi créé peut induire deux voies de "Silencing" : la dégradation de l'ARNm cible (dans le cas d'une complémentarité parfaite), ou la répression de la traduction (dans le cas d'une complémentarité imparfaite) du ou des ARN ciblés (Figure 13).

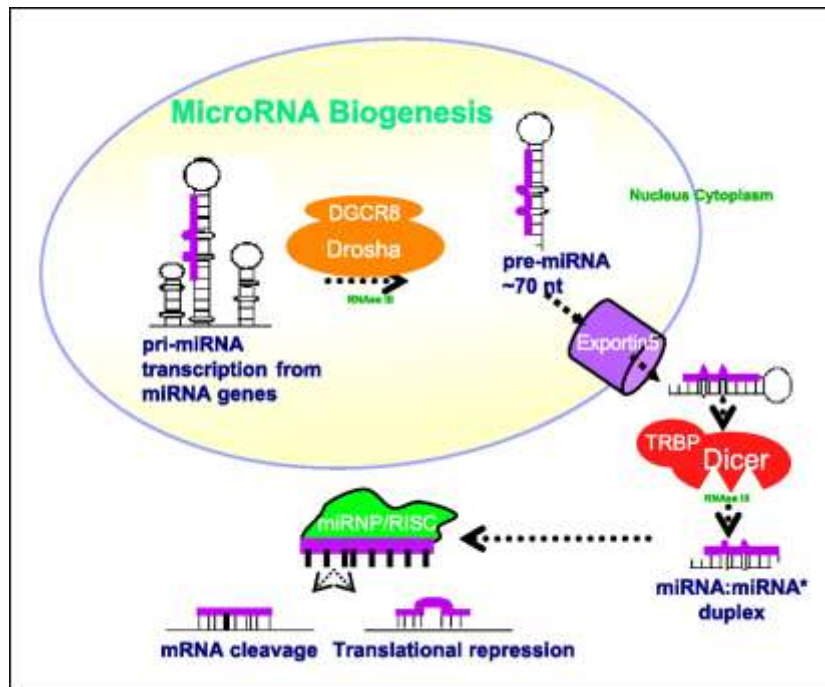


Figure 13. Biogénèse des miRNA. (Lowery, A. J. *et al.*, 2008).

De nombreuses études montrent l'implication des miRNA dans le développement des tumeurs hépatiques ou lors de phénomènes de fibrose. Le lien entre les miRNA et la régénération hépatique en condition normale, n'est pour l'instant pas très étudié. Cependant quelques études récentes montrent que les miRNA jouent sans doute un rôle dans le processus de régénération en condition normale. Chez des souris transgéniques Dicer^{-/-}, une étude a montré que la prolifération hépatocytaire était perturbée, et qu'il existait notamment une régénération plus importante que chez les souris sauvages (Hand, N. J. *et al.*, 2009). Une autre étude a montré que des souris DGCR8^{-/-} présentaient une régénération hépatique diminuée avec un retard dans la progression en phase G1/S. Ces travaux ont permis d'identifier deux miRNA impliqués dans la régénération l'un surexprimé, le miR-21, et l'autre inhibé le miR-378 (Song, G. *et al.* 2010). Finalement d'autres études ont mis en évidence le rôle du miR-21 dans la régulation de la prolifération hépatocytaire après hépatectomie 2/3. Une de ces études a montré que le pic de surexpression de miR-21 a lieu pendant la phase de progression (12 à 24 heures) et que miR-21 pourrait avoir un rôle de régulateur de la voie NF-κB (Marquez, R. T. *et al.* 2010) (Castro, R. E. *et al.* 2010.). Les miRNA sont donc impliqués dans le processus de régénération mais pour l'instant leur rôle exact n'a pas été clairement mis en évidence.

2.3.4.2 Neurotransmetteurs, xénobiotiques

Il existe de nombreux acteurs de la régénération hépatique tels que les hormones thyroïdiennes comme la T3 (Columbano, A. *et al.*, 2008) (Kariv, R. *et al.*, 2003), les œstrogènes (Biondo-Simoes Mde, L. *et al.*, 2009), mais aussi des neurotransmetteurs comme la sérotonine (Lesurtel, M. *et al.*, 2006). Certains facteurs impliqués dans la régénération hépatique, n'impliquent pas les voies de signalisation retrouvées au cours de la régénération hépatique « classique » tels TNF-α, IL6, STAT-3... C'est le cas des barbituriques, comme le phenobarbital, agissant sur le récepteur CAR (Constitutive Androstane Receptor) exprimé essentiellement dans le foie (Constitutive Androstane Receptor) (Ledda-Columbano, G. M. *et al.*, 1998) (Argyris, T. S. & Miller, A., 1976).

2.3.4.3 Acides biliaires

L'accumulation d'acides biliaires dans les hépatocytes (cholestase hépatique) est associée à la prolifération des hépatocytes. A l'inverse, lorsque la synthèse des acides biliaires est bloquée la régénération hépatique est diminuée. En effet une équipe a obstrué les voies biliaires de rats 5 à 14 jours avant une hépatectomie partielle et a observé chez ces rats une régénération hépatique fortement diminuée par rapport aux rats ayant subis simplement une hépatectomie (Kimura, F. *et al.*, 1997).

Le FXR (Farnesoid X Receptor) récepteur de la superfamille des récepteurs nucléaires exprimé principalement au niveau du foie, est activé par ses ligands endogènes, notamment les acides biliaires. L'activation de FXR diminue la lipogenèse au niveau du foie, augmente la sensibilité à l'insuline et protège l'hépatocyte contre l'action cytotoxique des acides biliaires. FXR aurait aussi un rôle protecteur vis-à-vis du développement des tumeurs. En effet, deux études montrent que des souris FXR^{-/-} développent spontanément des carcinomes hépatocellulaires (Kim, I. *et al.*, 2007) (Yang, F. *et al.*, 2007). En 2006 une équipe a observé que FXR intervient dans le contrôle de la régénération (Huang, W. *et al.*, 2006). En effet, Huang et al. ont observé qu'après une hépatectomie des deux tiers, des rongeurs traités à l'acide cholique présentent une régénération hépatique plus rapide que chez les contrôles et qu'au contraire, des souris FXR^{-/-} traitées ou non à l'acide cholique présentent une prolifération diminuée après hépatectomie. Il a été aussi démontré que FXR régule l'expression de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire tels que FoxM1B (Forkhead box M1B). Plus récemment cette même équipe a montré qu'après traitement au CCl₄, la régénération chez les souris FXR^{-/-} était largement diminuée (Figure 14) (Meng, Z. *et al.* 2010). Chez ces souris FXR^{-/-} traitées au CCl₄, STAT3 est fortement diminué.

Ainsi, l'ensemble de ces travaux montrent que les acides biliaires sont des facteurs essentiels intervenant très tôt dans le processus de régénération hépatique. Cependant les mécanismes moléculaires permettant aux acides biliaires d'initier les hépatocytes ne sont pas encore bien identifiés.

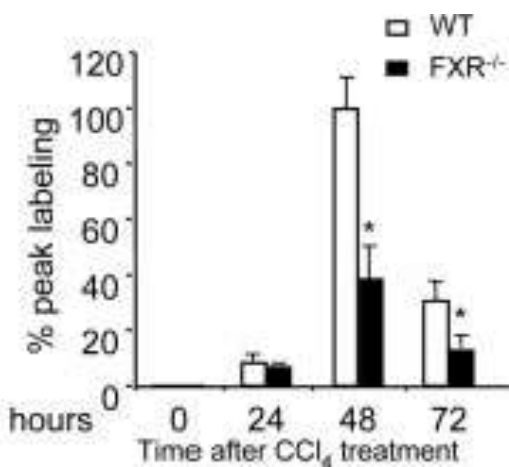


Figure 14. Prolifération hépatocytaire (marquage au BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine)) chez des souris sauvages ou FXR^{-/-} traités au CCL4. (Meng, Z. *et al.* 2010).

3 Cellules souches hépatiques

Les hépatocytes présentent donc une importante capacité de prolifération. Après une hépatectomie partielle, la prolifération des hépatocytes est suffisante pour restaurer la masse hépatique du foie. La capacité d'autorenouvellement de l'hépatocyte est telle, que cette cellule pourrait pratiquement être considérée comme une cellule souche monopotente.

Cependant, des cellules souches intrahépatique ou extrahépatique ont été décrites comme capables de se différencier en hépatocytes

3.1 Cellules souches embryonnaires/foetales

De nombreuses études ont permis de montrer que les cellules souches embryonnaires et fœtales sont capables in vitro de se différencier en hépatocytes et de repeupler un foie in vivo (Li, F. *et al.* 2010) (Rogler, L. E., 1997). Cependant, l'interdiction législative et les nombreux débats éthiques sur les cellules souches embryonnaires ont poussé les chercheurs à produire des cellules souches pluripotentes induites qui sont issues de la reprogrammation de cellules somatiques adultes en cellules pluripotentes par la surexpression de certains facteurs de transcription comme Oct4, Sox2, Klf4, cmyc. Ainsi ces dernières années, des études ont démontré la possibilité de produire des cellules hépatiques à partir d'IPS (induced pluripotent stem cell) (Aoi, T. *et al.*, 2008) (Si-Tayeb, K. *et al.* 2010).

3.2 Cellules souches adultes

L'existence de différentes cellules souches adultes extra ou intrahépatiques capables de se différencier en hépatocytes reste aujourd'hui une question largement controversée.

3.2.1 Cellules souches adultes extrahépatiques :

3.2.1.1 Cellules souches médullaires

Il y a une dizaine d'année, de nombreux travaux ont montré que les cellules souches issues de la moelle osseuse pouvaient participer à la régénération de plusieurs tissus par transdifférenciation en différents types cellulaires comme les cellules cardiaques, ou nerveuses (Ferrari, G. *et al.*, 1998) (Azizi, S. A. *et al.*, 1998). De la même façon, la transdifférenciation des cellules de la moelle osseuse en hépatocytes a été aussi décrite.

2000-2002 : mis en évidence de la transdifférenciation médullaire

L'équipe de Theise a été l'une des premières équipes à étudier ce phénomène (Theise, N. D. *et al.*, 2000a). Lors d'une première expérience, des souris femelles ont subi une greffe de moelle osseuse de donneurs mâles. Les cellules greffées étaient soit des cellules de moelle totale ou soit des cellules souches hématopoïétiques ($CD34^+ Lin^-$). Des souris ont été sacrifiées plusieurs jours ou mois après la greffe. Au sacrifice, la détection du chromosome Y et de l'ARMm de l'albumine a été réalisée par hybridation in situ sur les coupes de foie. Des hépatocytes $Y^+/albumine^+$ ont été détectés chez toutes les femelles greffées. Chez une souris sacrifiée à 7 jours, il a été détecté jusqu'à 2.2% d'hépatocytes Y^+ . Theise et al. ont alors proposé que la population $CD34^+ lin^-$ était capable de se transdifférencier en hépatocytes. Cette même équipe a démontré le même phénomène chez l'homme. En effet, 4% à 38%, d'hépatocytes et cholangiocytes Y^+ ont été détectés par hybridation in situ sur des coupes de foie de femmes ayant subi des greffes de cellules médullaires de donneurs masculins (Theise, N. D. *et al.*, 2000b).

La transdifférenciation des cellules souches hématopoïétiques en hépatocytes a aussi été rapportée chez la souris tyrosinémique $FAH^{-/-}$ (Lagasse, E. et al., 2000). La FAH est l'enzyme terminale du métabolisme de la tyrosine. Son déficit conduit à l'accumulation intracellulaire de fumarylacétoacétate et de son précurseur, le maleylacétoacétate. En l'absence de traitement par le NTBC qui permet de contourner le blocage métabolique, l'accumulation de ces métabolites conduit à une cytolysé hépatique mortelle. Dans ce

modèle, les hépatocytes normaux ont un avantage sélectif sur les hépatocytes porteurs de la mutation constitutionnelle. Des souris FAH^{-/-} ont été irradiées puis greffées avec des cellules de la moelle osseuse de souris transgénique ROSA26 exprimant la β -galactosidase. 15 jours après la transplantation, le traitement par le NTBC a été arrêté. Sans traitement, les souris greffées n'ont pas développé de cytolysé hépatique mortelle. Les animaux ont été sacrifiés 7 mois après la transplantation, et la β -galactosidase a été détectée dans le foie de toutes les souris greffées. Des nodules distincts exprimant la β -galactosidase représentaient de 30 à 50% des hépatocytes. Ainsi, Lagasse et al. ont montré la possibilité de corriger une maladie hépatique par greffe de cellules médullaires capables de repeupler le foie. De plus, dans cet article, Lagasse et al. ont montré que les cellules souches hématopoïétiques triées c-kit^{high}Thy^{low}Lin⁻Sca-1⁺⁺ étaient capables de se transdifférencier en hépatocytes.

Contrairement aux études de Theise et al., des travaux ont démontré que sans avantage sélectif l'événement de différenciation cellules médullaires-hépatocytes est extrêmement rare (Wagers, A. J. *et al.*, 2002) (Mallet, V. O. *et al.*, 2002). En effet, Wager et al. ont greffé des souris préalablement irradiées avec de la moelle osseuse de souris transgéniques exprimant la GFP. Au sacrifice deux mois après la greffe, seulement 1 hépatocyte sur 70000 a été retrouvé positif pour la GFP et l'albumine (Wagers, A. J. *et al.*, 2002).

Dans une autre étude, Mallet et al. ont utilisé une stratégie d'avantage sélectif grâce au souris transgéniques exprimant Bcl2. Lorsque le gène Bcl-2 humain est exprimé constitutionnellement dans le foie de souris transgéniques, ces dernières sont protégées de l'apoptose induite par l'anticorps agoniste de la voie Fas, l'anticorps Jo2. Ainsi, Des hépatocytes isolés exprimant le gène Bcl-2, transplantés dans un foie normal ont alors un avantage sélectif lorsqu'une pression de sélection est induite par l'injection de l'agent apoptotique Jo2. Mallet et al. ont transplanté des souris avec des cellules médullaires de souris transgéniques exprimant Bcl-2 sous le contrôle d'un promoteur foie spécifique. Les souris receveuses ont ensuite été soumises ou non à des injections hebdomadaires de l'anticorps anti-Fas, Jo2. Au sacrifice, chez les souris greffées et traitées avec Jo2, des clones d'hépatocytes exprimaient Bcl2. Au contraire, chez les souris greffées mais non traitées, aucun hépatocyte exprimant Bcl2 n'a pu être retrouvé. Ainsi cette étude a montré

que sans avantage sélectif, la population d'hépatocytes dérivés des cellules de la moelle osseuse est indétectable. Mallet et al. propose que la transdifférenciation des cellules médullaires en hépatocytes est un phénomène extrêmement rare.

2003 : mis en évidence du phénomène de fusion

A partir de 2003, de nouvelles données ont remis en cause le phénomène de transdifférenciation décrit dans les études précédentes. En effet, chez le rongeur, des événements de fusion entre des cellules issues de la moelle donneuse et les hépatocytes résidents ont été mis en évidence (Wang, X. *et al.*, 2003b) (Vassilopoulos, G. *et al.*, 2003) (Alvarez-Dolado, M. *et al.*, 2003). Une de ces démonstrations expérimentales était fondée sur l'utilisation du système de recombinaison Cre-lox (Alvarez-Dolado, M. *et al.*, 2003): in vivo, les cellules de la moelle osseuse de souris transgéniques pour Cre et GFP sous le promoteur β -actine ont été transplantées chez des souris Rosa26R, dans lequel le gène lacZ n'est exprimé qu'après excision d'une cassette « stop » flanquée des sites LoxP. L'excision ne peut se produire que s'il y a fusion avec une cellule exprimant Cre. Ainsi, dans ce système une cellule de la moelle osseuse transdifférenciée en hépatocyte, n'exprimera que la GFP et des marqueurs d'hépatocytes. Par contre, une cellule qui exprime la β -galactosidase, est le fruit d'une fusion entre un hépatocyte et une cellule d'origine médullaire (Figure15).

Deux mois après la greffe, les souris ont été sacrifiées, et des hépatocytes exprimant la β -galactosidase ont été détectés. Au contraire aucun hépatocyte GFP positif n'a été détecté. Ainsi les travaux d'Alvarez-Dolado ont montré que la fusion cellulaire est la principale source d'hépatocytes dérivés des cellules de moelle.

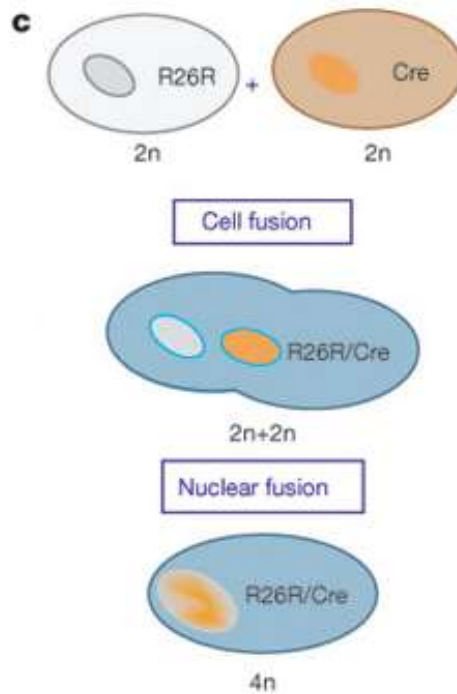


Figure 15 Système Cre lox pour détecter les phénomènes de fusion cellulaire. (Alvarez-Dolado, M. *et al.*, 2003)

La même année, deux autres études ont mis en évidence le phénomène de fusion cellulaire mais cette fois par des analyses des proportions des génomes du donneur dans des animaux $FAH^{-/-}$ transplantés avec des cellules de la moelle osseuse de souris sauvages (Wang, X. *et al.*, 2003b) (Vassilopoulos, G. *et al.*, 2003). Dans une des expériences de l'équipe de Wang, des souris $FAH^{-/-}$ mâles ont été irradiées puis greffées avec des cellules de moelle de souris femelles transgéniques ROSA26 exprimant la β -galactosidase. Chez des souris $FAH^{-/-}$ non greffées l'analyse cytogénétique des hépatocytes montre que la plupart des cellules sont diploïdes (40,XY), ou tétraploïdes (80,XXYY). Au contraire, chez les souris greffées chez lesquelles on retrouve des hépatocytes dérivés des cellules médullaires, une proportion importante de cellules est 80,XXXYY ou 120,XXXXYY. Ces cellules ne peuvent donc qu'être le fruit d'une fusion entre une cellule médullaire de la souris femelle donneuse et un hépatocyte diploïde ou tétraploïde du receveur mâle $FAH^{-/-}$.

Pour identifier le type cellulaire de la moelle osseuse qui a la capacité de fusionner avec les hépatocytes, Carmago et al. ont utilisé une souris double transgénique LysM-Cre/R26R, dans laquelle seule la lignée myélocytaire exprime la β -galactosidase. Des cellules de moelle osseuse de ces souris ont été greffées chez des souris FAH^{-/-}. Quelques mois après la greffe 279 ± 38 clones β -gal⁺ ont été comptabilisés. Le même nombre de clones (247 ± 45) a été retrouvé chez des souris FAH^{-/-} greffées avec des cellules médullaires de souris ROSA 26 (Camargo, F. D. *et al.*, 2004). Ainsi cette étude a montré que les cellules myélomonocytaires sont les principales cellules responsables des événements de fusion cellulaire avec les hépatocytes. Ce résultat a été confirmé par d'autres équipes (Willenbring, H. *et al.*, 2004).

2004 à nos jours : transdifférenciation ou fusion ?

En 2004, Jang et al. ont mis en évidence la plasticité des cellules de la moelle et le phénomène de transdifférenciation en hépatocyte en écartant tout phénomène de fusion cellulaire (Jang, Y. Y. *et al.*, 2004). Dans la première partie de son étude cette équipe a utilisé un modèle de coculture hépatocytes/cellules souches de la moelle osseuse séparés par une membrane ne laissant passer que les composés biochimiques. Au bout de deux jours de coculture, 3% des cellules médullaires exprimaient des marqueurs hépatocytaires (albumine, CK8.). Dans la seconde partie de son étude, des cellules de moelle osseuse de souris mâles, ont été injectées chez des femelles irradiées et ayant subi au préalable une lésion hépatique par injection de CCl₄. Au sacrifice, 7.6% des hépatocytes possédaient le chromosome Y. Une étude du caryotype a écarté le phénomène de fusion cellulaire puisque les cellules étaient soit XY ou XYXY.

Plus récemment, Yadav, et al. ont aussi montré *in vivo* la transdifférenciation des cellules médullaires en hépatocytes et l'absence de fusion cellulaire. Des souris souffrant d'hémophilie A ont subi une greffe de moelle de souris transgéniques GFP⁺ couplée à une lésion hépatique par l'acétaminophène. 12 mois après la greffe, environ 10% des hépatocytes exprimaient la GFP, et donc provenait des cellules de la moelle du donneur. La fraction cellulaire contenant à la fois une paire de chromosomes XX et une paire de chromosomes

XY était de l'ordre de 0.2%. Ainsi, le phénomène de fusion était négligeable. Les cellules de moelle osseuse transdifférenciées en hépatocytes étaient fonctionnelles puisqu'ils ont permis de rétablir 20% de l'activité du facteur VIII d'une souris normale (Yadav, N. *et al.*, 2009).

Ainsi, d'après ces études après une simple greffe de cellules médullaires le phénomène de transdifférenciation est un événement rare voir absent et l'on observe plutôt des événements de fusion cellulaire. Cependant, les études les plus récentes montrent qu'après une lésion hépatique (CCl4 ou acétaminophène), les cellules de la moelle osseuse, douées d'une grande plasticité, peuvent contribuer à la régénération hépatique en se transdifférenciant en hépatocytes.

3.2.1.2 cellules souches du tissu adipeux

D'autres cellules sont capables de se différencier *in vivo* et *in vitro* en hépatocytes et de contribuer au repeuplement du foie. Il s'agit des cellules stromales localisées dans le tissu adipeux (les ATSCs pour adipose tissue stromal cells). (Seo, M. J. *et al.*, 2005) (Li, H. *et al.* 2011). Récemment Li et al. ont montré qu'une approche de thérapie cellulaire et génique était possible avec ces cellules. En effet des cellules ATSCs de souris ont été transduites par de l'AAV hAAT (human alpha 1-antitrypsin), puis ont été greffées chez des souris receveuses. Afin de donner un avantage sélectif aux cellules greffées, juste avant la transplantation les souris receveuses ont été hépatectomisées et traitées au préalable avec de la monocrotaline (molécule capable de bloquer la prolifération des hépatocytes résidents). Ces cellules ont été capables de repeupler le foie et d'exprimer l' α -anti trypsine à long terme (Li, H. *et al.* 2011.).

3.2.2 Cellules souches intrahépatiques

En condition normale

Depuis longtemps il était admis qu'en condition non pathologique, le renouvellement hépatocytaire s'effectuait à partir des hépatocytes eux même sans l'intervention de cellules progénitrices. Or, très récemment des études ont démontré l'implication de cellules souches hépatiques dans différents modèles de régénération ainsi que lors de la croissance physiologique (De Alwis, N. *et al.*, 2009) (Furuyama, K. *et al.* 2011). Ces cellules n'interviendraient pas lors de la régénération après hépatectomie partielle. Ces cellules souches Sox9⁺ seraient capables de se différenciées en cellules intestinales, pancréatiques et hépatiques. Ces observations corroborent avec les données de l'embryogenèse, et démontre l'étroite parenté existant entre les précurseurs embryonnaires du foie, du pancréas et de certains segments de l'intestin antérieur. Dans le foie ces cellules seraient localisées au niveau des canaux de Héring entre le parenchyme hépatique et les cellules des canaux biliaires (Figure 16).

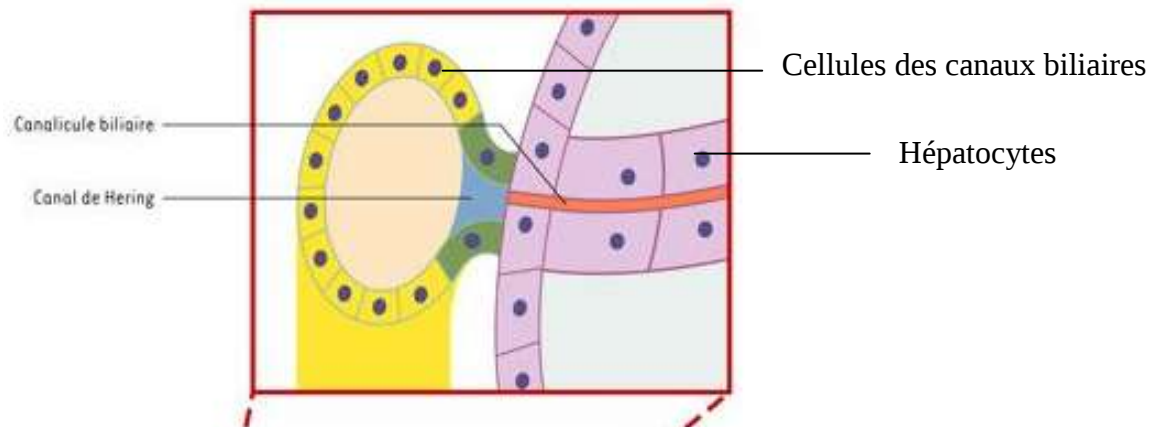


Figure 16. Le canal de Héring.

-En condition pathologique

L'utilisation de drogues inhibant la prolifération hépatocytaire suivie d'une stimulation de régénération hépatique a permis de révéler l'existence de nouvelles populations cellulaires : l'administration du 2-acétylamino-fluorène (2-AAF) suivie d'une hépatectomie partielle conduit à la prolifération hépatique de cellules dites progénitrices les cellules ovales, alors qu'un autre type cellulaire les SHPCs (Small Hepatocyte-Like Progenitor Cells) est observé lors d'un traitement par la rétrovirusine.

3.2.2.1 *Les cellules ovales*

Les premières observations des cellules ovales dans le foie datent du milieu du vingtième siècle. Ces cellules sont plus petites que les hépatocytes (10µm de diamètre), et présentent un noyau de forme ovoïde. Elles constituent une population polymorphe et ont un ratio nucléo-cytoplasmique très élevé. Leur cytoplasme contient peu d'organelles : quelques mitochondries et un réticulum endoplasmique assez peu développé.

A l'heure actuelle, aucun marqueur spécifique de la population des cellules ovales n'a été mis en évidence. Cependant, de nombreuses études ont tenté de caractériser ces cellules et ont montré qu'elles expriment des marqueurs communs exprimés aussi par :

-Les hépatocytes adultes (les cytokératine (CK) 8 et 18) (Golding, M. *et al.*, 1995)

-Les hépatocytes fœtaux (Glypican-3, l'alpha-fœtoprotéine (AFP), la GST-P (Glutathione-S-transferase Pi), (Grozdanov, P. N. *et al.*, 2006) (Sell, S., 1978)).

-Les cellules biliaires (CK19, OV-6, epithelial cell adhesion molecule Ep-CAM, CD44, et CD24), (Engelhardt, N. V. *et al.*, 1993) (Yovchev, M. I. *et al.*, 2007)

-Les cellules souches hématopoïétiques (Thy-1, C-kit, CD133, Sca-1) (Petersen, B. E. *et al.*, 2003) (Petersen, B. E. *et al.*, 1998)

En fonction du stade de différenciation des cellules ovales, certains marqueurs apparaissent plus tôt, d'autres plus tardivement. En effet, au cours du stade de différenciation les cellules ovales perdent certains marqueurs pour acquérir un phénotype épithélial. C'est le cas de l'AFP, ou encore de C-kit (Bisgaard, H. C. *et al.*, 1994) (Yovchev, M. I. *et al.*, 2008).

Certains marqueurs sont spécifiques à l'espèce. Par exemple, il est admis que l'AFP est un bon marqueur de cellules ovales de rat mais par contre elle n'est pas exprimée par les cellules ovales de souris (Jelnes, P. *et al.*, 2007).

Récemment, des études ont remis en cause certains marqueurs d'origine hématopoïétique comme par exemple le marqueur Thy-1. (Yovchev, M. I. *et al.*, 2008) (Dudas, J. *et al.*, 2007). Yovchev et al. montrent que les cellules Thy-1⁺ ne présentent pas un phénotype de cellules ovales mais un phénotype de cellules mésenchymateuses. En effet, les cellules Thy-1⁺ expriment des marqueurs de cellules étoilées. De plus alors que les cellules Thy-1⁻, Ep-CAM⁺, OV6⁺ sont capables après transplantation de repeupler le foie, les cellules Thy-1⁺ elles lorsqu'elles sont transplantées ne se différencient pas en hépatocytes. Yovchev, conclut que les cellules Thy-1⁺ ne sont pas des cellules ovales, mais des myofibroblastes qui s'accumulent dans le foie lors de l'activation et de la prolifération des cellules ovales.

De nombreux protocoles d'isolement des cellules ovales sont décrits. Les plus récents consistent à utiliser des modèles de rats dans lesquels la prolifération des cellules ovales est importante puis à isoler ces cellules par la taille, ou par des tris cellulaires (Wang, P. *et al.* 2010) (Shupe, T. D. *et al.*, 2009). On peut s'interroger sur la pertinence du protocole décrit par Shupe et al., qui trient simplement les cellules à l'aide du marqueur Thy-1, (alors qu'il est décrit en 2008 pour être plutôt un marqueur des myofibroblastes). De plus, cette équipe ne réalise qu'un seul marquage (OV6) pour confirmer que les cellules triées sont bien des cellules ovales. Le protocole de Wang et al semble plus pertinent. En effet, cette équipe trie les cellules par la taille en réalisant des gradients de percoll mais s'assurent que ces cellules sont bien des cellules ovales en réalisant de nombreux marquages comme OV6, CK8, CK18, l'AFP, CK19....

Comme il n'est pas connu de marqueur spécifique de la population des cellules ovales, il semble important de multiplier les marquages afin d'être certain d'avoir trié les bonnes cellules.

Les modèles expérimentaux

Chez l'homme, les cellules ovales ont été observées au cours de processus pathologiques comme le carcinome hépatocellulaire (CHC), le cholangiocarcinome, les cirrhoses virales, l'hémochromatose, les adénocarcinomes (Hsia, C. C. *et al.*, 1992), (Zhang, F. *et al.*, 2008) (Sun, C. *et al.*, 2006) (Lowes, K. N. *et al.*, 1999) (Libbrecht *et al.*, 2001). Il existe différents modèles expérimentaux dans lesquels on peut observer la prolifération de cellules ovales. Dans le foie de rongeurs la prolifération cellulaire est observée après traitement avec des agents carcinogènes ou des drogues hépatotoxiques. Selon ces modèles, la prolifération et la cinétique d'apparition des cellules ovales sont très variables. De plus, rares sont les modèles qui sont efficaces à la fois chez la souris et le rat (Jelnes, P. *et al.*, 2007).

Un des modèles souvent utilisé chez le rat associe une perte hépatocytaire suite à une hépatectomie partielle des deux tiers par exemple, et une inhibition de la prolifération des hépatocytes par un traitement au 2-acétylamino-fluorène. Dans ce modèle simple à mettre en place et reproductible, on peut observer une importante prolifération des cellules ovales avec un pic à 9 jours post hépatectomie (Evarts, R. P. *et al.*, 1987). Chez le rat il est aussi possible d'observer une prolifération de cellules ovales 3-4 jours après injection de D-galactosamide responsable d'une nécrose hépatocytaire massive (Kuhlmann, W. D. & Peschke, P., 2006).

D'autres modèles sont basés sur une perte hépatocytaire chronique. C'est le cas par exemple lorsque des rats ou des souris sont soumis à un régime déficient en choline supplémenté en éthionine (CDE). Deux à trois semaines après le régime, des cellules ovales apparaissent et prolifèrent (Akhurst, B. *et al.*, 2001). Le modèle basé sur un régime de quelques semaines contenant du DDC (3,5-diéthoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine) permet une prolifération de cellules ovales chez la souris avec un pic de prolifération à 3 semaines (Preisegger, K. H. *et al.*, 1999) (Wang, X. *et al.*, 2003a).

Enfin les cellules ovales prolifèrent dans d'autres modèles : par exemple après injection d'acétaminophène à forte dose, ou de cocaïne et phénobarbital (Kofman, A. V. *et al.*, 2005) (Rosenberg, D. *et al.*, 2000). On peut observer aussi ces cellules dans des modèles naturels de maladies génétiques comme la maladie de Wilson (Yasui, O. *et al.*, 1997).

L'origine des cellules ovales

Les cellules ovales considérées comme des cellules progénitrices, prolifèrent autour de l'espace porte puis migrent vers le parenchyme hépatique. Par marquage immunohistochimique et étude de la migration cellulaire par incorporation de thymidine tritiée, ou de BrdU, certains auteurs ont proposé que les cellules ovales proviennent de l'activation de cellules souches intrahépatiques et que la principale niche se trouve sans doute au niveau de canaux de Hering à l'interface entre le parenchyme hépatique et les cellules des canaux biliaires (Sell, S. & Salman, J., 1984) (Paku, S. *et al.*, 2001) (Kuwahara, R. *et al.*, 2008). Cependant aucun de ces travaux, n'a permis de caractériser, d'isoler ou de localiser de manière certaine les cellules souches.

Actuellement l'origine des cellules ovales est toujours controversée. Certains auteurs proposent que ces précurseurs aient une origine extrahépatique.

L'origine extrahépatique des cellules ovales a été proposée pour la première fois en 1999 par l'équipe de Petersen (Petersen, B. E. *et al.*, 1999). Dans cette étude, des rattes déficientes pour la dipeptidyl-peptidase IV (DPPIV^{-/-}), avaient reçu une greffe de moelle de rats DPPIV^{+/+} puis avaient été soumises à un régime AAF et à une lésion hépatique au CCl₄ afin d'induire une prolifération des cellules ovales. L'observation de quelques cellules ovales DPPIV^{+/+} signalait donc leur origine hématopoïétique.

Plus tard ces résultats ont été contredits par plusieurs études (Menthen, A. *et al.*, 2004) (Wang, X. *et al.*, 2003a) (Rountree, C. B. *et al.*, 2007). Menthen et al. n'ont pas identifié chez des rats $DDP_{IV}^{-/-}$, de cellules ovales issues d'un greffon $DDP_{IV}^{+/+}$ après régime AAF suivi d'une hépatectomie. Dans l'étude de Wang, des souris sauvages ont été greffées avec 2.10^6 cellules de moelle osseuse de souris Rosa26 exprimant la β -galactosidase. Les souris ont été traitées avec un régime DDC en continu pendant 7 mois puis ont été sacrifiées. Plus de 99% des hépatocytes et cellules ovales n'exprimaient pas la β -galactosidase. Ces résultats ont donc démontré que dans le modèle DDC les cellules ovales ne dérivent pas de la moelle osseuse. De la même façon, Rountree et al. ont greffé des cellules de moelle osseuse de souris transgéniques GFP chez des souris sauvages. Les souris adultes ont été mises sous régime DDC pendant 3 semaines. 2 à 6 semaines après la fin du régime, l'analyse du tissu hépatique n'a révélé aucune cellule ovale exprimant la GFP.

D'après ces articles on peut émettre l'hypothèse que dans l'étude de Petersen les quelques cellules ovales dérivées de la moelle sembleraient plutôt provenir d'un phénomène de fusion cellulaire.

Cependant, Oh et al. en 2007, ont relancé l'hypothèse d'une éventuelle origine extrahépatique des cellules ovales (Oh, S. H. *et al.*, 2007). Oh et al. ont utilisé des rattes $DDP_{IV}^{-/-}$, ayant reçu une greffe de moelle de rats $DDP_{IV}^{+/+}$. Ces rattes ont été soumises au protocole AAF/hépatectomie 2/3. Les animaux ont également été traités, avant ou après la greffe, par la monocrotaline, un inhibiteur de la prolifération des hépatocytes et des cellules précurseurs de la moelle. Lorsque la monocrotaline est administrée avant la greffe, l'étude histochimique du foie révèle qu'environ 50% des cellules ovales expriment DDP_{IV} , ce qui démontre leur origine médullaire. Une analyse des chromosomes X et Y par hybridation in situ révèle que les cellules ovales $DDP_{IV}^{+/+}$ ne proviennent pas d'évènements de fusion. Lorsque la monocrotaline est administrée après la greffe, aucune cellule ovale DDP_{IV}^{+} n'est détectée. Ceci démontre que la monocrotaline a inhibé la prolifération et la différenciation des cellules ovales issues de la moelle. Il y a cependant prolifération de cellules ovales sans doute d'origine hépatique.

D'après cet article, il est probable que les cellules ovales aient à la fois une origine intrahépatique et une origine médullaire. Cependant, la plupart des auteurs traitant de ce sujet, pensent que la niche principale se situerait dans le foie (Tonkin, J. N. *et al.*, 2008).

En fonction des modèles utilisés, l'origine des cellules ovales semble multiple. Il pourrait être envisagé par exemple que la DDC ait un effet toxique vis-à-vis des précurseurs médullaires. Ainsi, dans ce modèle les cellules souche intrahépatique deviendraient la source majeure de cellules ovales. Inversement, dans d'autres modèles certains composés comme le CCl₄ pourraient être toxique pour les cellules bordant les canaux de Hering. Ainsi dans le modèle utilisant le CCl₄, les cellules d'origine médullaire deviendraient la source majeure des cellules ovales. A ce jour l'origine des cellules ovales n'est toujours pas déterminée.

Mécanisme de prolifération

Certains mécanismes observés lors de la régénération hépatocytaire sont aussi retrouvés lors de la prolifération des cellules ovales. Par exemple, les cytokines IL-6 et le TNF- α sont impliqués dans la réponse proliférative des cellules ovales. Chez des souris déficientes en IL-6 ou pour le récepteur de type 1 du TNF- α , la prolifération des cellules ovales est fortement diminuée sous régime CDE. De même en bloquant la production de TNF- α et d'Il6 par la dexaméthasone chez des rats soumis à un régime AAF/hépatectomie 2/3, la prolifération des cellules ovales est diminuée (Nagy, P. *et al.*, 1998) (Knight, B. *et al.*, 2000). Enfin, tout comme pour les hépatocytes, la prolifération des cellules ovales semble induite par des facteurs de croissance (HGF, TGF- α) (Nagy, P. *et al.*, 1996) (Hasuike, S. *et al.*, 2005).

Mais certains facteurs activent spécifiquement la prolifération des cellules ovales. C'est le cas de Tweak (TNF Like Weak Inducer of Apoptosis), de la lymphotoxine-b, et de SDF-1 (Lowes, K. N. *et al.*, 2003) (Akhurst, B. *et al.*, 2005) (Mavier, P. *et al.*, 2004) (Jakubowski, A. *et al.*, 2005).

Finalement, il pourrait exister une étroite relation entre l'inflammation et la prolifération des cellules ovales. La matrice extracellulaire et les myofibroblastes semblent jouer un rôle important lors de la prolifération et différenciation de ces cellules progénitrices (Van Hul, N. K. *et al.*, 2009) (Knight, B. *et al.*, 2005).

Différenciation

La cellule ovale est une cellule dite bipotente dans le foie mais les potentialités de ces cellules ne semblent pas se limiter aux lignages hépatiques, puisqu'il a été montré qu'elles pouvaient aussi se différencier en cellules pancréatiques et même en cardiomyocytes (Yang, L. *et al.*, 2002), (Malouf, N. N. *et al.*, 2001).

Bien que cela ne soit pas encore démontré chez l'homme, les cellules ovales ont la capacité de se différencier en hépatocytes et en cellules des canaux biliaires. La différenciation des cellules ovales en hépatocytes *in vivo*, a été montrée dans plusieurs études de transplantation de cellules ovales chez le rongeur (Yasui, O. *et al.*, 1997) (Wang, X. *et al.*, 2003a; Yovchev, M. I. *et al.*, 2008). Yasui *et al.* ont montré *in vivo* la différenciation des cellules ovales en hépatocytes. Ils ont isolé des cellules ovales par la taille chez des rats LEC (Long-Evans Cinnamon), modèle génétique naturel de la maladie de Wilson. Ces cellules ovales AFP⁺, CK19⁺ et CK18⁺ ont ensuite été transduites par des rétrovirus porteurs du gène *lacZ*, puis reimplantées chez des rats NAR/LEC rats analbuminiques. Une à dix semaines plus tard les rats ont été sacrifiés. Des hépatocytes exprimant la β -galactosidase ont été détectés par technique enzymatique, et un niveau élevé d'albumine a été retrouvé dans le sérum des rats analbuminiques. Cette étude a donc démontré que les cellules ovales sont capables de générer des hépatocytes matures (Yasui, O. *et al.*, 1997).

En 2003, Wang *et al.* ont isolé des cellules ovales par gradient de Nycodenz chez des souris Rosa26 mises sous régime DDC pendant 3 à 4 semaines. Ces cellules ont été greffées chez des souris FAH^{-/-} et le traitement par le NTBC a été arrêté. Chez 4 des 6 souris greffées, un repeuplement du foie par les cellules des donneurs a été observé.

Des clones d'hépatocytes exprimant la β -galactosidase provenant du donneur ont été observés par analyse immunoenzymatique sur les coupes des foies (Figure 17B). Ainsi, la reconstitution du foie par des cellules ovales différenciées en hépatocytes a été démontrée.

Cependant, la population de cellules greffées était enrichie en cellules ovales mais contaminée par un peu moins de 2% d'hépatocytes. Pour prouver que cette contamination n'était pas responsable à elle seule du repeuplement hépatocytaire, une seconde expérience a été réalisée. Des cellules ovales isolées de souris Rosa 26 ont été cotransplantées chez les souris FAH^{-/-} avec 2% ou 50% d'hépatocytes provenant de souris transgéniques hétérozygotes présentant une mutation dans le gène FANC (Fanconi anemie group C). Après 6 à 8 semaines, un southern blot a été réalisé sur les foies repeuplés (Figure 17 A), et il montre clairement que lorsque la fraction des cellules ovales est contaminée avec 2% d'hépatocytes FANC⁻, seuls les hépatocytes β gal⁺ (donc dérivés des cellules ovales) sont retrouvés (Figure 17B).

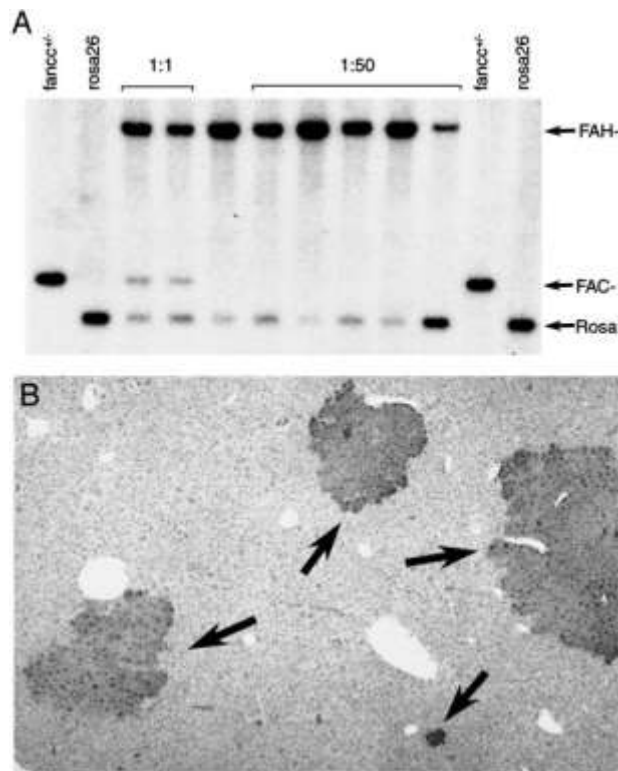


Figure 17. Repeuplement du foie de souris FAH^{-/-} par des cellules ovales Rosa26 A- southern blot B- Xgal sur les coupes des foies FAH^{-/-}. (Wang, X. *et al.*, 2003a)

La plupart des études démontrant la différenciation des cellules ovales en hépatocytes, sont réalisés par isolement puis transplantation des cellules ovales. Seules quelques études de lignage effectuées directement in vivo notamment par incorporation de thymidine tritiée ont montré que les cellules ovales pouvaient se différencier en hépatocytes (Evarts, R. P. *et al.*, 1989) (Alison, M. *et al.*, 1997).

La capacité des cellules ovales à se différencier en cellules des canaux biliaires n'a jamais été démontrée très clairement. Ceci a été simplement suggéré après avoir observé par analyse en microscopie électronique la prolifération de structures ductulaires communiquant avec la voie biliaire (Paku, S. *et al.*, 2001).

Cellules ovales et cancer

Il est donc admis que les cellules ovales sont des précurseurs qui participent à la régénération hépatique en conditions pathologiques notamment lorsque les hépatocytes ne sont plus en mesure de proliférer. Les cellules ovales prolifèrent dans des modèles qui conduisent souvent à la formation de tumeurs hépatiques. De la même façon, chez l'homme, elles sont retrouvées dans des pathologies associées à un risque élevé de cancer. Enfin, les cellules ovales présentent certains marqueurs communs exprimés aussi par des cellules tumorales (AFP, Glypican-3, CK7,CK19) (Imoto, M. *et al.*, 1985) (Van Eyken, P. *et al.*, 1988) (Wu, P. C. *et al.*, 1999).

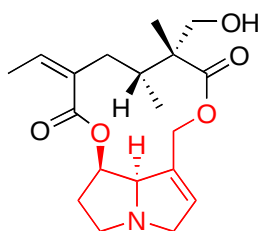
Une des hypothèses serait que les cellules ovales pourraient être à l'origine des CHC et des cholangiocarcinomes (Zhang, F. *et al.*, 2008) (Kim, H. *et al.*, 2004). Les mécanismes par lesquels il existerait une différenciation des cellules souches en cellules cancéreuses ne sont pas déterminés. Cependant le dérèglement de certaines voies de signalisation comme la voie Wnt et la voie Notch impliquées dans la prolifération et la différenciation des cellules ovales, pourraient être à l'origine de la formation des tumeurs (Lade, A. G. & Monga, S. P. *et al* 2011) (Yang, W. *et al.*, 2008). Le rôle des cellules ovales dans la cancérogénèse hépatique n'est toujours pas déterminé. Des cellules ovales cultivées pendant 2 ans n'ont pas dérivé en cellules cancéreuses (Wang, P. *et al.* 2010). De plus, tous les CHC ne proviennent pas des cellules ovales. Nous avons montré dans un modèle dans

lequel nous n'avons pas observé de prolifération de cellules ovales, et dans lequel l'administration de DEN (diétylnitrosamine) en continu dans l'eau de boisson induit des CHC, que les tumeurs provenaient des hépatocytes matures. En effet un marquage génétique des hépatocytes matures par des rétrovirus recombinants porteurs du gène de la β -galactosidase, a été réalisé avant l'administration de DEN. Les rats ont été sacrifiés 3 mois après le régime, et nous avons observé 17% de tumeurs exprimant la β -galactosidase. Sachant que la proportion d'hépatocytes matures marqués avant le régime était de 18%, nous avons pu dans ce modèle soutenir l'hypothèse de l'implication des hépatocytes au cours de la carcinogénèse hépatique (Bralet, M. P. *et al.*, 2002).

3.2.2.2 Les SHPC (*Small Hepatocyte like progenitor cells*)

On peut observer la prolifération d'un autre type cellulaire nommé SHPCs chez le rat après inhibition de la prolifération hépatocytaire par la rétrorsine suivie d'une lésion hépatique.

La rétrorsine est un alcaloïde pyrrolizidinique présente dans les plantes angiospermes (famille comprenant les chardons, les artichauts...). Ce composé est néfaste pour les mammifères. Ces alcaloïdes sont des esters constitués d'un acide carboxylique, et d'un aminoalcool dérivé de la pyrrolizidine (Figure 18).



Rétrorsine

Figure 18. La rétrorsine

Chez les mammifères, la rétrorsine est facilement oxydée en composés pyrroliques par les monooxygénases du cytochrome P450 du foie (White, I. N. *et al.*, 1973). Les esters pyrroliques exercent leur toxicité en désactivant les protéines et les acides nucléiques ce qui

engendre une altération des fonctions cellulaires. C'est dans le foie que l'on retrouve le plus de dérivés toxiques. Après traitement à la rétroarsine, des dommages à l'ADN ont été observés notamment des adduits à l'ADN (Wang, Y. P. *et al.*, 2005). Cependant, il n'a pas été montré que la rétroarsine pouvait induire des tumeurs. En effet deux ans après avoir traité des rats à la rétroarsine, aucune tumeur n'est apparue (Laconi, S. *et al.*, 2006).

Une des propriétés de la rétroarsine est sa capacité à bloquer la division des hépatocytes. L'action exacte de la rétroarsine concernant le blocage de la division cellulaire n'est pas encore très bien déterminée. L'apparition de mégaloctes après traitement à la rétroarsine et lésion hépatique a permis de montrer que des hépatocytes sont bloqués en phase S tardive ou G2 précoce du cycle cellulaire (Samuel, A. & Jago, M. V., 1975). En effet les mégaloctes sont le résultat de phénomènes d'endoréplication sans mitose, et les cycles répétés de synthèse de l'ADN ont permis de détecter des noyaux d'hépatocytes possédant 32n voir 64n.

Cependant d'autres études montrent qu'une grande partie des hépatocytes pourraient être bloqués en phase G1/ S (Laconi, S. *et al.*, 1999) (Picard, C. *et al.*, 2003). Picard et al. ont réalisé une ligature de la branche porte chez des rats Wistar au préalable traités à la rétroarsine. Avant la ligature, cette étude montre que les rats traités à la rétroarsine ont un niveau basal de protéines exprimées lors de la phase G1 plus important que des rats non traités. Picard et al. pensent que la rétroarsine pourrait faire sortir les hépatocytes de leur quiescence (Figure 19).

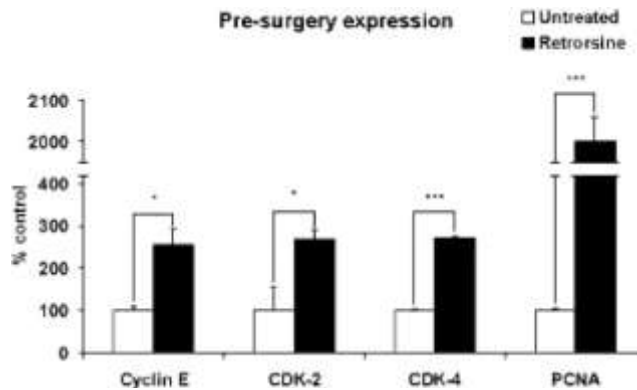


Figure 19. Protéines du cycle cellulaire exprimées après traitement à la rétorsine ou chez des rats non traités.

Après la ligature de la branche porte, la synthèse d'ADN a été analysée par marquage BrdU, et l'ADN a été dosé chez les rats traités ou non avec la rétorsine. La quantité d'ADN ainsi que le marquage BrdU étaient diminués chez des rats traités à la rétorsine. Au vu de ces résultats, Picard et al. suggèrent que le blocage pourrait avoir lieu en phase G1/S, qu'il y aurait une réplication de l'ADN mais incomplète et donc une impossibilité que la cellule passe en phase G2 (Picard, C. *et al.*, 2003).

L'équipe de Laconi a réalisé une hépatectomie partielle chez des rats Fischer ayant été traités avec la rétorsine. Après hépatectomie l'index mitotique est quasi nul et la synthèse d'ADN analysée par marquage BrdU est très diminuée par rapport aux rats contrôles ayant subis simplement une hépatectomie (Figure 20). Laconi et al. comme dans l'étude précédente émet donc l'hypothèse que la plupart des hépatocytes sont bloqués en phase S. Cependant il admet qu'une sous population de mégaloctes est capable d'avoir des cycles répétés de synthèse d'ADN puisqu'ils présentent une ploïdie importante. Cependant aucune donnée sur la proportion d'hépatocytes bloqués en phase G1/S et S/G2 n'est donnée. Une analyse de la ploïdie des foies traités à la rétorsine pourrait permettre de répondre à cette question.

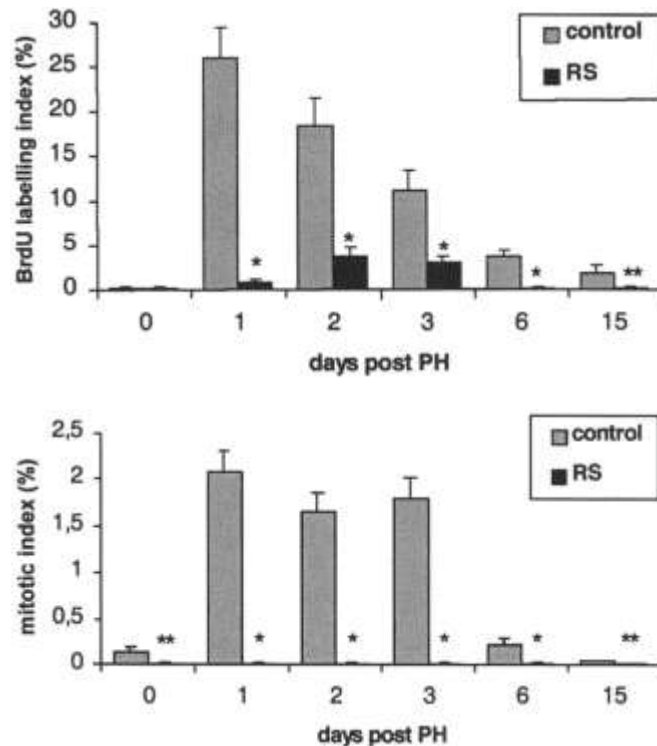


Figure 20 Marquage BrdU et index mitotique chez des rats hépatectomisés traités ou non à la rétrotransposine (Laconi, S. *et al.*, 1999).

Après traitement à la rétrotransposine et lésion hépatique, la division hépatocytaire est donc bloquée. Chez des rats Fischer ayant subi ce traitement, Gordon et al. observent 2 à 5% de cellules en apoptose les 5 premiers jours post hépatectomie ainsi que l'apparition de nombreux mégaloctes (pic à 5 jours post hépatectomie). Dix jours après l'hépatectomie, des clones de « petits hépatocytes » ont proliféré et représentent environ 50% du lobule hépatique. Un mois après l'hépatectomie partielle la masse hépatique est restaurée (Gordon, G. J. *et al.*, 2000a).

L'équipe de Gordon a suggéré que ces petits hépatocytes pourraient être considérés comme un nouveau type de progéniteur hépatique et c'est la raison pour laquelle ils ont nommé ces petits hépatocytes «Small Hepatocyte Like Progenitors Cells» (Gordon, G. J. *et al.*, 2000b).

Les SHPCs sont de petites cellules (10-12 μm) qui morphologiquement ressemblent à des hépatocytes. Ces cellules expriment des marqueurs d'hépatocytes matures comme l'albumine et la transferrine. Elles expriment faiblement quelques marqueurs de cellules ovales comme l'AFP. De plus les SHPCs sont déficients pour certaines enzymes du cytochrome P450 (CYP 2E1, CYP 1A2, and CYP 3A1), ce qui participe sans doute à leur résistance à la rétrovirus (Gordon, G. J. *et al.*, 2000a) (Gordon, G. J. *et al.*, 2000b).

Les SHPCs activées notamment par l'IL6 (Best, D. H. *et al.* 2010) prolifèrent dans la région périportale et se différencient en hépatocytes. Ces cellules sont capables de repeupler un foie après transplantation chez un receveur (Gordon, G. J. *et al.*, 2002). Il est important de noter que chez le rat Fischer les SHPCs prolifèrent rapidement, alors que dans d'autres souches de rats comme les Sprague Dawley ou chez les souris les SHPCs prolifèrent moins bien, voir pas du tout (Zhou, X. F. *et al.*, 2006) (Avril, A. *et al.*, 2004).

L'origine des SHPCs est controversée. Dans un modèle de souris traitées à la rétrovirus, Vig et al, ont proposé en réalisant une reconstruction en 3D des lobules hépatiques à l'aide de coupes sériées, que les SHPCs dérivent des cellules ovales (Vig, P. *et al.*, 2006). Cette hypothèse a été renforcée par le fait que les SHPCs expriment l'OV6 marqueur de cellules ovales.

Cependant cette origine a été controversée par plusieurs équipes. En effet, en bloquant la prolifération des cellules ovales par traitement au 4,4-diaminodiphenylmethane (DAPM) qui détruit l'épithélium biliaire, la cinétique d'apparition des SHPCs reste la même. (Best, D. H. & Coleman, W. B., 2007a). Au contraire, chez des rats traités avec de la rétrovirus et de l'AAF (qui bloque la prolifération hépatocytaire), on observe la prolifération de cellules ovales mais pas d'expansion de SHPCs sans doute bloquées par l'AAF (Best, D. H. & Coleman, W. B., 2007b). Ces études démontrent clairement que les SHPCs et les cellules ovales sont bien deux populations distinctes.

4. Transfert de gènes -Généralités

La découverte au milieu du vingtième siècle de la structure de l'ADN suivi de progrès rapides dans le domaine de l'ingénierie génétique, ont logiquement conduit aux développements de technologies qui permettent aujourd'hui de modifier le patrimoine génétique de cellules ou d'organismes entiers. Le transfert de gènes a trouvé de larges champs d'applications comme la production agroalimentaire, pharmaceutique ou le domaine biomédical.

4.1 Quelques applications du transfert de gènes dans le domaine de la recherche biomédicale

En ce qui concerne la recherche biomédicale, le transfert de gènes est devenu un outil essentiel tant pour des études fondamentales que pour la recherche à visée thérapeutique.

4.1.1 La transgénèse ou thérapie génique germinale :

Les techniques de transgénèse, permettent de modifier le génome d'un organisme :

- soit par l'addition de nouvelles séquences d'ADN dans son génome, avec une intégration au hasard (transgénèse additive).

- soit par la modification de séquences déjà présentes dans son génome (knock-out / knock-in / transgénèse ciblée) par recombinaison homologue ou à l'aide de zinc finger nucléase.

Les techniques de transgénèse dans le domaine de la recherche biomédicale sont très utilisées notamment par exemple pour les études de génomiques fonctionnelles, ou la création de modèles animaux de maladies humaines.

4.1.2 La thérapie génique somatique

Une autre application importante du transfert de gènes est la thérapie génique somatique qui est une approche thérapeutique fondée sur la possibilité de transférer une information génétique (ADN ou ARN) afin d'obtenir un effet thérapeutique.

4.1.2.1 Maladie monogénique

Le plus souvent, pour le traitement de maladies monogéniques, les stratégies de thérapie génique consistent à corriger une anomalie génétique en apportant un gène normal et fonctionnel. Le gène thérapeutique peut être introduit selon deux voies : directement dans l'organisme d'un patient (thérapie génique *in vivo*) ou dans des cellules extraites de l'organisme pour être traitées avant d'être réimplantées (thérapie génique *ex vivo*).

Il existe cependant d'autres stratégies. Par exemple, pour une des formes de la sclérose latérale amyotrophique une des stratégies de thérapie génique est de transférer un ARN interférent permettant d'inhiber la transcription du gène muté s'avérant toxique et à l'origine de symptôme dans cette pathologie (Xia, X. G. *et al.*, 2005). Un autre exemple utilisé notamment pour le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne est celui de la thérapie génique par saut d'exon. Cette stratégie a pour objectif d'éliminer un exon spécifique muté tout en conservant un cadre de lecture permettant à la cellule de fabriquer une protéine certes plus courte mais fonctionnelle. Le saut d'exon peut être induit par des oligonucléotides antisens agissant au niveau du mécanisme d'épissage (Goyenvallé, A. *et al.*, 2004) (Aartsma-Rus, A. *et al.* 2010).

4.1.2.2 Cancer

Dans le monde, aujourd'hui 1644 essais de thérapie génique ont été proposés, et les maladies monogéniques ne représentent que 8.2% de ses essais (Figure 21). Le cancer est une des principales cibles de la thérapie génique.

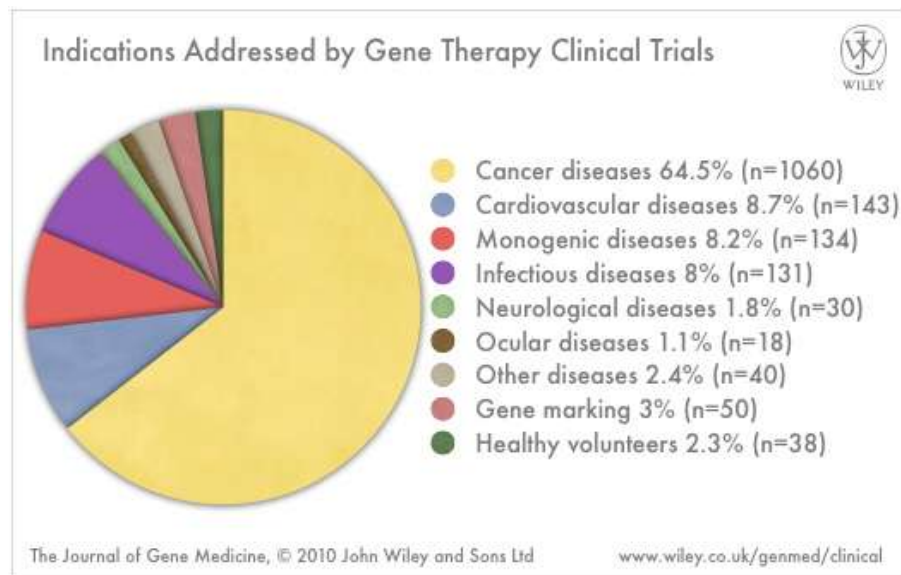


Figure 21. Essais cliniques de thérapie génique en 2010.

Les stratégies de thérapie génique anticancéreuse sont nombreuses. Elles recouvrent un grand nombre de stratégies parmi lesquelles on peut citer :

-Les gènes suicides : La thérapie génique par gènes suicides a pour but d'éliminer des cellules tumorales, en leur faisant acquérir un gène codant une enzyme capable de transformer une molécule non toxique en un métabolite doué de toxicité cellulaire. Un exemple est le gène codant la thymidine kinase du virus de l'herpes simplex de type 1. Cette enzyme a la propriété de transformer le ganciclovir en un composé toxique qui induit la mort cellulaire. Des études cliniques ont démontré que cette stratégie utilisant HSV-TK-GCV dans un vecteur adénoviral pouvait être appliquée de façon sécuritaire chez l'homme (Sung, M. W. *et al.*, 2001).

Les gènes suppresseurs de tumeurs . Certains gènes jouent un rôle déterminant dans le cycle cellulaire, et leur altération augmente le risque de cancer. Le transfert de ces gènes (le plus connu étant P53) au sein des tumeurs combinées avec la radiothérapie, ou chimiothérapie est une stratégie efficace et testée en clinique. (Tian, G. *et al.*, 2009).

Les gènes anti-angiogénèses : La croissance d'une tumeur dépend de l'angiogénèse puisque les cellules tumorales ont besoin d'oxygène et de nutriments présents dans la circulation sanguine. De plus la formation des vaisseaux sanguins est requise pour l'évasion de métastases. Ainsi, les stratégies anti-angiogénèse consistent par exemple à transférer des ARN antisens de facteurs stimulant l'angiogénèse comme le VEGF ou encore à transférer des gènes codant des facteurs angiogéniques comme par exemple l'angiostatine (Xu, R. *et al.*, 2003).

L'immunothérapie : Cette stratégie a pour objectif d'induire ou amplifier une réponse immunitaire contre les cellules tumorales. Une des stratégies pour stimuler le système immunitaire est l'utilisation de gènes codant les cytokines comme l'IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, l'IL-12 l'INF- γ etc...combiné ou non avec des gènes codant des molécules de co-stimulation. Cette stratégie peut être effectuée soit par transduction ex vivo de cellules tumorales ou de cellules dendritiques qui seront réimplantées, ou directement par transfert de gènes in vivo (Barajas, M. *et al.*, 2001) (Knippertz, I. *et al.*, 2009). Une autre approche, l'immunothérapie adoptive a pour but d'augmenter la réponse immunitaire en apportant des effecteurs cellulaires antitumoraux, les lymphocytes T génétiquement modifiés afin d'augmenter leur efficacité cytotoxique. De plus, dans le but d'augmenter leur potentiel antitumoral, les lymphocytes peuvent par exemple être modifiés par transfert de gènes codant des récepteurs d'antigènes tumoraux.

Les approches de thérapie génique à but anticancéreuses sont multiples, chacune ayant des avantages et des inconvénients. La variété des vecteurs de transfert de gènes et la diversité des approches de thérapie génique permettent de choisir à la fois le vecteur et la stratégie de thérapie génique qui paraissent le mieux adaptés pour le traitement d'une tumeur donnée.

4.2 Les outils de transfert de gènes

Une étape cruciale du transfert de gènes est de faire pénétrer la nouvelle information génétique au sein des cellules. De par ses propriétés physico-chimiques (taille et charge négative), l'ADN peut difficilement franchir les membranes cellulaires. L'efficacité de transfection est donc faible et variable selon les cellules. In vivo, l'expression d'un transgène peut être observée après injection d'ADN nu dans la peau ou le muscle squelettique (Hengge, U. R. *et al.*, 1995) (Wolff, J. A. *et al.*, 1990), mais les niveaux d'expression sont très faibles. La vaccination reste une des applications majeures de l'injection de l'ADN nu.

Afin d'augmenter l'efficacité de transfection in vivo ou in vitro, des méthodes physiques peuvent être utilisées. In vitro, le matériel génétique peut être introduit dans les cellules par micro injection, technique couramment utilisée pour produire des animaux transgéniques. D'autres techniques applicables in vivo consistent à perméabiliser les membranes en appliquant soit un champ électrique (électrotransfert), soit des ultrasons (sonoporation), ou bien en utilisant des sources lasers (irradiation par laser). Ces techniques sont appliquées par exemple pour le transfert de gènes dans le muscle, la peau ou dans les tumeurs. (Mir, L. M. *et al.*, 1999), (Tsai, K. C. *et al.*, 2009), (Gothelf, A. *et al.* 2010). Une autre technique, nommée injection hydrodynamique, consiste à injecter très rapidement en intraveineux ou intra artériel un grand volume de liquide contenant l'ADN d'intérêt. Cette forte pression permet une pénétration de l'ADN en ciblant principalement les cellules hépatiques (injection dans la veine de la queue pour le ciblage du foie), ou les cellules musculaires (injection dans le système artériel pour cibler les muscles) (Maruyama, H. *et al.*, 2002) (Liu, F. *et al.*, 1999). Des techniques chirurgicales ont été mises au point chez le primate afin de mimer la technique d'injection hydrodynamique dans le but de pouvoir transposer cette technique chez l'homme (Brunetti-Pierri, N. *et al.*, 2009).

Des techniques physiques permettent donc d'augmenter l'efficacité de transfection et l'injection d'ADN nu peut être une approche intéressante pour le transfert de gènes dans le muscle ou la peau. Cependant un des inconvénients majeurs du transfert d'ADN nu est sa dégradation rapide lorsqu'il est injecté par voie systémique. En effet, l'ADN nu, qui n'est pas protégé des protéines du sérum a une demi-vie plasmatique très courte.

De plus il existe un problème de ciblage cellulaire ou tissulaire évident.

Ainsi pour la majorité des applications de transfert de gènes, l'utilisation des systèmes de vecteurs de transfert de gènes est nécessaire. Injecté *in vivo*, le vecteur transportant le gène jusqu'au sein de la cellule cible, permet de protéger la molécule d'ADN, de faciliter son trajet dans les milieux extra cellulaires et d'assurer la reconnaissance de la cellule cible. Chaque type de vecteur possède ses caractéristiques propres, le choix d'un vecteur varie donc en fonction de différents critères, comme par exemple les cellules ou tissus à cibler, la taille du gène à transférer, ou encore la durée de l'expression du produit du transgène.

Les vecteurs sont regroupés en deux grandes catégories : les vecteurs synthétiques (aussi appelés chimiques ou non-viraux) et les virus recombinants.

4.2.1 Vecteurs non viraux :

Actuellement il existe une multitude de vecteurs synthétiques à l'étude. Les plus utilisés sont les lipides cationiques (+ lipides neutre) (DOTMA, DOTAP...) et les polymères cationiques (polyéthylèneimine, dendrimères...). Ils forment avec l'ADN des complexes appelés lipoplexes et polyplexes. Ces complexes chargés positivement, favorisent le transfert d'ADN à l'intérieur des cellules par la voie de l'endocytose. Des ligands membranaires peuvent être ajoutés aux complexes pour favoriser l'endocytose au sein des cellules cibles. Les vecteurs non viraux sont caractérisés par une faible toxicité, une faible immunogénicité ainsi qu'une production aisée et économique. Quel que soit le vecteur synthétique utilisé, l'expression du transgène reste temporaire du fait de l'absence d'intégration dans le génome de la cellule hôte. Dans ce contexte, certaines pathologies comme le cancer sont des maladies candidates pour l'utilisation de ces vecteurs car une expression prolongée du gène thérapeutique n'est pas toujours requise. Pour d'autres applications, l'expression transitoire du produit du transgène reste un inconvénient. De plus, l'efficacité de transfection est bien inférieure à celles des vecteurs viraux.

4.2.2 Vecteur viraux

Parmi les différentes techniques de transfert de gènes une des techniques les plus efficaces consiste à transporter le gène d'intérêt grâce à des vecteurs viraux. Ces vecteurs utilisent la capacité des virus à introduire son matériel génétique dans une cellule hôte. Les virus recombinants sont classiquement non répliatifs puisque les séquences responsables de la réplication sont remplacées par le transgène. Cependant, pour certaines thérapies géniques du cancer, certains vecteurs utilisés sont des vecteurs répliatifs conditionnels capables de se se répliquer préférentiellement dans les tumeurs.

Les rétrovirus, adénovirus et AAV (Adeno-associated virus) sont les vecteurs viraux les plus couramment utilisés pour les applications de transfert de gènes.

4.2.2.1 Les rétrovirus recombinants

Rétrovirus sauvage

Les lentivirus et les oncorétrovirus sont deux des membres de la famille des retroviridae. Les rétrovirus sont des virus ayant une enveloppe entourant la capsid avec au centre la nucléocapsid très dense contenant deux molécules identiques d'ARN. Le cycle répliatif des rétrovirus se divise en deux phases principales : la phase précoce débute par la reconnaissance de la cellule hôte et sa décapsidation, puis la rétrotranscription et l'import nucléaire du génome viral et enfin son intégration au sein du génome de la cellule hôte. La seconde phase (phase tardive), débute par l'étape de transcription du provirus intégré suivi de l'épissage, étape centrale pour le contrôle de l'expression du génome viral. Puis, après l'étape d'export du noyau, s'ensuit l'étape de traduction des protéines virales, l'assemblage, la maturation des virions et enfin le bourgeonnement et le relargage des particules virales (Figure 22).

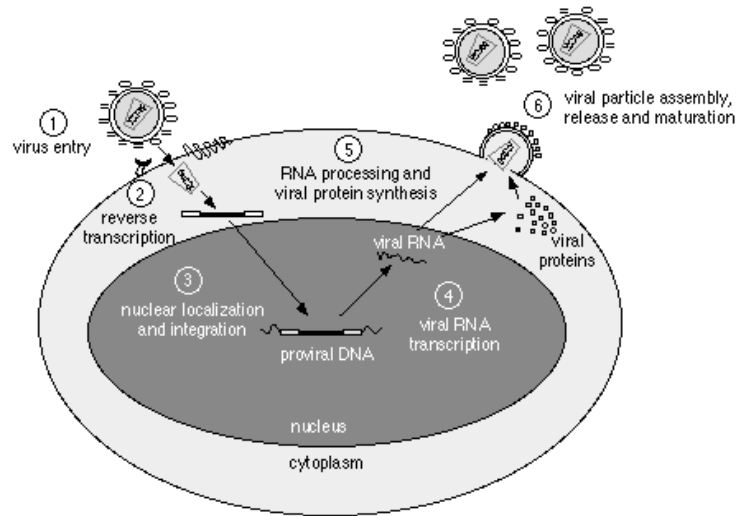


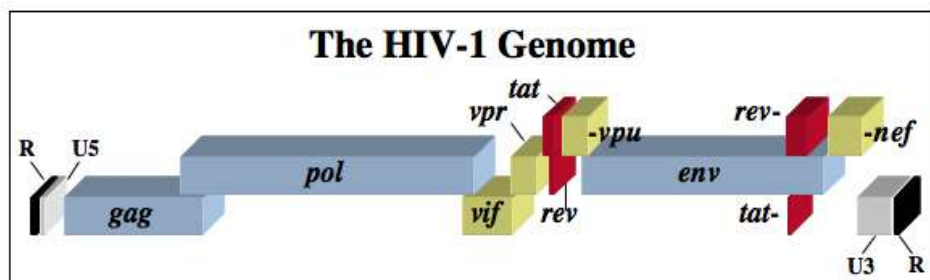
Figure 22. Cycle réplcatif simplifié des rétroviridae.

La taille du génome des rétrovirus varie de 7 à 12 kb. Les rétrovirus contiennent deux séquences virales LTR (long terminal repeat) essentielles pour la transcription des ARNm viraux. Chaque LTR est constituée des régions U3, R et U5. La région U3 de la LTR 5' contient les séquences promotrices et régulatrices de la transcription qui sont essentiellement des sites de fixation à des facteurs cellulaires. Une séquence de polyadénylation située entre les régions R et U5 de la LTR 3' apporte le signal de fin de transcription. En aval de la LTR 5' se trouve une séquence 'leader' non codante, qui comprend le PBS (Primer Binding Site) suivi d'un site donneur d'épissage (SD) et de la séquence Ψ . Le PBS sert de site de fixation pour un ARN de transfert à partir duquel s'amorce la transcription inverse. La région Ψ correspond au signal d'encapsidation de l'ARN viral génomique non épissé dans les particules en formation. En amont de la LTR 3', on retrouve la séquence PPT (PolyPurine Tract) nécessaire à la synthèse du brin positif d'ADN durant la rétrotranscription. Une amorce supplémentaire existe dans le génome du HIV-1: le PPT central. (central polypurine tract). La partie centrale du génome porte les gènes codant les protéines de la capsid, les enzymes virales (*pol*) et les glycoprotéines d'enveloppe. Le gène *gag* (Group Specific Antigen) code des protéines essentielles permettant l'assemblage et le bourgeonnement des particules virales. Il code un précurseur protéique dont le clivage permet l'obtention des protéines de la matrice, de la capsid et de la nucléocapsid. Il existe d'autres précurseurs du gène *gag* présents dans le génome des

lentivirus comme p6 qui intervient lors du bourgeonnement viral et lors de l'incorporation de Vpr dans la particule virale, ou le peptide p2 impliqué dans la sélection des ARNm non-épissés au cours de l'encapsidation (Levin JG *et al.* 2010). La protéine p12, elle, est un produit de clivage du précurseur Gag du virus de la leucémie murine et interviendrait notamment lors de la phase précoce (Prizan-Ravid A *et al.* 2010). Le gène *pol* (Polymérase) code les enzymes essentielles à la réplication virale : la protéase, la transcriptase inverse, et l'intégrase. Le gène *env* (Enveloppe) code un large précurseur qui est clivé par une protéase cellulaire pour donner naissance aux glycoprotéines de surface et trans-membranaire constituant avec les protéines de la membrane cellulaire, l'enveloppe virale.

Les lentivirus possèdent un génome un peu plus complexe, en effet ils possèdent des gènes supplémentaires codant des protéines régulatrices et accessoires. Tat (Transactivator of transcription), Rev (Regulation of expression of viral proteins) et Vif (Virion infectivity factor) sont des protéines présentes chez tous les lentivirus. Le génome du HIV comporte trois gènes supplémentaires codant les protéines accessoires Vpu (Viral protein u), Vpr (Viral protein r) et Nef (Negative regulatory factor). Les gènes *tat* et *rev* codent des protéines régulatrices essentielles à la réplication virale, tandis que les autres sont appelés gènes accessoires car leur mutation n'est pas délétère pour la réplication virale (Figure 23).

A



B

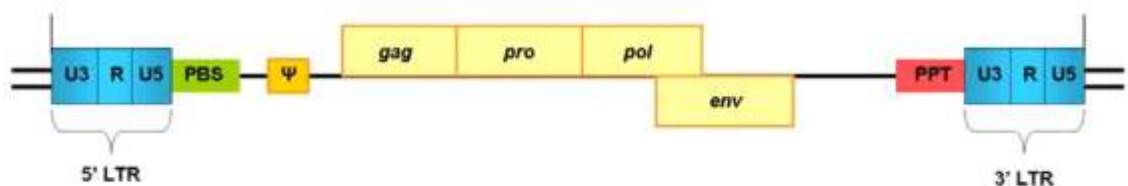


Figure 23. Génome du HIV-1 (A) et du provirus (B).

Les onco rétrovirus et lentivirus recombinants.

Le génome des rétrovirus recombinants conserve les séquences virales LTR alors que les régions codantes, servant à la réplication virale sont délétées et remplacées par des séquences d'intérêts pouvant aller jusqu'à 8 kb. Ainsi, les vecteurs rétroviraux recombinants n'expriment pas de protéines virales, et sont donc non réplicatifs. Le fait qu'il n'y ait pas expression de protéines virales limite la réponse immunitaire développée contre les épitopes viraux. Enfin, les rétrovirus recombinants ont l'avantage d'intégrer leur génome au sein du génome cellulaire ce qui permet une expression stable du transgène au cours des divisions cellulaires.

Les rétrovirus leucémogènes murins (MLV) présentent un inconvénient majeur qui est l'incapacité à infecter des cellules quiescentes. En effet, l'intégration ne peut se faire qu'après désorganisation de la membrane nucléaire, survenant lors de la mitose (Spitzer, D. *et al.*, 1999). Au contraire, les lentivirus recombinants permettent d'infecter des cellules quiescentes. Le développement de ces vecteurs a donc représenté une alternative intéressante pour de nombreux protocoles de transfert de gènes. Les lentivirus recombinants généralement pseudotypés par la glycoprotéine d'enveloppe V-SVG (glycoprotein from vesicular stomatitis virus) ont un large tropisme. Celui-ci peut être modifié par des techniques d'ingénierie moléculaire comme par exemple en modifiant quelques protéines (couplage d'anticorps ou de ligands par exemple) ou en modifiant les protéines d'enveloppe.

Au cours d'un essai clinique mené par l'équipe d'A.Fischer, des phénomènes de mutagénèses insertionnelles avaient entraîné des complications graves chez des patients présentant un déficit SCID-X1 (X-linked severe combined immunodeficiency) et traités par autogreffe de cellules médullaires transduites par des oncorétrovirus recombinants (Williams, D. A. & Baum, C., 2003). Suite à cet essai, des vecteurs plus sécurisés sont maintenant utilisés. Par exemple des vecteurs de nouvelle génération présentent une délétion dans la région U3 du LTR 3' ce qui entraîne l'auto-inactivation de l'enhancer et du

promoteur des deux LTR après intégration. Le lentivirus recombinant est plus utilisé que l'oncorétrovirus car il présente moins de risque de mutagenèse insertionnelle. En effet, le lentivirus cible préférentiellement les unités de transcription active, mais contrairement au MLV, sans préférence pour les régions proches des sites d'initiation de la transcription. En effet le MLV montrent des préférences pour les extrémités 5' des unités de transcription.

In vitro, les lentivirus recombinants sont des outils largement utilisés pour les techniques de transfert de gènes. En ce qui concerne les protocoles de thérapie génique, le premier essai couronné de succès sur un groupe d'enfants atteint du déficit immunitaire combiné sévère lié au chromosome X a fait partie des premières applications de la thérapie génique à l'aide de rétrovirus recombinants (Cavazzana-Calvo, M. *et al.*, 2000). Récemment d'autres pathologies comme l'adrenoleucodystrophie, la bêta-thalassémie, ou encore le déficit immunitaire en adénosine désaminase (ADA-SCID) ont été stoppées chez des patients après autogreffe de cellules souches de moelle osseuse génétiquement modifiées par des lentivirus recombinants (Cartier, N. *et al.*, 2009) (Cavazzana-Calvo, M. *et al.* 2010) (Aiuti, A. *et al.* 2009). Actuellement, les applications thérapeutiques des rétrovirus recombinants restent donc majoritairement associées à des applications de transfert de gènes ex vivo. Cependant un essai clinique de phase I /II est en cours chez des patients atteints de la maladie de Parkinson et traités par injection directe de lentivirus recombinants équins (Jarraya, B. *et al.*, 2009).

4.2.2.2 L'adénovirus recombinant.

L'adénovirus est un virus non enveloppé à ADN double brin linéaire de 36 kb. Le génome de l'adénovirus est encapsidé dans une structure icosaédrique comprenant majoritairement trois protéines principales : la fibre, la base du penton et l'hexon. Actuellement 51 sérotypes humains ont été identifiés. Le génome comprend deux séquences terminales inversées à chacune des extrémités servant d'origine de réplication (ITR pour Inverted Terminal Repeat). Il se compose aussi d'unités de transcription précoce (E1-E4), intermédiaire (IX, IVa2) et tardive (L1-L5) (Figure 24).

Le cycle infectieux de l'adénovirus peut être clairement divisé en deux phases : la phase précoce et la phase tardive, séparées par la réplication de l'ADN viral. La phase précoce comprend l'adsorption, la pénétration dans la cellule par endocytose, la décapsidation, le passage de l'ADN dans le noyau et enfin l'expression des gènes précoces. La réplication de l'ADN du virus peut alors commencer grâce à l'action d'une ADN polymérase cellulaire et des protéines précoces. La réplication est semi-conservatrice. Des brins bicaténaires et monocaténaires sont obtenus et vont se circulariser grâce aux ITR situés aux extrémités du génome. La phase tardive comprend la traduction des ARNm tardifs en protéines du core, de la capside et des fibres. Les gènes tardifs sont regroupés sous un seul opéron et se décomposent en 3 familles : L1, L2 et L3. La transcription s'effectue à partir d'un promoteur unique ce qui permet une expression simultanée des protéines tardives. Les ARNm tardifs vont être traduits en protéines du core, de la capside et des fibres, ce qui va permettre l'assemblage des virions et leur libération par lyse cellulaire et apoptose.

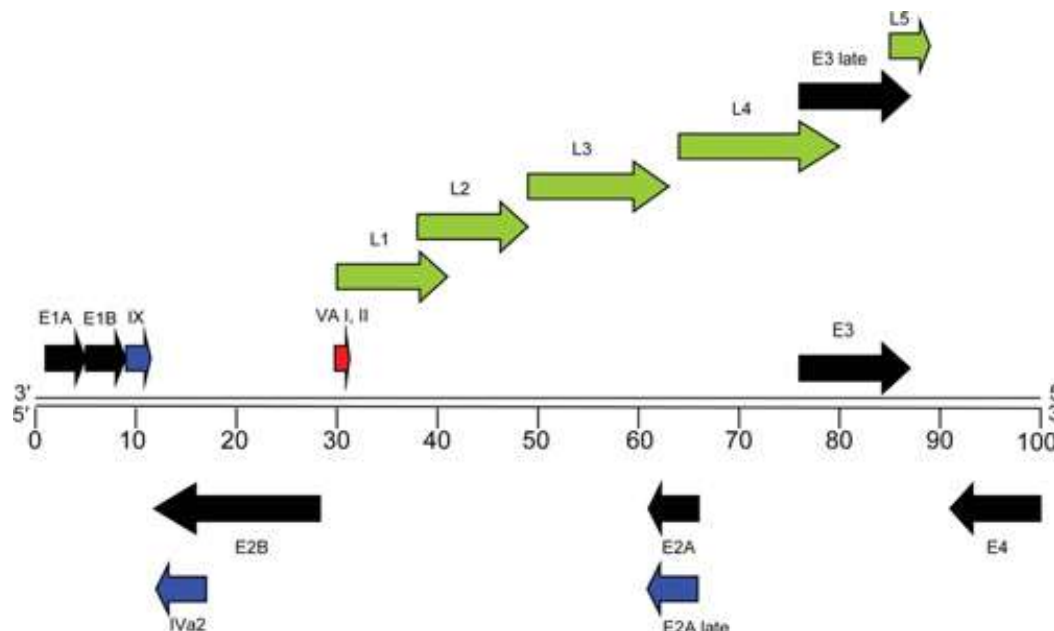


Figure 24 : Génome de l'adénovirus (Hall, K. *et al.*).

Adénovirus recombinants

Les vecteurs adénoviraux utilisés comme vecteurs de transfert de gènes sont le plus souvent dérivés des adénovirus de sérotype 2 ou 5. Ces vecteurs présentent un certain nombre d'avantages. En effet, *in vivo* les vecteurs adénoviraux présentent un large tropisme et sont capables d'infecter de façon très efficace des cellules en division ou au repos. De plus les titres obtenus en production sont très élevés, de l'ordre de 10^{12} ou 10^{13} particules totales par ml. Le génome viral reste sous forme d'épisomes dans la cellule infectée, ce qui permet d'éviter les risques de mutagenèse insertionnelle mais en contrepartie l'expression est transitoire dans les cellules en division.

Une des caractéristiques de ce vecteur est la forte réponse immunitaire cytotoxique. En effet l'expression à bas bruit de protéines adénovirales par les cellules infectées génèrent une réponse immune cytotoxique dirigée contre ses peptides viraux et déclenchée via le complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 qui entraîne l'élimination des cellules transduites. La toxicité de ce vecteur et son expression transitoire sont deux particularités qui peuvent présenter un avantage pour des applications de thérapie génique du cancer. Par contre, pour les traitements de maladies génétiques, la perte du transgène représente un inconvénient majeur.

En 1999 un patient atteint d'un déficit hépatique en OCT (ornityl carbamyl transférase) est décédé suite à une injection d'une forte dose d'un vecteur dérivé d'un adénovirus. Depuis, les efforts se concentrent sur de nouveaux types de vecteurs adénoviraux qui pourraient éviter une toxicité pour l'organisme. Le développement des vecteurs dit «Gutless», délétés de la totalité des gènes viraux à l'exception des séquences ITR et de la séquence d'encapsidation, est une des alternatives. Contrairement aux adénovirus de première ou de seconde génération, les adénovirus Gutless permettent une expression à long terme de protéine thérapeutique (Thomas, C. E. *et al.*, 2000) (Toietta, G. *et al.*, 2005). Cependant, ce vecteur est difficile à produire à grande échelle. De plus, la production de ces vecteurs nécessite l'utilisation d'un virus auxiliaire capable d'apporter en trans les facteurs nécessaires à la réplication et l'encapsidation ce qui entraîne la contamination des cultures par les virus « helper ». Actuellement, des équipes continuent à développer des techniques de purification permettant de réduire considérablement les contaminations (Dormond, E. *et al.* 2010.).

4.2.2.3 L'Adeno-associated virus

L'adeno-associated virus (AAV) est un parvovirus de petite taille (20 à 25 nm), non enveloppé et à ADN simple brin de 4,7 kb. Tout comme l'adénovirus, il possède une capside icosaédrique. Son génome est composé des gènes *rep* codant quatre protéines impliquées dans la réplication et la régulation en trans, et du gène *cap* codant trois protéines de capside. Ces régions sont encadrées par des séquences ITR de 145 paires de bases, nécessaires en cis pour la réplication et l'assemblage des particules virales (Figure 25).

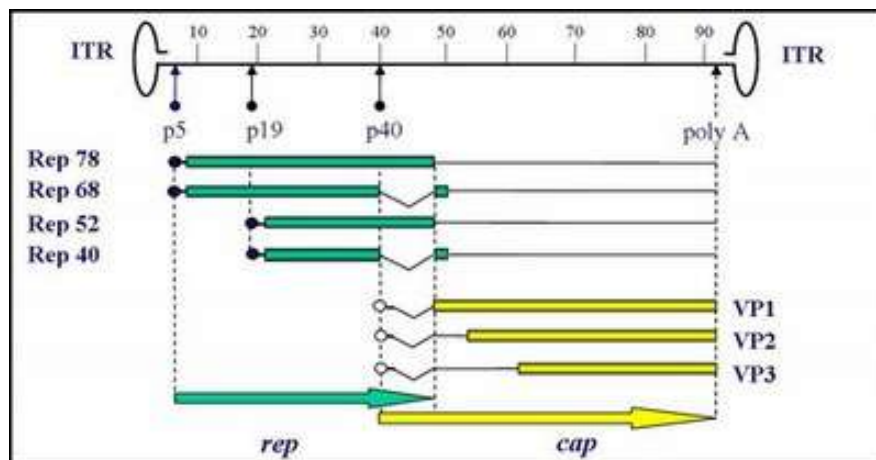


Figure 25. Génome de l'AAV sauvage.

L'AAV est un parvovirus humain dépendovirus, c'est à dire qu'il a besoin d'un virus auxiliaire tel que l'adénovirus la vaccine ou l'HSV (Herpes simplex virus) pour accomplir son cycle réplcatif. Ainsi, lorsque l'AAV infecte seul une cellule il entre dans une phase de latence caractérisée par l'absence d'expression des gènes viraux et la persistance du génome viral sous une forme intégrée et/ou épisomique. Chez l'homme, l'intégration de l'AAV se fait de façon préférentielle au niveau d'un site spécifique (AAV-S1) qui est localisé sur le bras long du chromosome 19. Lorsque l'AAV infecte une cellule

en présence d'un virus auxiliaire, il entre dans une phase répliquative qui est caractérisée par la production des protéines issues des transcrits *rep* et *cap*, par la répllication de l'ADN viral initiée au niveau des ITR et enfin par l'assemblage de nouvelles particules virales dans le noyau de la cellule.

AAV recombinants

Chez l'homme douze sérotypes ont été identifiés. Les principaux vecteurs utilisés en thérapie génique sont les sérotypes 1 à 9. Chaque sérotype possède un tropisme différent. Ainsi le foie est particulièrement bien transduit avec les sérotypes 1, 5, 8 et 9, alors que le système nerveux central sera mieux transduit avec les sérotypes 1, 4 et 5. Le génome de l'AAV recombinant conserve les deux ITR alors que les gènes *rep* et *cap* sont remplacés par le gène d'intérêt. Le génome de l'AAV sous forme simple brin est converti dans la cellule en molécules linéaire double brin le plus souvent par hybridation entre deux molécules de polarité complémentaire, ou par synthèse du second brin via l'ADN polymérase cellulaire. Cette étape est limitante pour la transduction de la cellule car le génome AAV sous forme simple brin est rapidement éliminé par la cellule. Ainsi il faut noter qu'un nouveau type d'AAV dit « self complementary » a été conçu afin de faciliter cette étape. L'AAVsc est composé d'un génome dimérique simple brin, ainsi la formation de la molécule double brin s'effectue de façon autonome par simple hybridation intramoléculaire. Ces vecteurs permettent une expression plus rapide et plus stable du transgène (Gao, G. P. *et al.*, 2006) (Kong, F. *et al.* 2010). La forme molécule linéaire double brin est ensuite circularisée. Les structures circulaires peuvent s'associer pour former des dimères ou des concatémères, structures majoritairement sous formes épisomales. Cependant il est maintenant admis que des phénomènes d'intégration peuvent avoir lieu dans différents organes, c'est d'ailleurs ce que nous et d'autres équipes avons pu observer dans le foie (Flageul, M. *et al.*, 2009) (Inagaki, K. *et al.*, 2008).

De nombreuses améliorations sont apportées au vecteur AAV notamment grâce à des stratégies qui permettent de modifier le tropisme initial. Il peut s'agir par exemple de modifier le tropisme initial d'un sérotype donné en utilisant les protéines de capsid d'un autre sérotype. Il est possible de produire un AAV portant à sa surface des protéines de

plusieurs sérotypes différents, ou encore d'ajouter des ligands spécifiques sur la capsid afin de cibler plus précisément un type cellulaire.

Les AAV possèdent un large tropisme, sont apathogènes pour l'homme et sont donc des candidats prometteurs pour les traitements de certaines maladies monogéniques. L'AAV est un vecteur utilisé dans de nombreux essais de traitements de maladies monogéniques. Par exemple de bons résultats ont été obtenus pour une pathologie rétinienne, l'amaurose de Leber conduisant à une cécité due à une mutation du gène *rpe65*. Le transfert du gène *rpe65* chez un patient a permis une nette amélioration de sa vision (Maguire, A. M. *et al.*, 2008).

Un des avantages de ce vecteur est qu'il est peu immunogène. Ainsi dans des organes immunoprivilégiés comme la rétine ou le cerveau, l'expression est stable à long terme. Dans d'autres organes comme le muscle ou le foie, l'apparition d'une réponse immunitaire vis-à-vis du produit du transgène varie en fonction du transgène, de la dose de vecteur injectée, du promoteur utilisé (spécifique ou non), du modèle animal (Martino, A. T. *et al.*, 2009). Chez l'homme vient s'ajouter le problème de la réaction immunitaire contre la capsid d'AAV virale puisqu'une partie de la population est séropositive (de façon variable selon les différents sérotypes).

Pour conclure sur ces généralités, chaque application de transfert de gènes comprend un gène, un vecteur, et une stratégie qui sont très différentes suivant l'objectif à atteindre et le tissu ou la cellule à cibler.

Foie /Régénération hépatique /Transfert de gènes

Travaux présentés

Le foie est un organe cible pour le transfert de gènes. C'est une cible unique constituée d'un parenchyme homogène et de fenestrations facilitant l'extravasation des vecteurs recombinants. De plus, le foie est facilement accessible grâce à sa vascularisation permettant aux vecteurs recombinants de l'atteindre préférentiellement après une injection systémique. Les travaux que je vais vous décrire dans les deux parties suivantes concernent deux applications distinctes de transfert de gènes dans le foie.

Partie 1: Transfert de gènes dans le foie : un outil pour une étude de lignage cellulaire dans des modèles de régénération en condition pathologique.

Nous avons utilisé le transfert de gènes comme outil permettant l'étude des lignages cellulaires hépatiques dans des modèles de régénération en condition pathologique. Comme je l'ai décrit dans l'introduction, après une hépatectomie partielle le foie est capable de réguler sa taille et sa masse à partir de ses propres hépatocytes différenciés. Cependant chez le rongeur, l'utilisation de drogues inhibant la prolifération hépatocytaire suivie d'une stimulation de régénération hépatique a permis de révéler l'existence de nouvelles populations cellulaires hépatiques. En effet, l'administration du 2-acétylaminofluorène (2-AAF) suivie d'une hépatectomie partielle conduit à la prolifération hépatique de cellules progénitrices, les cellules ovales, alors qu'un autre type cellulaire les SHPCs (Small Hepatocyte-Like Progenitor Cells) est observé lors d'un traitement par la rétroarsine.

En réalisant une étude de lignage cellulaire hépatique par marquage génétique au cours des traitements rétroarsine ou AAF, notre but a été de mieux comprendre l'origine et/ou le devenir de ces cellules.

Partie 2: Transfert de gènes dans le foie à visée thérapeutique

Le foie est le siège de nombreuses maladies héréditaires qui sont a priori susceptibles d'être traitées par thérapie génique. Au sein de l'unité 948, nous développons depuis déjà plusieurs années différentes stratégies pour le traitement de maladies métaboliques héréditaires. Des approches expérimentales utilisant différents vecteurs viraux ont été testées notamment chez le rat Gunn, modèle d'une maladie métabolique héréditaire, la maladie de Crigler Najjar.

Partie A : Corrélation entre le cycle cellulaire et l'efficacité de la transduction des hépatocytes par les lentivirus recombinants.

Dans l'optique d'effectuer un essai clinique pour une maladie monogénique métabolique héréditaire du foie, une des stratégies pourrait être de faire véhiculer le transgène d'intérêt par le lentivirus recombinant pseudotypé VSVG puisqu'il intègre son génome au sein du génome de la cellule hôte permettant ainsi une expression permanente du produit du transgène. Cependant, ce vecteur pourtant décrit pour transduire de façon efficace des cellules quiescentes, transduit très mal les hépatocytes en phase G0 du cycle cellulaire. Au contraire, les hépatocytes d'un foie en régénération (après une hépatectomie, ou chez des rongeurs jeunes) sont facilement transduits par le lentivirus. Dans cette partie, je vous décrirai deux études qui nous ont permis de mieux comprendre la corrélation entre l'efficacité de la transduction lentivirale des hépatocytes et le cycle cellulaire.

Partie B : Régulation ciblée de l'expression de gènes par des miRNA

Pour une approche de transfert de gènes in vivo, il est préférable d'obtenir une expression du transgène forte et limitée aux seules cellules cibles. Dans cette seconde partie je vous décrirai une construction originale ayant pour but d'obtenir une expression spécifique d'un produit d'un transgène au sein des hépatocytes. Cette construction utilise un système de régulation par la tétracycline, lui-même régulé par un miRNA spécifiquement exprimé dans les hépatocytes.

Partie 1

**Transfert de gènes dans le foie :
un outil pour une étude de lignage cellulaire dans des
modèles de régénération en condition pathologique.**

Introduction

L'utilisation de drogues inhibant la prolifération hépatocytaire suivie d'une stimulation de régénération hépatique a permis de révéler l'existence de nouvelles populations cellulaires hépatiques chez le rongeur. En effet, l'administration du 2-acétylaminofluorène (2-AAF) suivie d'une hépatectomie partielle conduit à la prolifération hépatique de cellules progénitrices, les cellules ovales, alors qu'un autre type cellulaire, les SHPCs (Small Hepatocyte-Like Progenitor Cells), est observé lors d'un traitement par la rétrovirusine. En réalisant une étude de lignage cellulaire hépatique par marquage génétique au cours des traitements rétrovirusine ou AAF, notre but a été de mieux comprendre l'origine et/ou le devenir de ces cellules.

1 Lignage par marquage génétique

Le lignage par marquage génétique consiste à introduire un gène marqueur au sein du génome d'une fraction cellulaire d'un organe. Le marqueur que nous avons choisi d'utiliser dans nos études est le gène *nls lacz* porteur d'un signal de translocation nucléaire de la protéine. Ce signal permet à la β -galactosidase exogène synthétisée d'être concentrée au niveau du compartiment nucléaire et ainsi de la différencier de la β -galactosidase endogène. L'avantage de la β -galactosidase est qu'elle est facilement détectable par simple coloration enzymatique ou immunohistochimique, et qu'elle n'est pas toxique pour la cellule. Pour véhiculer le gène *nls lacz* nous avons choisi d'utiliser des oncorétrovirus recombinants leucémiques murins qui se prêtent particulièrement bien aux études de lignage puisqu'ils intègrent leur génome au sein du génome de la cellule qu'ils infectent. Ainsi, chaque cellule marquée est à l'origine d'un clone cellulaire dont on peut suivre le devenir au cours du temps et dans l'espace.

1.1 Marquage à l'aide des rétrovirus recombinants

1.1.1 Chez les rats adultes

Puisque les rétrovirus recombinants n'infectent que des cellules en division, nous avons utilisé l'effet mitogène de la T3 (triiodothyronine) et du CPA (acétate de cyprotérone), pour transduire les hépatocytes. En effet, dans une précédente étude, nous avons montré l'effet additif de la T3 et du CPA sur l'activité proliférative des hépatocytes ainsi que l'existence d'une synergie pour la transduction par les rétrovirus recombinants (Pichard, V. *et al.*, 2001). Dans cette étude des rats mâles de souche Wistar ont été injectés avec des rétrovirus recombinants porteurs du gène de la β -galactosidase (1.10^9 particules infectieuses par kg). Tous les animaux ont subi deux injections de virus par voie périphérique et ont été sacrifiés dix jours après. Un groupe a reçu une injection intra péritonéale de T3 (4 mg/kg). Un autre groupe a reçu du CPA par gavage (200 mg/kg). Enfin un dernier groupe a été traité avec le CPA et la T3. L'activité mitogène a été révélée sur des biopsies hépatiques par évaluation de l'index mitotique ou par marquage de la protéine Ki67 exprimée au cours du cycle cellulaire. L'expression de la β -galactosidase a été évaluée par immunohistochimie sur les foies prélevés au sacrifice.

	Contrôle	T3	CPA	CPA+T3
Index mitotique (%)	0,24	0,61	1,03	1,13
MIB5 (%)	8,3	22,6	36	56
Bêta-galactosidase (%)	0,33	0,97	1,46	5,32

Tableau 1. Effet mitogène de la T3 et CPA (Pichard, V. *et al.*, 2001)

Les résultats, résumés dans le tableau 1 ci-dessus, montrent un effet additif de la T3 et du CPA sur l'activité proliférative du foie. De plus, nous avons confirmé que l'activité mitogène de ces drogues était permissive pour la transduction des hépatocytes *in vivo* avec des rétrovirus recombinants. Enfin, dans le groupe ayant reçu la T3+CPA, il semble exister une synergie pour la transduction oncorétrovirale.

1.1.2 Chez les rats nouveaux nés

Chez les rats nouveaux nés, l'utilisation d'agents mitogènes n'est pas nécessaire pour transduire les cellules hépatocytaires puisque l'organisme est en pleine croissance et qu'un grand nombre de cellules prolifère.

1.1.3 Chez des rats transgéniques

L'injection de rétrovirus porteurs du gène *nls lacZ* chez des rongeurs adultes induit une réponse immunitaire cytotoxique dirigée spécifiquement contre la β -galactosidase qui aboutit à l'élimination des cellules transduites (Izembart, A. *et al.*, 1999), (Aubert, D. *et al.*, 2002). Ainsi, il est possible d'utiliser des rats Sprague Dawley transgéniques porteurs du gène *lacZ*, qui n'expriment pas la β -galactosidase à l'âge adulte et qui sont tolérants pour la β -galactosidase (Menoret, S. *et al.*, 2002).

2. Première étude concernant l'origine des SHPCs

En 2004, nous avons mené une étude de lignage par marquage génétique qui avait pour but de mieux comprendre l'origine des SHPCs (Avril, A. *et al.*, 2004).

Dans cette étude les hépatocytes des rats transgéniques adultes ont été transduits par des rétrovirus porteurs du gène *lacZ*, après stimulation de la division par T3 +CPA. Une semaine après ils ont été soumis à deux administrations de rétrovirus à 37mg/Kg réalisés à 15 jours d'intervalle. Ce traitement avait pour but de bloquer la division hépatocytaire. Cinq semaines après la dernière injection de rétrovirus une hépatectomie partielle a été réalisée chez les rats. Sur les lobes réséqués, un immunomarquage a révélé 4% d'hépatocytes exprimant la β -galactosidase. Le devenir de ces hépatocytes marqués a été suivi de façon séquentielle sur des coupes de foies biopsiés à 1 mois post hépatectomie, ainsi qu'au sacrifice, soit deux mois après l'hépatectomie.

Après l'hépatectomie, nous avons observé la prolifération de SHPCs sous forme de clones. La proportion globale d'hépatocytes transduits est restée stable au cours de la régénération (Figure 26).

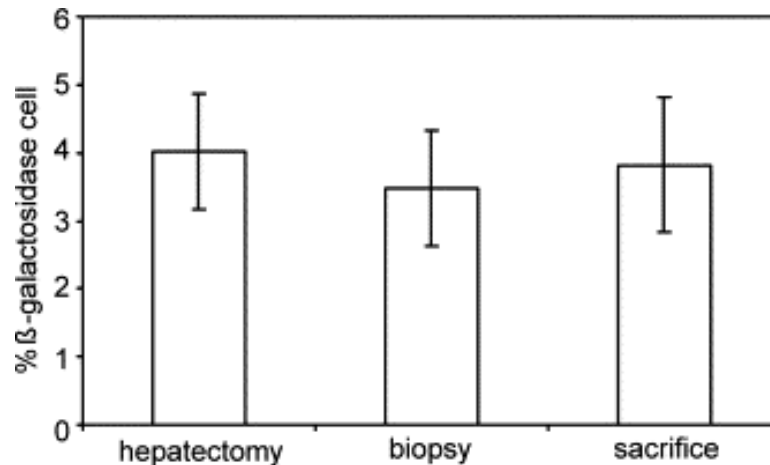


Figure 26. Proportion de cellules exprimant la β -galactosidase au cours de la régénération hépatique dans un modèle retrorsine (Avril, A. *et al.*, 2004).

De plus, certains clones de SHPCs exprimaient la β -galactosidase. Nous avons comptabilisé 4.6% de clones positifs 1 mois après l'hépatectomie et 3.8 % 2 mois après. Ces clones exprimaient la β -galactosidase dans une proportion similaire au nombre d'hépatocytes transduits au moment de l'hépatectomie. Ainsi, ces résultats suggèrent fortement que les SHPCs dérivent des hépatocytes résidents matures (Avril, A. *et al.*, 2004).

3 But de notre étude

Comme je l'ai décrit dans l'introduction, l'origine des SHPCs reste controversée. Certains pensent que les SHPCs dérivent des cellules ovales (Vig, P. *et al.*, 2006). Au contraire, récemment une équipe a montré que les SHPCs pourraient dériver des Small Hepatocytes (SH) qui sont de petits hépatocytes matures endogènes ayant une très forte capacité proliférative (Tateno, C. *et al.* 2010). Enfin, certaines équipes continuent à considérer les SHPCs comme de véritables cellules progénitrices, et restent sceptiques

quant à la pertinence de notre modèle (Best, D. H. & Coleman, W. B., 2007b). Ces auteurs ont critiqué nos travaux car dans notre modèle nous n'avions pas montré que seuls les hépatocytes étaient transduits. Ainsi, sans cette vérification, nous ne pouvions pas affirmer que les SHPCs dérivait des hépatocytes matures. De plus, nous avons utilisé des rats Sprague Dawley chez lesquels le repeuplement du foie par les SHPCs après traitement à la rétrovirus est moins efficace que chez le rat Fischer. Nous avons donc décidé de reproduire l'expérience chez le rat Fischer en vérifiant dans ce modèle que la quasi totalité des cellules transduites avant traitement étaient bien des hépatocytes.

En utilisant la même stratégie de marquage, nous avons également élargi cette étude aux cellules ovales dont l'origine ou le devenir est encore incertain (Figure 27).

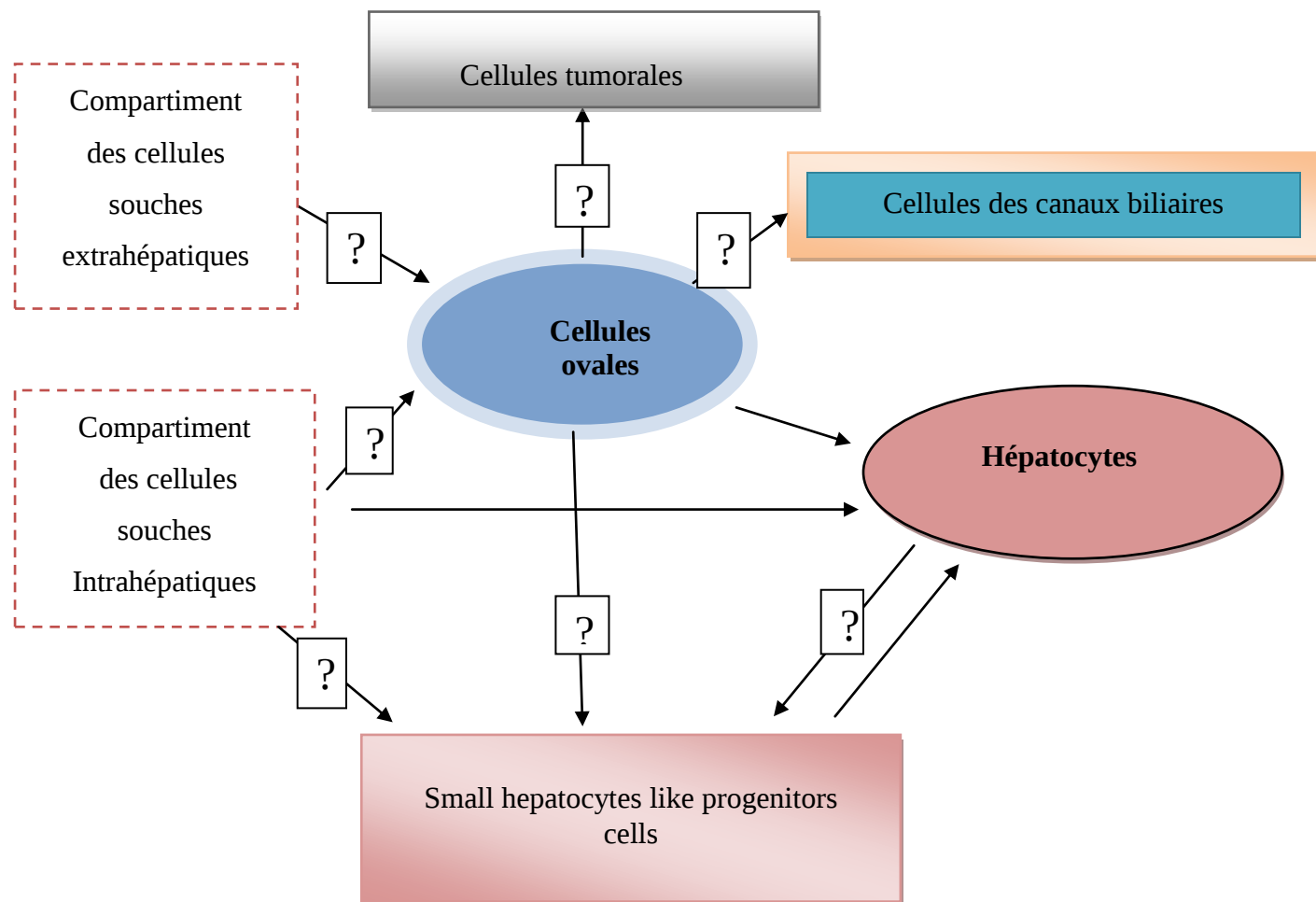


Figure 27 Origine et devenir des cellules ovales et des SHPCs.

Résultats

Nous avons choisi cette fois d'effectuer cette étude de lignage chez des rats mâles Fischer (nouveaux nés ou adultes) puisque c'est dans ce modèle que la prolifération des SHPCs est optimale. Chez le rat adulte, afin d'empêcher une réponse immunitaire vis-à-vis de la β -galactosidase, nous avons injecté en intramusculaire juste après l'injection rétrovirale un adénovirus porteur du gène de la CTLA4-IG (10^{10} particules infectieuses par animal). Le CTLA4Ig est une protéine de fusion comprenant la région constante d'une IgG1 humaine et la partie extracellulaire de la molécule CTLA4. Cette protéine est capable d'inhiber la réponse immunitaire en bloquant le signal de costimulation CD8/CD28, signal d'activation lymphocytaire T délivré par contacts membranaires avec la cellule présentatrice de l'antigène. Il faut noter que chez les rats injectés nouveaux-nés, il n'est pas nécessaire d'injecter des immunosuppresseurs puisque le système immunitaire est encore immature ce qui permet une expression du produit du transgène à long terme (Bellodi-Privato, M. *et al.*, 2005).

1 Quelles sont les cellules transduites après traitement au CPA/T3?

Les rats adultes ont reçu 2 injections de 3.10^9 particules infectieuses par kg par la veine dorsale pénienne après traitement par le (CPA) et la triiodothyronine (T3). Nous avons démontré qu'après traitement au CPA/T3 les rétrovirus recombinants ne transduisent que les hépatocytes (Pichard, V. & Ferry, N., 2008). En effet chez des rats Fischer traités avec du CPA et de la T3 puis injectés avec du rétrovirus recombinant porteur du gène lac Z, nous avons isolé les cellules hépatiques, puis séparé par gradient de percoll les cellules parenchymateuses des cellules non parenchymateuses (Tateno, C. *et al.*, 2000). Une coloration enzymatique X-gal et un dosage d'activité de la β -galactosidase ont été réalisés (Tableau 2). Dans la fraction hépatocytaire environ 9% des cellules exprimaient la β -galactosidase contre 0.25% dans la fraction de cellules non parenchymateuses. Les quelques cellules β -gal⁺ présentes dans la fraction non parenchymateuse présentaient toutes une morphologie d'hépatocyte.

Rat number	X-gal (%)	β -Gal activity (ng/mg prot)
<i>Small hepatocytes</i>		
#1	9.9	33.5
#2	11.3	48.9
#3	6.9	56.9
Mean	9.4 ± 2.2	46.4 ± 11.9
<i>Parenchymal hepatocytes</i>		
#1	9.3	24.8
#2	10.6	51.5
#3	7.5	38.7
Mean	9.1 ± 1.5	38.3 ± 13.4
<i>Non parenchymal cells</i>		
#1	0.01	0
#2	0.7	3.3
#3	0.04	0.92
Mean	0.25 ± 0.4	1.4 ± 1.7

Tableau 2- Assessment of β -galactosidase expression in labelled rats (Pichard, V. & Ferry, N., 2008)

N.B :

Chez le rat nouveau-né, injectés par la veine temporale avec 1.10^8 particules infectieuses par rat l'organisme est en pleine croissance et une multitude de cellules prolifère. Ainsi, dans ce modèle, contrairement à ce qui se passe après traitement au T3/CPA chez l'adulte, les rétrovirus recombinants ne vont pas transduire exclusivement les hépatocytes.

2 Modèles expérimentaux (Figure 28).

Les rats injectés avec les rétrovirus recombinants à l'âge adulte ou nouveau né ont été mis sous régime AAF ou sous régime rétrorsine.

Régime AAF

Les rats âgés de 7 semaines ont été mis sous régime AAF pour une durée de 15 jours. Sept jours après le début du régime, ils ont subi une hépatectomie des 2/3. Sur les lobes réséqués nous avons pu comptabiliser et caractériser les cellules marquées. Le devenir des cellules exprimant la β -galactosidase a été suivi de façon séquentielle au cours de la régénération chez les rats sacrifiés à 9 jours (pic de prolifération de cellules ovales) ou 1 mois après l'hépatectomie.

Régime Rétrorsine

Les rats âgés de 6 semaines $\frac{1}{2}$, ont subi deux injections de rétrorsine à 30 mg/kg à 15 jours d'intervalle. Cinq semaines après la dernière injection, ils ont subi une hépatectomie des 2/3. Sur les lobes réséqués nous avons pu comptabiliser le pourcentage de cellules β -gal⁺ et déterminer les types cellulaires marqués. Le devenir des cellules marquées a été suivi de façon séquentielle au cours de la régénération chez les rats sacrifiés à 15 jours (pic de prolifération des SHPCs) ou 1 mois après l'hépatectomie.

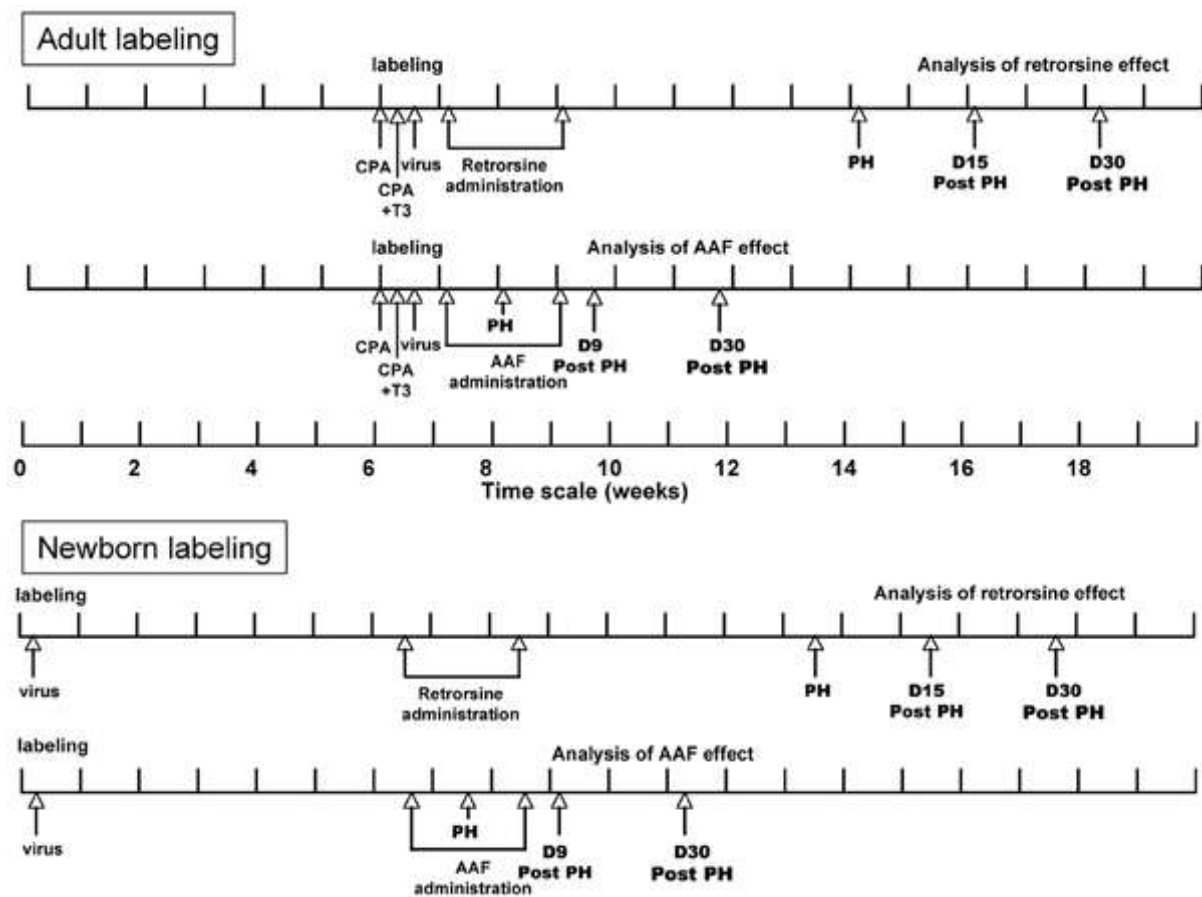


Figure 28. Modèles expérimentaux (Pichard, V. *et al.*, 2009)

Nous avons suivi et comparé le devenir des cellules transduites dans ces différents modèles, notre but étant de mieux comprendre l'origine et/ ou le devenir des cellules ovales et des SHPCs.

Direct *In Vivo* Cell Lineage Analysis in the Retrorsine and 2AAF Models of Liver Injury after Genetic Labeling in Adult and Newborn Rats

Virginie Pichard, Dominique Aubert, Nicolas Ferry*

INSERM U948, Biothérapies Hépatiques, CHU Hotel Dieu, Nantes, France

Abstract

Backgrounds and Aims: When hepatocyte proliferation is impaired, liver regeneration proceeds from the division of non parenchymal hepatocyte progenitors. Oval cells and Small Hepatocyte-like Progenitor Cells (SHPCs) represent the two most studied examples of such epithelial cells with putative stem cell capacity. In the present study we wished to compare the origin of SHPCs proliferating after retrorsine administration to the one of oval cells observed after 2-Acetyl-Amino fluorene (2-AAF) treatment.

Methodology/Principal Findings: We used retroviral-mediated nlslacZ genetic labeling of dividing cells to study the fate of cells in the liver. Labeling was performed either in adult rats before treatment or in newborn animals. Labeled cells were identified and characterised by immunohistochemistry. In adult-labeled animals, labeling was restricted to mature hepatocytes. Retrorsine treatment did not modify the overall number of labeled cells in the liver whereas after 2-AAF administration unlabeled oval cells were recorded and the total number of labeled cells decreased significantly. When labeling was performed in newborn rats, results after retrorsine administration were identical to those obtained in adult-labeled rats. In contrast, in the 2-AAF regimen numerous labeled oval cells were present and were able to generate new labeled hepatocytes. Furthermore, we also observed labeled biliary tracts in 2-AAF treated rats.

Conclusions: Our results strongly suggest that SHPCs are derived from hepatocytes and we confirm that SHPCs and oval cells do not share the same origin. We also show that hepatic progenitors are labeled in newborn rats suggesting future directions for *in vivo* lineage studies.

Citation: Pichard V, Aubert D, Ferry N (2009) Direct *In Vivo* Cell Lineage Analysis in the Retrorsine and 2AAF Models of Liver Injury after Genetic Labeling in Adult and Newborn Rats. PLoS ONE 4(9): e7267. doi:10.1371/journal.pone.0007267

Editor: Christos Samakovlis, Stockholm University, Sweden

Received: March 3, 2009; **Accepted:** September 7, 2009; **Published:** September 30, 2009

Copyright: © 2009 Pichard et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Supported by grants from Ligue Contre le Cancer. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: nicolas.ferry@inserm.fr

Introduction

Hepatic regeneration after liver injury is normally accounted for by division of mature hepatocytes. However, when hepatocyte division is impaired, proliferation of non parenchymal cells occurs to eventually replace the injured parenchyma. A large variety of animal models have been used to study the origin and the role of these non-parenchymal liver stem cells and one constant finding from these studies was the wide heterogeneity of the stem cell populations involved. Two main categories of putative hepatic progenitors have been described which differ morphologically and phenotypically: oval cells (according to the oval shape of their nucleus) and SHPCs (for Small Hepatocyte-like Progenitor Cells) [1]. Other populations of putative stem cells have been described but their actual existence is dubious, mostly because the search for specific markers of hepatic progenitor cells has not yet been completely successful. Indeed, most of the initially described markers of oval cells are actually expressed by biliary cells, fetal hepatocytes or even SHPCs. More recently-described markers also pointed out to the mixed epithelial/mesenchymal phenotype of oval cells [2]. The search for specific

markers is a critical issue since most of the knowledge regarding the origin and the fate of liver stem cells is based on such phenotypic characterisation with the assumption that cells expressing the same markers pattern may have a common origin. As an example, a number of hematopoietic markers were described in various models of oval cell proliferation (including thy-1, CD34, Sca1) supporting the hypothesis that oval cells might derived from bone marrow [3,4]. On the opposite, recent studies revealed that hematopoietic markers may be not expressed in the true stem cell fraction of the oval cell population [5,6] thus indicating that oval cells are not from bone marrow origin but may originate either from the canal of Hering as suspected long ago [7,8] or from other hepatic stem cell niches identified inside the liver [9]. The origin of SHPCs is also controversial. Many previous lineage studies in the dipin as well as in the retrorsine model of hepatic injury support the notion that SHPCs derive from hepatocytes that escape the effect of toxic compound [10,11,12]. However, it has also been suggested that SHPCs originate from a new stem cell population or even from oval cells [13,14]. However the latter hypothesis was refuted by subsequent studies [15,16].

In the present study, we wished to use *in vivo* genetic labeling to trace the fate of specific cell populations in the liver after liver intoxication with two different compounds: retrorsine which is known to induce proliferation of SHPCs and 2-Acetyl amino-fluoren (2-AAF) which results in the proliferation of oval cells. In adult animals, mature hepatocytes were specifically labeled and their lineage was analyzed in response to either drugs. We also labeled cells with lacZ recombinant retroviral vectors injected at 2 days of age in newborn animals that were subsequently treated with either of the two drugs.

Results

In a first set of experiments we analysed the fate of hepatocyte in the retrorsine and 2-AAF models of liver injury after genetic labeling of hepatocytes in adult animals. Hepatocytes were labeled with recombinant Moloney Murine Leukemia Virus (MoMuLV) vectors carrying the nls lacZ gene after a short treatment with cyproterone acetate (CPA) and triiodothyronin (T3) as previously described [12,17]. This protocol will force hepatocytes in the cell cycle to render them infectable with MoMuLV vectors [18]. To circumvent any cytotoxic immune response to β -galactosidase and allow long term transgene expression, animals received a single dose of a recombinant adenoviral vector carrying a modified CTLA4Ig as previously described. This treatment is known to suppress immune response against β -galactosidase for at least 18 weeks in most of the animals with no alteration of liver physiology [19].

After labeling, animals were divided in two cohorts and received retrorsine (n = 10) or 2-AAF (n = 9) according to the schedule

depicted in Figure 1. Liver specimens were harvested at the time of hepatectomy as well as at sacrifice in all animals.

In the retrorsine group, the liver lobes removed at partial hepatectomy revealed a mean proportion of $6.3 \pm 3\%$ of β -galactosidase positive hepatocytes (Table 1). This value is in the same range than in animals that did not receive retrorsine [11,12]. We also observed, that cells other than hepatocytes were not labeled ($<0.01\%$) as previously described [12]. The labeled cells were randomly distributed in the liver lobule, indicating indiscriminate infection of hepatocytes with the retroviral vector [11,20,21]. In two animals (R4 and R6 in Table 1), no β -galactosidase positive hepatocytes were found. However, anti β -galactosidase antibodies were found in the serum indicating that some animals may escape immune suppression induced by CTLA4Ig. Four animals were sacrificed at day 15 after hepatectomy. In these animals the mean proportion of β -galactosidase positive hepatocytes was $4.7 \pm 1.5\%$ (Figure 2). Moreover, we observed the presence of clusters of small-size hepatocytes (less than 20 cells in size) which corresponded to Small Hepatic Progenitor cells (SHPCs) as previously described [10]. These clusters were highly labeled with anti Ki67 antibody indicating a high proliferation index. As shown in Figure 3A some clusters also expressed β -galactosidase and the proportion of clusters expressing β -galactosidase was similar to the proportion of hepatocytes that were initially labeled (Table 1). Four animals were sacrificed at 4 weeks after hepatectomy. In these animals, we found larger clusters of small hepatocytes, resulting from the division of SHPCs as expected in the retrorsine model at this time point [10,11]. Moreover, at that time the Ki67 labeling was much lower, indicating a drop in cell proliferation in the clusters. We

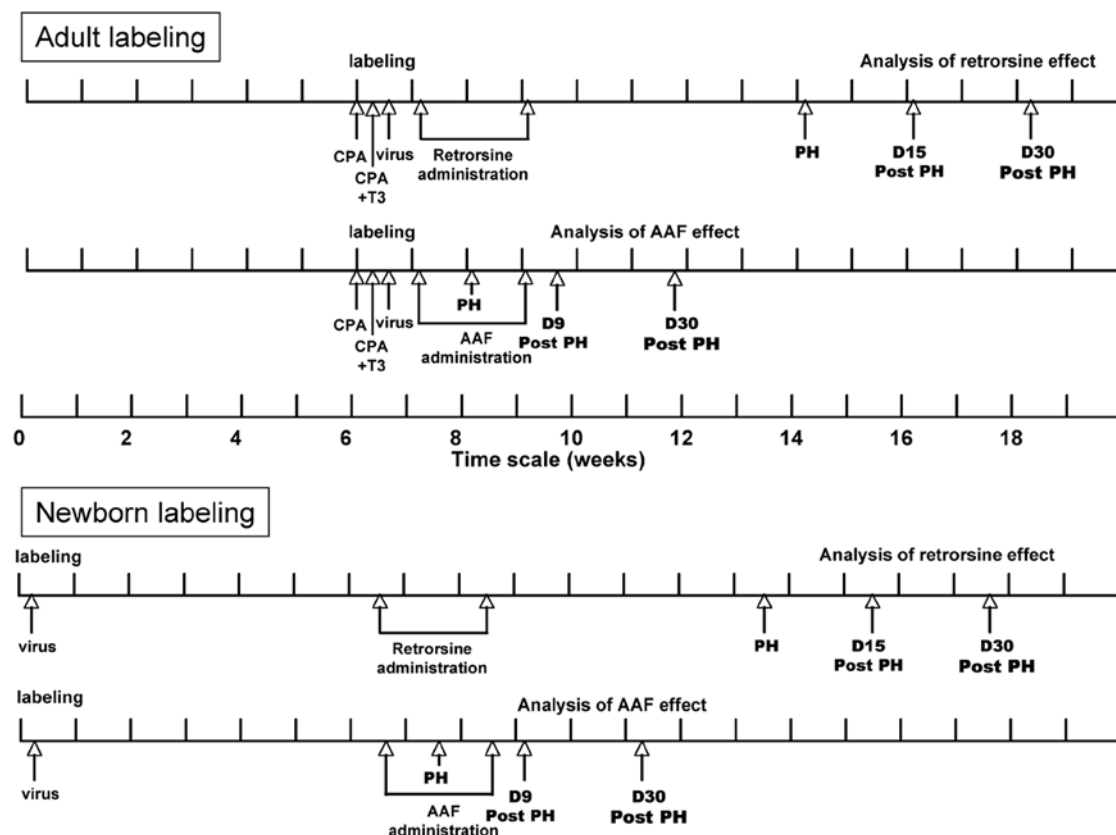


Figure 1. Schematic diagrams of retrorsine and 2-AAF treatments.

doi:10.1371/journal.pone.0007267.g001

Table 1. Quantification of β -galactosidase positive hepatocytes and clones in the liver of adult-labeled rats treated with retrorsine.

	% β gal hepatocytes	% β gal hepatocytes	% β gal hepatocytes	% β gal clones
rat number	hepatectomy	day 15	day 30	day 15
R1	11	7		10.1
R2	10.1	4.3		3.2
R3	7.2	4		5.7
R4	0			
R5	4.3	3.6		4.6
R6	0			
R7	6		4	
R8	4.5		5.6	
R9	4.4		4.6	
R10	2.6		4.1	
mean	6.3 ± 3	4.7 ± 1.5	4.6 ± 0.7	5.9 ± 2.9

doi:10.1371/journal.pone.0007267.t001

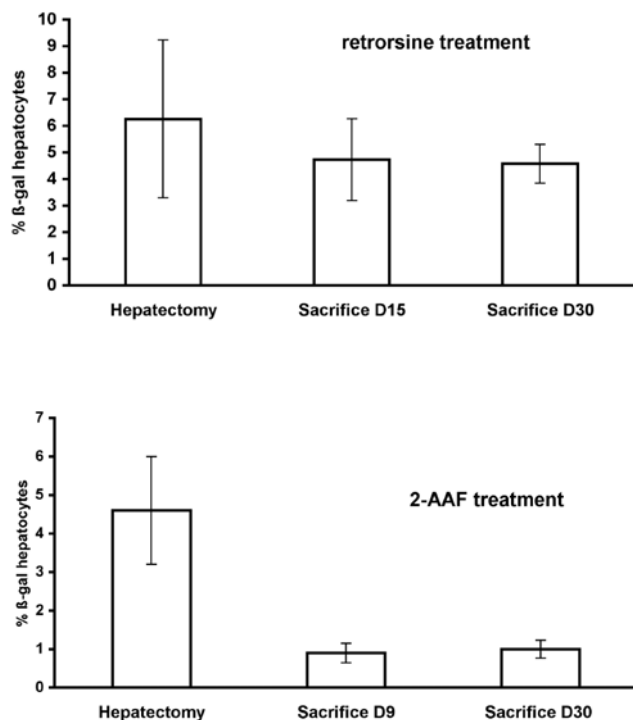
also observed that some clusters expressed β -galactosidase (Figure 3B). Because these large clusters frequently merged, precise quantification of the proportion of β -galactosidase positive clusters was not possible. However, the mean overall proportion of β -gal positive hepatocytes was $4.6 \pm 0.7\%$. We never detected clear oval cell proliferation in any section at sacrifice although transient ductular reaction was sometimes seen. Cytokeratin

staining was limited to biliary epithelial cells. These data recapitulated our previous results and showed that the mean proportion of β -galactosidase positive hepatocytes was not statistically different in livers harvested at hepatectomy or at the two times of sacrifice ($p=0.4$ using ANOVA). Moreover, the proportion of β -galactosidase clusters at day 15 was identical to the proportion of labeled hepatocytes, strongly suggesting that the clusters originated from the labeled hepatocytes that were present in the liver before retrorsine administration. To confirm that the presence of merging clusters of various sizes did not impact the counting of hepatocytes, we verified that β -galactosidase enzymatic activity was identical in liver homogenates from rats sacrificed at day 15 or day 30 (17.9 ± 6.1 ng β gal/mg protein at day 15 vs 18.5 ± 5.6 at day 30; $p=0.9$ using Student's *t* test).

In the 2-AAF cohort ($n=9$), the mean proportion of β -galactosidase positive cells at the time of hepatectomy was $4.5 \pm 1.36\%$ (Figure 2) similar to the one observed in the retrorsine group at hepatectomy ($p=0.23$ using Student's *t* test). One animal died immediately after hepatectomy from unknown cause. In the liver of rats sacrificed at day 9 post hepatectomy ($n=4$) immunohistochemistry revealed $0.9 \pm 0.25\%$ of β -galactosidase positive hepatocytes. Oval cells were detected in large amounts and were positive for Gamma Glutamyl Transpeptidase (GGT) and β -catenin. They were also labeled with a panel of anti cytokeratins antibodies which do not label hepatocytes but are known to detect oval cells with a sensitivity and specificity greater than 99% (Figure 3C–E) [22]. We never detected the presence of oval cells that were positive for β -galactosidase. Four animals were sacrificed one month after partial hepatectomy. In these animals the overall proportion of β -galactosidase hepatocytes was $1 \pm 0.23\%$. Oval cells were still present at that time, although in lower amounts, but they were consistently negative for β -galactosidase expression. It is noteworthy that in this cohort, we observed a significant decrease in the number of β -galactosidase positive hepatocytes between hepatectomy and sacrifice ($p=0.01$ using ANOVA). Lower enzyme activity was also recorded at sacrifice (6.9 ± 2.6 ng β -galactosidase/mg prot at day 9 vs 7.45 ± 1.9 at day 30) ($p=0.7$ using Student's *t* test). We also observed in the liver of animals at sacrifice the presence of rare clusters of mature hepatocytes (from 2 to 10 clones/cm²). These clusters were always larger than 20 cells (17% from 20 to 50 cells; 59% from 50 to 100 cells and 24% more than 100 cells) (Figure 3F). We already observed such β -galactosidase positive clusters after 2-AAF treatment and we hypothesized that they originated from the division of hepatocytes resistant to the toxic effect of 2-AAF [23]. We cannot completely exclude that some of them arise from labeling of rare progenitor cells because the proportion of these clusters was very low (less than 1 for 2000 cells).

Overall, our data clearly established that after retrorsine treatment the proportion of labeled hepatocytes was stable with the presence of numerous small clones of labeled hepatocytes. In contrast, following 2-AAF treatment the proportion of labeled cells dropped and only rare large clusters of labeled hepatocytes were detected. This indicated that liver regeneration proceeds from different populations in retrorsin treated and 2-AAF treated adult animals. After AAF intoxication, regeneration is known to proceed from the division of oval cells that proliferate and gradually differentiate into hepatocytes [1,24,25]. Thus in our model, genetically-labeled hepatocytes were diluted by the proliferation of non-labeled oval cells that proliferated and differentiated in non-labeled hepatocytes.

In a second set of experiments we genetically labeled liver cells by administration of recombinant nls LacZ MoMuLV vectors to newborn rats. The proportion of labeled cells was highly variable

**Figure 2.** Quantification of the number of β -galactosidase positive hepatocytes in the liver of rat labeled at adulthood and treated with Retrorsine (upper panel) or 2-AAF (lower panel).

doi:10.1371/journal.pone.0007267.g002

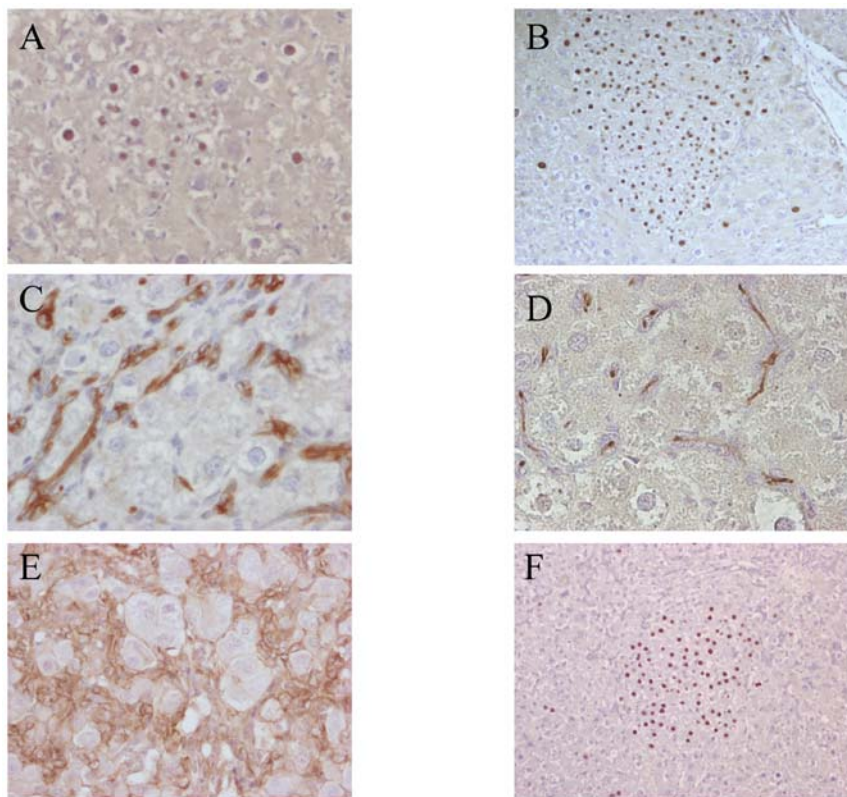


Figure 3. Histological analysis of retrorsin and 2-AAF treated rat liver after genetic labeling of mature hepatocytes in adult animals. Retrorsin model. (A) β -galactosidase positive cells gathered in clusters of small hepatocyte day 15. (B) same clusters at day 30 post hepatectomy. 2-AAF model. Immunohistochemical detection of CKs (C), GGT (D), and β -catenin (E) expressed by oval cells. (F) Clusters of β -galactosidase positive hepatocyte observed in the 2-AAF model. All sections are hematoxylin counterstained. All magnifications: $\times 400$ except $\times 200$ B and F. doi:10.1371/journal.pone.0007267.g003

between animals ranging from 0.2% to 8% when assessed at different time points. In these animals, we observed the presence of a small proportion of non-hepatocyte cells that were labeled. These cells were mainly in the portal tract represented 0.60% of all labeled cells at day 15, 1.98% at 4 weeks and 1.3% at 7 weeks. After labeling, animals were divided in two groups and received either retrorsine or 2-AAF at six weeks of age (Figure 1).

In the retrorsine group ($n = 7$) the proportion of β -galactosidase positive hepatocytes was evaluated in the liver lobes removed at partial hepatectomy. The mean proportion of β -galactosidase hepatocytes was $1.57 \pm 1\%$ (Table 2). In the labeled cells population, 1.83% of the cells were neither hepatocytes nor oval cells. The presence of β -galactosidase positive cells and the enzyme activity were analysed at sacrifice in the same animals. We observed a robust so-called “SHPC response” with the presence of numerous clusters of proliferating hepatocytes, either isolated or merging in large patches, some of which were also positive for β -galactosidase (Figure 4A–B). As shown in Table 2 there were slightly more β -galactosidase positive hepatocytes at sacrifice ($2.07 \pm 1.4\%$) than at the time of hepatectomy. However this difference was not statistically significant ($p = 0.79$ by Student's t test). At the time of sacrifice it was not possible to quantify the proportion of non-hepatocyte labeled cells. It is noteworthy that we never detected oval cells in any section either by morphological examination or by immunohistological staining (Figure 4C). This confirms that SHPCs do not arise from oval cells. Although we never detected a clear proliferation of other non parenchymal cells, we cannot exclude in this setting that some labeled hepatocytes derived from labeled progenitors.

In the 2-AAF cohort ($n = 4$), the proportion of β -galactosidase positive hepatocytes was also highly variable at hepatectomy. However, in sharp contrast to the 2-AAF treated adult cohort, there was no decrease in the proportion of β -galactosidase hepatocytes between hepatectomy and sacrifice ($p = 0.63$ using

Table 2. % β -galactosidase positive hepatocytes in the liver of rats labeled at birth.

treatment	hepatectomy	sacrifice	ratio sacr/hep
retrorsine	0.5	1	2
retrorsine	0.5	0.7	1.4
retrorsine	1.4	2.2	1.57
retrorsine	1.7	1.4	0.82
retrorsine	3.4	4.4	1.29
retrorsine	2.2	3.6	1.63
retrorsine	1.3	1.2	0.92
mean	1.57 ± 1	2.07 ± 1.4	1.36 ± 0.41
2-AAF	5.2	8.6	1.65
2-AAF	0.4	0.6	1.5
2-AAF	4	4.9	1.23
2-AAF	0.2	0.5	2.5
mean	2.47 ± 2.5	3.65 ± 4.64	1.72 ± 0.54

doi:10.1371/journal.pone.0007267.t002

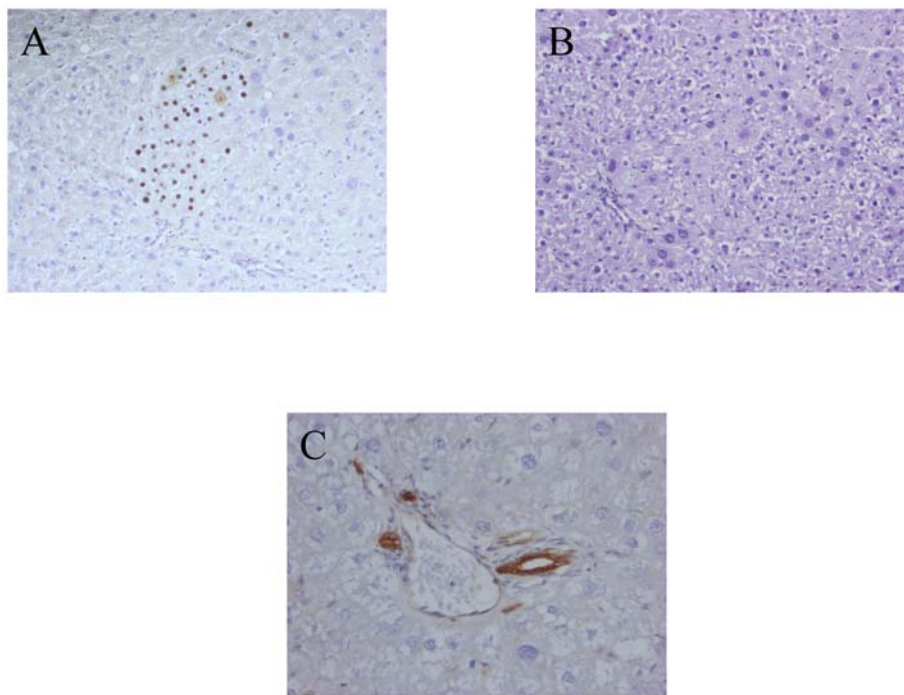


Figure 4. Histological analysis of the retrorsin model after genetic labeling of liver cells in newborn rats. Retrorsin model. (A) Cluster of SHPCs positive for β -galactosidase. (B) Hematoxylin and eosin staining showing large number of merging clusters 30 days post hepatectomy. (C) Immunohistochemical detection of CKs day 30 post hepatectomy. Oval cells are not detected. Hematoxylin counterstain. Magnification: $\times 200$ A–B: $\times 400$ C. doi:10.1371/journal.pone.0007267.g004

the Student's *t* test) (Table 2). We observed a high proportion of β -galactosidase positive oval cells. (Figure 5A). β -galactosidase expression in oval cells was confirmed by β -galactosidase and CKs immuno colocalization coupled with confocal microscopy (Fig. 5 B1–B2). The β -galactosidase positive oval cells were mainly located around the portal tract, in the vicinity of the Hering canal, suggesting that they may arise from transitional cells. The absence of decrease in the number of β -galactosidase hepatocytes in these

animals in which a proliferation of labeled oval cells occurred, strongly suggested a lineage relationship between the two populations with labeled oval cells giving rise to labeled hepatocytes. Along the same line, β -galactosidase positive hepatocytes were frequently adjacent to oval cells even at day 9 after hepatectomy (Figure 5A) suggesting that oval cell differentiation in hepatocytes is a rapid process. Another salient observation was the presence of β -galactosidase positive cells in

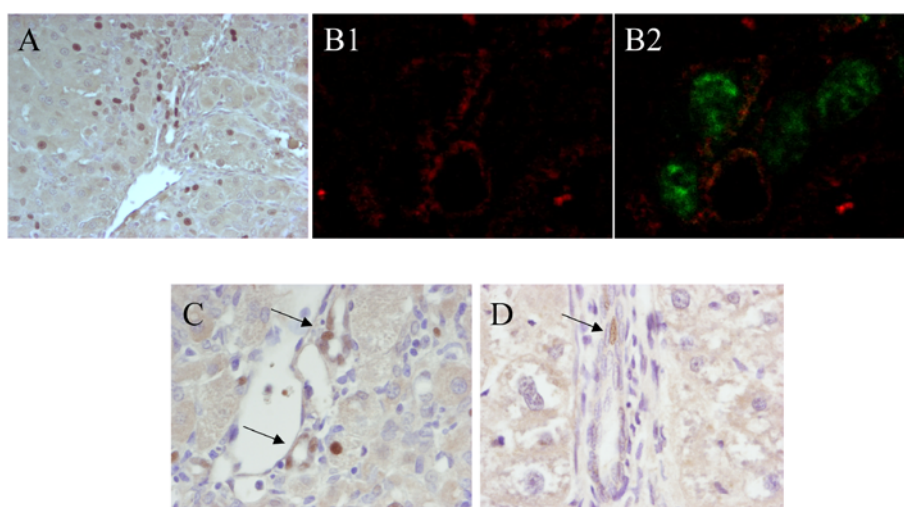


Figure 5. Histological analysis of 2-AAF model after genetic labeling of liver cells in newborn rats. (A) Detection of β -galactosidase positives oval cells. (B1) Immunofluorescent staining of CK in oval cells appearing in red (B2) colocalisation of CK with β -galactosidase appearing in green. (C) Detection of β -galactosidase positive cells in the biliary cell population (arrows). (D) Detection of a positive cells (arrow) near the Hering canal. Hematoxylin counterstain for A, C, D, Magnification: $\times 400$ except for B: $\times 1000$. doi:10.1371/journal.pone.0007267.g005

the biliary cell population (Figure 5C). These positive biliary ducts were not frequent and present in 2% of the portal space analysed.

The presence of β -galactosidase positive oval cells and biliary cells prompted us to analyse liver sections in a cohort of newborn injected animals ($n = 5$) sacrificed at 4 weeks of age (i.e. before any treatment) to look for the presence of putative oval cell precursors. In each animal, 37 to 75 portal spaces were carefully examined. The mean proportion of portal space in which a single positive cell was observed was $12 \pm 6.5\%$. In these portal spaces, the positive cells were most often in zone 1 and 3 of the portal space according to the classification of Petersen and Shupe (Figure 5D) [26]. Only two cells in zone 2 were observed indicating that biliary cells were almost never observed.

Discussion

Genetic labeling with integrative gene transfer vectors is a powerful approach to study cell lineage in various organs. In the liver, the opportunity to label cells *in vivo* makes lineage study feasible in the absence of any *ex vivo* manipulation of the cells that will be studied. In the present study, we wished to use genetic labeling with the nlsLacZ gene to compare the fate of mature hepatocytes in two models of liver injury in which replication of hepatocytes is impaired.

First we present evidence for the different cellular origin of SHPCs and oval cells. SHPCs share antigenic characteristics with hepatocytes and fetal hepatoblasts [14] but their origin has long been debated. They may arise from a distinct population of stem cells present in the liver [14,27]. Alternatively, it has been suggested that SHPCs are derived from oval cells [13]. However these results were not confirmed [15,16]. We previously presented evidence that SHPCs are derived from mature hepatocytes [11,12]. This hypothesis was also previously proposed in dipin-induced toxic injury in mice and hepatocytes resistant to dipin were shown to contribute to the regeneration process [10]. Our present results show that when only hepatocytes are labeled in the adult animals, the number of SHPC clusters expressing the label is identical to the number of labeled hepatocytes before treatment. Moreover, there is no variation in the overall proportion of β -galactosidase hepatocytes after retrorsine administration. These findings strengthen the hypothesis that "SHPCs" are the progeny of hepatocytes as we previously suggested [11]. In contrast, after 2-AAF administration in adult labeled animals the number of labeled cells drops significantly. This confirms that oval cells do not arise from hepatocytes and do not share a common origin with SHPCs. Although we cannot formally exclude the possibility that putative stem cells are labeled and give rise to SHPCs, this seems unlikely when labeling is performed in adult rats because: i) when labeling is performed in the adult rat, hepatocytes account for more than 99.9% of labeled cells using our protocol, ii) if non hepatocytes progenitors would be activated after administration of retrorsine, they should not be labeled by MoMULV vectors injected long before retrorsine administration.

Second, we observed a clear difference between animals labeled at adulthood or after birth. In newborn-labeled animals a significant proportion of non parenchymal cells was labeled. This precluded to draw any conclusion regarding the origin of mature hepatocytes in the retrorsine model. After 2-AAF injury many oval cells were labeled. In these animals the proportion of β -galactosidase positive hepatocytes was stable in contrast to the results obtained in adult-labeled animals indicating that oval cells were able to generate hepatocytes in this setting. To our knowledge this represents the first report of *in vivo* genetic labeling of oval cells. Numerous studies have already demonstrated that oval cells

isolated from a donor liver and enriched with various systems can give rise to hepatocytes after transplantation. Direct *in vivo* studies of the fate of oval cells have been previously carried out using ^3H -thymidine as a marker more than 20 years ago. Tatematsu et al. failed to get evidence for the conversion of oval cells to hepatocytes after ^3H -thymidine labeling of oval cells [28]. In contrast, Evarts et al. observed transfer of radio-labeled thymidine from oval cells to hepatocytes and suggested a precursor-product relationship between oval cells and hepatocytes [25,29]. It is worth noting that in this study differentiation of oval cells was rapid and 91% of basophilic hepatocytes contained the label 9 days after partial hepatectomy. Very low labeling was observed in acidophilic hepatocytes that are hepatocytes not originating from oval cells. In the present study we observed numerous labeled hepatocytes in the vicinity of areas of β -galactosidase positive oval cells as early as 9 days after partial hepatectomy. β -galactosidase positive hepatocytes were intermingled with clusters of β -galactosidase positive oval cells a situation compatible with a lineage relationship.

Because labeling occurred six weeks before 2-AAF administration, oval cells were not directly infected with MoMULV vectors. Therefore it is likely that in the newborn, viral vectors were able to infect hepatocytes as well as other precursor cells that were still dividing at the time of infection. These labeled precursors were thereafter detected in the portal spaces of the animals and may include Hering cells. When 2-AAF was given to these animals, the labeled precursors may have been activated to proliferate and give rise to labeled oval cells. We cannot exclude that some other precursor cells different from oval cells can be activated after retrorsine administration and contribute to the regeneration in this setting. Similarly, the labeled precursors are a likely source of labeled biliary cells that we observed after 2-AAF treatment. However, another possibility is that labeled oval cells may also differentiate *in vivo* into biliary epithelial cells. This would explain why no labeled biliary cells were detected in the retrorsine model. The bipotential capacity of oval cells has been already suggested [1]. Oval cells are supposed to proliferate and form ductular structures that communicate with the biliary system [30]. To our knowledge, no direct *in vivo* lineage analysis has yet reported the generation of biliary cells from oval cells in the liver and our data are the first indication that such lineage analysis is feasible.

In conclusion our results demonstrate the validity of genetic labeling to study cell fate in pathological conditions and support the use of this strategy in future studies of hepatic regeneration.

Materials and Methods

Animals

Male Fischer 344 rats were used in this study. They were housed at the Nantes School of Medicine animal facility. All surgical procedures were conducted according to the guidelines of the French Ministère de l'Agriculture. Rats were anesthetized by isoflurane inhalation (3% v/v).

Two-thirds hepatectomy was performed according to [31].

Cyproterone acetate (CPA) was administered by force feeding two consecutive days at a daily dose of 200 mg/kg. Triiodothyronine (T_3) was administered intra-peritoneally the second day (day 2) at a dose of 4 mg/kg. Two injections of retrovirus (i.e. 3×10^9 infectious units/kg) were performed in the dorsal penile vein [17]. In newborn animals, viral vectors were injected via the temporal vein as described previously (1×10^8 infectious units/rats) [32].

Retrorsine was added to distilled water at 10 mg/ml and titrated to pH 2.5 with 1N HCL to achieve dissolution. Subsequently, the solution was neutralized using 1 N NaOH,

and NaCl was added to a final concentration of 6 mg/ml retrorsine and 0.15 mol/L NaCl (pH 7). Retrorsine was administered by intra peritoneal injection. 2-AAF was incorporated at 0.02% in the pellet chow.

Viral vector

We used amphotropic MoMULV recombinant retroviral vectors containing the E.coli nlsLcZ gene encoding β -galactosidase gene coupled to the nuclear localization signal from the SV40 large T antigen. The viral supernatant was prepared as previously described [20] and the titer was routinely 10^9 infectious units/ml.

CTLA4-Ig recombinant adenoviral vectors were prepared by the Vector Core of Nantes Hospital as previously described [19]. They harbor the sequence encoding the extracellular portion of the murine CTLA4 fused to human IgG1 Fc fragment, placed under the transcriptional control of the CMV promoter. Recombinant CTLA4Ig adenoviral vectors were injected in the tibialis anterior at a dose of 10^{10} infectious particles/animal immediately after injection of retroviral vectors.

Histology

The following antibodies were used on formalin-fixed/paraffin-embedded sections (5 μ m): Cytokeratins (rabbit anti-cow cyto-keratine polyclonal ref Z062201 Dako, France 1:750), β -galactosidase (1:1000), gamma glutamyl transpeptidase (GGT, gift from Pr Laperche 1:150), β -catenin, (1/50), Mib5 antibody (anti Ki67 antibody, 1:50). Citrate buffer antigen retrieval was used for cyto-keratins Mib5 and β -catenin. Primary antibodies were

incubated overnight at 4°C revealed with biotinylated goat anti-mouse immunoglobulin and streptavidin-peroxidase using DAB as a chromogenic substrate. Positive cells were counted on at least 10 fields at 40 $\times$ magnification, corresponding approximately to 3000 hepatocytes. For colocalization of cytokeratin and β -galactosidase, anti CKs antibodies were incubated overnight at 4°C. After washing, sections were incubated with Cy3-conjugated anti-rabbit Ig (1/500) for 30 minutes. Anti β -galactosidase antibodies were then applied for 2 hours and revealed with FITC-conjugated anti-rabbit Ig for 30 minutes. Slides were visualized using Leica SP1 and image processing used Metamorph and ImageJ software.

β -galactosidase Assay

Beta-galactosidase activity was detected by fluorescence assay using methylumbelliferyl- β -D-galactoside as previously described [12]. Fluorescence was measured on a fluorometer, with excitation and emission wavelengths of 365 nm and 460 nm respectively.

Acknowledgments

We wish to thank the vector core from the Laboratoire de Thérapie Génique de Nantes for preparing the AdCTLA4Ig vectors. We also thank the imaging facility of IFR 26 of Nantes.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NF. Performed the experiments: VP DA. Analyzed the data: VP NF. Contributed reagents/materials/analysis tools: DA. Wrote the paper: NF.

References

1. Fausto N, Campbell JS (2003) The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev* 120: 117–130.
2. Yovchev MI, Grozdanov PN, Joseph B, Gupta S, Dabeva MD (2007) Novel hepatic progenitor cell surface markers in the adult rat liver. *Hepatology* 45: 139–149.
3. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, et al. (1999) Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284: 1168–1170.
4. Oh SH, Witek RP, Bae SH, Zheng D, Jung Y, et al. (2007) Bone marrow-derived hepatic oval cells differentiate into hepatocytes in 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy-induced liver regeneration. *Gastroenterology* 132: 1077–1087.
5. Dezso K, Jelnes P, Laszlo V, Baghy K, Bodor C, et al. (2007) Thy-1 is expressed in hepatic myofibroblasts and not oval cells in stem cell-mediated liver regeneration. *Am J Pathol* 171: 1529–1537.
6. Yovchev MI, Grozdanov PN, Zhou H, Racherla H, Guha C, et al. (2008) Identification of adult hepatic progenitor cells capable of repopulating injured rat liver. *Hepatology* 47: 636–647.
7. Mentha A, Deb N, Oertel M, Grozdanov PN, Sandhu J, et al. (2004) Bone marrow progenitors are not the source of expanding oval cells in injured liver. *Stem Cells* 22: 1049–1061.
8. Oertel M, Mentha A, Chen YQ, Shafritz DA (2007) Comparison of hepatic properties and transplantation of Thy-1(+) and Thy-1(−) cells isolated from embryonic day 14 rat fetal liver. *Hepatology* 46: 1236–1245.
9. Kuwahara R, Kofman AV, Landis CS, Swenson ES, Barendsward E, et al. (2008) The hepatic stem cell niche: identification by label-retaining cell assay. *Hepatology* 47: 1994–2002.
10. Braun KM, Sandgren EP (2000) Cellular origin of regenerating parenchyma in a mouse model of severe hepatic injury. *Am J Pathol* 157: 561–569.
11. Avril A, Pichard V, Bralet MP, Ferry N (2004) Mature hepatocytes are the source of small hepatocyte-like progenitor cells in the retrorsine model of liver injury. *J Hepatol* 41: 737–743.
12. Pichard V, Ferry N (2008) Origin of small hepatocyte-like progenitor in retrorsine-treated rats. *J Hepatol* 48: 368–369.
13. Vig P, Russo FP, Edwards RJ, Tadrous PJ, Wright NA, et al. (2006) The sources of parenchymal regeneration after chronic hepatocellular liver injury in mice. *Hepatology* 43: 316–324.
14. Gordon GJ, Coleman WB, Hixson DC, Grisham JW (2000) Liver regeneration in rats with retrorsine-induced hepatocellular injury proceeds through a novel cellular response. *Am J Pathol* 156: 607–619.
15. Best DH, Coleman WB (2007) Treatment with 2-AAF blocks the small hepatocyte-like progenitor cell response in retrorsine-exposed rats. *J Hepatol* 46: 1055–1063.
16. Best DH, Coleman WB (2007) Bile duct destruction by 4,4'-diaminodiphenylmethane does not block the small hepatocyte-like progenitor cell response in retrorsine-exposed rats. *Hepatology* 46: 1611–1619.
17. Pichard V, Aubert D, Ferry N (2001) Efficient retroviral gene transfer to the liver in vivo using nonpolypeptidic mitogens. *Biochem Biophys Res Commun* 286: 929–935.
18. Roe TY, Reynolds TC, Yu G, Brown P (1993) Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO Journal* 12: 2099–2108.
19. Puppi J, Guillonneau C, Pichard V, Bellodi-Privato M, Cuturi MC, et al. (2004) Long term transgene expression by hepatocytes transduced with retroviral vectors requires induction of immune tolerance to the transgene. *J Hepatol* 41: 222–228.
20. Aubert D, Menoret S, Chiari E, Pichard V, Durand S, et al. (2002) Cytotoxic immune response blunts long-term transgene expression after efficient retroviral-mediated hepatic gene transfer in rat. *Mol Ther* 5: 388–396.
21. Kitten O, Cosset FL, Ferry N (1997) Highly efficient retrovirus-mediated gene transfer into rat hepatocytes in vivo. *Hum Gene Ther* 8: 1491–1494.
22. Kofman AV, Morgan G, Kirschenbaum A, Osbeck J, Hussain M, et al. (2005) Dose- and time-dependent oval cell reaction in acetaminophen-induced murine liver injury. *Hepatology* 41: 1252–1261.
23. Bralet MP, Calise D, Brechot C, Ferry N (1996) In vivo cell lineage analysis during chemical hepatocarcinogenesis using retroviral-mediated gene transfer. *Lab Invest* 74: 871–881.
24. Farber E (1956) Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res* 16: 142–148.
25. Evarts RP, Nagy P, Marsden E, Thorgeirsson SS (1987) A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. *Carcinogenesis* 8: 1737–1740.
26. Petersen B, Shupe T (2008) Location is everything: the liver stem cell niche. *Hepatology* 47: 1810–1812.
27. Gordon GJ, Coleman WB, Grisham JW (2000) Temporal analysis of hepatocyte differentiation by small hepatocyte-like progenitor cells during liver regeneration in retrorsine-exposed rats. *Am J Pathol* 157: 771–786.
28. Tatematsu M, Ho R, Kaku T, Ekem J, Farber E (1984) Studies on the proliferation and fate of oval cells in the liver of rats treated with 2-acetylaminofluorene and partial hepatectomy. *Am J Pathol* 114: 418–430.
29. Evarts R, Nagy P, Nakatsukasa H, Marsden E, Thorgeirsson S (1989) *In vivo* differentiation of rat liver oval cells into hepatocytes. *Cancer Res* 49: 1541–1547.
30. Paku S, Schnur J, Nagy P, Thorgeirsson SS (2001) Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver. *Am J Pathol* 158: 1313–1323.

31. Higgins GM, Anderson RM (1931) Experimental pathology of the liver I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 12: 186–202.
32. Bellodi-Privato M, Aubert D, Pichard V, Myara A, Trivin F, et al. (2005) Successful gene therapy of the Gunn rat by in vivo neonatal hepatic gene transfer using murine oncoretroviral vectors. *Hepatology* 42: 431–438.

Discussion

Les SHPCs

Cette étude de lignage génétique démontre l'origine parenchymateuse des SHPCs et permet d'écarter l'hypothèse que ces cellules dérivent des cellules ovales.

Les SHPCs comme leur nom l'indique sont considérés par certains auteurs comme un nouveau type de progéniteur. Aucun argument ne permet d'assimiler ces cellules à des cellules souches adultes hépatiques. En effet tout comme les hépatocytes elles sont unipotentes et capables de générer des hépatocytes. Ces cellules présentent des marqueurs d'hépatocytes matures cependant il est vrai qu'elles expriment faiblement l'AFP. Or l'AFP est un marqueur d'hépatocytes fœtaux mais qui est aussi exprimée par des hépatocytes en prolifération (Tuczek, H. V. *et al.*, 1981). Les SHPCs n'ont été observées qu'après traitement à la rétroisine et plus particulièrement chez les rats Fischer mâles. Il est donc fort probable que les SHPCs soient des hépatocytes déficients en certaines enzymes du cytochrome P450, leur conférant ainsi une résistance à la rétroisine.

Récemment une équipe a suggéré que les SHPCs pourraient dériver d'hépatocytes nommés SH (Small Hepatocyte). Cette population hépatocytaire de petite taille, résidente dans le foie quiescent, est décrite comme ayant une capacité proliférative plus importante que la majorité des hépatocytes (Tateno, C. *et al.* 2010). Dans cette étude, Tateno et al. ont greffé des SHs chez des rats hépatectomisés et traités avec de la rétroisine puis ont comparé le phénotype, l'expression génique, la capacité de prolifération des SH et des SHPCs. Dans cette étude Tateno et al. soulignent les nombreuses caractéristiques des SH et SHPCs avec les hépatocytes matures, notamment l'expression des marqueurs H1, pan-cadherin, desmoplakine I, et leucine-aminopeptidase. De plus, il montre que les phénotypes des SHPCs et des SH sont identiques. Les SH se distinguent seulement des SHPCs par quelques différences dans l'expression génique. L'expression du récepteur de la transferrine est plus importante chez les SHPCs. De plus, contrairement au SHPCs, les SH expriment faiblement CYP2E1. L'équipe de Tateno propose alors que les SHPCs représentent une sous population de SH.

Le foie bien que paraissant un tissu homogène est très hétérogène d'un point de vue morphologique et immunohistochimique (Jungermann, K. & Kietzmann, T., 1996). Il existe une zonation métabolique glucidique, lipidique, xénobiotique de l'expression des gènes, en fonction notamment de la localisation des hépatocytes dans le lobule hépatique. Les hépatocytes sont donc spécialisés selon leur localisation le long de l'axe porto-central de la travée hépatocytaire. Ainsi les hépatocytes ne représentent pas une population homogène et il ne me semble pas étonnant que certains hépatocytes aient des capacités régénératives plus importantes que d'autres comme les SH, ou que d'autres soient résistants à certains xénobiotiques comme les SHPCs.

Les cellules ovales

Contrairement aux SHPCs, les cellules ovales sont véritablement considérées comme des progéniteurs hépatiques. Il est admis qu'elles peuvent se différencier en hépatocytes et nous montrons dans notre étude qu'elles ont la capacité de se différencier en cellules des canaux biliaires. En effet, chez les rats injectés nouveaux nés et traités à l'AAF, des cellules ovales marquées prolifèrent et nous observons des cellules des canaux biliaires qui expriment la β -galactosidase. On pourrait penser que les canaux biliaires proviennent d'autres types cellulaires marqués. Or ce n'est pas le cas puisque chez les rats injectés nouveaux nés et traités à la rétrovirus nous n'avons jamais observé de cellules biliaires exprimant la β -galactosidase.

Dans notre étude, nous avons marqué chez les nouveaux nés des cellules souches ou cellules intermédiaires capables de se différencier en cellules ovales. Puisque nous les avons transduites avec des oncorétrovirus recombinants cela signifie aussi que ces cellules étaient en division au moment de l'infection. Ceci n'est pas surprenant, puisque dans un organisme en pleine croissance les cellules souches s'autorenouvellent (division symétrique) et se différencient (division asymétrique) afin de générer les tissus. Notre étude ne nous a pas permis de déterminer l'origine intra ou extrahépatique des cellules ovales.

Les cellules ovales, retrouvées chez l'homme sont de véritables cellules souches capables de se différencier en hépatocytes cependant leur éventuelle utilisation pour des thérapies cellulaires est limitée car cette population hétérogène reste encore mal

caractérisée, et son rôle potentiel dans la carcinogénèse hépatique reste à déterminer.

Cellules souches et thérapie cellulaire

Démontrer qu'il est possible d'identifier, d'isoler et de cultiver des cellules capables de se différencier en hépatocytes font l'objet de nombreuses études. En effet ces recherches ouvrent de nombreuses perspectives thérapeutiques. Par exemple, maintenir in vitro des cellules souches hépatiques afin de pouvoir obtenir rapidement de grandes quantités d'hépatocytes pourrait être très utile pour la transplantation de patients atteints d'insuffisance hépatique aiguë. De plus, des cellules souches de malades atteints de maladies hépatiques héréditaires pourraient être isolées puis modifiées génétiquement ex vivo par transfert du gène et enfin reimplantées chez les patients afin que ces cellules corrigées recolonisent le parenchyme hépatique.

Actuellement une des pistes les plus prometteuses concerne les études sur les cellules souches humaines pluripotentes induites puisque ces cellules sont capables de proliférer indéfiniment in vitro et de se différencier en hépatocytes. Cependant le potentiel de ces cellules n'a pas encore été très bien démontré in vivo. Il faut rester prudent, bien souvent les cellules se prêtent in vitro à des transformations qui n'ont pas d'équivalent in vivo. De plus, des informations importantes concernant par exemple l'immunogénicité de ces cellules, ou le risque de formation maligne reste à déterminer.

Le repeuplement du foie par des greffes de cellules souches ou hépatocytes allogéniques a été réalisé avec succès dans des modèles dans lesquels un avantage sélectif est donné aux cellules (traitement avec la monocrotaline ou rétrovirus suivi d'une hépatectomie par exemple). Cependant ces modèles ne sont pas transposables à l'homme, et l'une des difficultés majeures de la thérapie cellulaire hépatique est l'implantation d'une proportion suffisante de cellules dans le foie du receveur en l'absence d'avantage sélectif donné aux cellules greffées.

Ainsi la thérapie génique in vivo reste une stratégie de choix pour le traitement des maladies hépatiques héréditaires.

Partie 2: Transfert de gènes dans le foie à visée thérapeutique

**Partie A : Corrélation entre cycle cellulaire et efficacité
de la transduction des hépatocytes par les lentivirus
recombinants**

Introduction

Au sein de l'unité 948, nous développons depuis déjà plusieurs années différentes stratégies pour le traitement de maladies métaboliques héréditaires. Des approches expérimentales utilisant différents vecteurs viraux ont été testées notamment chez le rat Gunn, modèle de la maladie de Crigler Najjar. Cette maladie génétique rare (1 cas sur 1 million de naissance), est autosomale et récessive. Elle est due à un déficit en bilirubine UDP-Glucuronosyl transférase (UGT1-A1). Cette enzyme catalyse le métabolisme de la bilirubine. La bilirubine dérive essentiellement de l'hémoglobine, est hydrophobe et transportée par l'albumine dans le plasma. Elle doit être rendue hydrosoluble pour être excrétée dans la bile. Ainsi dans le foie, elle est conjuguée avec un groupe polaire hydrophile, l'acide D-glucuronique. Cette réaction de glucuro conjugaison est catalysée par l'UGT1A1. Les patients atteints de la maladie de Crigler Najjar, présentent un déficit en UGT1-A1 et par conséquent un défaut de conjugaison qui entraîne une accumulation de bilirubine dans l'organisme. Les liaisons avec l'albumine sont alors saturées et la bilirubine non conjuguée en excès libre dans le plasma peut diffuser à travers les membranes cellulaires pouvant provoquer des troubles graves comme l'ictère nucléaire.

Cette maladie peut être classée en type 1 ou en type 2 selon la réponse au traitement inducteur par le phénobarbital. Les patients atteints de la maladie de Crigler Najjar de type 2 ont une activité UGT1 augmentée en présence de barbiturique. Le type 1 ne répond pas au traitement et le déficit en UGT1 est total, il n'y a aucune activité de l'enzyme (Brierley, C. H. & Burchell, B., 1993). Le Crigler Najjar de type 1 est non inductible et le seul traitement est la photothérapie. Des séances d'environ 10 heures par jour permettent la formation de photoisomères de la bilirubine plus hydrosoluble et donc plus facilement excrétée. La transplantation hépatique reste le seul traitement curatif radical de la maladie. La thérapie génique peut être une alternative à la transplantation hépatique, puisque c'est une maladie monogénique, que le foie est histologiquement sain et enfin que la restauration de 5% à 10% d'activité enzymatique suffirait pour que les malades retrouvent une vie normale.

Il existe un modèle animal naturel pour la maladie « le rat Gunn » qui lui aussi présente un déficit complet de conjugaison de la bilirubine (Sato, H. *et al.*, 1990). Ceci en fait un bon modèle d'autant plus que l'enzyme UGT1 du rat est très semblable à l'UGT1 humaine. De nombreuses études menées chez le rat Gunn, ont montré la faisabilité d'une approche de thérapie génique dans cette affection que ce soit à l'aide de vecteurs viraux ou non viraux, par des approches *in vivo* ou *ex vivo* (Toietta, G. *et al.*, 2005), (Seppen, J. *et al.*, 2003), (Aubert, D. *et al.*, 2002), (Nguyen, T. H. *et al.*, 2005a), (Fox, I. J. *et al.*, 1995; Tada, K. *et al.*, 1998).

Au laboratoire nous avons testé la possibilité de réaliser le transfert de gènes dans le foie à l'aide de rétrovirus recombinants. Nous avons travaillé tout d'abord avec l'oncorétrovirus recombinant qui infecte exclusivement des hépatocytes en phase mitotique puis dans un second temps nous avons testé le lentivirus capable lui d'infecter des cellules quiescentes.

1. Les oncorétrovirus recombinants : efficacité dans un foie en régénération

1.1 Oncorétrovirus dans un foie en régénération

Les oncorétrovirus recombinants infectent très bien les cellules qui se divisent, et intègrent le génome au sein de la cellule hôte permettant ainsi une expression permanente du produit du transgène. Plusieurs études ont montré que le transfert de gènes via les rétrovirus recombinants chez les nouveaux nés (petit ou grand modèle animal) permettait une expression à long terme de protéines thérapeutiques, du fait de l'intégration du transgène, mais aussi grâce à l'induction d'une tolérance vis-à-vis du produit du transgène en raison de l'immaturité du système immunitaire du nouveau-né (VandenDriessche, T. *et al.*, 1999) (Ponder, K. P. *et al.*, 2002). Ainsi, concernant la maladie de Crigler Najjar, nous avons montré que l'injection d'oncorétrovirus porteurs du cDNA de l'UGT1 humaine chez des rats Gunn âgés de deux jours, entraînait une correction complète et permanente de l'hyperbilirubinémie (Bellodi-Privato, 2005).

1.2 Oncorétrovirus dans un foie quiescent

Le MLV n'infecte que des cellules en division ainsi pour transduire les hépatocytes d'un foie adulte il faut induire leur prolifération. En injectant des rétrovirus après une hépatectomie partielle autour du pic de mitose, il est possible d'obtenir un fort taux de transduction. En effet chez le rat, 24 heures après une hépatectomie, l'injection de 1.10^9 particules infectieuses par kg permet d'obtenir jusqu'à 60% d'hépatocytes transduits (Kitten, O. *et al.*, 1997). L'utilisation d'agents mitogènes comme les facteurs de croissance (l'HGF par exemple) (Bosch, A. *et al.*, 1998), permettent aussi de transduire les hépatocytes (Forbes, S. J. *et al.*, 1998). De même, nous avons montré l'effet additif de la T3 et du CPA sur l'activité proliférative du foie et confirmé que l'activité mitogène de ces drogues permettait la transduction oncorétrovirale des hépatocytes (Pichard, V. *et al.*, 2001).

L'utilisation d'oncorétrovirus recombinants chez des rongeurs adultes permet de transduire une fraction significative d'hépatocytes et permet la correction de certaines maladies hépatiques héréditaires comme la tyrosinémie héréditaire de type 1 ou la maladie de Crigler Najjar (Overturf, K. *et al.*, 1996) (Aubert, D. *et al.*, 2002). Nous avons montré en effet que chez le rat Gunn adulte l'injection de 10^9 particules infectieuses d'oncorétrovirus véhiculant l'ADNc UGT1A1 24 heures après une hépatectomie partielle permettait de transduire une fraction significative des hépatocytes et de corriger l'hyperbilirubinémie (Aubert, D. *et al.*, 2002). Cette correction n'avait pas pu être observée à long terme en raison du déclenchement d'une réponse immunitaire dirigée contre l'UGT1A1 qui n'est pas synthétisée chez le rat Gunn et n'est donc pas reconnue comme une protéine du soi. Notre équipe a mis différentes stratégies en place pour contourner la réponse immunitaire vis vis d'un produit d'un transgène après administration systémique de rétrovirus recombinants à haut titre. Ces stratégies ont consisté par exemple à restreindre l'expression du transgène aux hépatocytes en utilisant une technique chirurgicale de foie isolé perfusé (Podevin, G. *et al.*, 2004). D'autres stratégies ont consisté à induire soit une tolérance périphérique en utilisant des immunosuppresseurs (LF15-0195 ou CTLA4-Ig) (Puppi, J. *et al.*, 2004), soit une tolérance centrale en créant un chimérisme

hématopoïétique dans l'organisme par autogreffe de cellules souches de moelle génétiquement modifiées (Pichard, V. *et al.*, 2006).

1.3 Inconvénients de l'oncorétrovirus recombinants

L'oncorétrovirus peut permettre de corriger des maladies métaboliques du foie mais pour une utilisation clinique, il présente deux inconvénients majeurs :

Le premier inconvénient est le risque de mutagénèse insertionnelle. En 1999 l'équipe d'Alain Fisher avait traité 10 patients à l'aide d'un vecteur rétroviral murin MFG (dérivé du MoMuLV) par transfert *ex vivo* du gène γc dans des précurseurs médullaires CD34⁺. Une correction stable du déficit immunitaire avait été obtenue chez neuf d'entre eux (Cavazzana-Calvo, M. *et al.*, 2000). Trois ans après le traitement certains enfants ont développé une prolifération clonale de lymphocytes T différenciés partageant certaines caractéristiques avec des cellules leucémiques (Hacein-Bey-Abina, S. *et al.*, 2003). Deux insertions ont été identifiées au sein ou à proximité du locus d'un proto-oncogène, LMO-2 (LIM domain only-2). L'insertion du provirus dans le premier intron dans l'un des cas, et près du promoteur dans l'autre, a provoqué un effet enhanceur du LTR viral sur la transcription du gène LMO-2. Or l'expression aberrante de LMO-2 est associée à une forme de leucémie aiguë lymphoblastique. Même s'il a été montré que le risque d'insertion proche du locus LMO-2 serait lié spécifiquement à l'âge des jeunes enfants et de la pathologie, il a aussi été montré que les MLV s'intègrent de façon préférentielle dans une région de 5 kb en amont ou en aval du site d'initiation de la transcription des gènes (Wu, X. *et al.*, 2003) (Schroder, A. R. *et al.*, 2002) (Mitchell, R. S. *et al.*, 2004).

Le second inconvénient est qu'il n'infecte que des hépatocytes en division. En effet, des études ont montré qu'après blocage des cellules en G0 par privation de sérum, G1/S par de l'aphidicoline, ou G2 par la génistéine, des cellules ne pouvaient pas être infectées par le MLV recombinant (Hatzioannou, T. & Goff, S. P., 2001) (Zhang, S. *et al.*, 2006) (Figure 29). En effet, le complexe de préintégration (PIC) acheminé jusqu'au noyau vraisemblablement via le réseau de microtubules, ne peut pénétrer dans le noyau que lors

de la rupture de l'enveloppe nucléaire c'est-à-dire pendant la mitose mais les mécanismes exactes concernant le passage du PIC dans le noyau sont encore mal compris.

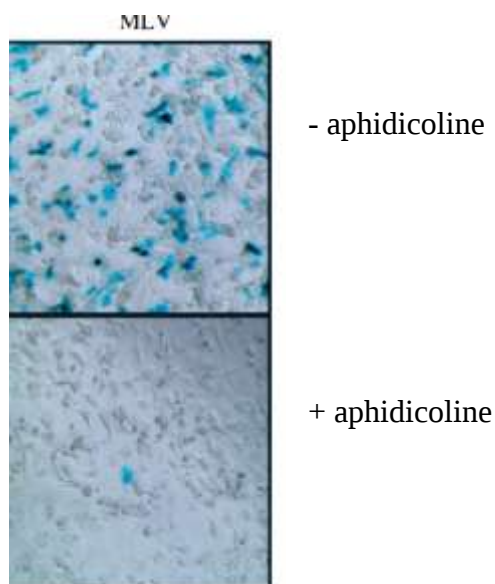


Figure 29 Blocage des cellules an G1/S et infection avec un oncorétrovirus(Hatzioannou, T. & Goff, S. P., 2001)

Le fait que l'oncorétrovirus recombinant n'infecte que des hépatocytes en division présente un inconvénient pour une éventuelle utilisation en clinique, puisqu'il faudrait envisager chez des patients adultes avant l'injection rétrovirale l'administration de doses aiguës d'agents mitogènes, ou un acte chirurgical comme l'hépatectomie partielle.

2. Les lentivirus recombinants : une alternative aux oncorétrovirus ?

2.1 Le lentivirus moins de risque de mutagénèse insertionnelle

Le lentivirus recombinant présente moins de risque de mutagénèse insertionnelle que l'oncorétrovirus. En effet, le lentivirus cible spécifiquement les unités de transcription actives mais, contrairement au MLV, sans préférence pour les régions proches des sites d'initiation de la transcription (Schroder, A. R. *et al.*, 2002) (Mitchell, R. S. *et al.*, 2004). De plus les lentivirus recombinants de nouvelle génération présentent une délétion dans la région U3 du LTR 3' qui entraîne l'inactivation de l'enhancer et du promoteur des deux LTR après intégration. Enfin il faut noter qu'il est possible d'utiliser des lentivirus mutés pour l'intégrase, qu'on nomme «lentivirus non intégratif», développés justement pour éviter le risque de mutagénèse insertionnelle et capable de transduire différents tissus comme le cerveau, le muscle ou le foie (Bayer, M. *et al.*, 2008) (Matrai *et al.*, 2011).

2.2 Le lentivirus recombinant infecte des cellules quiescentes

De nombreux travaux comparatifs entre les oncorétrovirus et les lentivirus ont mis en évidence une différence fondamentale entre ces deux rétrovirus. En effet le lentivirus recombinant infecte des cellules quiescentes. Contrairement à l'oncorétrovirus, dans le cas du lentivirus recombinant, la présence d'une triple hélice au centre du génome du HIV nommée flap et générée par la présence du Cppt pourrait favoriser le passage des pores nucléaires (Zennou, V. *et al.*, 2000). Des signaux de localisation nucléaire contenus dans la protéine MA, la protéine accessoire Vpr ou l'intégrase favoriseraient aussi le transport du PIC du HIV dans le noyau (Sherman, M. P. & Greene, W. C., 2002).

2.3 Le lentivirus recombinant : difficulté à infecter certaines cellules quiescentes

Le lentivirus est donc capable d'infecter des cellules quiescentes, d'intégrer son génome au sein de la cellule hôte avec un risque limité de mutagenèse insertionnelle. Le lentivirus recombinant le plus couramment utilisé est revêtu de glycoprotéines du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV-G), et transduit de nombreux types cellulaires quiescents *in vivo* (neurones, cellules musculaires) (Blomer, U. *et al.*, 1997) (Sonza, S. *et al.*, 1996). Cependant, ce vecteur ne permet pas de transduire tous les types cellulaires à l'état de quiescence. En effet, pour certaines cellules un certain niveau de différenciation est requis c'est le cas des cellules dendritiques par exemple. En effet les cellules dendritiques immatures s'infectent très bien par les lentivirus alors que les cellules dendritiques matures sont réfractaires à l'infection (Salmon, P. *et al.*, 2001). D'autre part, certains types cellulaires comme les monocytes, les lymphocytes B et T en phase G0, sont complètement réfractaires à la transduction par des lentivirus pseudotypés VSVG. Il a été montré que la transduction des lymphocytes T par des lentivirus recombinants requiert un minimum de stimulation avec des cytokines ou autres facteurs les faisant entrer en phase G1b (Dardalhon, V. *et al.*, 2001) (Korin, Y. D. & Zack, J. A., 1998).

La restriction de l'infection dans les lymphocytes T quiescents par le lentivirus sauvage ou recombinant a été très étudiée et il a été montré que ceci pouvait être attribué à de multiples blocages. Par exemple dans les cellules quiescentes il est observé un processus plus lent de la transcription inverse qui pourrait entraîner une dégradation de l'ADN linéaire pré-intégratif (Gao, W. Y. *et al.*, 1993). De plus, certains facteurs de restriction actifs seulement dans les cellules quiescentes T pourraient alors exercer leur activité anti virale. BAF (Barrier-to-autointegration factor) par exemple qui favorise l'import nucléaire est détecté dans les cellules T activées, mais pas dans les cellules quiescentes (Mansharamani, M. *et al.*, 2003). Récemment une équipe a montré que JNK (c-Jun N-terminal kinase) et l'enzyme PIN 1 (peptidyl prolyl-isomerase) ne sont pas exprimées dans les lymphocytes T quiescents et que ces facteurs permettent d'augmenter la stabilité de l'intégrase et sont donc essentiels pour l'infection des cellules par le lentivirus (Manganaro, L. *et al.* 2010). Ainsi dans le cas du lymphocyte T, il existe une corrélation entre le cycle cellulaire et l'acquisition de la susceptibilité à la transduction lentivirale pseudotypée V-SVG.

2.4 Le lentivirus recombinant et transduction des hépatocytes quiescents

Le lentivirus recombinant transduit très bien les hépatocytes en prolifération. Après une hépatectomie partielle, la transduction lentivirale augmente de 30 fois et il est possible d'obtenir jusqu'à 60 % d'hépatocytes transduits (Park, F. *et al.*, 2000) (Ohashi, K. *et al.*, 2002). Ce vecteur transduit très bien les hépatocytes de nouveau nés ou de jeunes rongeurs (Park, F. *et al.*, 2000) (Park, F. *et al.*, 2003; Nguyen, T. H. *et al.*, 2005a; Nguyen, T. H. *et al.*, 2007) (Nguyen, T. H. *et al.*, 2005a). Nous avons montré qu'en injectant $1.5 \cdot 10^{10}$ TU/kg chez des rats de 6 semaines, ayant un foie encore en pleine croissance, près de 50% des hépatocytes sont transduits (Schmitt, F. *et al.* 2010). Or chez des rats de 10 semaines, injectés avec la même quantité de lentivirus, à peine 0.2% des cellules sont transduites. En effet le lentivirus recombinant transduit mal les hépatocytes en G0. Tout comme pour le lymphocyte T, l'efficacité de l'infection lentivirale semble être dépendante du cycle cellulaire. Certaines équipes réfutent cette hypothèse et montrent que ni l'activation du cycle cellulaire ni la division hépatocytaire ne sont requises pour une bonne efficacité de transduction (Pfeifer, A. *et al.*, 2001) (VandenDriessche, T. *et al.*, 2002). Pfeifer et al. ont injectés tous les jours 50mg/kg de BrdU à des souris. Après 3 semaines de traitement les souris ont été injectées avec $1 \cdot 10^9$ particules infectieuses de lentivirus recombinants porteurs du gène de la *gfp*. Quinze jours après, les souris ont été sacrifiées et 5.3% des hépatocytes exprimaient la GFP. Moins de 1% des hépatocytes transduits étaient marqués au BrdU. Pfeifer et al. ont donc conclu que les hépatocytes quiescents pouvaient être transduits par les lentivirus recombinants.

Notre hypothèse est que la progression dans le cycle est importante pour une bonne transduction lentivirale, mais que la simple initiation des hépatocytes, (ou priming), pourrait suffire à favoriser la transduction. En effet, une équipe a montré qu'en traitant des souris avec de l'IL6, la transduction lentivirale augmentait de 10 fois (Picanco-Castro, V. *et al.*, 2008). Or l'IL6 est un agent initiateur. De plus, les hépatocytes en culture qui sont en phase G1, sont très bien transduits par les lentivirus recombinants (Seppen, J. *et al.*, 2002).

Résultats 1

Afin de démontrer la corrélation entre l'entrée en cycle des hépatocytes et l'efficacité de la transduction lentivirale, nous avons utilisé l'acide cholique décrit comme capable d'initier le cycle cellulaire hépatique (Huang, W. *et al.*, 2006). Nous avons aussi utilisé le phénobarbital et l'hépatectomie partielle qui induisent des divisions hépatocytaires afin d'étudier si l'efficacité de la transduction pouvait être corrélée à une division cellulaire complète.

**Priming of hepatocytes enhances in vivo liver transduction
with lentiviral vectors in adult mice**

Journal:	<i>Human Gene Therapy</i>
Manuscript ID:	HUM-2011-010.R3
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Pichard, Virginie; INSERM U948, Biothérapies hépatiques BONI, Sébastien; INSERM U948, Biothérapies hépatiques Baron, William; INSERM U948, Biothérapies hépatiques Nguyen, Tuan; INSERM U948, Biothérapies hépatiques Ferry, Nicolas; INSERM U948, Biothérapies hépatiques
Keyword:	Inborn Errors of Metabolism - Includes hemophilia < C. Disease Models and Clinical Applications, RNA Virus Vectors < A. Viral Vector Development

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Priming of hepatocytes enhances *in vivo* liver transduction
with lentiviral vectors in adult mice

Virginie Pichard^{1,2}, Sébastien Boni^{1,2}, William Baron^{1,2}, Tuan Huy Nguyen^{1,2,*} and Nicolas
Ferry^{1,2,*}

¹ INSERM U948 and ² Université de Nantes,
CHU Hotel Dieu
44093 Nantes Cedex
France

Short title: lentiviral transduction of hepatocyte

* these two authors contributed equally to this work (co-last authors)

Corresponding author:
Dr Nicolas Ferry M.D. Ph.D.
INSERM U948
Biothérapies hépatiques
CHU Hotel Dieu
44093 Nantes Cedex
France
Phone: +33 240 08 74 88
Fax: +33 240 08 30 48
e-mail: nicolas.ferry@inserm.fr

ABSTRACT

Lentiviral vectors are promising tools for liver disease gene therapy because they can achieve protracted expression of transgenes in hepatocytes. However, the question as to whether cell division is required for optimal hepatocyte transduction has still not been completely answered. Liver gene transfer efficiency after in vivo administration of recombinant lentiviral vectors carrying a GFP reporter gene under the control of a liver specific promoter in mice that were either hepatectomized or treated with cholic acid or phenobarbital was compared. Phenobarbital is known as a weak inducer of hepatocyte proliferation while cholic acid has no direct effect on cell cycle. This study shows that cholic acid is able to prime hepatocyte without mitosis induction. Both phenobarbital and cholic acid significantly increased hepatocyte transduction 6-9 fold, although cholic acid did not modify the mitotic index or cell cycle entry. However, the effect of either compound was weaker than that observed after partial hepatectomy. In no cases was there a correlation between the expression of cell cycle marker and transduction efficiency. We conclude that priming of hepatocytes should be considered a clinically applicable strategy to enhance in vivo liver gene therapy with lentiviral vectors.

INTRODUCTION

The liver is the target organ of many inherited metabolic diseases, some of which are amenable to gene therapy. It is particularly suitable for in vivo gene transfer because it is an organ readily accessible via the bloodstream through fenestrations of the hepatic sinusoid endothelium. Recombinant lentiviruses are powerful vectors for gene transfer and have the ability to integrate their transgene into the genome of infected host cells. This ensures long-term expression of the transgene, in particular in the case of cell division. Another stated advantage of lentivirus-based vectors, in contrast to other retroviral vectors such as MoMULV vectors, is their ability to infect non-proliferating cells in addition to dividing cells (Naldini *et al.*, 1996; Zufferey *et al.*, 1997; Uchida *et al.*, 1998). However some exceptions may exist, for example, lentiviral vectors pseudotyped with a VSV-G envelope gene do not easily transduce G₀-arrested haematopoietic cells such as quiescent lymphocytes or macrophages (Zack *et al.*, 1990; Kootstra *et al.*, 2000).

The adult liver is formed of hepatocytes that are in G₀ and only a limited proportion of hepatocytes are transduced in adult rodents after systemic injection of lentiviral vectors. Induction of cell proliferation by mitogens or by partial hepatectomy dramatically improved liver transduction (Park *et al.*, 2000; Ohashi *et al.*, 2002; Picanco-Castro *et al.*, 2008). In mice, using lentiviral vectors carrying LacZ cDNA, there was a nearly 30-fold increase in X-Gal positive hepatocytes in hepatectomized animals resulting in up to 60% hepatocyte transduction, compared to below 3% in non hepatectomized controls (Park *et al.*, 2000). Most of transduced hepatocytes (>80%) were BrDU positive. Similarly, the use of mitogenic compounds known to induce liver hyperplasia, such as TCPOBOP, resulted in a 30-fold increase in hepatocyte transduction in mice (Ohashi *et al.*, 2002). Along the same line, a number of studies have revealed that lentiviral vector transduction efficiency was 10 times higher in young and newborn rodents, for which the physiological turn-over of hepatocytes is higher than in adult animals (Park *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2007). However, some studies demonstrate that hepatocyte cell division is not a prerequisite for in vivo lentiviral gene transfer (Pfeifer *et al.*, 2001; Tsui *et al.*, 2002; VandenDriessche *et al.*,

2002). Administration of BrdU by different techniques (osmotic-pump, intraperitoneal injection) during the 3-7 days following vector injection all show an absence of co-localization of BrdU and GFP staining in most lentivirally-transduced cells, indicating that passage through S phase is not mandatory to achieve effective transduction. Therefore, questions pertaining to the correlation between cellular division and hepatocyte transduction remain. In addition, besides the difficulty of reproducing these methods of stimulating hepatocyte transduction, in a clinical setting, a recent study showed that lentiviral vectors are less prone to integrate in transcription units in nondividing cells than in actively dividing cells (Bartholomae *et al.*, 2011). Improving lentiviral transduction of hepatocytes without inducing liver regeneration is therefore important in terms of efficacy as well as safety of gene therapy.

In the present study, we studied the impact on lentiviral transduction of hepatocytes in 10-week adult mice of two compounds already used in the clinic: phenobarbital, which is known to enhance cell proliferation in the liver (Busser and Lutz, 1987; Smith *et al.*, 1991), and cholic acid, a bile acid which could have a key role in liver regeneration and may behave as a primer for hepatocytes (Huang *et al.*, 2006; Dong *et al.*, 2010). Hepatocyte priming has been defined, initially by Fausto *et al.*, as a specific and reversible condition of hepatocytes during which they are responsive to cytokines and other growth factors which stimulate cell cycle entry (Webber *et al.*, 1994). However, priming *per se* is not sufficient to trigger mitosis completion. Here we report that injection of phenobarbital or cholic acid treatment increased hepatocyte transduction to the same level, supporting a future clinical application of this strategy for liver gene therapy.

MATERIALS AND METHODS

Animals

We used male congenic C57BL/6 mice aged 10 weeks (weighed 25±1 g) obtained from Iffa Credo, l'Abresle, France and maintained under a 12-h light/dark illumination cycle with food and water *ad libitum*. All surgical procedures were conducted according to the guidelines of the French Ministere de l'agriculture on animals deeply anesthetized by using isoflurane inhalation (3% v/v in air). Hepatectomies were performed according to the procedure of Higgins and Anderson (Higgins and Anderson, 1931). Phenobarbital was given by intra-peritoneal injection at a daily dose of 80 mg/kg at 10 a.m. for 4 days. Cholic acid was incorporated at 0.2% (w/w) in the pellet chow. Recombinant lentiviral vectors (2x10¹⁰ TU/kg) were injected in the penile vein at the different time points indicated. Viral vectors were injected at doses of 2x10¹⁰ or 7x10¹⁰ TU/kg body weight. Assuming that the liver weight of a mouse is 1 g and contains 1x10⁸ hepatocytes (Seglen, 1973; Sohlenius-Sternbeck, 2006), the corresponding MOI were 2 and 7 for the low and high doses, respectively.

Lentiviral vectors

High-titer lentiviral vector stocks were generated by calcium phosphate-mediated transient transfection of 293T cells (2x10⁸ cells) in 10-chambers Corning CellSTACK large culture vessels with the vector transfer plasmid (1 mg), the packaging plasmid psPAX2 (0,75 mg), and the vesicular stomatitis virus G protein (VSVG) envelope protein-coding plasmid pMD2G (0,5 mg). Cells were transiently transfected at 70% confluence and twenty-four hours after transfection, fresh Advanced DMEM (Invitrogen) medium containing 2 mM glutamine and antibiotics (100 IU/mLpenicillin, 100 mg/mL streptomycin) was added, and viral supernatant was collected at 24-hour intervals for two consecutive days. Viruses were concentrated by high-speed centrifugation in an JA10 rotor at 10,000 rpm (17,700 x g, AvantiJ-26 XP centrifuge) for 16 hours at 4°C and viral pellet was resuspended in Advanced DMEM. Concentrated vector aliquots were snap-frozen and stored at -80°C.

These vectors harbored the GFP gene or macaque EPO cDNA under control of a liver-specific mTTR promoter formed with a murine transthyretin promoter fused to a synthetic hepatocyte-specific enhancer. They contained four copies of a perfectly matched miR142-3p target sequence (kindly provided by Dr Luigi Naldini) to decrease immune response (Brown *et al.*, 2006; Schmitt *et al.*, 2010). They also harbored the posttranscriptional regulatory element from the woodchuck hepatitis virus (WPRE), and a matrix attachment region, which increased transgene expression.

To determine the titers of GFP-transducing vectors, serial dilutions of vector stock were used to transduce HeLa cells in six-well plates. DNA was extracted and vector titers were determined by real-time quantitative PCR as described below. Vector titers were routinely 5×10^9 TU/ml.

Real-time quantitative PCR

High molecular weight DNA was extracted from total liver using the standard phenol-chloroform method. For quantitative PCR 100 ng of DNA were added to a solution containing the primers and the Sybr Green PCR Master Mix, and loaded to a 96-wells plate. Reaction conditions were: 10 min at 95°C for activation followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. The values were normalized with the mouse or human β actin gene. A standard curve was generated by using dilutions of lentiviral vector plasmid in genomic DNA extracted from liver mouse or for titration of lentivirus from Hela cells. The points ranged from 0 to 100 copies of plasmid per genome.

The sequences of the forward and reverse primers gene were as follows:

GAG-F, GGAGCTAGAACGATTCGCAGTTA ; GAG-R, GGTTGTAGCTGTCCCAGTATTTGT
C ; mouse β -actin-F, ATCCTGTGGCATCCATGAAACTAC ; mouse β -actin-R,
GGAGCCAGAGCAGTAATCTCCTTC.

Human β -actin F, TCCGTGTGGATCGGCGGCTCCA ; Human β -actin R,
CTGCTTGCTGATCCACATCTG.

Histological analysis and immunohistochemistry

Liver samples were formalin-fixed, embedded in paraffin and cut in 5 µm sections. Morphological analysis was performed after hematoxylin and eosin staining. Mitotic index was calculated after microscopic examination of at least 10 fields at 40X magnification (one field contained 300 hepatocytes). The presence of Ki67 and GFP positive hepatocytes was assessed by immunohistochemistry on formalin-fixed/paraffin embedded sections using anti GFP antibodies or the TEC-3 antibody, which recognizes the Ki67 antigen. Sections were deparaffinized and rehydrated. For Ki67 immunostaining, antigen retrieval was carried out by microwaving slides in antigen retrieval buffer (1.8 mM citric acid, 8.2 mM sodium citrate pH 6) for a total of 6 cycles of 5 min. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation for 10 min in a 3% H₂O₂ solution in methyl alcohol. Blocking of nonspecific activity was carried out by incubation for 90 min in 5% BSA in phosphate-buffered saline (PBS). Monoclonal primary rabbit anti-GFP antibody and monoclonal primary rat anti-Ki67 were applied for 2 hours at room temperature. The dilutions were 1:200 for anti GFP and 1:50 for anti Ki67 antibodies diluted in PBS containing 2% bovine serum albumin and 0.1% Tween 20. Positive cells were revealed with biotinylated goat anti-mouse immunoglobulin and streptavidin-peroxidase using diaminobenzidine as a substrate. After counterstaining with hematoxylin, mitosis and the percentage of positive cells were counted after microscopic examination of at least 10 fields at 40X magnification corresponding approximately to at least 3000 hepatocytes.

Hematocrit and erythropoietin monitoring

Hematocrit values were measured by microcapillary centrifugation. Serum EPO levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (Quantikine IVD; R&D Systems) according to the instructions provided by the manufacturer.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Graphpad Prism software and the Mann-Whitney U

test to compare quantitative data.

RESULTS

First, the basal turnover of hepatocytes in male C57BL/6 mice aged 3.5, 5.5, 7.5, 9.5 and 11.5 weeks (n=3 mice/time point) was evaluated. The mitotic index was low after 5.5 weeks and not significantly different from older mice. Immunohistological detection of the Ki-67 antigen, which is expressed during all active phases of the cell cycle (G1, S, G2, and M), revealed a higher labelling in C57BL/6 mice aged 3.5 weeks which was significantly different from the older mice. The labelling index was the lowest ($0.015\pm0.017\%$) in mice aged 9.5 weeks and thus 10-week-old mice were chosen for this study to ensure quiescence of the hepatocytes.

Next, regeneration triggered by partial hepatectomy was evaluated. A first cohort of 24 mice (10 weeks old) was sacrificed at different time points (n=4 mice/time point) after a two-thirds or a one-third partial hepatectomy to evaluate the kinetics of hepatocyte proliferation. At 41h after a two-thirds hepatectomy, a peak of mitosis ($4.2\pm0.1\%$) together with a strong increase in the Ki67 positive cells ($75\pm7\%$) was observed. After a one-third hepatectomy, the proliferation peak occurred at the same time (41h), but with a 15 to 20 fold lower intensity (mitotic index $0.27\pm0.28\%$, Ki67 labelling $3.9\pm 2.1\%$) (Fig. 1 A and B). In both instances, at 24 h after hepatectomy, the Ki67 labelling was low and not significantly different from the control value, as shown in Fig.1B. These results concord with those reported in previous studies showing a DNA synthesis peak at 40 hours after partial hepatectomy in mice (Yamada *et al.*, 1997).

Liver cell proliferation after administration of phenobarbital or cholic acid was then assessed. Twenty-seven mice received phenobarbital intraperitoneally (80 mg /kg daily for up to 4 days) and a second cohort of 27 mice was fed cholic acid (0.2% in the pellet chow). Animals were sacrificed at 48, 72, 96 hours after the first injection of phenobarbital or after the beginning of the cholic acid diet (n=9 at each time point). After phenobarbital treatment, we observed a statistically significant increase in mitotic index: $0.15\pm0.13\%$ and $0.13\pm0.13\%$ at 72h and 96h respectively, Fig 1A). Similarly, Ki67 labelling at both time points was higher than in control animals ($3.7\pm1.5\%$ and $3.5\pm2.3\%$ at 72h and 96h hours respectively, Fig. 1B). With the cholic

acid diet, the mitotic index and Ki67 staining were not significantly different from the control value at all time points (Fig 1 A and B).

Next the impact of cell cycle activation on hepatocyte lentiviral transduction was evaluated. A first series of 7 control mice, aged 10 weeks, were injected with mTTR-GFP lentiviral vectors at a unique dose of $2 \cdot 10^{10}$ TU/kg corresponding to a MOI of 2. At day 7 after injection, the animals were sacrificed and the number of GFP expressing hepatocytes was measured using immunohistochemistry. As shown in Figures 1C and 3, $0.14 \pm 0.07\%$ of GFP positive hepatocytes was observed. Furthermore, the vector copy number in whole liver was determined by quantitative PCR; this was 0.73 ± 0.17 genome copy (gc) per haploid genome, two-fold higher than that of the control mice (Fig 2).

A second series of mice (n=4 mice/time point) were injected with the same amount of vector 24h or 41h after a two-thirds hepatectomy. At the time of sacrifice, one week later, the animals injected 24 hours after hepatectomy showed the highest level of GFP-positive hepatocytes ($4.3 \pm 1.10\%$) together with a genome copy number (1.3 ± 0.5 gc/haploid genome) statistically different from controls (Fig 1C-3). For animals injected 41 hours after surgery, a statistically significant increase in positive hepatocytes ($2.05 \pm 1.2\%$) was observed (Figs 1C and 3). However, although there was an increase in genome copy numbers, the difference was not statistically significant (Fig 2).

A third group of mice (n=3 mice/time point) received the same lentiviral dose at 30 min, 24h or 41h after a one-third hepatectomy. Transduction efficiency was significantly higher than in the control group at all time points and varied between $0.92 \pm 0.18\%$ (30 min) and $1.3 \pm 0.3\%$ (41h) as shown in Fig 1C and 3. The amount of vector copies was higher than in the control group at all time points but was statistically significant only when vector delivery occurred 41h after hepatectomy (Fig 2).

Next the efficiency of gene transfer after treatment with phenobarbital was investigated. The groups of animals received mTTR-GFP lentiviral vectors 48h, 72h or 96h after the first phenobarbital injection (n=8 for each time point). After vector injection, phenobarbital treatment was stopped. At sacrifice, a significantly higher proportion of GFP positive

hepatocytes than in controls was observed for all time points, and transduction efficiency varied from $0.36 \pm 0.16\%$ and $1.29 \pm 0.92\%$, as shown in Fig 1C and 3. The highest value corresponds to lentiviral injection performed 48 hours after treatment with a 9-fold increase in hepatocyte transduction. No statistical difference was observed in the genome vector copy numbers between phenobarbital-treated and control mice (Fig. 2).

A last group of animals were fed cholic acid and received mTTR-GFP lentiviral vectors 48h, 72h or 96h after the beginning of the diet (n=8 for each time point). At day 7, the animals were sacrificed, and a statistically significant increase in the percentage of transduction was observed for all time points. Transduction efficiency varied between $0.42 \pm 0.23\%$ and $0.76 \pm 0.49\%$, as shown in Fig 1C and 3. The highest value was achieved when lentiviral injection was performed 48 hours after the beginning of the diet. Genome vector copy numbers determined by q-PCR were not different from those of the control mice (Fig. 2). It is noteworthy that it was possible to achieve significant hepatocyte transduction in animals in which Ki67 staining and the mitotic index were similar to control values. To further determine whether the induction of cell cycle was correlated to transduction efficiency, values of Ki67 staining and GFP transduction obtained in all animals were compared. The correlation coefficient was low ($r^2=0.04106$) indicating the absence of any correlation between the two parameters. In contrast Ki67 labelling was strongly correlated to mitotic index, as expected ($r^2=0.999$). Therefore these data strongly suggest that cell cycle entry is not mandatory for efficient transduction with lentiviral vectors.

In addition, a cohort group of mice (n=10 mice) was injected with a higher dose of vector. Five mice were injected with mTTR-GFP lentiviral vectors at a unique dose of 7.10^{10} TU/kg corresponding to a MOI of 7. Five other animals received the same dose of vectors after administration of phenobarbital (80 mg/kg i.p. daily for 2 days). At day 7 after injection, the animals were sacrificed and the number of GFP expressing hepatocytes was measured using immunohistochemistry. As shown in Figure 4, we observed $27.5 \pm 7.6\%$ of GFP positive hepatocytes in control mice that received the vector with no pretreatment (n=5). In phenobarbital treated mice (n=5), an average of $51.65 \pm 19.9\%$ of GFP positive hepatocytes,

with up to 70% of transduced hepatocytes in one animal, was observed. The values were significantly different between the two groups ($p < 0.05$).

In order to confirm the above results using a therapeutic transgene, a lentiviral vector carrying the erythropoietin (Epo) cDNA under the transcriptional control of the same mTTR liver specific promoter was constructed. Five mice, aged 10 weeks, were injected with mTTR-EPO viral infectious particles at a unique dose of $2 \cdot 10^{10}$ TU/kg infectious particles, corresponding to a MOI of 2. Five other mice also received lentiviral vectors but 48 h after being injected with 80 mg phenobarbital/kg i.p. daily. One week after lentiviral injection, blood hematocrit had increased in phenobarbital-treated mice compared to non-injected controls (Figure 5). At one week, there was a statistically significant difference in blood hematocrit between phenobarbital treated mice and mice that received the vector with no pretreatment ($61.6\% \pm 3.2$ vs $55.2\% \pm 4.6$; $p < 0.05$). At two weeks, blood hematocrit was increased and the values were still significantly different. We also measured serum Epo by Elisa and the values were also significantly different between the two groups (Figure 5, $p = 0.03$).

DISCUSSION

In the present study the correlation between cell proliferation and transduction in the liver after in vivo delivery of recombinant lentiviral vectors via a peripheral vein has been studied using adult mice. In young animals, liver growth is responsible for a background level of hepatocyte division that may complicate the interpretation of transduction experiments. The existence of binucleated hepatocytes and the polyploidisation process that takes place after weaning may have led to misinterpretation of previous results. As shown in Table 1, it is not before 8 weeks of age that the majority of hepatocytes become quiescent. Therefore, in previous studies carried out in younger animals, the transduction levels that were observed may have been related to hepatocytes that were not completely quiescent.

In the present study older animals with fully-developed livers were used and it was verified that the hepatocytes were quiescent at 10 weeks of age. After a two-thirds partial hepatectomy, there was a dramatic increase in Ki67 staining and mitotic index. Similarly, hepatectomy improved the level of hepatocyte transduction, with a 30-fold increase in GFP positive hepatocytes as compared to control, non-hepatectomized, animals. This ratio is similar to the one reported in a previous study by Park et al. (Park *et al.*, 2000). The ability of two chemical compounds, phenobarbital and cholic acid, to trigger cell cycle entry and to increase in vivo transduction of adult hepatocytes was next compared. Phenobarbital can increase the mitotic index and after phenobarbital administration, a 9-fold increase in GFP transduced hepatocytes following administration of vector at 2×10^{10} TU/kg was detected using immunohistochemistry. A similar enhancement of lentiviral transduction of hepatocyte with up to 70% of transduced hepatocytes in phenobarbital treated animals was also observed at a higher vector dose (7×10^{10} TU/kg). At this high dose, the basal level of transduction in non treated animals was also higher, in comparison to the low dose, indicating that the amount of vector administered is also a critical parameter in achieving high transduction levels. This is consistent with previous results reported by Park *et al.* (Park *et al.*, 2000). Finally, we demonstrated that phenobarbital enhanced the hematocrit level and serum Epo obtained after administration of a single dose of Epo lentiviral vectors, using Epo cDNA as a

therapeutic transgene. This result also showed that the stimulating effect of phenobarbital on lentiviral transduction of hepatocyte is not transgene dependent.

Cholic acid treatment did not elicit any significant modification of Ki67 labelling or the mitotic index. However, there was a 6-fold increase in GFP positive hepatocytes when lentiviral vectors were injected in cholic-acid-treated mice. This demonstrated that priming of hepatocytes was sufficient, in itself, to make a significant impact on transduction with lentiviral vectors without any requirement for cell division. However the effects of both phenobarbital and cholic acid were weaker than that of a two third hepatectomy.

Quantitative PCR showed that copy number did not correlated with transduction level. Indeed the number GFP-positive hepatocytes increased 30-fold in two-thirds hepatectomized mice compared to the control, although a minor difference in vector copy number (2 fold increase) was detected. Similarly, in cholic acid and phenobarbital treated mice, no difference in the vector copy numbers was detected compared to the control, whereas the proportion of GFP positive hepatocytes was significantly higher. To determine whether the high number of vector copies in control mice was due to a carry-over of the plasmid DNA used for vector production, a real-time PCR was carried out in order to detect any the ampicillin resistance gene, present in the plasmids only. Plasmid DNA in the genomic DNA from the mice was not detected (data not shown). The high level of vector copies in the experimental animals likely resulted from efficient transduction of non-parenchymal liver cells that did not express GFP under control of a liver specific promoter. Indeed, Van Til et al. previously reported a higher transduction rate of non-parenchymal cells as compared to hepatocytes (van Til *et al.*, 2005). Kupffer cell depletion led to 80% decrease in the number of viral copy number as assessed by quantitative PCR (van Til *et al.*, 2005). In another study, in which 26 % of liver cells were transduced with GFP recombinant lentiviral vectors, the majority (78.7%) of the positive cells were non hepatocytes (Pfeifer *et al.*, 2001). This could indicate that when looking at copy numbers, a high background level of non-parenchymal cell transduction (Kupffer cells and endothelial cells) may have diluted the positive effect of phenobarbital and cholic acid on hepatocyte transduction. In contrast, because a liver

specific promoter was used, transduced non-parenchymal cells were not detected after GFP immunohistochemistry. Finally it cannot be excluded that some unintegrated copies of the genome may still be present in the cells as one LTR or two LTR circles. These forms may also account for the high qPCR values observed.

The reasons why lentiviral vectors at low MOI do not easily transduce differentiated adult hepatocytes in the G0 state of the cell cycle are still unknown. Previous studies have demonstrated that lentiviral vectors can achieve high transduction efficiency in hepatocytes in primary culture and isolated liver biopsies resected from patients with liver diseases (Seppen *et al.*, 2002; Maruyama *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2006). However, such isolated cells are no longer fully quiescent but in the early G1 phase (Skouteris and Schroder, 1996). Regarding G₀-arrested cells of the haematopoietic system, like resting B cells, it has been recently shown that lentiviral vectors pseudotyped with the Edmonston measles virus hemagglutinin (H) and fusion (F) proteins could efficiently and stably transduce quiescent B cells or B-cell chronic lymphocytic leukemia cells that were not transduced with VSV-G pseudotyped lentiviral vectors (Frecha *et al.*, 2009). The same was true for resting T lymphocytes (Frecha *et al.*, 2010). Most importantly it appeared that a high level of gene transfer in the resting T and B cells was not at the cost of cell cycle entry or cell activation. Therefore we believe that hepatocyte priming may similarly alleviate certain ill-defined restriction points and make hepatocyte more susceptible to lentiviral vector transduction. It is worth noting that a minimal, transient damage to the liver (an increase in serum alanine aminotransferase) after vector injection has been observed in some studies, but transduction of hepatocytes was inefficient (Tsui *et al.*, 2002; VandenDriessche *et al.*, 2002).

A number of authors conclude that transduction efficiency relies much more on the design of the lentiviral backbone. Insertion of a central polypurin tract (cPPT) resulted in a 50% reduction in the requirement for cell cycling of hepatocytes in vivo (Park and Kay, 2001). Also the same study demonstrated an increase in transduction when a matrix attachment region was inserted in the viral backbone. Other studies have shown that *the* incorporation of cPPT, as well as the presence of a woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory

1
2
3 element (WPRE), in third-generation self-inactivating lentivectors could achieve transduction
4
5 levels in the range of 2 to 5% in adult livers (Follenzi *et al.*, 2002; VandenDriessche *et al.*,
6
7 2002).

8
9 For clinical applications of lentiviral mediated gene transfer in adults, it is conceivable
10
11 that a therapeutic level of transduction will not be reached after in vivo administration of low
12
13 doses of vectors. Therefore, other strategies aimed at increasing liver transduction will have
14
15 to be developed. Increasing the doses of vectors may prove to be difficult because clinical-
16
17 grade lentiviral vectors are still difficult to produce in large quantities. Moreover,
18
19 dissemination of the vector in the body may also be increased when using high doses. Most
20
21 of the methods that have been described so far to enhance lentiviral transduction (partial
22
23 hepatectomy, treatment with potentially carcinogenic chemical compounds) are not fully
24
25 compatible with a clinical application. Recently, a 10-fold increase in liver transduction was
26
27 achieved in mice that were pre-treated with a chimeric hyper-interleukin-6 cytokine (Picanco-
28
29 Castro *et al.*, 2008). This cytokine is known to participate in the initiation of liver regeneration
30
31 as a priming agent but is devoid of the potency to cause full cell replication (Webber *et al.*,
32
33 1994). We believe that our present results, obtained with drugs already used clinically, may
34
35 help in the design of future protocols in which low vectors doses will be used while
36
37 maintaining therapeutic efficacy and thus allow lentiviral vectors to enter the field of clinical
38
39 gene therapy for liver diseases.
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Association Française contre les Myopathies (AFM), the Association Francophone des Glycogénoses (AFG), from the “Agence Nationale de la Recherche” (ANR-07-MRAR_CRINAGENETHER) and the Région Pays de Loire.

REFERENCES

- BARTHOLOMAE, C.C., ARENS, A., BALAGGAN, K.S., YANEZ-MUNOZ, R.J., MONTINI, E., HOWE, S.J., PARUZYNSKI, A., KORN, B., APPELT, J.U., MACNEIL, A., CESANA, D., ABEL, U., GLIMM, H., NALDINI, L., ALI, R.R., THRASHER, A.J., VON KALLE, C., and SCHMIDT, M. (2011). Lentiviral vector integration profiles differ in rodent postmitotic tissues. *Mol Ther* **19**, 703-710.
- BROWN, B.D., VENNERI, M.A., ZINGALE, A., SERGI SERGI, L., and NALDINI, L. (2006). Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer. *Nature medicine* **12**, 585-591.
- BUSSER, M.T., and LUTZ, W.K. (1987). Stimulation of DNA synthesis in rat and mouse liver by various tumor promoters. *Carcinogenesis* **8**, 1433-1437.
- DONG, X., ZHAO, H., MA, X., and WANG, S. (2010). Reduction in bile acid pool causes delayed liver regeneration accompanied by down-regulated expression of FXR and c-Jun mRNA in rats. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao. Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao* **30**, 55-60.
- FOLLENZI, A., SABATINO, G., LOMBARDO, A., BOCCACCIO, C., and NALDINI, L. (2002). Efficient gene delivery and targeted expression to hepatocytes in vivo by improved lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* **13**, 243-260.
- FRECHA, C., COSTA, C., LEVY, C., NEGRE, D., RUSSELL, S.J., MAISNER, A., SALLES, G., PENG, K.W., COSSET, F.L., and VERHOEYEN, E. (2009). Efficient and stable transduction of resting B lymphocytes and primary chronic lymphocyte leukemia cells using measles virus gp displaying lentiviral vectors. *Blood* **114**, 3173-3180.
- FRECHA, C., LEVY, C., COSSET, F.L., and VERHOEYEN, E. (2010). Advances in the field of lentivector-based transduction of T and B lymphocytes for gene therapy. *Mol Ther* **18**, 1748-1757.
- HIGGINS, G.M., and ANDERSON, R.M. (1931). Experimental pathology of the liver. *Arch Pathol*, 187-202.
- HUANG, W., MA, K., ZHANG, J., QATANANI, M., CUVILLIER, J., LIU, J., DONG, B., HUANG, X., and MOORE, D.D. (2006). Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science (New York, N.Y)* **312**, 233-236.
- KOOTSTRA, N.A., ZWART, B.M., and SCHUITMAKER, H. (2000). Diminished human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription and nuclear transport in primary macrophages arrested in early G(1) phase of the cell cycle. *Journal of virology* **74**, 1712-1717.
- MARUYAMA, M., KOBAYASHI, N., OKITSU, T., TOTSUGAWA, T., WATANABE, T., MATSUMURA, T., KOSAKA, Y., and TANAKA, N. (2003). Successful lentivirus-based delivery of NLS-LACZ gene into porcine hepatocytes. *Transplantation proceedings* **35**, 435-436.
- NALDINI, L., BLOMER, U., GALLAY, P., ORY, D., MULLIGAN, R., GAGE, F., VERMA, I., and TRONO, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science (New York, N.Y)* **272**, 263-267.
- NGUYEN, T.H., AUBERT, D., BELLODI-PRIVATO, M., FLAGEUL, M., PICHARD, V., JAIDANE-ABDELGHANI, Z., MYARA, A., and FERRY, N. (2007). Critical

assessment of lifelong phenotype correction in hyperbilirubinemic Gunn rats after retroviral mediated gene transfer. *Gene therapy* **14**, 1270-1277.

NGUYEN, T.H., BELLODI-PRIVATO, M., AUBERT, D., PICHARD, V., MYARA, A., TRONO, D., and FERRY, N. (2005). Therapeutic lentivirus-mediated neonatal in vivo gene therapy in hyperbilirubinemic Gunn rats. *Mol Ther* **12**, 852-859.

NGUYEN, T.H., BIRRAUX, J., WILDHABER, B., MYARA, A., TRIVIN, F., LE COULTRE, C., TRONO, D., and CHARDOT, C. (2006). Ex vivo lentivirus transduction and immediate transplantation of uncultured hepatocytes for treating hyperbilirubinemic Gunn rat. *Transplantation* **82**, 794-803.

OHASHI, K., PARK, F., and KAY, M.A. (2002). Role of hepatocyte direct hyperplasia in lentivirus-mediated liver transduction in vivo. *Hum Gene Ther* **13**, 653-663.

PARK, F., and KAY, M.A. (2001). Modified HIV-1 based lentiviral vectors have an effect on viral transduction efficiency and gene expression in vitro and in vivo. *Mol Ther* **4**, 164-173.

PARK, F., OHASHI, K., CHIU, W., NALDINI, L., and KAY, M. (2000). Efficient lentiviral transduction of liver requires cell cycling in vivo. *Nat Genet* **24**, 49-52.

PARK, F., OHASHI, K., and KAY, M.A. (2003). The effect of age on hepatic gene transfer with self-inactivating lentiviral vectors in vivo. *Mol Ther* **8**, 314-323.

PFEIFER, A., KESSLER, T., YANG, M., BARANOV, E., KOOTSTRA, N., CHERESH, D., HOFFMAN, R., and VERMA, I. (2001). Transduction of liver cells by lentiviral vectors: analysis in living animals by fluorescence imaging. *Mol Ther* **3**, 319-322.

PICANCO-CASTRO, V., FONTES, A.M., HEINZ, S., TONN, T., and COVAS, D.T. (2008). The chimeric cytokine Hyper-IL-6 enhances the efficiency of lentiviral gene transfer in hepatocytes both in vitro and in vivo. *Biotechnology letters* **30**, 215-220.

SCHMITT, F., REMY, S., DARIEL, A., FLAGEUL, M., PICHARD, V., BONI, S., USAL, C., MYARA, A., LAPLANCHE, S., ANEGON, I., LABRUNE, P., PODEVIN, G., FERRY, N., and NGUYEN, T.H. (2010). Lentiviral vectors that express UGT1A1 in liver and contain miR-142 target sequences normalize hyperbilirubinemia in Gunn rats. *Gastroenterology* **139**, 999-1007.

SEGLIN, P.O. (1973). Preparation of rat liver cells. 3. Enzymatic requirements for tissue dispersion. *Exp Cell Res* **82**, 391-398.

SEPPEL, J., RIJNBERG, M., COOREMAN, M.P., and OUDE ELFERINK, R.P. (2002). Lentiviral vectors for efficient transduction of isolated primary quiescent hepatocytes. *J Hepatol* **36**, 459-465.

SKOUTERIS, G.G., and SCHRODER, C.H. (1996). C-myc is required for the G0/G1-S transition of primary hepatocytes stimulated with a deleted form of hepatocyte growth factor. *The Biochemical journal* **316 (Pt 3)**, 879-886.

SMITH, P.F., O'BRIEN, K.A., and KEENAN, K.P. (1991). Evaluation of bromodeoxyuridine labeling in hepatomegaly produced by peroxisomal proliferation or P-450 induction in rodents. *Progress in clinical and biological research* **369**, 285-289.

SOHLENIUS-STERNBECK, A.K. (2006). Determination of the hepatocellularity number for human, dog, rabbit, rat and mouse livers from protein concentration measurements. *Toxicol In Vitro* **20**, 1582-1586.

TSUI, L.V., KELLY, M., ZAYEK, N., ROJAS, V., HO, K., GE, Y., MOSKALENKO, M., MONDESIRE, J., DAVIS, J., ROEY, M.V., DULL, T., and MCARTHUR, J.G. (2002). Production of human clotting Factor IX without toxicity in mice after vascular delivery of a lentiviral vector. *Nat Biotechnol* **20**, 53-57.

UCHIDA, N., SUTTON, R.E., FRIERA, A.M., HE, D., REITSMA, M.J., CHANG, W.C., VERES, G., SCOLLAY, R., and WEISSMAN, I.L. (1998). HIV, but not murine leukemia virus, vectors mediate high efficiency gene transfer into freshly isolated

- 1
2
3 G0/G1 human hematopoietic stem cells. Proceedings of the National Academy of
4 Sciences of the United States of America **95**, 11939-11944.
- 5 VAN TIL, N.P., MARKUSIC, D.M., VAN DER RIJT, R., KUNNE, C., HIRALALL, J.K.,
6 VREELING, H., FREDERIKS, W.M., OUDE-ELFERINK, R.P., and SEPPEN, J.
7 (2005). Kupffer cells and not liver sinusoidal endothelial cells prevent lentiviral
8 transduction of hepatocytes. *Mol Ther* **11**, 26-34.
- 9
10 VANDENDRIESSCHE, T., THORREZ, L., NALDINI, L., FOLLENZI, A., MOONS, L.,
11 BERNEMAN, Z., COLLEN, D., and CHUAH, M.K. (2002). Lentiviral vectors
12 containing the human immunodeficiency virus type-1 central polypurine tract can
13 efficiently transduce nondividing hepatocytes and antigen-presenting cells in vivo.
14 *Blood* **100**, 813-822.
- 15 WEBBER, E.M., GODOWSKI, P.J., and FAUSTO, N. (1994). In vivo response of
16 hepatocytes to growth factors requires an initial priming stimulus. *Hepatology* **19**,
17 489-497.
- 18 YAMADA, Y., KIRILLOVA, I., PESCHON, J.J., and FAUSTO, N. (1997). Initiation of liver
19 growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I
20 tumor necrosis factor receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of
21 the United States of America **94**, 1441-1446.
- 22
23 ZACK, J.A., ARRIGO, S.J., WEITSMAN, S.R., GO, A.S., HAISLIP, A., and CHEN, I.S.
24 (1990). HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a
25 labile, latent viral structure. *Cell* **61**, 213-222.
- 26 ZUFFEREY, R., NAGY, D., MANDEL, R.J., NALDINI, L., and TRONO, D. (1997).
27 Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat*
28 *Biotechnol* **15**, 871-875.
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

FIGURE LEGENDS

Fig 1. Evaluation of the mitotic index (A) and Ki67 labelling (B) in the various groups of animals. Mitotic index was evaluated by counting the number of mitotic figures after hematoxylin and eosin staining of paraffin sections. Ki67 staining was performed by immunohistochemistry. (C) Evaluation of lentiviral transduction in mice liver. Seven days after virus injection, mice were sacrificed and the number of GFP positive hepatocytes was scored on paraffin sections immunohistochemical labelling. *Statistically different from control value ($p<0.05$) using Mann-WhitneyU test. Data are represented as mean $\pm$ SD.

Fig. 2. Evaluation of vector genome copy numbers in high molecular weight DNA by real time qPCR. *Statistically different from control value using Mann-Whitney test. Data are represented as mean $\pm$ SD.

Fig 3. Histochemical detection of GFP. (A, F) Control mouse. (B) Two-thirds hepatectomized mouse (sacrificed at 41h), (C) One-third hepatectomized mouse (sacrificed at 41h), (D, G) Phenobarbital fed mouse sacrificed at 48h , (E) Cholic acid-treated mouse sacrificed at 48h. Hematoxylin counterstain. Original magnification: X 20 (A-E) and X 4 (F, G).

Fig 4. Evaluation of phenobarbital to mediate lentiviral transduction into mouse liver cells. Mice were treated or not with phenobarbital and received GFP-lentiviral vectors. Seven days after virus injection, mice were sacrificed and the number of GFP positive hepatocytes was scored on paraffin sections immunohistochemical labelling. Histochemical detection of GFP in vehicle (A, B), or phenobarbital-treated mouse livers (C, D), (E) is an example of a mouse liver section from a mouse injected with PBS. (F) Percentage of GFP positive hepatocytes. Each value is the mean $\pm$ sd. *Statistically different from control value ($p<0.05$) using Mann-Whitney U test. Data are represented as mean $\pm$ SD. Hematoxylin counterstain. Original magnification: X20 (B, D) and X 4 (A, C, E).

Fig 5. Evaluation of therapeutic efficacy after lentiviral liver transduction in mice. (A) Hematocrit was evaluated at 7 and 14 days after lentiviral injection in mice treated or not with phenobarbital. (B) level of serum Epo was evaluated at day 14 post-injection by ELISA. *Statistically different ($p < 0.05$) using Mann and Whitney U test. The data shown are mean $\pm$ SEM. Each plot corresponds to one experimental animal.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

TABLE 1

Weeks	3 ½	5 1/2	7 1/2	9 1/2	11 1/2
Mitotic index	0.75±0.1 *	0.04±0.075	0.02±0.03	0.02±0.03	0.02±0.03
Ki67 labelling	23.8±5.1 *	0.59±0.19	0.75±0.15	0.15±0.07	0.31±0.10

Table 1: Comparison of mitotic index and Ki67 labelling in the liver of mice (n= 15) at various ages. Mitotic index is expressed as % of mitotic figures in hepatocytes and Ki67 as % of immunohistologically labelled hepatocytes. *Statistically different from other cohort of mice values (p<0.05) using Mann-Whitney U test. Data shown are mean ± SD.

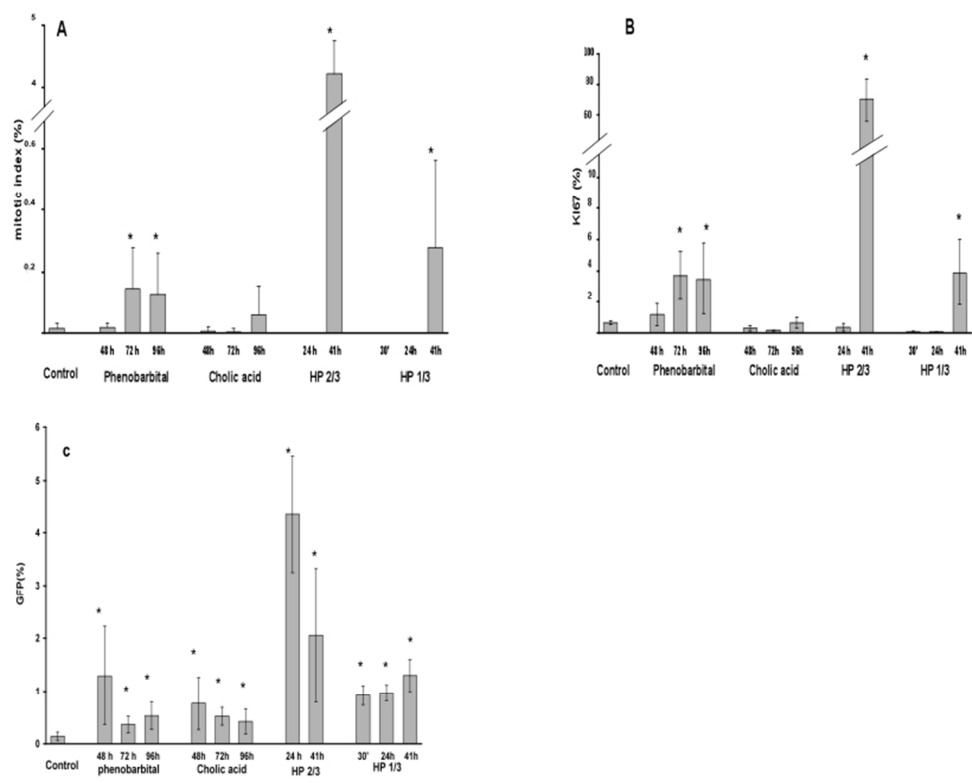


Figure 1
298x236mm (72 x 72 DPI)

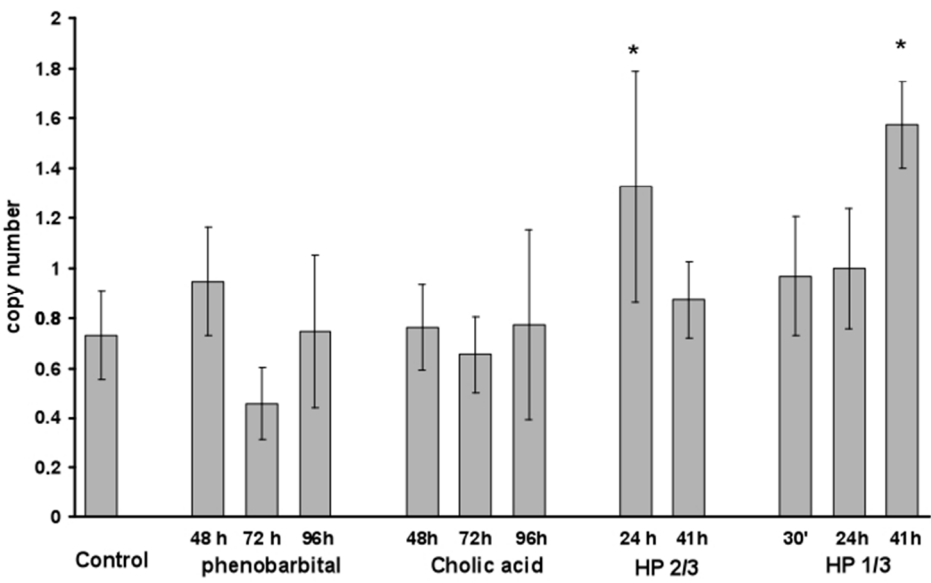


Figure 2
270x171mm (72 x 72 DPI)

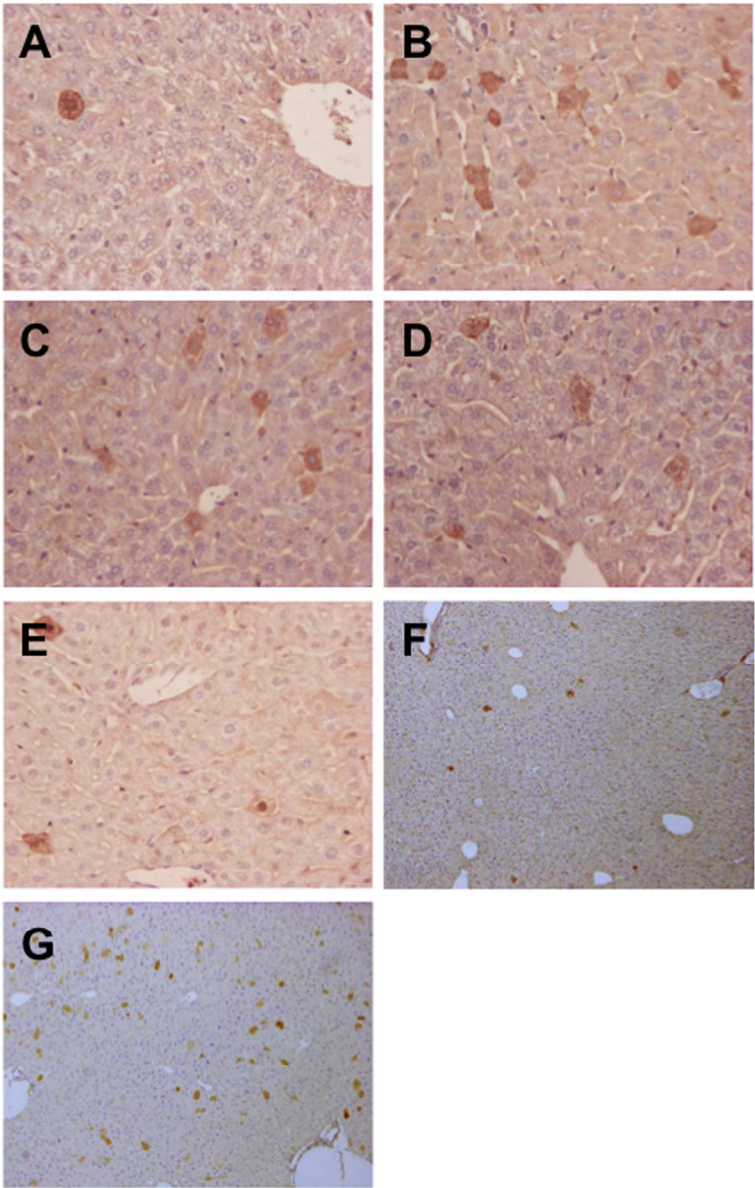


Figure 3
167x261mm (200 x 200 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

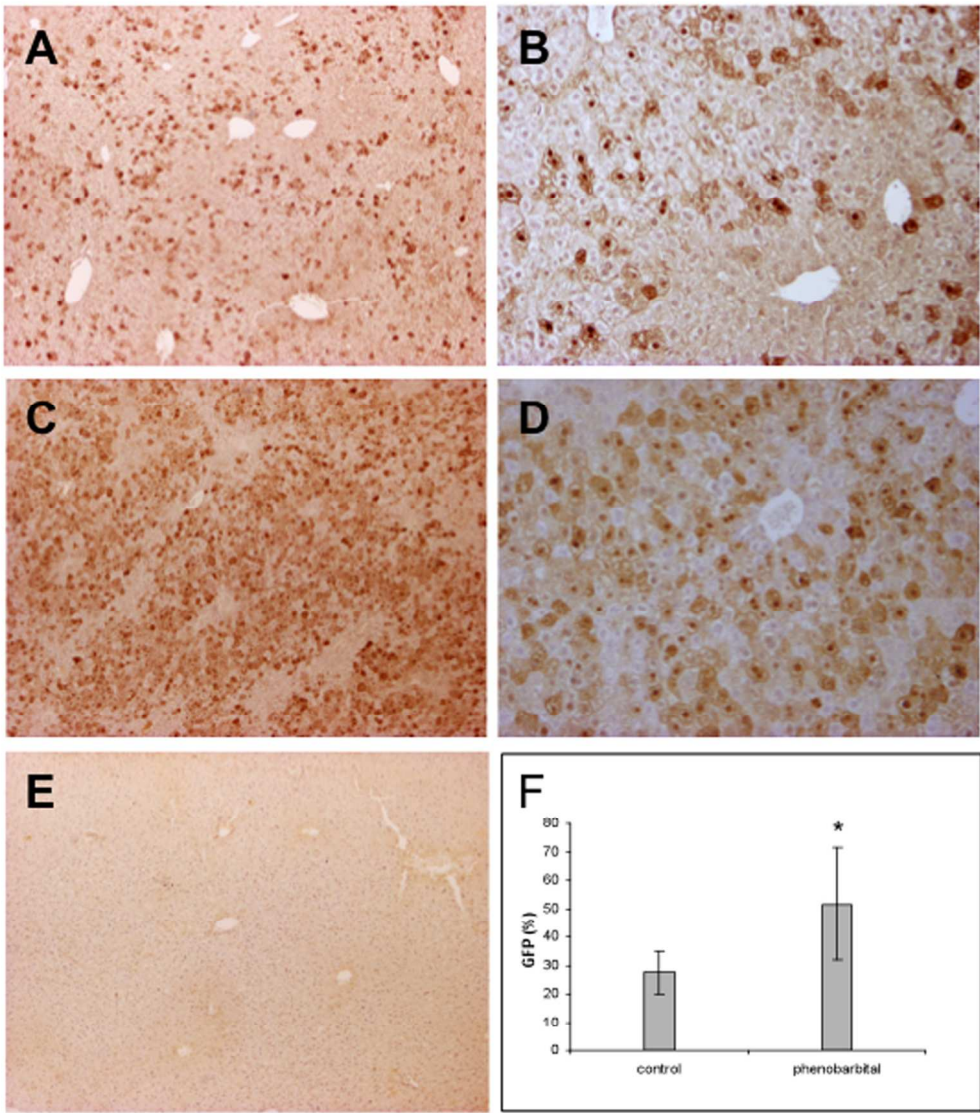


Figure 4
191x217mm (200 x 200 DPI)

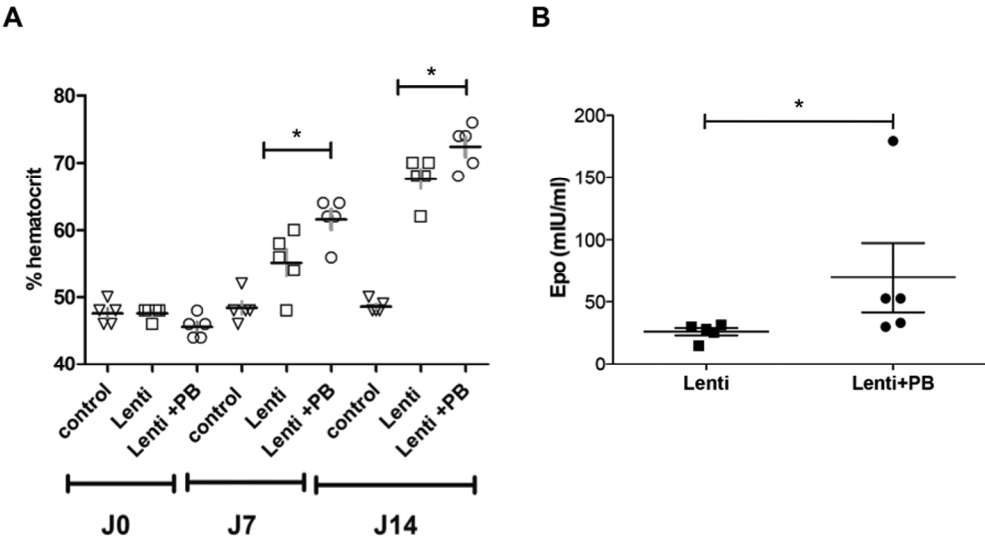
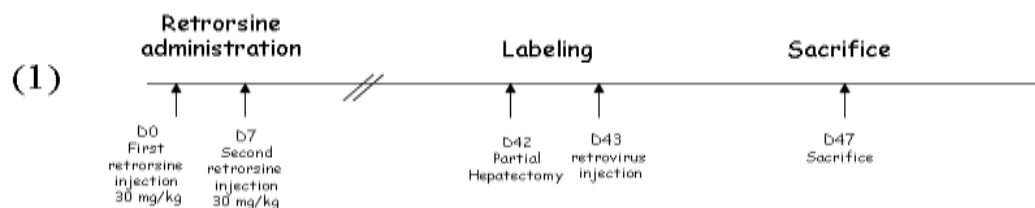


Figure 5
321x179mm (300 x 300 DPI)

Résultats 2

Afin d'écarter définitivement le fait que l'hépatocyte ait besoin d'une division complète pour être infecté efficacement par le lentivirus recombinant, nous avons bloqué *in vivo* les hépatocytes avant la mitose et nous avons réalisé une infection lentivirale sur ces hépatocytes. Pour bloquer les hépatocytes nous avons traité des rats Fischer âgés de 13 semaines avec de la rétroirsine puis induit une régénération hépatique en réalisant une hépatectomie partielle. Nous avons injecté le lentivirus recombinant porteur du gène de la *gfp* ($4.3 \cdot 10^9$ TU/kg) 24 heures après l'hépatectomie, puis sacrifié les rats 4 jours après l'injection (groupe 1).

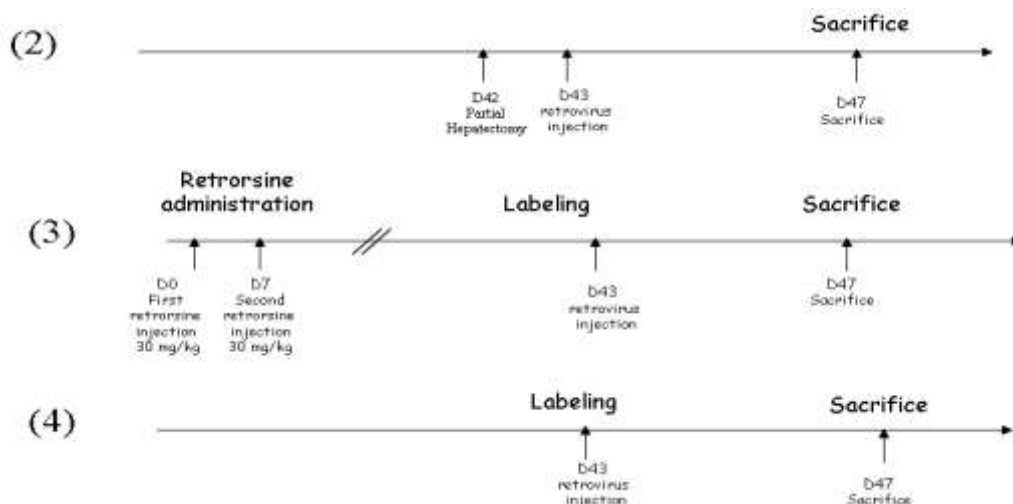


Des groupes contrôles ont été réalisés :

Groupe 2 (n=4) : Hépatectomie et injection du lentivirus recombinant.

Groupe 3 (n=4) : Traitement rétroirsine et injection lentivirale.

Groupe 4 (n=4) : Injection du lentivirus recombinant.



La même expérience a été réalisée avec un oncorétrovirus porteur du gène *lacZ* ($3 \cdot 10^9$ TU/kg injectées 24 heures après l'hépatectomie).

1-Validation de notre modèle : étude de la ploïdie

Dans le groupe de rats hépatectomisés (groupe 2) nous avons pu observer au sacrifice des hépatocytes en mitose. Ceci n'a pas été le cas chez les rats injectés avec de la rétrovirus puis hépatectomisés (groupe 1). Cette observation n'est pas suffisante pour valider notre modèle et affirmer que la rétrovirus a bien bloqué les hépatocytes avant la mitose. Ainsi, afin de confirmer que dans notre modèle le traitement de la rétrovirus avait été efficace et qu'il y avait bien apparition de mégaloctes, l'équipe de Chantal Desdouets (Institut Cochin) a réalisé une étude de la ploïdie sur des coupes des foies des rats hépatectomisés traités ou non avec de la rétrovirus (groupe 1 et 2). La ploïdie nucléaire a été analysée grâce à un marquage Hoechst (Figure 30) et la surface de chaque noyau proportionnelle en fonction de la ploïdie, a été déterminée (Figure 31). 1000 à 3000 noyaux ont été analysés pour chaque rat.

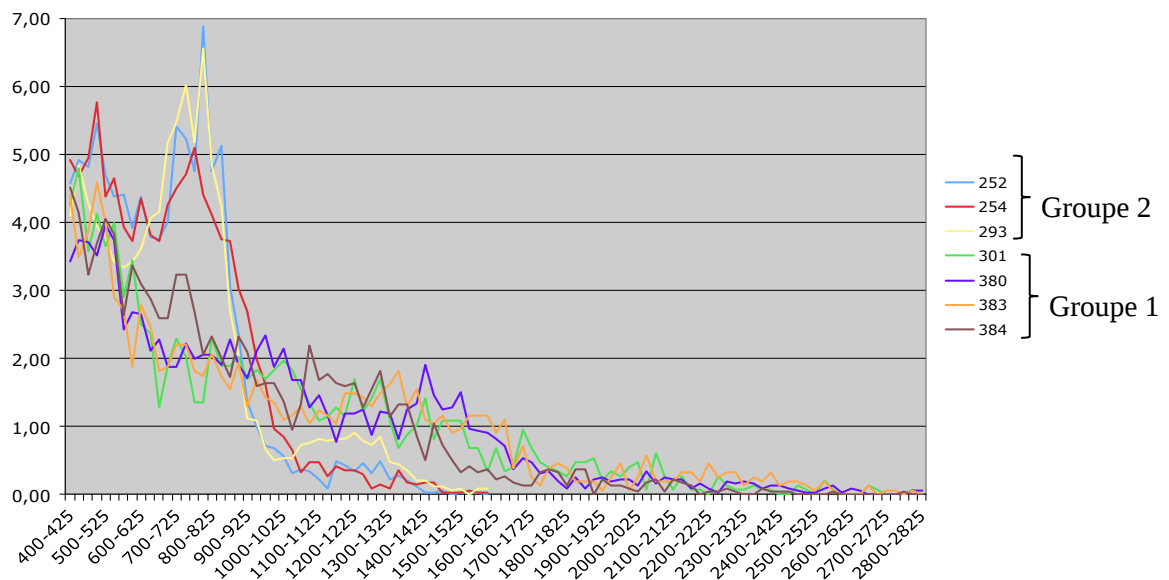


Figure 30. Détermination de la surface de chaque noyau des hépatocytes des rats du groupe 1 et 2 (Chantal Desdouets).

Dans le groupe 1, traité à la rétrovirus et ayant subi une hépatectomie 2/3, la taille des noyaux, proportionnelle à la ploïdie, était anormalement élevée par rapport à ceux des rats qui ont simplement subi une hépatectomie (Figure 30).

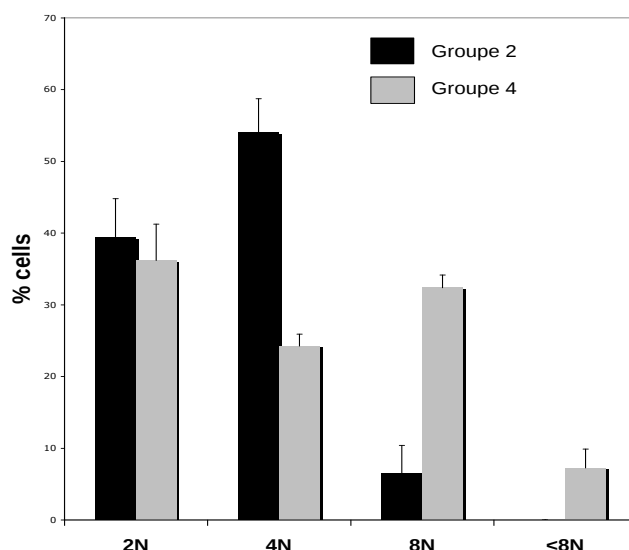


Figure 31 Détermination de la ploïdie des hépatocytes des rats du groupe 1 et 2.

Ainsi, comme on peut l'observer sur le graphe ci-dessus (figure 31), dans le groupe 1 plus de 40% des hépatocytes présentaient une ploïdie supérieure à 4n contre seulement 5% dans le groupe 2. Le résultat de cette analyse est en accord avec la littérature qui montre qu'il n'est pas rare de trouver des degrés de ploïdie supérieurs à 64n dans des foies traités à la rétroirsine alors que dans un foie en régénération les degrés de ploïdie supérieurs à 8n sont rares.

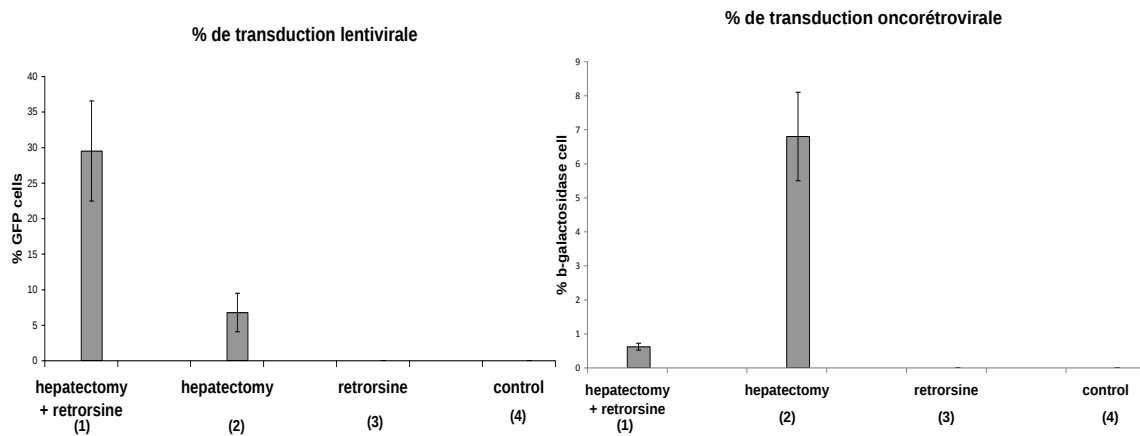
3 Transduction hépatocytaire

Nous avons tout d'abord analysé le taux de transduction des foies des rats injectés avec l'oncorétrovirus. Le taux de transduction était nul chez les rats non hépatectomisés, de 6.8% chez les rats hépatectomisés, alors qu'il n'était que de 0.6% chez les rats hépatectomisés et traités à la rétroirsine (Figure 32 A). Ce résultat est en accord avec le fait que les oncorétrovirus n'infectent que des cellules en division, et que la rétroirsine bloque la division de la quasi totalité des hépatocytes.

Concernant la transduction lentivirale, chez les rats non hépatectomisés traités ou non à la rétroirsine (groupe 2 et 3), nous avons observé un faible taux de transduction inférieur à 0,05%. Ceci nous indique que l'injection de $1.5 \cdot 10^9$ particules lentivirales par rat

n'est pas efficace pour transduire les hépatocytes d'un rat adulte. De plus, la rétroirsine seule n'a pas d'effet sur la transduction lentivirale. Chez les rats hépatectomisés, 6,7% d'hépatocytes sont transduits. De façon surprenante, les rats traités à la rétroirsine et hépatectomisés ont un taux de transduction plus élevé (29,5%) (Figure 32 A). Ces résultats montrent donc clairement qu'un cycle cellulaire complet n'est pas essentiel pour une bonne transduction lentivirale. De plus ces résultats nous montrent que la phase du cycle cellulaire pendant laquelle les hépatocytes sont bloqués par la rétroirsine est une phase durant laquelle la transduction lentivirale est très efficace.

A



B

C

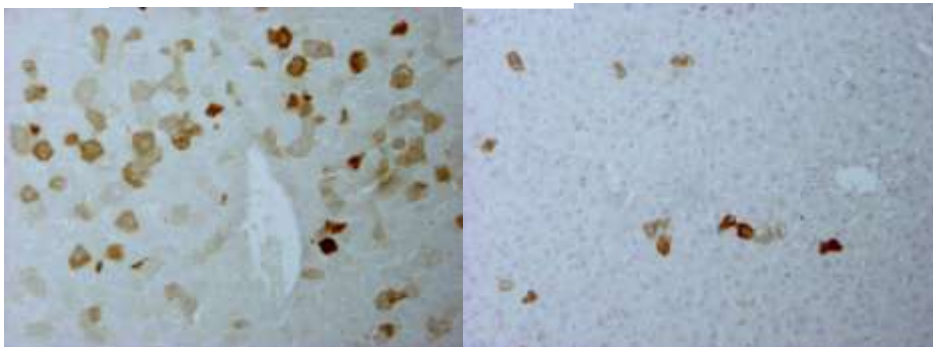


Figure 32. (A) Taux de transduction après injection lentivirale ou oncorétrovirale. Marquage immunohistochimique anti-GFP : (B) injection lentiviral post hépatectomie + rétroirsine (C) injection lentivirale post hépatectomie (x200).

Discussion

Le lentivirus recombinant transduit de manière efficace les cellules quiescentes, cependant il existe quelques exceptions dont font parties les hépatocytes. L'efficacité de l'infection lentivirale semble dépendante du cycle cellulaire cependant cette hypothèse est controversée. En effet, certains affirment que la division cellulaire est requise (Park, F. *et al.*, 2000) (Ohashi, K. *et al.*, 2002). Au contraire d'autres montrent que ni l'activation du cycle cellulaire ni la division hépatocytaire n'est requise pour une bonne efficacité lentivirale (Pfeifer, A. *et al.*, 2001) (VandenDriessche, T. *et al.*, 2002).

Pour essayer de mieux comprendre la corrélation entre le cycle cellulaire et l'efficacité de la transduction des hépatocytes par les lentivirus recombinants, nous avons réalisé deux études complémentaires chez la souris et le rat.

Lors de la première étude, nous avons traité des souris adultes avec de l'acide cholique, reconnu être agent initiateur capable de faire entrer les hépatocytes dans le cycle cellulaire sans aboutir forcément à une division complète de la cellule. Nous avons aussi traité des souris avec du phénobarbital ou réalisé des hépatectomies partielles afin d'induire une division complète des hépatocytes. Après injection de vecteurs lentiviraux dans les différents modèles, nous montrons que l'acide cholique permet d'augmenter de 6 fois le taux de transduction lentivirale et donc que les hépatocytes «primés» s'infectent mieux qu'en phase de quiescence. De plus il n'existe aucune corrélation entre le taux d'hépatocytes en mitose et le pourcentage d'hépatocytes transduits. Cette première étude nous permet de confirmer que l'efficacité de transduction lentivirale dans un foie en régénération, n'était pas corrélée à la présence d'hépatocytes en mitose. De plus nous montrons que des hépatocytes activés sont plus permissifs à l'infection par les lentivirus que des hépatocytes en phase G0.

Lors de la seconde étude nous avons bloqué les hépatocytes avant la mitose chez des rats à l'aide de la rétroirsine suivi d'une hépatectomie partielle. Nous avons observé un pourcentage élevé de cellules transduites d'environ 30 % soit 5 fois supérieur à ce qu'on a pu observer après une hépatectomie partielle seule. Ceci confirme que la division cellulaire n'est pas requise pour une bonne efficacité de la transduction lentivirale.

De façon très intéressante, nous montrons que des hépatocytes bloqués par la rétrovirus sont très bien transduits par les lentivirus recombinants. L'action exacte de la rétrovirus concernant le blocage de la division cellulaire n'est pas encore très bien déterminée. Il est admis, que l'apparition de mégaloctes présentant une ploïdie importante après traitement à la rétrovirus et lésion hépatique démontre que des hépatocytes sont bloqués en phase S/G2. Cependant certains auteurs comme je l'ai décrit dans l'introduction pensent qu'un certain nombre d'hépatocytes sont bloqués en phase G1/S (Laconi, S. *et al.*, 1999) (Picard, C. *et al.*, 2003). Leurs études sont basées sur une analyse du marquage BrdU, mais ils ne font aucune étude de la ploïdie et ne précisent pas combien d'hépatocytes semblent être bloqués en G1/S et combien ont des cycles répétés de synthèse d'ADN. Dans le modèle de la rétrovirus, nous avons fait une étude de la ploïdie et 40% des hépatocytes présentent une ploïdie supérieure ou égale à 8n, et sont donc susceptibles d'être bloqués en phase S/G2.

En ce qui concerne la transduction lentivirale, nos résultats montrent clairement que la mitose n'est pas nécessaire pour l'infection lentivirale mais que les hépatocytes bloqués pendant l'interphase sont très bien transduits par le lentivirus recombinant.

Nos résultats semblent corroborer quelques résultats publiés concernant la réplication du HIV ou la transduction par les lentivirus recombinants.

L'arrêt de cellules de rein embryonnaires (293T) en phase G1 provoque une nette amélioration de la transduction par le HIV. L'arrêt en phase G2 a un effet similaire mais avec un degré supérieur (Groschel, B. & Bushman, F., 2005). En effet, lors de l'infection par le HIV sauvage, il a été montré que la protéine accessoire VPr induit l'arrêt des cellules en G2 afin d'augmenter la réplication virale (He, J. *et al.*, 1995) (Zhou, Y. & Ratner, L., 2000).

Enfin concernant les lentivirus recombinants, en 2006, Zang et al ont montré qu'en bloquant in vitro différents types cellulaires en phase G2 avec de la génistéine, le taux de transduction à l'aide de lentivirus recombinants était augmentée (Zhang, S. *et al.*, 2006) (Figure 33).

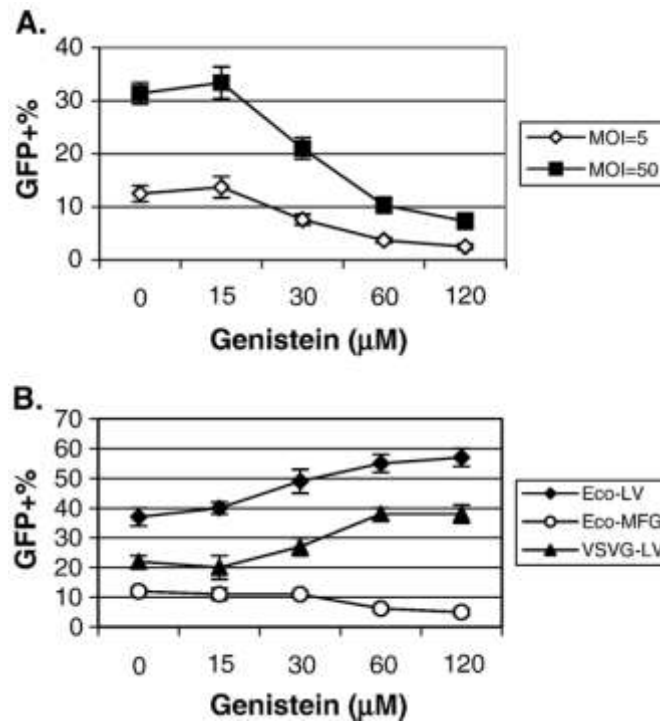


Figure 33. Effet du blocage en G2 sur l'infection lentivirale ou oncorétrovirale (Zhang, S. *et al.*, 2006).

Dans un certain nombre de types cellulaires la phase G1/S et S/G2 apparait donc être une phase importante pour la réplication du HIV ou pour la transduction par un lentivirus recombinant. Ceci n'avait jamais été montré pour des cellules d'origine hépatique. De plus, tous ces travaux ont été réalisés *in vitro* et il semble intéressant, comme nous l'avons fait, de pouvoir démontrer *in vivo* l'importance de l'interphase lors la transduction lentivirale.

Les mécanismes moléculaires ou cellulaires qui pourraient améliorer la réplication ou la transduction pendant certaines phases du cycle sont peu connus. La restriction de l'infection dans les lymphocytes T quiescents est très étudiée et pourtant il n'est pas encore exactement déterminé si l'augmentation de la transduction lentivirale est liée directement au cycle cellulaire lui-même ou à des facteurs de restriction actifs ou non pendant les différentes phases du cycle.

Pour l'hépatocyte, on pourrait émettre l'hypothèse que des facteurs de restriction soient actifs lorsque l'hépatocyte est quiescent, et que ces facteurs soient moins exprimés en phase G1 et G2 rendant alors l'hépatocyte plus permissif à la transduction lentivirale. Mais il est aussi possible que les modifications de la structure cellulaire durant le cycle (réorganisation des microtubules par exemple) favorisent certaines étapes nécessaires à la transduction cellulaire.

Bilan

Le lentivirus recombinant pseudotypé VSVG s'avère être un vecteur efficace pour le transfert de gènes dans un foie en régénération. C'est un vecteur intégratif donc le transgène n'est pas perdu au cours des différentes divisions cellulaires. C'est aussi un bon vecteur pour les approches ex vivo.

Dans le foie quiescent par contre il transduit très mal les hépatocytes, et il faut injecter des doses de vecteurs très importantes pour réussir à observer quelques hépatocytes transduits. Dans le foie adulte il présente finalement le même inconvénient que l'oncorétrovirus, à savoir qu'une simple injection de vecteurs ne suffit pas et qu'il faut trouver des méthodes pour faire sortir les hépatocytes de leur quiescence afin de pouvoir les transduire.

Ainsi, actuellement, pour le transfert de gènes dans un foie quiescent, des vecteurs comme l'AAV ou l'adénovirus s'avèrent être des vecteurs de transfert de gènes plus efficaces.

Pseudotypage, une solution ?

Le lentivirus le plus couramment utilisé est revêtu de glycoprotéines du virus de la stomatite vésiculeuse. Certaines équipes spécialistes des lymphocytes B et T, ont cherché d'autres glycoprotéines que la VSVG, qui permettraient d'atteindre une transduction efficace des cellules quiescentes. Ils ont généré des vecteurs lentiviraux revêtus des glycoprotéines du virus de la rougeole (MV), H et F. Ces vecteurs conservent le tropisme de la rougeole et se fixent sur la cellule via les récepteurs CD46 et SLAM, tous deux présents sur les lymphocytes. Étonnamment, ce vecteur, contrairement au lentivirus VSVG transduit efficacement les lymphocytes B et T tout en préservant leur phénotype (Frecha, C. *et al.* 2010).

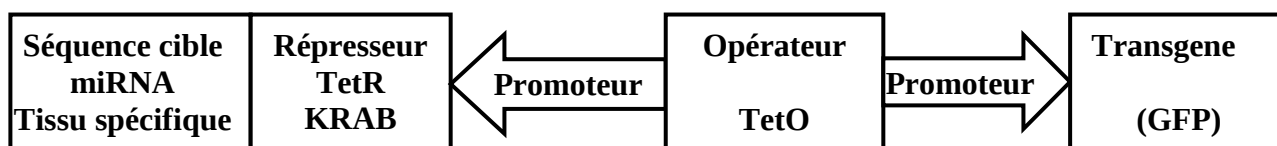
En se basant sur ces résultats, une des solutions pour transduire des hépatocytes quiescents pourrait être de tester d'autres glycoprotéines d'enveloppe. Afin de faire entrer les hépatocytes en cycle, il pourrait être testé des enveloppes sur lesquelles soit couplées des cytokines initiatrices, comme l'Il6. Le pseudotypage pourrait être un des axes de travail pour l'amélioration du transfert de gènes lentiviral dans un foie quiescent.

Partie B : Régulation ciblée de l'expression de gènes par des miRNA

Introduction

Pour une approche *in vivo*, il est nécessaire d'obtenir une expression du transgène forte et limitée aux hépatocytes. Les promoteurs spécifiques utilisés sont souvent plus faibles que les promoteurs ubiquitaires. De plus, il existe des fuites d'expression dans d'autres types cellulaires, notamment les cellules présentatrices d'antigènes et cela peut déclencher une réponse immunitaire vis-à-vis du produit du transgène (Matsui, H. *et al.* 2011).

Pour obtenir une expression spécifique d'un transgène avec un promoteur ubiquiste ou pour renforcer la spécificité d'un promoteur spécifique, notre approche est d'utiliser un système de régulation tTR-KRAB modifié le rendant sensible à une régulation par les miRNA.



Le système tetR-krab

Le système régulable par la tétracycline a été décrit par Gossen et Bujard en 1992 sous le nom de système Tet-Off (Gossen, M. & Bujard, H., 1992). Ce système est basé sur les éléments de régulation de l'opéron du gène de résistance à la tétracycline du transposon Tn10 d'*Escherichia coli*. Chez la bactérie, l'expression des gènes de résistance à la tétracycline est normalement réprimée par fixation du répresseur TetR (Tetracycline repressor protein) sur les séquences de régulation de l'opérateur Tt (TetO). En présence de tétracycline, le répresseur change de conformation et ne peut plus se fixer à l'opérateur. Ainsi, les gènes de résistance à la tétracycline sont activés.

Pour créer le système initial Tet-Off suppressible par la tétracycline, Bujard et al. ont transformé le répresseur en un activateur en le fusionnant aux séquences activatrices de la protéine VP16 du virus de l'herpès. Ainsi, en absence de tétracycline, la protéine de fusion tTA se fixe sur tetO et active la transcription. Par contre en présence de tétracycline, la protéine tTA subit un changement de conformation ce qui diminue son affinité pour tetO et inactive ainsi indirectement l'initiation de la transcription (Figure 34 B) (Gossen, M. *et al.*, 1995).

Bujard et al. ont construit une autre version de l'activateur cette fois inductible par la tétracycline appelé Tet-On. Dans cette version, quatre acides aminés du TetR ont été modifiés pour créer le rTetR (reverse Tetracycline repressor protein). Dans cette version mutée, la liaison de rTetR-VP16 aux séquences tetO ne se fait qu'en présence de tétracycline ou de ses analogues tels que la doxycycline (Figure 34C).

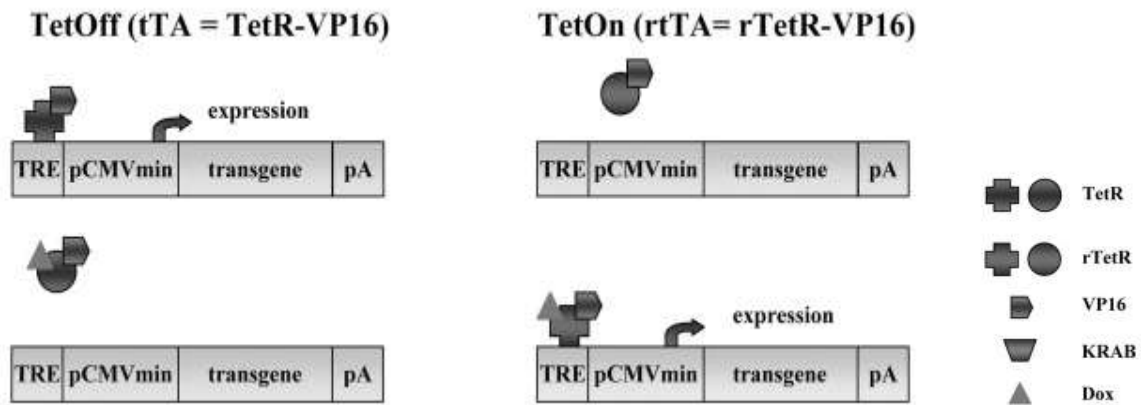


Figure 34. Schémas des systèmes tet off et tet on. (Stieger, K. *et al.*, 2009)

Ces systèmes de régulation se sont avérés efficaces dans différents organes (muscle cerveau, rétine..) chez les rongeurs et primates (Favre, D. *et al.*, 2002) (Samakoglu, S. *et al.*, 2002) (Stieger, K. *et al.*, 2006) (Harding, T. C. *et al.*, 1998).

En ce qui concerne le foie, ces systèmes ont permis par exemple de réguler l'expression de l'interféron dans des modèles animaux pour l'hépatite (chez le primate et le rongeur). Il a été montré aussi qu'il était possible de réguler l'expression du facteur IX (Auricchio, L. *et al.*, 2005) (Auricchio, L. *et al.*, 2001) (Srouf, M. A. *et al.*, 2003;) (Dumortier, J. *et al.*, 2005).

En se basant sur ces systèmes de régulation Deuschle et al. ont développé un nouveau système en utilisant cette fois un répresseur de transcription sous contrôle également de la doxycycline. Ils ont fusionné le domaine répresseur KRAB A (Kruppel-associated Box) des facteurs de transcriptions kid-1 (kidney ischemia and developmental regulated gene 1) avec le répresseur de la transcription tetR initiale (Deuschle et al, 1995). Ainsi en absence de doxycycline tetR KRAB réprime la transcription. En présence de doxycycline tetR KRAB ne peut se lier à l'opérateur et la transcription des gènes peut avoir lieu (Figure 35)

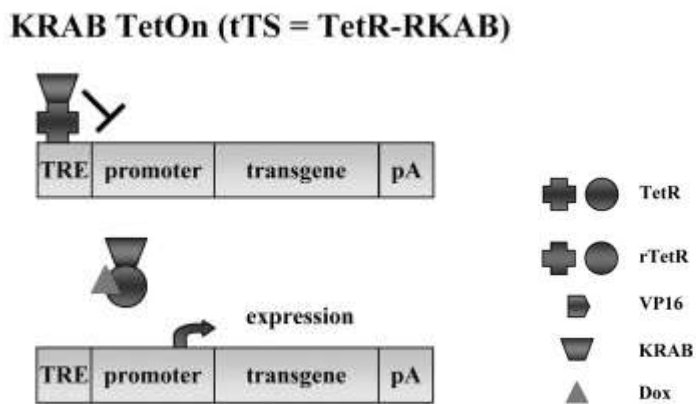


Figure 35. Système tetR KRAB.(Stieger, K. *et al.*, 2009).

KRAB est le domaine régulateur de transcription le plus représenté chez les mammifères. Cette famille de facteurs de transcription contient en position N-terminale un domaine de répression KRAB, et en position c terminal un domaine de liaison à l'ADN constitué de motifs en doigts de zinc. Ce domaine est capable de propager la répression sur des distances allant de plus de 10KB (Groner, A. C. *et al.* 2010) Il agit à la fois sur les promoteurs polII, II, et III. L'interaction entre Kap1 (ou TIF-1 pour Transcriptional Intermediary Factor 1) et le domaine KRAB potentialise l'activité de répression (Ryan, R. F. *et al.*, 1999). D'autres complexes qui sont des répresseurs de remodelage de la chromatine interagissent avec KAP-1 : C'est le cas des NuRD/HDAC1 et N-COR1 HDAC3 qui ont une activité histone déacétylase (Schultz, D. C. *et al.*, 2001), (Underhill, C. *et al.*, 2000). Kap 1 interagit aussi avec l'histone méthyltransférase SETDB1 spécifique de la lysine 9 de l'histone3.

Ainsi, KRAB recrute kap -1 qui recrute à son tour, les complexes enzymatiques qui vont conduire à la déacétylation et à la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3. Il y a alors formation d'une structure type hétérochromatine au niveau des promoteurs des gènes cibles ce qui entraîne la répression de la transcription (Figure 31). Récemment il a été montré que KRAB - KAP-1 intervient dans la répression épigénétique de la transcription des rétrovirus au niveau des cellules embryonnaires (Wiznerowicz, M. *et al.*, 2007).

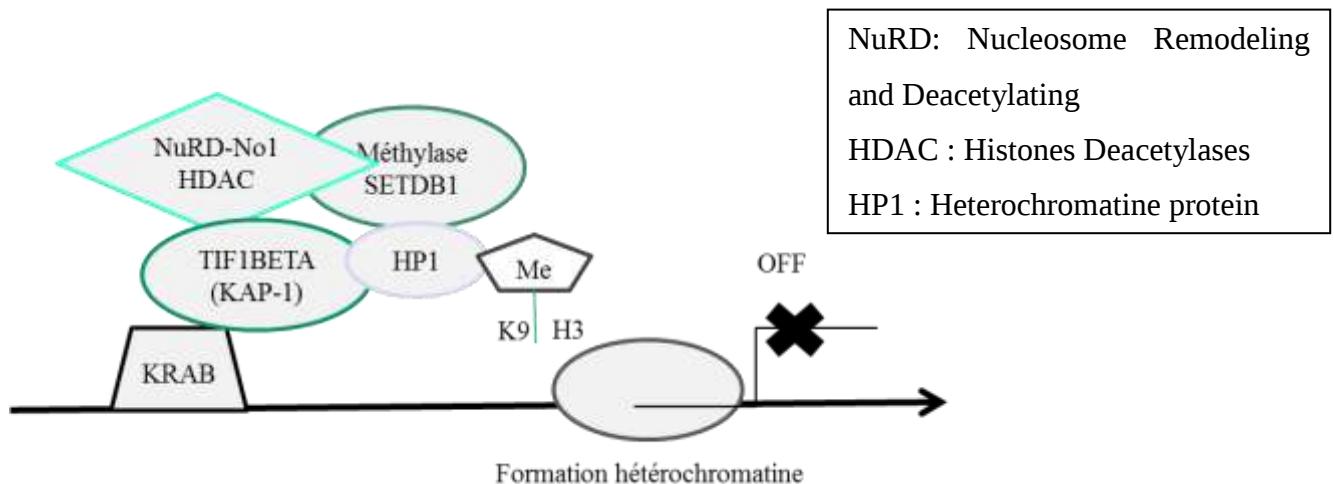


Figure 36. Répression des gènes par KRAB via des phénomènes épigénétiques

Ainsi le système tetR KRAB a montré son efficacité *in vivo* pour la régulation de produits de transgène, ou de shRNA permettant ainsi de réguler l'expression de protéines (Szulc, J. *et al.*, 2006). Le système de régulation tetR KRAB permet aussi la répression de gènes présents sous forme épisomale (Barde, I. *et al.*, 2009). Barde et al. ont injecté des AAV porteurs du gène de la *gfp* sous contrôle d'une région tetO chez des souris transgéniques pour le gène *krab*. Les souris ont été traitées ou non avec de la doxycycline. Une analyse par immunofluorescence a été réalisée dans différents tissus et a confirmé la régulation du gène de la *gfp* sous forme épisomale par le système tetRKRAB (Figure 36)

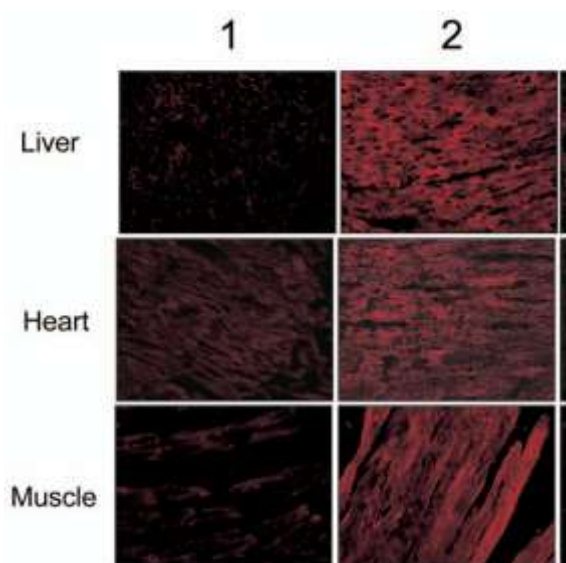
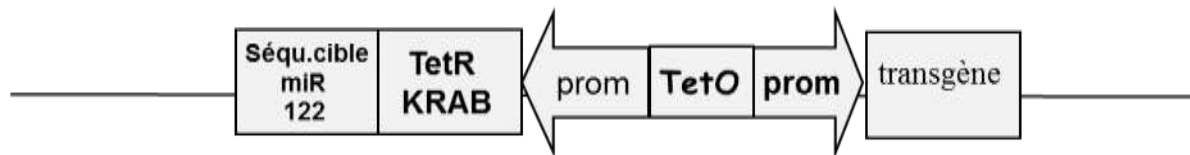


Figure 37 Régulation du gène de la GFP sous forme épisomale (1/ souris traitée avec de la dox, 2/ souris non traitée) (Barde, I. *et al.*, 2009)

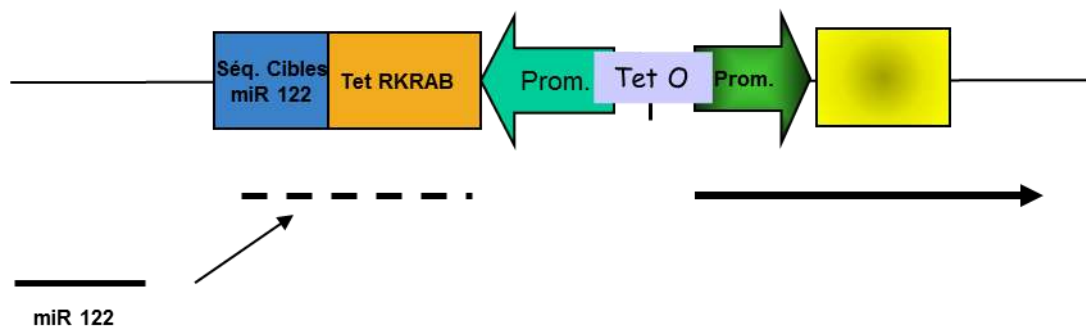
Résultats

Pour obtenir une expression spécifique du transgène dans le foie, notre approche est d'utiliser ce système de régulation tTR-KRAB contrôlé lui-même par des miRNA spécifiques du tissu hépatique comme les miR-122.

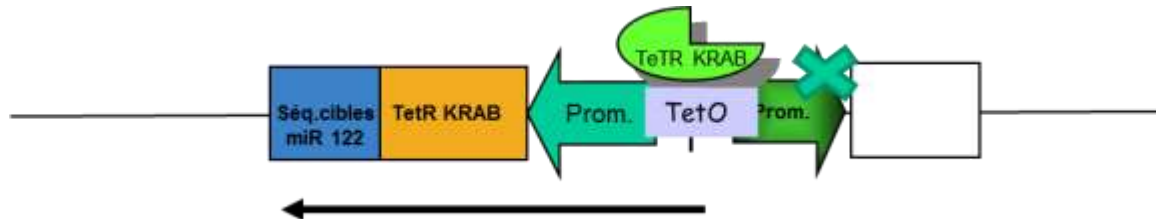
Ce système est composé de deux cassettes bidirectionnelles. La première cassette d'expression contient un transgène avec un promoteur spécifique ou ubiquiste sous contrôle d'une région tetO. La seconde cassette contient un promoteur ubiquiste qui dirige l'expression de la protéine chimérique tTR KRAB ainsi que les séquences cibles du miR122 spécifiquement exprimés dans les hépatocytes.



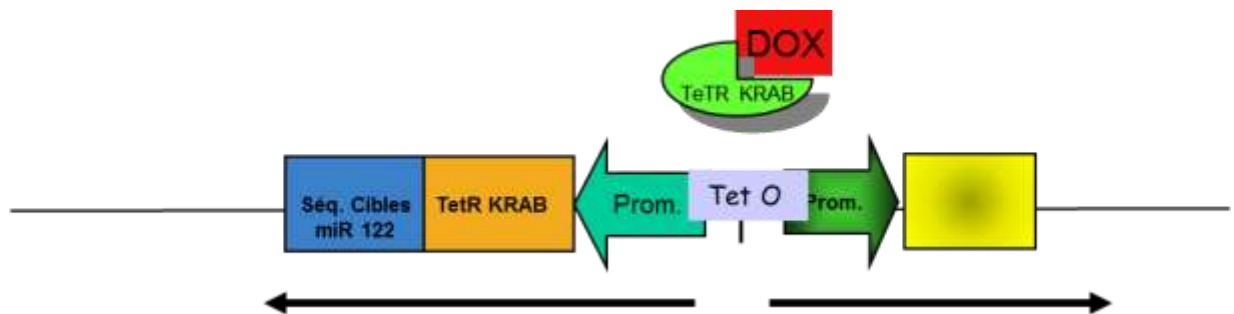
Ainsi dans les cellules d'origine hépatique, la synthèse du répresseur tTR-KRAB est inhibée par le miR-122. En effet, le miR-122, par complémentarité parfaite avec sa cible va dégrader l'ARNm tTR-KRAB. En présence ou en absence de doxycycline le transgène peut s'exprimer.



En revanche dans les autres types cellulaires le répresseur tTR-KRAB se lie au tetO pour inhiber la transcription du transgène.



Mais en présence de doxycycline, tetR krab ne peut se lier à l'opérateur et la transcription des gènes peut avoir lieu



Nous avons réalisé différentes constructions dans lesquelles la GFP est dirigée par différents promoteurs spécifiques ou ubiquistes. Nous avons utilisé soit les séquences cibles du mir-122, soit les séquences cibles du mir142 spécifiques des cellules du système immunitaire. Ces constructions ont été placées dans une cassette lentivirale et nous les avons testé in vitro dans différentes lignées cellulaires hépatocytaires ou non. Ce système a fait l'objet d'un brevet auprès d'Inserm Transfert.

TISSUE-SPECIFIC REGULATION OF TRANSGENE EXPRESSION

FIELD OF THE INVENTION:

5 The present invention relates to nucleic acid constructs and vector comprising thereof for use in gene transfer and therapy applications, and uses thereof for obtaining a tissue-specific expression of a transgene of interest.

BACKGROUND OF THE INVENTION:

10 Achieving tight regulation of transgene expression in the space and during the time has been the goal of many studies in the field of gene therapy.

 The first line of transcriptional control is based on the use of tissue-specific promoters. For instance, many natural or artificial promoters which activity is restricted to hepatocytes
15 have been used with a large panel of gene transfer vectors. However, it has been shown that these promoters are usually weak, as compared to ubiquitous promoters and can be leaky in many other cell types. Therefore, there is still a clear need to improved regulatory systems.

 It results that inducible gene expression systems have been developed and have been
20 proven valuable tools to control expression of a transgene during the time and many of them have been tested in gene therapy models. In mammalian cells a number of inducible system that respond to inducing agents such as hormones, or heat shock proteins have been devised in the past years. An inducible system may thus turn “on” or turn “off” expression of a transgene of interest according to the desired effect. The switch is usually obtained by administration of
25 a drug that will bind to the chimeric regulator and will modify its DNA binding activity.

 The tetracycline regulatable system was first described by Gossen and Bujard in 1992 (Gossen and Bujard, 1992). It is based on the fusion of the Tet repressor protein (TetR) with the VP16 transactivator of the Herpes simplex virus. The TetR from E. Coli Tn10 operon is
30 able to bind to the Tet operator DNA sequence (TetO) in a specific manner. In the presence of tetracyclin (tet) the TerR conformation changes and it is no longer able to bind to TetO sequence. When fused to VP16, the TetR-VP16 chimeric protein is able to activate DNA transcription, provided that the TetO sequence is present in the target DNA. The TetR-VP16 is still sensitive to conformational changes and in the presence of tet it is no longer able to

bind DNA and hence to activate transcription. This system was coined the Tet-Off regulatable system. Mutagenesis in TetR allowed to isolate mutants which DNA binding activity was opposite to the wild type protein. Rather to attach to DNA in the absence of tet, the reverse TetR (rTetR) can only bind DNA in the presence of the drug. This mutant system was called the Tet-On regulatable system. Using an opposite strategy, some investigators sought to develop a tet regulatable system based on the fusion of the same TetR with a transcriptional repressor domain, (Deuschle *et al.* 1995). This tetracycline-controlled transrepressor chimeric protein was engineered by fusing the KRAB (Krüppel associated box) domain of human KOX1 to the Tet repressor derived from Tn10 of *Escherichia Coli*. The Krab domain is a 75 aa domain found in about one third of the several hundreds of human zinc finger proteins and found exclusively in the amino terminal end of proteins that contain Krüppel-class zinc fingers in their carboxy termini. The KRAB domain acts by triggering formation of heterochromatin in the vicinity of its binding site and thus is able to shut off polymerase I, II and III promoters. To achieve heterochromatin formation, KRAB recruits KAP1 (KRAB-associated protein 1 also known as TRIM28 or KRIP1) which acts as a scaffold for various proteins such as heterochromatin protein 1, histone methyl transferase and histone deacetylase. KRAB induced transcriptional silencing can act over several kilobases. It has been demonstrated that KRAB can mediate transcriptional repression through tens of kilobases and that this system is mainly involved in the control of endogenous retroviruses in embryonic stem cells. In presence of tetracycline, the binding of tTR-Krab to DNA is prevented with concomitant restoration of the initial promoter activity. Therefore the tTR-Krab system works in a tet-“on” fashion.

It was initially shown that a large increase in transgene expression could be achieved in an *in vitro* system with a range of repression of more than 3 kb apart from the tetO target sequence (Szulc *et al.* 2006). The repressor activity of the tTR-Krab system extends to pol III promoters and lentiviral vectors in which shRNA driven by pol III promoters have been placed under control of tetO dependent tTR-Krab repression have described recently (Szulc *et al.* 2006). These vectors allow the highly efficient doxycycline-controlled expression of shRNA and hence control of knockdown of cellular genes targeted by the shRNA. It was initially thought that repression could only be achieved in integrated genome. But, several studies demonstrated efficient regulation of transgene expression in AAV and integration-defective lentiviral vectors (Barde *et al.* 2009).

However, in the context of gene therapy with desirable expression of a transgene of interest, inducible systems such as the tTR-Krab system, suffer from a number of drawbacks:

(1) The inducer drug should be orally available and penetrate the target tissue;

(2) A prolonged exposure to the drug is required to achieve long-term expression of the transgene, involving therefore that the inducer drug should have a metabolism compatible with prolonged therapeutic use;

(3) An immune response to the chimeric protein can be expected when expressed at high level for prolonged periods of time.

Recently, a new regulation system of transgene expression has been described (Brown *et al.* 2006). This system is based on RNA interference. RNA interference was first described in the nematode *Caenorhabditis Elegans*. Soon after, it was shown to occur also in mammalian cells. Naturally miRs are transcribed by RNA polymerase II from cellular sequences as primary miRs (pri-miRs). Within the nucleus, pri-miRs are cleaved by Drosha to form shorter precursor miR (pre-miR) hairpins of 60-80 nt in length. Pre-miRs are then exported to the cytoplasm, where the hairpin pre-miRs are processed by Dicer to form a RNA duplexes of 19-23 bp that have 2 nt 3' overhangs. This duplex is handed on to the RNA induced silencing complex (RISC) where one of the strands, the passenger strand, is cleaved within RISC and then released from the complex. The remaining intact single stranded guide RNA activates RISC to direct target-specific silencing through hybridization of the guide to complementary sequences. The guide strands of natural miRs typically hybridize to the 3' untranslated regions (3'UTRs) of a gene to cause translational suppression. When guide and target sequences are perfectly complementary, RISC mediates mRNA slicing through effects of its Ago2 'slicer' component. Theoretically, the RNAi pathway can be harnessed to silence any gene that is transcribed and where the pathway is functional. Because the patterns of expression of miRNAs are different among cell types, some miRNA are specifically expressed in specific cell types or in specific cell lineages. Therefore it is theoretically possible to silence any transgene in a specific cell type or lineage by adding to the transgene transcript sequences that are targets to the corresponding miRNAs (Brown *et al.* 2007).

This was demonstrated by a seminal study of Brown *et al.* 2006. In this study, the immune response to GFP was shut-off by using a lentiviral construct containing 4 tandem repeats of the miR142-3, which is specifically expressed in cells from the hematopoietic lineage. miR142-3 efficiently mediated degradation of the GFP mRNA in antigen presenting

cells and suppressed cytotoxic elimination of transduced cells including hepatocytes. International patent application N° WO 2007/000668 describes thus a gene transfer vector suitable for genetic engineering approaches, such as gene therapy, gene transfer and/or regulation of expression of a transgene comprising a miRNA target sequence. Such vectors
5 can be thus designed to be regulated by endogenous miRNAs for controlling transgene expression to achieve specific expression profiles of the vector and more particularly to obtain a miRNA-mediated approach for restricting gene expression.

SUMMARY OF THE INVENTION:

10 The present invention arises from the combination by the inventors of this miRNA-mediated approach for restricting gene expression with a repressor in order to obtain a tissue-specific expression of a transgene only in cells in which a particular miRNA is expressed. Thus, to detarget tTR-Krab repression in specific cell types the TeR-KRAB coding sequence was linked to 4 copies of miR target sequences with perfect homology to tissue specific
15 miRNA. This resulted in reduced expression of the tTR-Krab repressor in specific cell types.

Advantageously, this improved strategy provides an important, and hitherto unavailable, means of obtaining a satisfying tissue-specific expression of a transgene of interest without the drawbacks of the systems previously described in the state of the art.

20 Thus, the invention relates to a nucleic acid construct comprising:

- a) a first sequence encoding for a repressor operably linked to a first promoter and to at least one tissue-specific miRNA target sequence, and
- b) a second sequence encoding for a transgene of interest operably linked to a
25 second promoter and to an operator.

The invention also relates to a vector comprising said nucleic acid construct as defined above.

30 The invention further relates to a cell infected or transduced with the vector as defined above.

The invention also relates to a vector or a cell as defined above for use as drug.

The invention further relates to an *in vitro* or *ex vivo* method for obtaining a tissue-specific expression of a transgene of interest comprising the following steps:

- a) providing a vector of the invention as defined above, and
- 5 b) transferring said vector in a cell or a tissue of interest expressing a corresponding tissue-specific miRNA.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION:

10 The present invention relates to a nucleic acid construct and uses thereof, carried out by the inventors by an approach combining a miRNA-mediated approach for restricting gene expression to a repressor in order to obtain a tissue-specific expression of a transgene only in cells in which a particular miRNA is expressed.

15 Therefore, when the cell expresses the tissue-specific miRNA liable to bind to the corresponding tissue-specific miRNA target sequence, the repressor is not translated since its mRNA is destroyed caused by the binding of the miRNA and therefore the transgene may be expressed in said particular tissue.

20 On the contrary, when the cell does not express the tissue-specific miRNA liable to bind to the corresponding tissue-specific miRNA target sequence, the repressor is translated and expressed and may therefore bind the operator and prevent the transcription of the transgene.

Definitions:

25 Throughout the specification, several terms are employed and are defined in the following paragraphs.

30 As used herein, the terms “miRNA” or “microRNA” refer to a short and non-coding ribonucleic acid (RNA) molecule (on average 21 nucleotides long) found in all eukaryotic cells. miRNAs are post-transcriptional regulators that bind to complementary sequence on target messenger RNA transcripts (mRNAs), usually resulting in transcriptional repression and gene silencing. Gene silencing may occur either via mRNA degradation or preventing mRNA being translated.

As used herein, the term “tissue-specific miRNA” refers to a miRNA which is specifically expressed in a particular organ and therefore in kind of cells found in said particular organ. For example, miR122 is a liver-specific miRNA and is specifically expressed in hepatocytes. This suggests that tissue-specific miRNAs may play a conserved role in the establishment and/or maintenance of a cell or tissue type of that particular organ.

As used herein, the terms “miRNA target sequence” or “target sequence of a miRNA” refer to the complementary sequence on target mRNAs which is bound by a miRNA.

As used herein, the terms “tissue-specific miRNA target sequence” or “target sequence of a tissue-specific miRNA” refer to a complementary sequence recognized and bound by endogenous miRNAs cell type specific, thus regulating transgene expression in a desired subset of cells.

As used herein, the term “repressor” refers to a DNA-binding protein that regulates the expression of one or more genes by binding to the operator and blocking the attachment of RNA polymerase to the promoter, thus preventing transcription of genes. This blocking of expression is called repression. Repressor proteins attach to a DNA segment known as the operator.

As used herein, the term “operator” refers to a DNA segment to which a repressor binds.

As used herein, the term “operably linked” means that the components described are in a relationship permitting them to function in their intended manner. Thus, a nucleic acid sequence is “operably linked” when placed into a functional relationship with another sequence nucleic sequence. For instance, a promoter is “operably linked” to a coding sequence if the promoter causes the transcription of the coding sequence. Generally, operably linked means the linked nucleic acid sequences are contiguous.

Nucleic acid constructs of the invention:

The present invention provides for nucleic acid constructs useful for obtaining a tissue-specific expression of a transgene of interest without using an inducer drug.

In a first aspect, the invention thus relates to a nucleic acid construct comprising:

- a) a first sequence encoding for a repressor operably linked to a first promoter and to at least one tissue-specific miRNA target sequence, and
- b) a second sequence encoding for a transgene of interest operably linked to a second promoter and to an operator.

In one embodiment, the repressor is a chimeric repressor fusion protein.

Such chimeric repressor fusion protein comprises a DNA binding domain and a transcriptional repressor domain.

The DNA binding domain can be derived from a large array of bacterial operons in which a transcriptional regulator binds to a specific target sequence. Examples are the lacZ operon, the CynR operon. The use of mammalian DNA binding domain may also be considered such as the GAL4, Lex1 or Ecdysone receptor binding domain. Specific DNA binding domain may also be engineered by designing a zinc finger domain capable to bind DNA of known sequence.

The panel of transcriptional repressor domains includes the KRAB repressor, or the ERD and SID transcriptional repressor domains.

In a particular embodiment, the chimeric repressor fusion protein is the tTR-KRAB protein. Said protein is formed by the fusion of the DNA binding domain of the tetracycline repressor (tTR) to the KRAB repression domain of human (tTR-KRAB), which can bind the tetO sequence (called operator in the context of the present invention).

In one embodiment, the tissue-specific miRNA is selected in the group consisting of liver-specific miRNA, brain-specific miRNA, heart-specific miRNA, lung-specific miRNA, spleen-specific miRNA, kidney-specific miRNA, hematopoietic tissue-specific miRNA, muscle-specific miRNA.

In a particular embodiment, the tissue-specific miRNA is a liver-specific miRNA. Accordingly, the liver-specific miRNA is miR-122.

5 In another particular embodiment, the tissue-specific miRNA is a hematopoietic tissue-specific miRNA. Accordingly, hematopoietic tissue-specific miRNA is miR142.

In one embodiment, the first sequence comprises at least one tissue-specific miRNA target sequence. More than one copy of a miRNA target sequence may increase the effectiveness of the system.

10 Accordingly, the first sequence may comprise from one to ten, preferably four tissue-specific miRNA target sequence.

In a particular embodiment, the multiple miRNA target sequences may be in tandem.

It should be further underlined that combinations of miRNA target sequences to obtain highly specific cell expression patterns of the transgene of interest.

15 In this context, some tissue-specific expression patterns of mammalian miRNAs have already been disclosed: for example, international patent application WO 2007/000668 describes N° WO 2007/000668, which is incorporated herein by reference, gives tissue-specific expression patterns of mammalian miRNAs (Table 1).

20 It should be further noted that tissue specific miRNA can be assayed by profiling using microarrays as previously described (Liu *et al*, 2008).

Alternatively, one can use the miRbase database available on the web at:

<http://www.mirbase.org/> to determine the most appropriate target sequences to be used for expression in a specific tissue or cell type.

25 For the purpose of the invention, the term “transgene of interest” is intended to mean in particular any gene encoding a protein product having a therapeutic product. The protein product may be homologous with respect to the target cell (i.e. a product which is normally expressed in the target cell when said cell exhibits no pathology). In this case, the expression of a protein makes it possible, for example, to compensate for an insufficient expression in the cell or the expression of a protein that is inactive or weakly active due to a mutation. The therapeutic gene can also encode a mutant of a cellular protein, having increased stability, modified activity, etc. The protein product may also be heterologous with respect to the target

cell. In this case, an expressed protein may, for example, add to or introduce a deficient activity in or into the cell, allowing it to treat a pathology or stimulate an immune response.

5 In one embodiment, the transgene of interest is selected in the group consisting of enzymes, blood derivatives, hormones, chimiokines, interleukins, growth factors, neurotransmitters or their precursors, trophic factors, tumor suppressor genes, factors involved in clotting, proteins involved in DNA repair, protein transporters, receptors, etc.

10 In a particular embodiment, the transgene of interest is a transgene useful for treating a liver disease. Accordingly, the transgene of interest is the hepatic enzyme bilirubin glucuronosyl transferase useful for treating the Criggler-Najjar syndrome.

15 As used herein, the term "promoter" refers to a DNA sequence that determines the site of transcription initiation for an RNA polymerase. A promoter useful in the present invention may comprise a RNA polymerase III promoter that can provide high levels of constitutive expression across a variety of cell types and will be sufficient to direct the transcription of a distally located sequence, which is a sequence linked to the 3' end of the promoter sequence in a cell. Suitable promoters include, for example, constitutive, regulated, tissue-specific or ubiquitous promoters, which may be of cellular, viral or synthetic origin, such as CMV, RSV, 20 PGK, EF1[alpha], NSE, synapsin, [beta]-actin, GFAP, and the like.

In one embodiment, the first promoter and the second promoter are ubiquitous strong promoters. Accordingly, the first promoter may be the human cytomegalovirus (CMV) promoter and the second promoter may be PGK promoter. Alternatively, the liver specific 25 mTTR promoter can also be used.

In relation to the present invention, the repressor is thus operatively linked downstream of a promoter and upstream of at least one tissue-specific miRNA target sequence to form a sequence that can be used to prevent translation of the transgene in the 30 presence of a corresponding tissue-specific miRNA expressed in a desired cell.

In one embodiment, the operator is a tet operator sequence.

Said tet operator sequence comprises from two to ten, preferably from five to nine, even more preferably seven tetO binding sequences.

Preferably, said tetO binding sequences are in tandem. Each adjacent tetO binding sequences may be spaced from each other the same distance in the same nucleic acid sequence. The distance between the two or more tetO adjacent binding sequences may also vary and/or may be modified to achieve a desired degree of regulation efficiency.

5

In relation to the present invention, the transgene of interest is thus operatively linked downstream of a promoter and downstream of a tet operator sequence to form a sequence that can be used to control expression of the transgene in the presence of a repressor.

Alternatively the tet operator may be placed in within the lentiviral LTR as described in the WO 2007/000668. In this case, after reverse transcription, the tet operator is present at both sides of the proviral genome integrated in infected cells.

In another embodiment, the tet operator sequence is operatively linked to a promoter to form a sequence, including operatively linked tet-O sequences, a promoter and a transgene, that can be used to control expression of said transgene in the presence of a repressor.

15

It should be further noted that in another embodiment the both sequences previously described may also be carried out in two distinct nucleic acid constructs. Such embodiment may be useful for *in vitro* and *ex vivo* experiments.

20

Vector comprising the nucleic acid constructs of the invention:

The nucleic acid constructs of the present invention may be used to deliver in the transgene of interest to a site or cell of interest. For this purpose, a vector may be used.

25

A vector is thus a tool that allows or facilitates the transfer of an entity from one environment to another. By way of example, some vectors used in recombinant DNA techniques allow entities, such as a segment of DNA (such as a heterologous DNA segment, such as a heterologous cDNA segment), to be transferred into a target cell. Optionally, once within the target cell, the vector may then serve to maintain the heterologous DNA within the cell or may act as a unit of DNA replication. Examples of vectors used in recombinant DNA techniques include plasmids, chromosomes, artificial chromosomes or viruses.

30

It should be further be noted that a vector according to the present invention include a viral or non-viral vector.

Non-viral delivery systems include but are not limited to DNA transfection methods. Transfection includes a process using a non-viral vector to deliver a gene to a target cell. Typical transfection methods include electroporation, DNA biolistics, lipid-mediated transfection, compacted DNA-mediated transfection, liposomes, lipofectin, cationic agent-mediated, cationic facial amphiphiles (CFAs) and combinations thereof.

Viral delivery systems include but are not limited to an adenovirus vector, an adeno-associated viral (AAV) vector, a herpes viral vector, a retroviral vector, a lentiviral vector, a baculoviral vector as well as a virus-like particle (VLP).

In one particular embodiment, the vector is a lentiviral vector such as a lentiviral vector selected from the group consisting of Human Immunodeficiency Virus (HIV), e.g. HIV-1 or HIV-2, and Simian Immunodeficiency Virus (SIV).

Viral delivery systems and to produce them are known by those skilled in the art. In this context, such systems and methods have already been disclosed: for example, international patent application N° WO 2007/000668, which is incorporated herein by reference, describes the major examples of viral delivery systems useful in the context of the invention as well as the methods to produce them.

In another particular embodiment, the vector is a virus-like particle (VLP).

Where virus-like particle are being used, they may be prepared according to techniques known in the art and for example as described in the international patent application published under n° WO 02/34893, which is incorporated therein by reference.

Therapeutic uses of the vectors of the invention:

As is apparent from the foregoing, the above-defined vectors can be used for the *in vivo* or *ex vivo* transfer of a transgene of interest to cells.

Accordingly, the vector is particularly indicated for treating diseases either by direct administration of the vector particle to the patient afflicted by such a disease, or by

administering cells, in particular cells originating from the individual afflicted by such a disease, which have been contacted *ex vivo* with the vector.

Another aspect of the invention relates to a vector of the invention for use as drug.

5 As previously mentioned, the transgene of interest is selected in the group consisting of enzymes, blood derivatives, hormones, chemokines, interleukins, growth factors, neurotransmitters or their precursors, trophic factors, tumor suppressor genes, factors involved in clotting, proteins involved in DNA repair, protein transporters, receptors, etc.

10 Therefore, a vector of the invention is useful for treating any pathology caused by an insufficient expression of a particular protein or a mutation resulting in a protein that is inactive or weakly active. This kind of pathology usually results from recessive genetic mutations of a single gene.

15 The term "patient" as used herein denotes a mammal. Preferably, a patient according to the invention is a human.

In the context of the invention, the term "treating" or "treatment", as used herein, means reversing, alleviating, inhibiting the progress of, the pathology to which such term applies, or one or more symptoms of such pathology.

20

Another aspect of the invention relates to an *in vitro* or *ex vivo* method for obtaining a tissue-specific expression of a transgene of interest comprising the following steps:

- a) providing a vector of the invention as previously defined, and
- b) transferring said vector in a cell or a tissue of interest expressing a
25 corresponding tissue-specific miRNA.

Therefore, another aspect of the invention relates to a cell infected or transduced with a vector according to the invention as such.

The invention also relates to a said cell infected or transduced with a vector according to the invention for use as drug.

30

Pharmaceutical compositions

Therefore, the present invention also provides a pharmaceutical composition for treating a patient by gene therapy, wherein the pharmaceutical composition comprises a therapeutically effective amount of a vector of the present invention or a cell comprising thereof. The pharmaceutical composition may be for human or animal usage. Typically, a physician will determine the actual dosage will be most suitable for the patient and it will vary with the age, weight and response of said patient.

FIGURES:

Figure 1: Operating principle of the invention.

A: When the cell does not express the tissue-specific miRNA liable to bind to the corresponding tissue-specific miRNA target sequence, the repressor is translated and expressed and may therefore bind the operator and prevent the transcription of the transgene. However in the presence of a tetracyclin analog (Doxycyclin) the binding of the repressor does not occur any longer and transcription occurs.

B: When the cell expresses the tissue-specific miRNA liable to bind to the corresponding tissue-specific miRNA target sequence (e.g. miR 122 in hepatic cells), the repressor is not translated since its mRNA is destroyed caused by the binding of the miRNA and therefore the transgene may be expressed in said particular tissue.

Figure 2: Schematic diagram of the vectors used. cPPT : Central polypurine tract, IRES : internal ribosomal entry site, WPRE : woodchuck hepatitis virus post-transcriptional, RRE : rev protein Responsive element, pA : polyadenylation site, CMV : cytomegalovirus, CAG : CMV immediate enhancer/ β -actin, PGK : phosphoglycerate kinase, mTTR : liver-specific transthyretin promoter.

Figure 3: GFP expression in cells transduced (293T (A), HUH7 (B), or NR8383 (C)) with the different lentiviral constructs in the presence or absence of doxycycline. After 10 days of culture, transduced cells were analyzed for GFP expression by FACS. Results are expressed as a percentage of mean fluorescence intensity (MFI). In tetR-Krab system, the expression of GFP is optimal in the presence of doxycycline: this corresponds to 100% of the MFI.

EXAMPLE:**Material & Methods**

Constructions of lentiviral vectors: As shown in Figure 2, lentiviral constructs contain two different expression cassettes. The first cassette contains a ubiquitous promoter driving the tetR-Krab sequence and the 4 target sequences of miR 122 or 142.3. This cassette has been placed in reverse orientation with an unidirectional polyadenylation site. The tetO heptamer sequence is placed between the two cassettes, or in the proviral long terminal repeats (LTRs) sequences. The second cassette contains the GFP gene under control of a ubiquitous or specific promoter followed by a woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element (WPRE). This construction was synthesized as a modular system including unique restriction sites on both sides of each component. From this plasmid, different promoter of GFP and TetR-Krab were inserted. All other constructs were generated from the same backbone (PTKM 3, 7, 9, 10, 12, 13, 15). Our construction has been compared with a conventional inducible tetR-Krab system that includes GFP gene under control of CAG promoter (CMV immediate enhancer/ β -actin) as part of bicistronic unit comprising the Krab-based repressor (PLVCT) previously published. In this construct the TetO was inserted into the U3 region of the 3' LTR.

Production of lentiviral vectors: Lentiviral vector stocks were generated by calcium phosphate-mediated transient transfection of 293T cells of the vector transfer plasmid, the packaging plasmid psPAX2, and the vesicular stomatitis virus G protein (VSVG) envelope protein-coding plasmid pMD2G. Culture medium was collected at 24 and 48 h, aliquoted, and stored at -80°C until used.

Cell culture and infection: 293T cells, HUH7 cells, and NR8383 were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 50 IU/ml penicillin, and 50 μ g/ml streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

2.5.10⁴ cells per well were seeded into 24-well plates and were infected with 100ul of lentiviral supernatant during 24 hours. Doxycycline was used at a final concentration of 100ng/ml.

FACS Analysis: Ten days after infection, transduced cells were analysed for EGFP expression by FACS. Analysis was performed on an LSRII (Becton Dickinson). Data were analysed with FlowJo software.

Results

Cell lines from hepatic or non-hepatic origin were transduced with the various vectors described previously (Figure 2). We used HuH7 cells from human hepatic origin that are known to strongly express miR122. We also used 293T cells derived human embryonic kidney as well as cells from rat alveolar macrophage (NR8383 cells). NR8383 cells are part of the immune system and express miR142. In all cell lines, the expression of GFP was quantified by FACS analysis and we compared GFP expression in the presence or absence of doxycycline in each cell line and between the various cell lines (Figure 3).

We compared our system combining a miRNA-mediated approach for restricting gene expression to a repressor tetR- Krab, with a conventional inducible tetR-Krab system. In this construction, named PLVCT, The tetR-Krab cDNA was expressed from the ubiquitously active CAG-promoter as part of a bicistronic transcript also producing the GFP gene. After transduction with PLVCT, we observed very tight regulation of GFP expression. Indeed, as other studies have previously shown, in 293T cells and in the absence of doxycycline, the decrease in GFP MFI is about 98%. However the efficiency varies according to cell types. In the hepatic cell line, the decrease is 90% but only about 60% in the macrophage of rats.

We tested in different cells line our tetR-Krab regulation system in which the tetR-Krab mRNA is coupled to target sequences of the miR122 or miR142.

In 293T cells (miR122^{negative} and miR142^{negative}), we observed in absence of doxycycline a decrease in mean fluorescence with all construction (Figure 3 A). This indicates that tetR-Krab protein is produced and will bind to the tetO in the absence of doxycycline and repress the expression of the GFP. Repression of transcription of GFP gene is more efficient when the GFP is under the control of a liver-specific transthyretin promoter (mTTR) rather than under a ubiquitous promoter. Indeed, regarding the PTKM 3 and PTKM 13 constructions that contain ubiquitous promoters driving GFP, there is a decrease in GFP MFI of about 50 % in 293 cells. It is worth noting that the mTTR promoter which activity should be restricted to hepatocytes is leaky in other cell types.

With lentiviral constructs PTKM 9, 7, 10, 12, and 15 there was a decrease of GFP MFI of at least of 74 percent. PTKM 9 was the most efficient (GFP MFI decreased of 94%). This may be due to the fact that PTKM 9 contains a strong promoter (CMV) driving TetR KRAB expression unlike PTKM 7, 10 and 12 containing a weaker PGK promoter. The difference between PTKM 9 and 15 is the position of tetO (Figure 2). In PTKM 9, the tetO sequence is placed upstream of the promoters, between the two diverging cassettes. In PTKM 15, TetO was inserted into the U3 region of the 3' LTR. During reverse transcription, RNA 3' U3 region serves as the template for the synthesis of its 5' DNA homologue and the tetO sequence is duplicated in the integrated provirus. However, our results showed that tPTKM 15 is not more efficient than PTKM 9 suggesting that multiplying tetO sequences does not seem to impact effectiveness of repression.

In HUH7 cells, (miR122^{positive} and miR142^{negative}) we observed that in the absence of doxyxycline there was no variation of GFP in all versions that contain the miR122 target sequences (Figure 3 B). These results showed that, as expected, the miR122 will bind to its target sequence and will destroy the mRNA coding for the chimeric repressor. Therefore, with these constructions, transgene expression can be restricted to hepatic cells.

Lentiviral constructs PTKM 10 and 12, do not contain the miR 122 target sequences. Consequently, in HuH7 tetR-Krab protein is produced and therefore we observed in the absence of doxycycline a decrease in MFI with both constructs. This clearly shows that the absence of tetR-Krab inhibition with the miR122 target containing vectors is actually due to the presence of the miR122 targets.

In NR8383 cells (miR142^{positive} and miR122^{negative}) in the absence of doxycycline there was a decrease of GFP MFI of approximately 70% when cells were transduced with constructs that did not contain the target sequences of the miR 142 (Figure 3 C) . In NR8383 cells infected with PTKM 12 that contains the miR142 target sequence, transgene expression did not change in the absence of doxycycline. This indicates that the miR142 target sequence is functional in cells from the hematopoietic lineage.

Taken together, these results indicate that our new expression system provides miRNA-based specific expression and high transgene expression in cells from different tissues.

5 **REFERENCES:**

Throughout this application, various references describe the state of the art to which this invention pertains. The disclosures of these references are hereby incorporated by reference into the present disclosure.

10

Barde, I., et al. Regulation of episomal gene expression by KRAB/KAP1-mediated histone modifications. *J Virol* 83, 5574-5580 (2009).

15

Brown, B.D., Venneri, M.A., Zingale, A., Sergi, L. & Naldini, L. Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer. *Nat Med* 12, 585-591 (2006).

Brown, B.D., et al. Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state. *Nat Biotechnol* 25, 1457-1467 (2007).

20

Deuschle, U., Meyer, W.K. & Thiesen, H.J. Tetracycline-reversible silencing of eukaryotic promoters. *Mol Cell Biol* 15, 1907-1914 (1995).

Gossen M, Bujard H; Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters; *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jun 15;89(12):5547-51.

Liu CG, Calin GA, Volinia S, Croce CM; MicroRNA expression profiling using microarrays; *Nat Protoc*. 2008;3(4):563-78.

25

Szulc, J., Wiznerowicz, M., Sauvain, M.O., Trono, D. & Aebischer, P. A versatile tool for conditional gene expression and knockdown. *Nature methods* 3, 109-116 (2006).

30

CLAIMS:

- 5 1. A nucleic acid construct comprising :
 - a) a first sequence encoding for a repressor operably linked to a first promoter and to at least one tissue-specific miRNA target sequence, and
 - b) a second sequence encoding for a transgene of interest operably linked to a
10 second promoter and to an operator.
2. The nucleic acid construct according to claim 1, wherein the tissue-specific miRNA is a liver-specific miRNA.
- 15 3. The nucleic acid construct according to claim 2, wherein the liver-specific miRNA is miR122.
4. The nucleic acid construct according to any one claims 1 to 3, wherein the repressor is a chimeric repressor fusion protein.
20
5. The nucleic acid construct according to claim 4, wherein the chimeric repressor fusion protein is the tTR-KRAB protein.
6. The nucleic acid construct according to any one claims 1 to 5, wherein the operator
25 is a tet operator sequence.
7. The nucleic acid construct according to claim 6, wherein the tet operator sequence comprises seven tetO binding sequences.
- 30 8. A vector comprising a nucleic acid construct as defined in any one claims 1 to 7.
9. The vector according to claim 8, wherein the vector is a viral vector.
10. A cell infected or transduced with the vector as defined in claim 8 or 9.

11. A vector as defined in claim 8 or 9 or a cell as defined in claim 10 for use as drug.

12. A vector as defined in claim 8 or 9 or a cell as defined in claim 10 for use in the
5 treatment of a liver disease.

13. An *in vitro* or *ex vivo* method for obtaining a tissue-specific expression of a
transgene of interest comprising the following steps:

a) providing a vector of the invention as defined above, and

b) transferring said vector in a cell or a tissue of interest expressing a
10 corresponding tissue-specific miRNA.

15

20

25

30

ABSTRACT OF THE INVENTION

TISSUE-SPECIFIC REGULATION OF TRANSGENE EXPRESSION

5

The present invention relates to nucleic acid constructs and vector comprising thereof for use in gene transfer and therapy applications, and uses thereof for obtaining a tissue-specific expression of a transgene of interest.

10

15

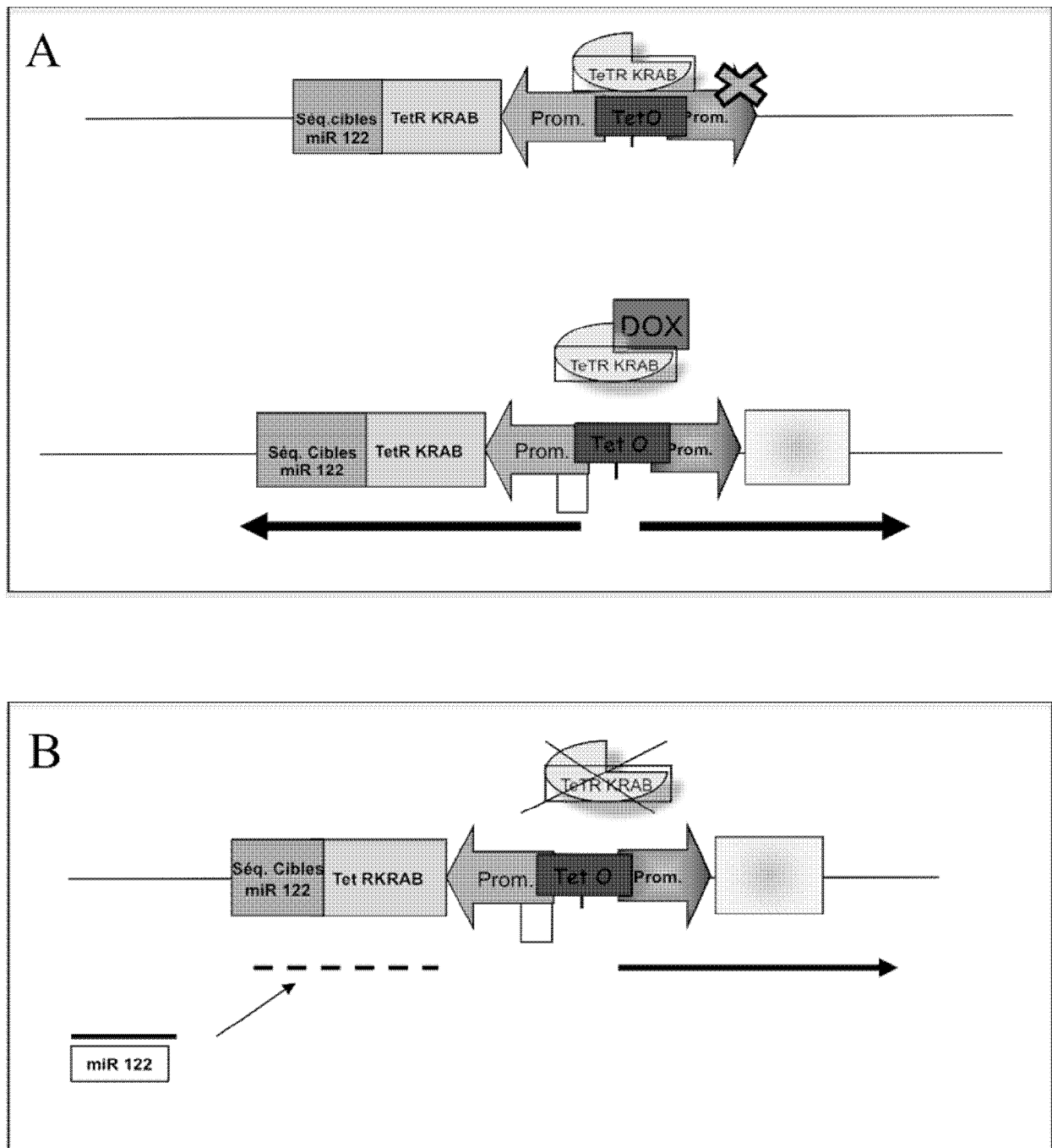


Figure 1

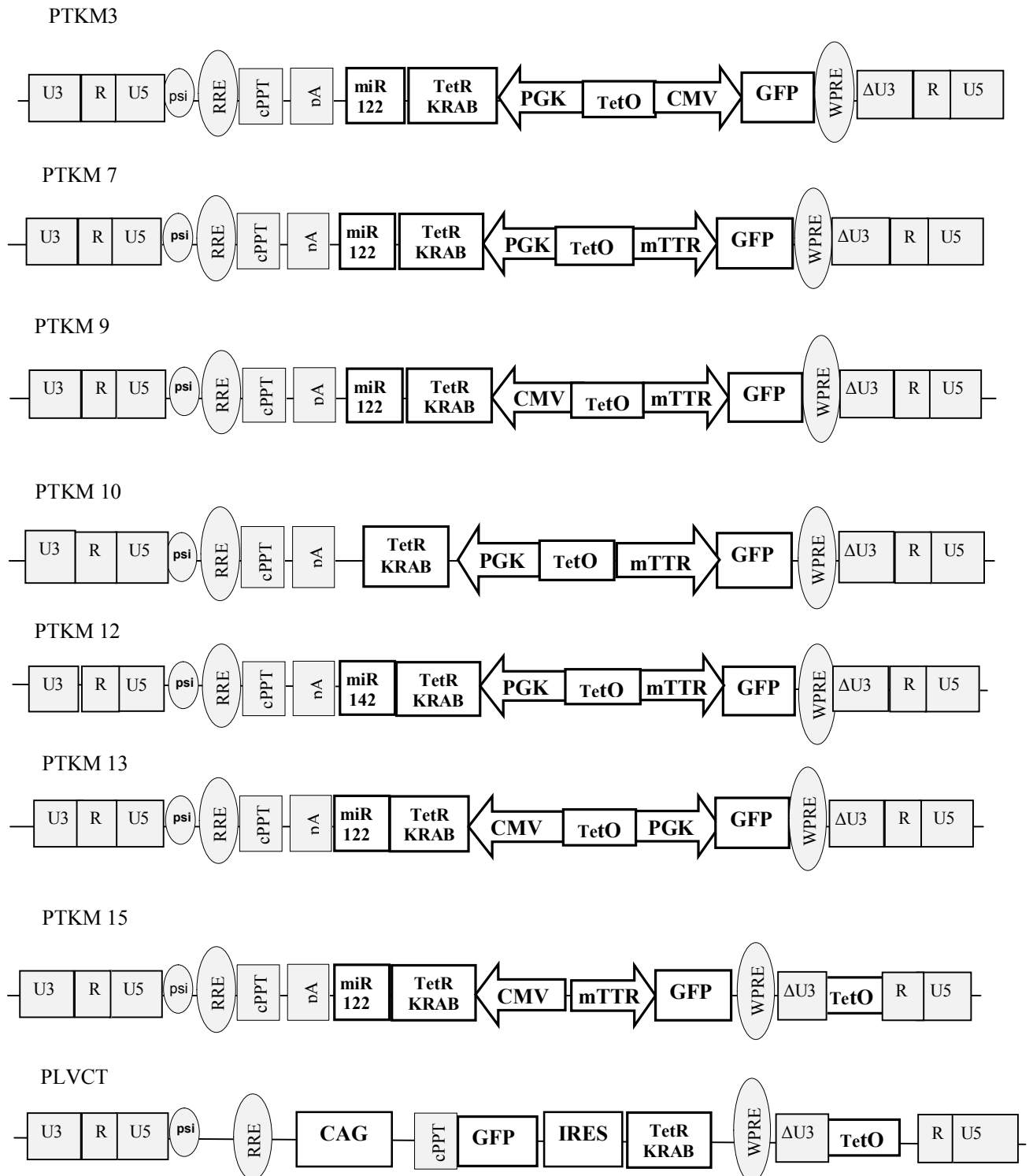
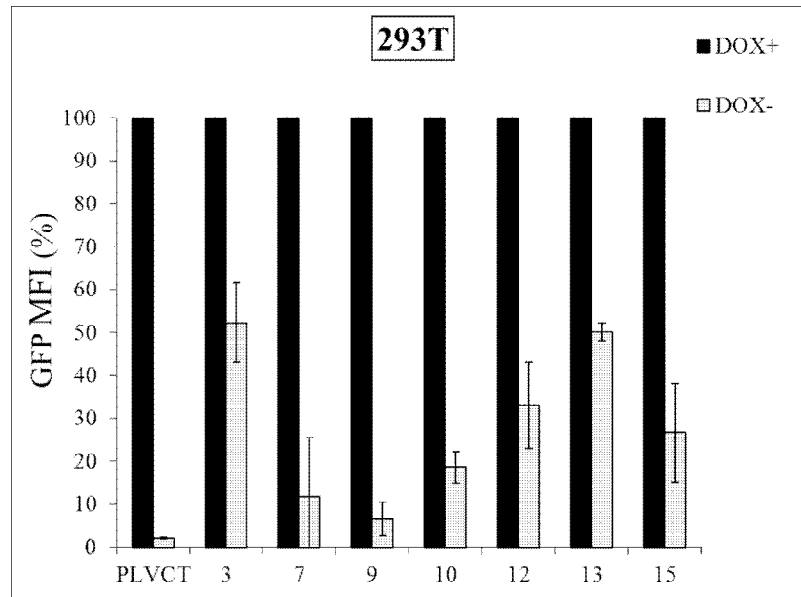
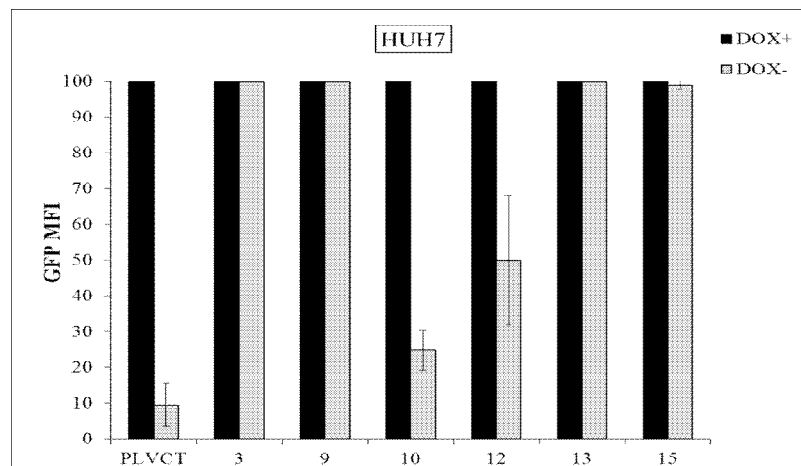
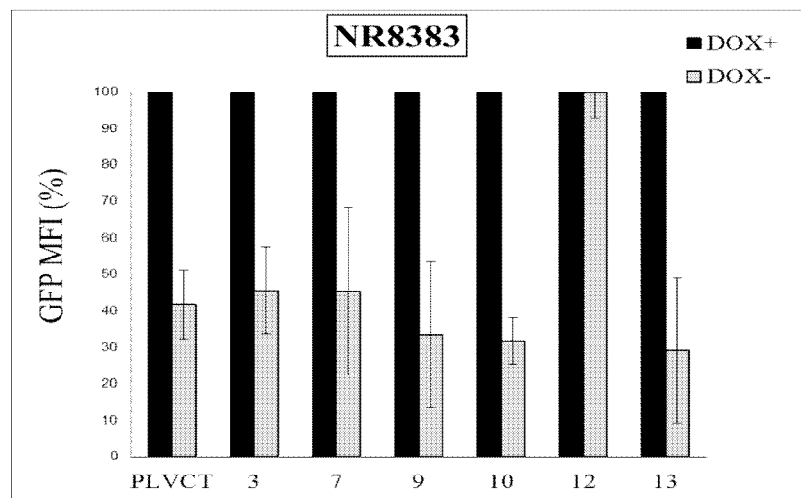


Figure 2

A**B****C****Figure 3**

Discussion

Expression spécifique hépatocytaire

Nos résultats valident la fonctionnalité de notre système. Lorsque les séquences spécifiques du miR-122 sont placées en amont de tTR-KRAB, l'expression de la GFP est forte au sein de la lignée hépatocytaire alors que dans les lignées non hépatocytaires l'expression y est réduite. Ainsi dans les lignées hépatocytaires le miR-122 reconnaît sa cible et empêche la synthèse de tTR-KRAB.

L'expression du produit du transgène diminue dans les lignées hépatocytaires mais n'est pas complètement réprimée. Dans le but d'améliorer le système de régulation, l'opérateur TetO a été placé dans la région U3 (PTKM 15). Lors de la transcription inverse, l'ARN de la région U3 en 3' sert de matrice pour la synthèse de U3 en 5', ainsi l'opérateur TetO est dupliqué dans le provirus intégré. Cependant la construction comportant 2 TetO ne permet pas une répression de la GFP plus importante que dans les constructions qui ne comportent qu'un seul opérateur.

D'après les résultats obtenus, l'efficacité de la répression du produit du transgène est variable selon les promoteurs utilisés et selon les lignées cellulaires dans lesquelles elles sont testées. Les forces des promoteurs sont différentes selon les lignées. De plus des interférences entre les différents promoteurs utilisés peuvent diminuer l'efficacité du système de répression. Ainsi, il faudrait placer des promoteurs identiques dans chaque cassette afin d'éventuellement limiter les interactions entre eux.

Système permettant d'inhiber la réponse immunitaire d'un produit d'un transgène ?

Un des obstacles à résoudre pour les approches de thérapie génique *in vivo* est la réponse immunitaire vis-à-vis du produit d'un transgène. En effet l'injection de lentivirus recombinants pseudotypés VSVG chez l'adulte entraîne systématiquement une réponse immunitaire vis-à-vis du produit du transgène et ne permet pas l'expression à long terme de protéines thérapeutiques (Di Domenico, C. *et al.*, 2005) (Kootstra, N. A. *et al.*, 2003).

Concernant l'AAV, dans certains cas, il peut s'avérer tolérogène et permettre une expression à long terme de protéines thérapeutiques c'est le cas par exemple des protéines sécrétées (Cao, O. *et al.*, 2007) (Mingozzi, F. *et al.*, 2003). Cependant certains produits de transgènes provoquent une réponse immunitaire. C'est le cas de la GFP chez le primate et le chien (Bell, P. *et al.* 2011) (Gao, G. *et al.*, 2009), (Wang, L. *et al.* 2010). L'absence ou non de la réponse immune varie en fonction du produit du transgène, de la dose de vecteur injectée, de la voie d'injection, du promoteur utilisé (spécifique ou non), et du modèle animal utilisé (Martino, A. T. *et al.*, 2009) (Di Domenico, C. *et al.*, 2006). Les souches de souris utilisées semblent importante : par exemple le facteur IX est très immunogène chez la C3H/HeJ et la GFP très immunogène chez la Balb/c (Hoffman, B. E. *et al.* 2011) (Breous, E. *et al.* 2010).

De nombreuses stratégies sont utilisées pour limiter la réponse immunitaire. Une des stratégies peut consister à empêcher l'expression du produit du transgène par les cellules présentatrices d'antigènes. Ainsi, l'utilisation d'un promoteur spécifique qui limite l'expression du produit du transgène aux hépatocytes peut dans certains cas éviter une réponse immunitaire cytotoxique vis à vis du produit du transgène. (Di Domenico, C. *et al.*, 2006), (Follenzi, A. *et al.*, 2004). Dans certains cas l'utilisation de promoteurs spécifiques ne suffit pas à éviter la réponse immunitaire. Lorsque nous injectons du lentivirus mTTR UGT1A1 chez des rats Gunn adultes, nous n'obtenons pas une expression de l'UGT1A1 à long terme (Schmitt, F. *et al.* 2010). Une autre stratégie plus récente consiste à inhiber l'expression du produit du transgène dans les cellules présentatrices d'antigène en incorporant dans la cassette lentivirale des séquences cibles du mir142, qui est exprimé

seulement dans les cellules immunitaires (Brown, B. D. *et al.*, 2007). Ainsi, nous avons montré qu'en utilisant des lentivirus porteurs de l' *ugt1a1* sous le contrôle d'un promoteur spécifique du foie, ainsi que 4 copies de la séquence cible de miR-142, nous avons été en mesure d'obtenir une normalisation complète et permanente des taux de bilirubine sérique après injection chez le rat Gunn (Schmitt, F. *et al.* 2010). Mais avec certains transgènes véhiculés par le lentivirus recombinant, comme le facteur VIII, l'utilisation du mir142 n'est pas suffisante pour empêcher la réponse immunitaire vis-à-vis du produit du transgène (Matsui, H. *et al.* 2011). De plus, cette stratégie n'a pas été encore démontrée avec l'AAV.

Notre système pourrait permettre d'empêcher une réponse immunitaire vis à vis du produit d'un transgène. En effet les transactivateurs sont souvent immunogènes (Le Guiner, C. *et al.*, 2007) (Latta-Mahieu, M. *et al.*, 2002). Dans notre cas nous espérons qu'une réponse immunitaire sera dirigée contre le tTR-KRAB qui est seulement exprimé dans les cellules non hépatocytaires. Ainsi seules les cellules non hépatocytaires exprimant tTR-KRAB seront éliminées.

Ce système, pourrait donc être un moyen pour obtenir une expression hépatocytaire forte, spécifique et à long terme. Le prochain axe de travail sera donc de tester cette construction et d'analyser son efficacité *in vivo*.

Bilan général et perspectives

Ce n'est qu'au milieu du 19^e siècle que des premiers écrits soulignent la capacité du foie à réparer spontanément certaines lésions (Cruveilhier et Andral). Les avancées scientifiques au cours des dernières décennies, nous permettent de mieux comprendre l'extraordinaire capacité de régénération de cette organe complexe, régénération orchestrée par un réseau d'interactions cellulaires impliquant de multiples voies de signalisations. Longtemps on a pensé qu'en condition physiologique ou qu'après lésions hépatiques seuls les hépatocytes étaient capables de restaurer la masse et la taille du foie. Mais aujourd'hui ce dogme est controversé puisqu'il y a quelques mois, une équipe a montré l'implication de cellules hépatiques progénitrices SOX9⁺ lors de la croissance physiologique du foie ou après lésions hépatiques au CCl₄ (Furuyama, K. *et al.* 2011). Ainsi en condition non pathologique, la masse et la taille du foie sont restaurées ou par les hépatocytes eux-mêmes ou par des cellules souches à ce jour encore mal caractérisées. En condition pathologique lorsque la prolifération hépatocytaire est bloquée, il est admis que les cellules ovales dont l'origine reste indéterminée, restaurent la masse et la taille du foie. D'autres cellules nommées SHPCs sont considérées par certains comme une nouvelle population de cellules souches hépatiques, mais notre étude a démontré que ces cellules proviennent d'hépatocytes résidents résistants à la rétrovirusine.

La recherche fondamentale concernant les cellules souches adultes hépatiques permet d'élargir notre champ de connaissance concernant les mécanismes de régénération hépatique en conditions physiologiques mais aussi en conditions physiopathologiques, et donc par exemple de mieux comprendre la survenue de tumeurs hépatiques etc.... Néanmoins c'est surtout pour leur potentiel thérapeutique que les cellules souches hépatiques sont au cœur des recherches actuelles.

L'hépatocyte a une capacité de réplication telle qu'il pourrait presque être considéré comme une cellule souche monopotente. La transplantation d'hépatocytes a été proposée comme alternative à la transplantation hépatique. Cependant les essais cliniques restent peu nombreux et pour le moment, chez l'homme la transplantation d'hépatocytes a permis simplement de suppléer partiellement la fonction hépatique. Les limitations majeures sont l'absence d'expansion des hépatocytes in vitro et le manque de disponibilité de foie humain comme source de cellules. Ainsi, la transplantation de cellules souches hépatiques pourrait être une alternative à la greffe d'hépatocytes pour le traitement des maladies métaboliques sévères. L'utilisation des cellules ovales en thérapie cellulaire n'est pas envisageable actuellement du fait de leur possible implication dans la formation de tumeurs hépatiques. Finalement, l'une des pistes prometteuses concerne les cellules souches de la moelle osseuse ou du tissu adipeux douées d'une grande plasticité, et qui se sont montrées capables de repeupler le foie par des phénomènes de fusion et de transdifférenciation. Un autre axe de recherche est l'utilisation des IPS, qui ont la capacité de se différencier en hépatocytes.

La thérapie cellulaire pour les maladies hépatiques héréditaires se heurte à une difficulté majeure qui est l'implantation d'une proportion suffisante de cellules dans le foie du receveur en l'absence d'avantage sélectif donné aux cellules greffées. Ainsi, la thérapie cellulaire est efficace dans des modèles dans lesquelles les cellules greffées ont un avantage prolifératif sur les hépatocytes résidents comme par exemple dans la tyrosinémie héréditaire de type 1. Pour les maladies hépatiques héréditaires sans avantage sélectif, comme c'est le cas pour la maladie de Crigler Najjar, la thérapie génique in vivo reste à l'heure actuelle une stratégie de choix.

Nous avons développé depuis plusieurs années différentes stratégies de thérapie génique pour le traitement de maladies métaboliques héréditaires en utilisant différents vecteurs viraux testés notamment chez le rat Gunn, modèle de la maladie de Crigler Najjar. Le rat Gunn a été traité avec un oncorétrovirus murin mais ce vecteur sera difficilement utilisable en clinique pour traiter des patients adultes puisqu'il n'infecte que des cellules en division. L'utilisation du lentivirus recombinant pseudotypé VSVG représentait alors pour nous une alternative puisqu'il était décrit comme infectant des cellules quiescentes. Malheureusement les hépatocytes quiescents sont peu permissifs à l'infection lentivirale.

Le lentivirus recombinant pseudotypé VSVG semble ainsi tout comme l'oncorétrovirus difficilement utilisable pour traiter les patients adultes dans lequel le foie est quiescent. Néanmoins, nous avons montré dans notre étude qu'il existe une amélioration de la transduction lentivirale hépatocytaire lors de la phase d'initiation ou pendant l'interphase du cycle cellulaire. Ainsi, pour les applications cliniques, ce vecteur semble mieux adapté pour traiter les nouveaux nés ou certaines maladies métaboliques d'origine hépatique dans lequel le foie est en régénération comme c'est le cas dans la maladie de Wilson.

En ce qui concerne la maladie de Crigler Najjar, parmi les vecteurs de transfert de gènes l'AAV semble le plus approprié pour un traitement thérapeutique chez le patients adultes. D'ailleurs, un essai clinique Européen de thérapie génique pour la maladie de Crigler Najjar de type 1 fondé sur le transfert de gènes dans le foie par des AAV8sc recombinants porteurs du gène de l'*ugt1* sous contrôle d'un promoteur foie spécifique LP1, est prévu en 2012. Nous fondons beaucoup d'espoir dans cet essai clinique qui nous l'espérons permettra aux malades de retrouver une vie normale grâce à une correction de leur bilirubinémie. De plus, si cet essai s'avère être efficace, il pourra ensuite être appliqué à d'autres maladies métaboliques héréditaires du foie.

BIBLIOGRAPHIE

- Aartsma-Rus, A., den Dunnen, J.T. & van Ommen, G.J. (2010) New Insights in Gene-Derived Therapy: The Example of Duchenne Muscular Dystrophy. *Ann N Y Acad Sci*, 1214, 199-212.
- Akerman, P., Cote, P., Yang, S.Q., McClain, C., Nelson, S., Bagby, G.J. & Diehl, A.M. (1992) Antibodies to Tumor Necrosis Factor-Alpha Inhibit Liver Regeneration after Partial Hepatectomy. *Am J Physiol*, 263, G579-585.
- Akhurst, B., Croager, E.J., Farley-Roche, C.A., Ong, J.K., Dumble, M.L., Knight, B. & Yeoh, G.C. (2001) A Modified Choline-Deficient, Ethionine-Supplemented Diet Protocol Effectively Induces Oval Cells in Mouse Liver. *Hepatology*, 34, 519-522.
- Akhurst, B., Matthews, V., Husk, K., Smyth, M.J., Abraham, L.J. & Yeoh, G.C. (2005) Differential Lymphotoxin-Beta and Interferon Gamma Signaling During Mouse Liver Regeneration Induced by Chronic and Acute Injury. *Hepatology*, 41, 327-335.
- Alison, M., Golding, M., Lalani, E.N., Nagy, P., Thorgeirsson, S. & Sarraf, C. (1997) Wholesale Hepatocytic Differentiation in the Rat from Ductular Oval Cells, the Progeny of Biliary Stem Cells. *J Hepatol*, 26, 343-352.
- Alvarez-Dolado, M., Pardal, R., Garcia-Verdugo, J.M., Fike, J.R., Lee, H.O., Pfeffer, K., Lois, C., Morrison, S.J. & Alvarez-Buylla, A. (2003) Fusion of Bone-Marrow-Derived Cells with Purkinje Neurons, Cardiomyocytes and Hepatocytes. *Nature*, 425, 968-973.
- Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T. & Yamanaka, S. (2008) Generation of Pluripotent Stem Cells from Adult Mouse Liver and Stomach Cells. *Science*, 321, 699-702.
- Arai, M., Yokosuka, O., Chiba, T., Imazeki, F., Kato, M., Hashida, J., Ueda, Y., Sugano, S., Hashimoto, K., Saisho, H., Takiguchi, M. & Seki, N. (2003) Gene Expression Profiling Reveals the Mechanism and Pathophysiology of Mouse Liver Regeneration. *J Biol Chem*, 278, 29813-29818.
- Argast, G.M., Campbell, J.S., Brooling, J.T. & Fausto, N. (2004) Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation Mediates Tumor Necrosis Factor-Induced Hepatocyte Replication. *J Biol Chem*, 279, 34530-34536.

- Argyris, T.S. & Miller, A. (1976) Liver Hepatocyte Mitotic Activity after a Single Injection of Phenobarbital in Immature Male Rats. *Anat Rec*, 185, 447-451.
- Aubert, D., Menoret, S., Chiari, E., Pichard, V., Durand, S., Tesson, L., Moullier, P., Anegon, I. & Ferry, N. (2002) Cytotoxic Immune Response Blunts Long-Term Transgene Expression after Efficient Retroviral-Mediated Hepatic Gene Transfer in Rat. *Mol Ther*, 5, 388-396.
- Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S, Benninghoff U, Cassani B, Callegaro L, Scaramuzza S, Andolfi G, Mirolo M, Brigida I, Tabucchi A, Carlucci F, Eibl M, Aker M, Slavin S, Al-Mousa H, Al Ghonaïum A, Ferster A, Duppenenthaler A, Notarangelo L, Wintergerst U, Buckley RH, Bregni M, Marktel S, Valsecchi MG, Rossi P, Ciceri F, Miniero R, Bordignon C, Roncarolo MG. (2009) Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N Engl J Med*, 29;360(5):447-58
- Aurisicchio, L., Bujard, H., Hillen, W., Cortese, R., Ciliberto, G., La Monica, N. & Palombo, F. (2001) Regulated and Prolonged Expression of Mifn(Alpha) in Immunocompetent Mice Mediated by a Helper-Dependent Adenovirus Vector. *Gene Ther*, 8, 1817-1825.
- Aurisicchio, L., De Tomassi, A., La Monica, N., Ciliberto, G., Traboni, C. & Palombo, F. (2005) Regulated and Liver-Specific Tamarin Alpha Interferon Gene Delivery by a Helper-Dependent Adenoviral Vector. *J Virol*, 79, 6772-6780.
- Avril, A., Pichard, V., Bralet, M.P. & Ferry, N. (2004) Mature Hepatocytes Are the Source of Small Hepatocyte-Like Progenitor Cells in the Retrorsine Model of Liver Injury. *J Hepatol*, 41, 737-743.
- Azizi, S.A., Stokes, D., Augelli, B.J., DiGirolamo, C. & Prockop, D.J. (1998) Engraftment and Migration of Human Bone Marrow Stromal Cells Implanted in the Brains of Albino Rats--Similarities to Astrocyte Grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 3908-3913.
- Barajas, M., Mazzolini, G., Genove, G., Bilbao, R., Narvaiza, I., Schmitz, V., Sangro, B., Melero, I., Qian, C. & Prieto, J. (2001) Gene Therapy of Orthotopic Hepatocellular Carcinoma in Rats Using Adenovirus Coding for Interleukin 12. *Hepatology*, 33, 52-61.
- Barde, I., Laurenti, E., Verp, S., Groner, A.C., Towne, C., Padrun, V., Aebischer, P., Trumpp, A. & Trono, D. (2009) Regulation of Episomal Gene Expression by Krab/Kap1-Mediated Histone Modifications. *J Virol*, 83, 5574-5580.
- Bayer, M., Kantor, B., Cockrell, A., Ma, H., Zeithaml, B., Li, X., McCown, T. & Kafri, T. (2008) A Large U3 Deletion Causes Increased in Vivo Expression from a Nonintegrating Lentiviral Vector. *Mol Ther*, 16, 1968-1976.

- Bell, P., Gao, G., Haskins, M.E., Wang, L., Sleeper, M.M., Wang, H., Calcedo, R., Vandenberghe, L., Weisse, C., Withnall, E., Wilson, J.M. & Chen, S.J. (2011) Evaluation of Aav Vectors for Liver-Directed Gene Transfer in Dogs. *Hum Gene Ther.*
- Bellodi-Privato, M., Aubert, D., Pichard, V., Myara, A., Trivin, F. & Ferry, N. (2005) Successful Gene Therapy of the Gunn Rat by in Vivo Neonatal Hepatic Gene Transfer Using Murine Oncoretroviral Vectors. *Hepatology*, 42, 431-438.
- Benhamouche, S., Decaens, T., Godard, C., Chambrey, R., Rickman, D.S., Moinard, C., Vasseur-Cognet, M., Kuo, C.J., Kahn, A., Perret, C. & Colnot, S. (2006) Apc Tumor Suppressor Gene Is The "Zonation-Keeper" Of Mouse Liver. *Dev Cell*, 10, 759-770.
- Berasain, C., Garcia-Trevijano, E.R., Castillo, J., Erroba, E., Lee, D.C., Prieto, J. & Avila, M.A. (2005) Amphiregulin: An Early Trigger of Liver Regeneration in Mice. *Gastroenterology*, 128, 424-432.
- Best, D.H., Butz, G.M. & Coleman, W.B. (2010) Cytokine-Dependent Activation of Small Hepatocyte-Like Progenitor Cells in Retrorsine-Induced Rat Liver Injury. *Exp Mol Pathol*, 88, 7-14.
- Best, D.H. & Coleman, W.B. (2007a) Bile Duct Destruction by 4,4'-Diaminodiphenylmethane Does Not Block the Small Hepatocyte-Like Progenitor Cell Response in Retrorsine-Exposed Rats. *Hepatology*, 46, 1611-1619.
- Best, D.H. & Coleman, W.B. (2007b) Treatment with 2-Aaf Blocks the Small Hepatocyte-Like Progenitor Cell Response in Retrorsine-Exposed Rats. *J Hepatol*, 46, 1055-1063.
- Biondo-Simoes Mde, L., Erdmann, T.R., Ioshii, S.O., Matias, J.E., Calixto, H.L. & Schebelski, D.J. (2009) The Influence of Estrogen on Liver Regeneration: An Experimental Study in Rats. *Acta Cir Bras*, 24, 3-6.
- Bisgaard, H.C., Nagy, P., Ton, P.T., Hu, Z. & Thorgeirsson, S.S. (1994) Modulation of Keratin 14 and Alpha-Fetoprotein Expression During Hepatic Oval Cell Proliferation and Liver Regeneration. *J Cell Physiol*, 159, 475-484.
- Blomer, U., Naldini, L., Kafri, T., Trono, D., Verma, I.M. & Gage, F.H. (1997) Highly Efficient and Sustained Gene Transfer in Adult Neurons with a Lentivirus Vector. *J Virol*, 71, 6641-6649.
- Bockhorn, M., Frilling, A., Benko, T., Best, J., Sheu, S.Y., Trippler, M., Schlaak, J.F. & Broelsch, C.E. (2007a) Tri-Iodothyronine as a Stimulator of Liver Regeneration after Partial and Subtotal Hepatectomy. *Eur Surg Res*, 39, 58-63.

- Bockhorn, M., Goralski, M., Prokofiev, D., Dammann, P., Grunewald, P., Trippler, M., Biglarnia, A., Kamler, M., Niehues, E.M., Frilling, A., Broelsch, C.E. & Schlaak, J.F. (2007b) Vegf Is Important for Early Liver Regeneration after Partial Hepatectomy. *J Surg Res*, 138, 291-299.
- Bohm, F., Kohler, U.A., Speicher, T. & Werner, S. (2010) Regulation of Liver Regeneration by Growth Factors and Cytokines. *EMBO Mol Med*, 2, 294-305.
- Boonen, K.J. & Post, M.J. (2008) The Muscle Stem Cell Niche: Regulation of Satellite Cells During Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*, 14, 419-431.
- Borowiak, M., Garratt, A.N., Wustefeld, T., Strehle, M., Trautwein, C. & Birchmeier, C. (2004) Met Provides Essential Signals for Liver Regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 10608-10613.
- Bosch, A., McCray, P.B., Jr., Walters, K.S., Bodner, M., Jolly, D.J., van Es, H.H., Nakamura, T., Matsumoto, K. & Davidson, B.L. (1998) Effects of Keratinocyte and Hepatocyte Growth Factor in Vivo: Implications for Retrovirus-Mediated Gene Transfer to Liver. *Hum Gene Ther*, 9, 1747-1754.
- Boulton, R., Woodman, A., Calnan, D., Selden, C., Tam, F. & Hodgson, H. (1997) Nonparenchymal Cells from Regenerating Rat Liver Generate Interleukin-1alpha and -1beta: A Mechanism of Negative Regulation of Hepatocyte Proliferation. *Hepatology*, 26, 49-58.
- Bralet, M.P., Branchereau, S., Brechot, C. & Ferry, N. (1994) Cell Lineage Study in the Liver Using Retroviral Mediated Gene Transfer. Evidence against the Streaming of Hepatocytes in Normal Liver. *Am J Pathol*, 144, 896-905.
- Bralet, M.P., Pichard, V. & Ferry, N. (2002) Demonstration of Direct Lineage between Hepatocytes and Hepatocellular Carcinoma in Diethylnitrosamine-Treated Rats. *Hepatology*, 36, 623-630.
- Breous, E., Somanathan, S. & Wilson, J.M. (2010) Balb/C Mice Show Impaired Hepatic Tolerogenic Response Following Aav Gene Transfer to the Liver. *Mol Ther*, 18, 766-774.
- Brierley, C.H. & Burchell, B. (1993) Human Udp-Glucuronosyl Transferases: Chemical Defence, Jaundice and Gene Therapy. *Bioessays*, 15, 749-754.
- Brown, B.D., Cantore, A., Annoni, A., Sergi, L.S., Lombardo, A., Della Valle, P., D'Angelo, A. & Naldini, L. (2007) A Microrna-Regulated Lentiviral Vector Mediates Stable Correction of Hemophilia B Mice. *Blood*, 110, 4144-4152.

- Brunetti-Pierri, N., Stapleton, G.E., Law, M., Breinholt, J., Palmer, D.J., Zuo, Y., Grove, N.C., Finegold, M.J., Rice, K., Beaudet, A.L., Mullins, C.E. & Ng, P. (2009) Efficient, Long-Term Hepatic Gene Transfer Using Clinically Relevant Hdad Doses by Balloon Occlusion Catheter Delivery in Nonhuman Primates. *Mol Ther*, 17, 327-333.
- Burke, Z.D. & Tosh, D. (2006) The Wnt/Beta-Catenin Pathway: Master Regulator of Liver Zonation? *Bioessays*, 28, 1072-1077.
- Burke, Z.D., Reed, K.R., Pheesse, T.J., Sansom, O.J., Clarke, A.R. & Tosh, D. (2009) Liver Zonation Occurs through a Beta-Catenin-Dependent, C-Myc-Independent Mechanism. *Gastroenterology*, 136, 2316-2324 e2311-2313.
- Camargo, F.D., Finegold, M. & Goodell, M.A. (2004) Hematopoietic Myelomonocytic Cells Are the Major Source of Hepatocyte Fusion Partners. *J Clin Invest*, 113, 1266-1270.
- Cao, O., Dobrzynski, E., Wang, L., Nayak, S., Mingle, B., Terhorst, C. & Herzog, R.W. (2007) Induction and Role of Regulatory Cd4+Cd25+ T Cells in Tolerance to the Transgene Product Following Hepatic in Vivo Gene Transfer. *Blood*, 110, 1132-1140.
- Cartier, N., Hacein-Bey-Abina, S., Bartholomae, C.C., Veres, G., Schmidt, M., Kutschera, I., Vidaud, M., Abel, U., Dal-Cortivo, L., Caccavelli, L., Mahlaoui, N., Kiermer, V., Mittelstaedt, D., Bellesme, C., Lahlou, N., Lefrere, F., Blanche, S., Audit, M., Payen, E., Leboulch, P., l'Homme, B., Bougneres, P., Von Kalle, C., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M. & Aubourg, P. (2009) Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy with a Lentiviral Vector in X-Linked Adrenoleukodystrophy. *Science*, 326, 818-823.
- Castro, R.E., Ferreira, D.M., Zhang, X., Borralho, P.M., Sarver, A.L., Zeng, Y., Steer, C.J., Kren, B.T. & Rodrigues, C.M. (2010) Identification of Micromas During Rat Liver Regeneration after Partial Hepatectomy and Modulation by Ursodeoxycholic Acid. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 299, G887-897.
- Cavazzana-Calvo, M., Payen, E., Negre, O., Wang, G., Hehir, K., Fusil, F., Down, J., Denaro, M., Brady, T., Westerman, K., Cavallesco, R., Gillet-Legrand, B., Caccavelli, L., Sgarra, R., Maouche-Chretien, L., Bernaudin, F., Girot, R., Dorazio, R., Mulder, G.J., Polack, A., Bank, A., Soulier, J., Larghero, J., Kabbara, N., Dalle, B., Gourmel, B., Socie, G., Chretien, S., Cartier, N., Aubourg, P., Fischer, A., Cornetta, K., Galacteros, F., Beuzard, Y., Gluckman, E., Bushman, F., Hacein-Bey-Abina, S. & Leboulch, P. (2010) Transfusion Independence and Hmga2 Activation after Gene Therapy of Human Beta-Thalassaemia. *Nature*, 467, 318-322.

- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J.L., Bousso, P., Deist, F.L. & Fischer, A. (2000) Gene Therapy of Human Severe Combined Immunodeficiency (Scid)-X1 Disease. *Science*, 288, 669-672.
- Celton-Morizur, S., Merlen, G., Couton, D. & Desdouets, C. (2010) Polyploidy and Liver Proliferation: Central Role of Insulin Signaling. *Cell Cycle*, 9, 460-466.
- Columbano, A., Simbula, M., Pibiri, M., Perra, A., Deidda, M., Locker, J., Pisanu, A., Uccheddu, A. & Ledda-Columbano, G.M. (2008) Triiodothyronine Stimulates Hepatocyte Proliferation in Two Models of Impaired Liver Regeneration. *Cell Prolif*, 41, 521-531.
- Conboy, I.M., Conboy, M.J., Wagers, A.J., Girma, E.R., Weissman, I.L. & Rando, T.A. (2005) Rejuvenation of Aged Progenitor Cells by Exposure to a Young Systemic Environment. *Nature*, 433, 760-764.
- Cosgrove, B.D., Cheng, C., Pritchard, J.R., Stolz, D.B., Lauffenburger, D.A. & Griffith, L.G. (2008) An Inducible Autocrine Cascade Regulates Rat Hepatocyte Proliferation and Apoptosis Responses to Tumor Necrosis Factor-Alpha. *Hepatology*, 48, 276-288.
- Cressman, D.E., Greenbaum, L.E., Haber, B.A. & Taub, R. (1994) Rapid Activation of Post-Hepatectomy Factor/Nuclear Factor Kappa B in Hepatocytes, a Primary Response in the Regenerating Liver. *J Biol Chem*, 269, 30429-30435.
- Cressman, D.E., Diamond, R.H. & Taub, R. (1995) Rapid Activation of the Stat3 Transcription Complex in Liver Regeneration. *Hepatology*, 21, 1443-1449.
- Cressman, D.E., Greenbaum, L.E., DeAngelis, R.A., Ciliberto, G., Furth, E.E., Poli, V. & Taub, R. (1996) Liver Failure and Defective Hepatocyte Regeneration in Interleukin-6-Deficient Mice. *Science*, 274, 1379-1383.
- Dardalhon, V., Jaleco, S., Kinet, S., Herpers, B., Steinberg, M., Ferrand, C., Froger, D., Leveau, C., Tiberghien, P., Charneau, P., Noraz, N. & Taylor, N. (2001) Il-7 Differentially Regulates Cell Cycle Progression and Hiv-1-Based Vector Infection in Neonatal and Adult Cd4+ T Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 9277-9282.
- De Alwis, N., Hudson, G., Burt, A.D., Day, C.P. & Chinnery, P.F. (2009) Human Liver Stem Cells Originate from the Canals of Hering. *Hepatology*, 50, 992-993.
- Deuschle U, Meyer WK, Thiesen HJ. (1995) Tetracycline-reversible silencing of eukaryotic promoters. *Mol Cell Biol*. Apr;15(4):1907-14.
- Di Domenico, C., Villani, G.R., Di Napoli, D., Reyero, E.G., Lombardo, A., Naldini, L. & Di Natale, P. (2005) Gene Therapy for a Mucopolysaccharidosis Type I Murine Model with Lentiviral-Idua Vector. *Hum Gene Ther*, 16, 81-90.

- Di Domenico, C., Di Napoli, D., Gonzalez, Y.R.E., Lombardo, A., Naldini, L. & Di Natale, P. (2006) Limited Transgene Immune Response and Long-Term Expression of Human Alpha-L-Iduronidase in Young Adult Mice with Mucopolysaccharidosis Type I by Liver-Directed Gene Therapy. *Hum Gene Ther*, 17, 1112-1121.
- Ding, B.S., Nolan, D.J., Butler, J.M., James, D., Babazadeh, A.O., Rosenwaks, Z., Mittal, V., Kobayashi, H., Shido, K., Lyden, D., Sato, T.N., Rabbany, S.Y. & Rafii, S. (2010) Inductive Angiocrine Signals from Sinusoidal Endothelium Are Required for Liver Regeneration. *Nature*, 468, 310-315.
- Dormond, E., Chahal, P., Bernier, A., Tran, R., Perrier, M. & Kamen, A. An Efficient Process for the Purification of Helper-Dependent Adenoviral Vector and Removal of Helper Virus by Iodixanol Ultracentrifugation. (2010) *J Virol Methods*, 165, 83-89.
- Drixler, T.A., Vogten, M.J., Ritchie, E.D., van Vroonhoven, T.J., Gebbink, M.F., Voest, E.E. & Borel Rinkes, I.H. (2002) Liver Regeneration Is an Angiogenesis- Associated Phenomenon. *Ann Surg*, 236, 703-711; discussion 711-702.
- Dudas, J., Mansuroglu, T., Batusic, D., Saile, B. & Ramadori, G. (2007) Thy-1 Is an in Vivo and in Vitro Marker of Liver Myofibroblasts. *Cell Tissue Res*, 329, 503-514.
- Dumortier, J., Schonig, K., Oberwinkler, H., Low, R., Giese, T., Bujard, H., Schirmacher, P. & Protzer, U. (2005) Liver-Specific Expression of Interferon Gamma Following Adenoviral Gene Transfer Controls Hepatitis B Virus Replication in Mice. *Gene Ther*, 12, 668-677.
- Eguchi, S., Rozga, J., Lebow, L.T., Chen, S.C., Wang, C.C., Rosenthal, R., Fogli, L., Hewitt, W.R., Middleton, Y. & Demetriou, A.A. (1996) Treatment of Hypercholesterolemia in the Watanabe Rabbit Using Allogeneic Hepatocellular Transplantation under a Regeneration Stimulus. *Transplantation*, 62, 588-593.
- Engelhardt, N.V., Factor, V.M., Medvinsky, A.L., Baranov, V.N., Lazareva, M.N. & Poltoranina, V.S. (1993) Common Antigen of Oval and Biliary Epithelial Cells (A6) Is a Differentiation Marker of Epithelial and Erythroid Cell Lineages in Early Development of the Mouse. *Differentiation*, 55, 19-26.
- Evarts, R.P., Nagy, P., Marsden, E. & Thorgeirsson, S.S. (1987) A Precursor-Product Relationship Exists between Oval Cells and Hepatocytes in Rat Liver. *Carcinogenesis*, 8, 1737-1740.
- Evarts, R.P., Nagy, P., Nakatsukasa, H., Marsden, E. & Thorgeirsson, S.S. (1989) In Vivo Differentiation of Rat Liver Oval Cells into Hepatocytes. *Cancer Res*, 49, 1541-1547.
- Factor, V.M., Seo, D., Ishikawa, T., Kaposi-Novak, P., Marquardt, J.U., Andersen, J.B., Conner, E.A. & Thorgeirsson, S.S. (2010) Loss of C-Met Disrupts Gene Expression Program Required for G2/M Progression During Liver Regeneration in Mice. *PLoS One*, 16;5(9).

- Fausto, N. (2000) Liver Regeneration. *J Hepatol*, 32, 19-31.
- Favre, D., Blouin, V., Provost, N., Spisek, R., Porrot, F., Bohl, D., Marme, F., Cherel, Y., Salvetti, A., Hurtrel, B., Heard, J.M., Riviere, Y. & Moullier, P. (2002) Lack of an Immune Response against the Tetracycline-Dependent Transactivator Correlates with Long-Term Doxycycline-Regulated Transgene Expression in Nonhuman Primates after Intramuscular Injection of Recombinant Adeno-Associated Virus. *J Virol*, 76, 11605-11611.
- Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G. & Mavilio, F. (1998) Muscle Regeneration by Bone Marrow-Derived Myogenic Progenitors. *Science*, 279, 1528-1530.
- Flageul, M., Aubert, D., Pichard, V., Nguyen, T.H., Nowrouzi, A., Schmidt, M. & Ferry, N. (2009) Transient Expression of Genes Delivered to Newborn Rat Liver Using Recombinant Adeno-Associated Virus 2/8 Vectors. *J Gene Med*, 11, 689-696.
- Follenzi, A., Battaglia, M., Lombardo, A., Annoni, A., Roncarolo, M.G. & Naldini, L. (2004) Targeting Lentiviral Vector Expression to Hepatocytes Limits Transgene-Specific Immune Response and Establishes Long-Term Expression of Human Antihemophilic Factor Ix in Mice. *Blood*, 103, 3700-3709.
- Forbes, S.J., Themis, M., Alison, M.R., Selden, C., Coutelle, C. & Hodgson, H.J. (1998) Retroviral Gene Transfer to the Liver in Vivo During Tri-Iodothyronine Induced Hyperplasia. *Gene Ther*, 5, 552-555.
- Fox, I.J., Chowdhury, N.R., Gupta, S., Kondapalli, R., Schilsky, M.L., Stockert, R.J. & Chowdhury, J.R. (1995) Conditional Immortalization of Gunn Rat Hepatocytes: An Ex Vivo Model for Evaluating Methods for Bilirubin-Udp-Glucuronosyltransferase Gene Transfer. *Hepatology*, 21, 837-846.
- Francavilla, A., Porter, K.A., Benichou, J., Jones, A.F. & Starzl, T.E. (1978) Liver Regeneration in Dogs: Morphologic and Chemical Changes. *J Surg Res*, 25, 409-419.
- Francavilla, A., Carr, B.I., Azzarone, A., Polimeno, L., Wang, Z., Van Thiel, D.H., Subbotin, V., Prelich, J.G. & Starzl, T.E. (1994a) Hepatocyte Proliferation and Gene Expression Induced by Triiodothyronine in Vivo and in Vitro. *Hepatology*, 20, 1237-1241.
- Francavilla, A., Zeng, Q., Polimeno, L., Carr, B.I., Sun, D., Porter, K.A., Van Thiel, D.H. & Starzl, T.E. (1994b) Small-for-Size Liver Transplanted into Larger Recipient: A Model of Hepatic Regeneration. *Hepatology*, 19, 210-216.
- Frecha, C., Levy, C., Cosset, F.L. & Verhoeven, E. (2010) Advances in the Field of Lentivector-Based Transduction of T and B Lymphocytes for Gene Therapy. *Mol Ther*, 18, 1748-1757.

- Fujita, J., Marino, M.W., Wada, H., Jungbluth, A.A., Mackrell, P.J., Rivadeneira, D.E., Stapleton, P.P. & Daly, J.M. (2001) Effect of Tnf Gene Depletion on Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Mice. *Surgery*, 129, 48-54.
- Furuyama, K., Kawaguchi, Y., Akiyama, H., Horiguchi, M., Kodama, S., Kuhara, T., Hosokawa, S., Elbahrawy, A., Soeda, T., Koizumi, M., Masui, T., Kawaguchi, M., Takaori, K., Doi, R., Nishi, E., Kakinoki, R., Deng, J.M., Behringer, R.R., Nakamura, T. & Uemoto, S. (2011) Continuous Cell Supply from a Sox9-Expressing Progenitor Zone in Adult Liver, Exocrine Pancreas and Intestine. *Nat Genet*, 43, 34-41.
- Gaglio, P.J., Baskin, G., Bohm, R., Jr., Blanchard, J., Cheng, S., Dunne, B., Davidson, J., Liu, H. & Dash, S. (2000) Partial Hepatectomy and Laparoscopic-Guided Liver Biopsy in Rhesus Macaques (*Macaca Mulatta*): Novel Approach for Study of Liver Regeneration. *Comp Med*, 50, 363-368.
- Gao, G., Wang, Q., Calcedo, R., Mays, L., Bell, P., Wang, L., Vandenberghe, L.H., Grant, R., Sanmiguel, J., Furth, E.E. & Wilson, J.M. (2009) Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Transfer to Nonhuman Primate Liver Can Elicit Destructive Transgene-Specific T Cell Responses. *Hum Gene Ther*, 20, 930-942.
- Gao, G.P., Lu, Y., Sun, X., Johnston, J., Calcedo, R., Grant, R. & Wilson, J.M. (2006) High-Level Transgene Expression in Nonhuman Primate Liver with Novel Adeno-Associated Virus Serotypes Containing Self-Complementary Genomes. *J Virol*, 80, 6192-6194.
- Gao, W.Y., Cara, A., Gallo, R.C. & Lori, F. (1993) Low Levels of Deoxynucleotides in Peripheral Blood Lymphocytes: A Strategy to Inhibit Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 8925-8928.
- Gebhardt, R. (1992) Metabolic Zonation of the Liver: Regulation and Implications for Liver Function. *Pharmacol Ther*, 53, 275-354.
- Golding, M., Sarraf, C.E., Lalani, E.N., Anilkumar, T.V., Edwards, R.J., Nagy, P., Thorgeirsson, S.S. & Alison, M.R. (1995) Oval Cell Differentiation into Hepatocytes in the Acetylaminofluorene-Treated Regenerating Rat Liver. *Hepatology*, 22, 1243-1253.
- Gordon, G.J., Coleman, W.B. & Grisham, J.W. (2000a) Temporal Analysis of Hepatocyte Differentiation by Small Hepatocyte-Like Progenitor Cells During Liver Regeneration in Retrorsine-Exposed Rats. *Am J Pathol*, 157, 771-786.
- Gordon, G.J., Coleman, W.B., Hixson, D.C. & Grisham, J.W. (2000b) Liver Regeneration in Rats with Retrorsine-Induced Hepatocellular Injury Proceeds through a Novel Cellular Response. *Am J Pathol*, 156, 607-619.

- Gordon, G.J., Butz, G.M., Grisham, J.W. & Coleman, W.B. (2002) Isolation, Short-Term Culture, and Transplantation of Small Hepatocyte-Like Progenitor Cells from Retrorsine-Exposed Rats. *Transplantation*, 73, 1236-1243.
- Gossen, M. & Bujard, H. (1992) Tight Control of Gene Expression in Mammalian Cells by Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W. & Bujard, H. (1995) Transcriptional Activation by Tetracyclines in Mammalian Cells. *Science*, 268, 1766-1769.
- Gothelf, A., Eriksen, J., Hojman, P. & Gehl, J. (2010) Duration and Level of Transgene Expression after Gene Electroporation to Skin in Mice. *Gene Ther*, 17, 839-845.
- Goyenvall, A., Vulin, A., Fougere, F., Leturcq, F., Kaplan, J.C., Garcia, L. & Danos, O. (2004) [an Opening in Duchenne Muscular Dystrophy: Persistent Therapeutic Rescue of Dystrophin by Vectorized Antisense Mediated Exon Skipping in Mdx Mice]. *Med Sci (Paris)*, 20, 1163-1165.
- Greene, A.K., Wiener, S., Puder, M., Yoshida, A., Shi, B., Perez-Atayde, A.R., Efstathiou, J.A., Holmgren, L., Adamis, A.P., Rupnick, M., Folkman, J. & O'Reilly, M.S. (2003) Endothelial-Directed Hepatic Regeneration after Partial Hepatectomy. *Ann Surg*, 237, 530-535.
- Grisham, J.W. (1962) A Morphologic Study of Deoxyribonucleic Acid Synthesis and Cell Proliferation in Regenerating Rat Liver; Autoradiography with Thymidine-H3. *Cancer Res*, 22, 842-849.
- Groner, A.C., Meylan, S., Ciuffi, A., Zangger, N., Ambrosini, G., Denervaud, N., Bucher, P. & Trono, D. (2010) Krab-Zinc Finger Proteins and Kap1 Can Mediate Long-Range Transcriptional Repression through Heterochromatin Spreading. *PLoS Genet*, 6, e1000869.
- Groschel, B. & Bushman, F. (2005) Cell Cycle Arrest in G2/M Promotes Early Steps of Infection by Human Immunodeficiency Virus. *J Virol*, 79, 5695-5704.
- Grozdanov, P.N., Yovchev, M.I. & Dabeva, M.D. (2006) The Oncofetal Protein Glypican-3 Is a Novel Marker of Hepatic Progenitor/Oval Cells. *Lab Invest*, 86, 1272-1284.
- Gupta, S., Rajvanshi, P., Aragona, E., Lee, C.D., Yerneni, P.R. & Burk, R.D. (1999) Transplanted Hepatocytes Proliferate Differently after Ccl4 Treatment and Hepatocyte Growth Factor Infusion. *Am J Physiol*, 276, G629-638.

- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M.P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C.S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J.I., de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L.E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T.H., Le Deist, F., Fischer, A. & Cavazzana-Calvo, M. (2003) Lmo2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for Scid-X1. *Science*, 302, 415-419.
- Hall, K., Blair Zajdel, M.E. & Blair, G.E. (2010) Unity and Diversity in the Human Adenoviruses: Exploiting Alternative Entry Pathways for Gene Therapy. *Biochem J*, 431, 321-336.
- Hand, N.J., Master, Z.R., Le Lay, J. & Friedman, J.R. (2009) Hepatic Function Is Preserved in the Absence of Mature Micrnas. *Hepatology*, 49, 618-626.
- Harding, T.C., Geddes, B.J., Murphy, D., Knight, D. & Uney, J.B. (1998) Switching Transgene Expression in the Brain Using an Adenoviral Tetracycline-Regulatable System. *Nat Biotechnol*, 16, 553-555.
- Hasuike, S., Ido, A., Uto, H., Moriuchi, A., Tahara, Y., Numata, M., Nagata, K., Hori, T., Hayashi, K. & Tsubouchi, H. (2005) Hepatocyte Growth Factor Accelerates the Proliferation of Hepatic Oval Cells and Possibly Promotes the Differentiation in a 2-Acetylaminofluorene/Partial Hepatectomy Model in Rats. *J Gastroenterol Hepatol*, 20, 1753-1761.
- Hatzioannou, T. & Goff, S.P. (2001) Infection of Nondividing Cells by Rous Sarcoma Virus. *J Virol*, 75, 9526-9531.
- Hayashi, H., Nagaki, M., Imose, M., Osawa, Y., Kimura, K., Takai, S., Imao, M., Naiki, T., Kato, T. & Moriwaki, H. (2005) Normal Liver Regeneration and Liver Cell Apoptosis after Partial Hepatectomy in Tumor Necrosis Factor-Alpha-Deficient Mice. *Liver Int*, 25, 162-170.
- He, J., Choe, S., Walker, R., Di Marzio, P., Morgan, D.O. & Landau, N.R. (1995) Human Immunodeficiency Virus Type 1 Viral Protein R (Vpr) Arrests Cells in the G2 Phase of the Cell Cycle by Inhibiting P34cdc2 Activity. *J Virol*, 69, 6705-6711.
- Hengge, U.R., Chan, E.F., Foster, R.A., Walker, P.S. & Vogel, J.C. (1995) Cytokine Gene Expression in Epidermis with Biological Effects Following Injection of Naked DNA. *Nat Genet*, 10, 161-166.

- Hoffman, B.E., Martino, A.T., Sack, B.K., Cao, O., Liao, G., Terhorst, C. & Herzog, R.W. Nonredundant Roles of Il-10 and Tgf-Beta in Suppression of Immune Responses to Hepatic Aav-Factor Ix Gene Transfer. (2011) *Mol Ther*.
- Hsia, C.C., Evarts, R.P., Nakatsukasa, H., Marsden, E.R. & Thorgeirsson, S.S. (1992) Occurrence of Oval-Type Cells in Hepatitis B Virus-Associated Human Hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, 16, 1327-1333.
- Huang, W., Ma, K., Zhang, J., Qatanani, M., Cuvillier, J., Liu, J., Dong, B., Huang, X. & Moore, D.D. (2006) Nuclear Receptor-Dependent Bile Acid Signaling Is Required for Normal Liver Regeneration. *Science*, 312, 233-236.
- Iimuro, Y. & Fujimoto, (2010) J. Tlrs, Nf-Kappab, Jnk, and Liver Regeneration. *Gastroenterol Res Pract*.
- Ilan, Y., Roy-Chowdhury, N., Prakash, R., Jona, V., Attavar, P., Guha, C., Tada, K. & Roy-Chowdhury, J. (1997) Massive Repopulation of Rat Liver by Transplantation of Hepatocytes into Specific Lobes of the Liver and Ligation of Portal Vein Branches to Other Lobes. *Transplantation*, 64, 8-13.
- Illingworth, C.M. (1974) Trapped Fingers and Amputated Finger Tips in Children. *J Pediatr Surg*, 9, 853-858.
- Imoto, M., Nishimura, D., Fukuda, Y., Sugiyama, K., Kumada, T. & Nakano, S. (1985) Immunohistochemical Detection of Alpha-Fetoprotein, Carcinoembryonic Antigen, and Ferritin in Formalin-Paraffin Sections from Hepatocellular Carcinoma. *Am J Gastroenterol*, 80, 902-906.
- Inagaki, K., Piao, C., Kotchey, N.M., Wu, X. & Nakai, H. (2008) Frequency and Spectrum of Genomic Integration of Recombinant Adeno-Associated Virus Serotype 8 Vector in Neonatal Mouse Liver. *J Virol*, 82, 9513-9524.
- Izembart, A., Aguado, E., Gauthier, O., Aubert, D., Moullier, P. & Ferry, N. (1999) In Vivo Retrovirus-Mediated Gene Transfer to the Liver of Dogs Results in Transient Expression and Induction of a Cytotoxic Immune Response. *Hum Gene Ther*, 10, 2917-2925.
- Jacobs, F., Wisse, E. & De Geest, B. (2010) The Role of Liver Sinusoidal Cells in Hepatocyte-Directed Gene Transfer. *Am J Pathol*, 176, 14-21.
- Jakubowski, A., Ambrose, C., Parr, M., Lincecum, J.M., Wang, M.Z., Zheng, T.S., Browning, B., Michaelson, J.S., Baetscher, M., Wang, B., Bissell, D.M. & Burkly, L.C. (2005) Tweak Induces Liver Progenitor Cell Proliferation. *J Clin Invest*, 115, 2330-2340.

- Jarraya, B., Boulet, S., Ralph, G.S., Jan, C., Bonvento, G., Azzouz, M., Miskin, J.E., Shin, M., Delzescaux, T., Drouot, X., Herard, A.S., Day, D.M., Brouillet, E., Kingsman, S.M., Hantraye, P., Mitrophanous, K.A., Mazarakis, N.D. & Palfi, S. (2009) Dopamine Gene Therapy for Parkinson's Disease in a Nonhuman Primate without Associated Dyskinesia. *Sci Transl Med*, 1, 2ra4.
- Jelnes, P., Santoni-Rugiu, E., Rasmussen, M., Friis, S.L., Nielsen, J.H., Tygstrup, N. & Bisgaard, H.C. (2007) Remarkable Heterogeneity Displayed by Oval Cells in Rat and Mouse Models of Stem Cell-Mediated Liver Regeneration. *Hepatology*, 45, 1462-1470.
- Jungermann, K. & Kietzmann, T. (1996) Zonation of Parenchymal and Nonparenchymal Metabolism in Liver. *Annu Rev Nutr*, 16, 179-203.
- Kam, I., Lynch, S., Svanas, G., Todo, S., Polimeno, L., Francavilla, A., Penkrot, R.J., Takaya, S., Ericzon, B.G., Starzl, T.E. & et al. (1987) Evidence That Host Size Determines Liver Size: Studies in Dogs Receiving Orthotopic Liver Transplants. *Hepatology*, 7, 362-366.
- Kariv, R., Enden, A., Zvibel, I., Rosner, G., Brill, S., Shafritz, D.A., Halpern, Z. & Oren, R. (2003) Triiodothyronine and Interleukin-6 (Il-6) Induce Expression of Hgf in an Immortalized Rat Hepatic Stellate Cell Line. *Liver Int*, 23, 187-193.
- Karrar, A., Broome, U., Uzunel, M., Qureshi, A.R. & Sumitran-Holgersson, S. (2007) Human Liver Sinusoidal Endothelial Cells Induce Apoptosis in Activated T Cells: A Role in Tolerance Induction. *Gut*, 56, 243-252.
- Kim, H., Park, C., Han, K.H., Choi, J., Kim, Y.B., Kim, J.K. & Park, Y.N. (2004) Primary Liver Carcinoma of Intermediate (Hepatocyte-Cholangiocyte) Phenotype. *J Hepatol*, 40, 298-304.
- Kim, I., Morimura, K., Shah, Y., Yang, Q., Ward, J.M. & Gonzalez, F.J. (2007) Spontaneous Hepatocarcinogenesis in Farnesoid X Receptor-Null Mice. *Carcinogenesis*, 28, 940-946.
- Kimura, F., Miyazaki, M. & Itoh, H. (1997) Effects of Biliary Obstruction on Hepatic Deoxyribonucleic Acid and Protein Synthesis after Partial Hepatectomy. *Hepatogastroenterology*, 44, 501-507.
- Kitten, O., Cosset, F.L. & Ferry, N. (1997) Highly Efficient Retrovirus-Mediated Gene Transfer into Rat Hepatocytes in Vivo. *Hum Gene Ther*, 8, 1491-1494.
- Knight, B., Yeoh, G.C., Husk, K.L., Ly, T., Abraham, L.J., Yu, C., Rhim, J.A. & Fausto, N. (2000) Impaired Preneoplastic Changes and Liver Tumor Formation in Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1 Knockout Mice. *J Exp Med*, 192, 1809-1818.

- Knight, B., Matthews, V.B., Akhurst, B., Croager, E.J., Klinken, E., Abraham, L.J., Olynyk, J.K. & Yeoh, G. (2005) Liver Inflammation and Cytokine Production, but Not Acute Phase Protein Synthesis, Accompany the Adult Liver Progenitor (Oval) Cell Response to Chronic Liver Injury. *Immunol Cell Biol*, 83, 364-374.
- Knippertz, I., Hesse, A., Schunder, T., Kampgen, E., Brenner, M.K., Schuler, G., Steinkasserer, A. & Nettelbeck, D.M. (2009) Generation of Human Dendritic Cells That Simultaneously Secrete Il-12 and Have Migratory Capacity by Adenoviral Gene Transfer of Hcd40l in Combination with Ifn-Gamma. *J Immunother*, 32, 524-538.
- Kofman, A.V., Morgan, G., Kirschenbaum, A., Osbeck, J., Hussain, M., Swenson, S. & Theise, N.D. (2005) Dose- and Time-Dependent Oval Cell Reaction in Acetaminophen-Induced Murine Liver Injury. *Hepatology*, 41, 1252-1261.
- Kogure, K., Omata, W., Kanzaki, M., Zhang, Y.Q., Yasuda, H., Mine, T. & Kojima, I. (1995) A Single Intraportal Administration of Follistatin Accelerates Liver Regeneration in Partially Hepatectomized Rats. *Gastroenterology*, 108, 1136-1142.
- Kong, F., Li, W., Li, X., Zheng, Q., Dai, X., Zhou, X., Boye, S.L., Hauswirth, W.W., Qu, J. & Pang, J.J. (2010) Self-Complementary Aav5 Vector Facilitates Quicker Transgene Expression in Photoreceptor and Retinal Pigment Epithelial Cells of Normal Mouse. *Exp Eye Res*, 90, 546-554.
- Kootstra, N.A., Matsumura, R. & Verma, I.M. (2003) Efficient Production of Human FVIII in Hemophilic Mice Using Lentiviral Vectors. *Mol Ther*, 7, 623-631.
- Korin, Y.D. & Zack, J.A. (1998) Progression to the G1b Phase of the Cell Cycle Is Required for Completion of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcription in T Cells. *J Virol*, 72, 3161-3168.
- Korpassy, B. & Kovacs, K. (1949) Experimental Liver Cirrhosis in Rats Produced by Prolonged Subcutaneous Administration of Solutions of Tannic Acid. *Br J Exp Pathol*, 30, 266-272, 262 pl.
- Kuhlmann, W.D. & Peschke, P. (2006) Hepatic Progenitor Cells, Stem Cells, and Afp Expression in Models of Liver Injury. *Int J Exp Pathol*, 87, 343-359.
- Kuwahara, R., Kofman, A.V., Landis, C.S., Swenson, E.S., Barendswaard, E. & Theise, N.D. (2008) The Hepatic Stem Cell Niche: Identification by Label-Retaining Cell Assay. *Hepatology*, 47, 1994-2002.
- Laconi, S., Curreli, F., Diana, S., Pasciu, D., De Filippo, G., Sarma, D.S., Pani, P. & Laconi, E. (1999) Liver Regeneration in Response to Partial Hepatectomy in Rats Treated with Retrorsine: A Kinetic Study. *J Hepatol*, 31, 1069-1074.

- Laconi, S., Montisci, S., Doratiotto, S., Greco, M., Pasciu, D., Pillai, S., Pani, P. & Laconi, E. (2006) Liver Repopulation by Transplanted Hepatocytes and Risk of Hepatocellular Carcinoma. *Transplantation*, 82, 1319-1323.
- Lade, A.G. & Monga, S.P. Beta-Catenin Signaling in Hepatic Development and Progenitors: Which Way Does the Wnt Blow? (2011) *Dev Dyn*. 240(3):486-500
- Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I.L. & Grompe, M. (2000) Purified Hematopoietic Stem Cells Can Differentiate into Hepatocytes in Vivo. *Nat Med*, 6, 1229-1234.
- Lambotte, L., Saliez, A., Triest, S., Maiter, D., Baranski, A., Barker, A. & Li, B. (1997) Effect of Sialoadenectomy and Epidermal Growth Factor Administration on Liver Regeneration after Partial Hepatectomy. *Hepatology*, 25, 607-612.
- Lambotte, L., Li, B., Leclercq, I., Sempoux, C., Saliez, A. & Horsmans, Y. (2000) The Compensatory Hyperplasia (Liver Regeneration) Following Ligation of a Portal Branch Is Initiated before the Atrophy of the Deprived Lobes. *J Hepatol*, 32, 940-945.
- Latta-Mahieu, M., Rolland, M., Caillet, C., Wang, M., Kennel, P., Mahfouz, I., Loquet, I., Dedieu, J.F., Mahfoudi, A., Trannoy, E. & Thuillier, V. (2002) Gene Transfer of a Chimeric Trans-Activator Is Immunogenic and Results in Short-Lived Transgene Expression. *Hum Gene Ther*, 13, 1611-1620.
- Levin JG, Mitra M, Mascarenhas A, Musier-Forsyth K. (2010) Role of HIV-1 nucleocapsid protein in HIV-1 reverse transcription. *RNA Biol*. 7(6):754-74.
- Le Guiner, C., Stieger, K., Snyder, R.O., Rolling, F. & Moullier, P. (2007) Immune Responses to Gene Product of Inducible Promoters. *Curr Gene Ther*, 7, 334-346.
- LeCouter, J., Moritz, D.R., Li, B., Phillips, G.L., Liang, X.H., Gerber, H.P., Hillan, K.J. & Ferrara, N. (2003) Angiogenesis-Independent Endothelial Protection of Liver: Role of Vegfr-1. *Science*, 299, 890-893.
- Ledda-Columbano, G.M., Curto, M., Piga, R., Zedda, A.I., Menegazzi, M., Sartori, C., Shinozuka, H., Bluethmann, H., Poli, V., Ciliberto, G. & Columbano, A. (1998) *Oncogene*, 17, 1039-1044.
- Lee, D.C., Sunnarborg, S.W., Hinkle, C.L., Myers, T.J., Stevenson, M.Y., Russell, W.E., Castner, B.J., Gerhart, M.J., Paxton, R.J., Black, R.A., Chang, A. & Jackson, L.F. (2003) Tace/Adam17 Processing of Egfr Ligands Indicates a Role as a Physiological Convertase. *Ann N Y Acad Sci*, 995, 22-38.

- Lesurtel, M., Graf, R., Aleil, B., Walther, D.J., Tian, Y., Jochum, W., Gachet, C., Bader, M. & Clavien, P.A. (2006) Platelet-Derived Serotonin Mediates Liver Regeneration. *Science*, 312, 104-107.
- Li, F., Liu, P., Liu, C., Xiang, D., Deng, L., Li, W., Wangenstein, K., Song, J., Ma, Y., Hui, L., Wei, L., Li, L., Ding, X., Hu, Y., He, Z. & Wang, X. (2010) Hepatoblast-Like Progenitor Cells Derived from Embryonic Stem Cells Can Repopulate Livers of Mice. *Gastroenterology*, 139, 2158-2169 e2158.
- Li, H., Zhang, B., Lu, Y., Jorgensen, M., Petersen, B. & Song, S. (2011) Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell-Based Liver Gene Delivery. *J Hepatol*. 54(5):930-8
- Libbrecht L, De Vos R, Cassiman D, Desmet V, Aerts R, Roskams T.(2001) Hepatic progenitor cells in hepatocellular adenomas. *Am J Surg Pathol*. 25(11):1388-96
- Liu, F., Song, Y. & Liu, D. (1999) Hydrodynamics-Based Transfection in Animals by Systemic Administration of Plasmid DNA. *Gene Ther*, 6, 1258-1266.
- Lorand, L., Loux, N., Allain, J.E., Di Rico, V., Weber, A., Franco, D., Capron, F. & Vons, C. (2000) [Effect of Portal Branch Ligation on Liver Regeneration in the Rat]. *Ann Chir*, 125, 144-148.
- Lowery, A.J., Miller, N., McNeill, R.E. & Kerin, M.J. (2008) Micrornas as Prognostic Indicators and Therapeutic Targets: Potential Effect on Breast Cancer Management. *Clin Cancer Res*, 14, 360-365.
- Lowes, K.N., Brennan, B.A., Yeoh, G.C. & Olynyk, J.K. (1999) Oval Cell Numbers in Human Chronic Liver Diseases Are Directly Related to Disease Severity. *Am J Pathol*, 154, 537-541.
- Lowes, K.N., Croager, E.J., Abraham, L.J., Olynyk, J.K. & Yeoh, G.C. (2003) Upregulation of Lymphotoxin Beta Expression in Liver Progenitor (Oval) Cells in Chronic Hepatitis C. *Gut*, 52, 1327-1332.
- Maguire, A.M., Simonelli, F., Pierce, E.A., Pugh, E.N., Jr., Mingozi, F., Bennicelli, J., Banfi, S., Marshall, K.A., Testa, F., Surace, E.M., Rossi, S., Lyubarsky, A., Arruda, V.R., Konkle, B., Stone, E., Sun, J., Jacobs, J., Dell'Osso, L., Hertle, R., Ma, J.X., Redmond, T.M., Zhu, X., Hauck, B., Zeleniaia, O., Shindler, K.S., Maguire, M.G., Wright, J.F., Volpe, N.J., McDonnell, J.W., Auricchio, A., High, K.A. & Bennett, J. (2008) Safety and Efficacy of Gene Transfer for Leber's Congenital Amaurosis. *N Engl J Med*, 358, 2240-2248.

- Mallet, V.O., Mitchell, C., Mezey, E., Fabre, M., Guidotti, J.E., Renia, L., Coulombel, L., Kahn, A. & Gilgenkrantz, H. (2002) Bone Marrow Transplantation in Mice Leads to a Minor Population of Hepatocytes That Can Be Selectively Amplified in Vivo. *Hepatology*, 35, 799-804.
- Malouf, N.N., Coleman, W.B., Grisham, J.W., Lininger, R.A., Madden, V.J., Sproul, M. & Anderson, P.A. (2001) Adult-Derived Stem Cells from the Liver Become Myocytes in the Heart in Vivo. *Am J Pathol*, 158, 1929-1935.
- Manganaro, L., Lusic, M., Gutierrez, M.I., Cereseto, A., Del Sal, G. & Giacca, M. (2010) Concerted Action of Cellular Jnk and Pin1 Restricts Hiv-1 Genome Integration to Activated Cd4+ T Lymphocytes. *Nat Med*, 16, 329-333.
- Mansharamani, M., Graham, D.R., Monie, D., Lee, K.K., Hildreth, J.E., Siliciano, R.F. & Wilson, K.L. (2003) Barrier-to-Autointegration Factor Baf Binds P55 Gag and Matrix and Is a Host Component of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Virions. *J Virol*, 77, 13084-13092.
- Margall-Ducos, G., Celton-Morizur, S., Couton, D., Bregerie, O. & Desdouets, C. (2007) Liver Tetraploidization Is Controlled by a New Process of Incomplete Cytokinesis. *J Cell Sci*, 120, 3633-3639.
- Marquez, R.T., Wendlandt, E., Galle, C.S., Keck, K. & McCaffrey, A.P. (2010) Microrna-21 Is Upregulated During the Proliferative Phase of Liver Regeneration, Targets Pellino-1, and Inhibits Nf-Kappab Signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 298, G535-541.
- Martino, A.T., Nayak, S., Hoffman, B.E., Cooper, M., Liao, G., Markusic, D.M., Byrne, B.J., Terhorst, C. & Herzog, R.W. (2009) Tolerance Induction to Cytoplasmic Beta-Galactosidase by Hepatic Aav Gene Transfer: Implications for Antigen Presentation and Immunotoxicity. *PLoS One*, 4, e6376.
- Maruyama, H., Higuchi, N., Nishikawa, Y., Kameda, S., Iino, N., Kazama, J.J., Takahashi, N., Sugawa, M., Hanawa, H., Tada, N., Miyazaki, J. & Gejyo, F. (2002) High-Level Expression of Naked DNA Delivered to Rat Liver Via Tail Vein Injection. *J Gene Med*, 4, 333-341.
- Mastellos, D., Papadimitriou, J.C., Franchini, S., Tsonis, P.A. & Lambris, J.D. (2001) A Novel Role of Complement: Mice Deficient in the Fifth Component of Complement (C5) Exhibit Impaired Liver Regeneration. *J Immunol*, 166, 2479-2486.

- Mátrai J, Cantore A, Bartholomae CC, Annoni A, Wang W, Acosta-Sanchez A, Samara-Kuko E, De Waele L, Ma L, Genovese P, Damo M, Arens A, Goudy K, Nichols TC, von Kalle C, L Chuah MK, Roncarolo MG, Schmidt M, Vandendriessche T, Naldini L. (2011) Hepatocyte-targeted expression by integrase-defective lentiviral vectors induces antigen-specific tolerance in mice with low genotoxic risk. *Hepatology*. 53(5):1696-707
- Matsui, H., Hegadorn, C., Ozelo, M., Burnett, E., Tuttle, A., Labelle, A., McCray, P.B., Jr., Naldini, L., Brown, B., Hough, C. & Lillicrap, D. (2011) A Microrna-Regulated and Gp64-Pseudotyped Lentiviral Vector Mediates Stable Expression of Fviii in a Murine Model of Hemophilia A. *Mol Ther*.
- Mavier, P., Martin, N., Couchie, D., Preaux, A.M., Laperche, Y. & Zafrani, E.S. (2004) Expression of Stromal Cell-Derived Factor-1 and of Its Receptor Cxcr4 in Liver Regeneration from Oval Cells in Rat. *Am J Pathol*, 165, 1969-1977.
- Meng, Z., Wang, Y., Wang, L., Jin, W., Liu, N., Pan, H., Liu, L., Wagman, L., Forman, B.M. & Huang, W. (2010) Fxr Regulates Liver Repair after Ccl4-Induced Toxic Injury. *Mol Endocrinol*, 24, 886-897.
- Menoret, S., Aubert, D., Tesson, L., Braudeau, C., Pichard, V., Ferry, N. & Anegon, I. (2002) LacZ Transgenic Rats Tolerant for Beta-Galactosidase: Recipients for Gene Transfer Studies Using LacZ as a Reporter Gene. *Hum Gene Ther*, 13, 1383-1390.
- Menthena, A., Deb, N., Oertel, M., Grozdanov, P.N., Sandhu, J., Shah, S., Guha, C., Shafritz, D.A. & Dabeva, M.D. (2004) Bone Marrow Progenitors Are Not the Source of Expanding Oval Cells in Injured Liver. *Stem Cells*, 22, 1049-1061.
- Michalopoulos, G.K. (2010) Liver Regeneration after Partial Hepatectomy: Critical Analysis of Mechanistic Dilemmas. *Am J Pathol*, 176, 2-13.
- Mingozzi, F., Liu, Y.L., Dobrzynski, E., Kaufhold, A., Liu, J.H., Wang, Y., Arruda, V.R., High, K.A. & Herzog, R.W. (2003) Induction of Immune Tolerance to Coagulation Factor Ix Antigen by in Vivo Hepatic Gene Transfer. *J Clin Invest*, 111, 1347-1356.
- Mir, L.M., Bureau, M.F., Gehl, J., Rangara, R., Rouy, D., Caillaud, J.M., Delaere, P., Branellec, D., Schwartz, B. & Scherman, D. (1999) High-Efficiency Gene Transfer into Skeletal Muscle Mediated by Electric Pulses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 4262-4267.
- Mitchell, R.S., Beitzel, B.F., Schroder, A.R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C.C., Ecker, J.R. & Bushman, F.D. (2004) Retroviral DNA Integration: Aslv, Hiv, and Mlv Show Distinct Target Site Preferences. *PLoS Biol*, 2, E234.
- Miyazawa, K. (2010) Hepatocyte Growth Factor Activator (Hgfa): A Serine Protease That Links Tissue Injury to Activation of Hepatocyte Growth Factor. *Febs J*, 277, 2208-2214.

- Mohammed, F.F. & Khokha, R. (2005) Thinking Outside the Cell: Proteases Regulate Hepatocyte Division. *Trends Cell Biol*, 15, 555-563.
- Moore, K.A. & Lemischka, I.R. (2006) Stem Cells and Their Niches. *Science*, 311, 1880-1885.
- Morello, D., Lavenu, A. & Babinet, C. (1990) Differential Regulation and Expression of Jun, C-Fos and C-Myc Proto-Oncogenes During Mouse Liver Regeneration and after Inhibition of Protein Synthesis. *Oncogene*, 5, 1511-1519.
- Moustakas, A. & Heldin, C.H. (2009) The Regulation of Tgfbeta Signal Transduction. *Development*, 136, 3699-3714.
- Nagy, P., Bisgaard, H.C., Santoni-Rugiu, E. & Thorgeirsson, S.S. (1996) In Vivo Infusion of Growth Factors Enhances the Mitogenic Response of Rat Hepatic Ductal (Oval) Cells after Administration of 2-Acetylaminofluorene. *Hepatology*, 23, 71-79.
- Nagy, P., Kiss, A., Schnur, J. & Thorgeirsson, S.S. (1998) Dexamethasone Inhibits the Proliferation of Hepatocytes and Oval Cells but Not Bile Duct Cells in Rat Liver. *Hepatology*, 28, 423-429.
- Naldini, L., Tamagnone, L., Vigna, E., Sachs, M., Hartmann, G., Birchmeier, W., Daikuhara, Y., Tsubouchi, H., Blasi, F. & Comoglio, P.M. (1992) Extracellular Proteolytic Cleavage by Urokinase Is Required for Activation of Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor. *Embo J*, 11, 4825-4833.
- Natarajan, A., Wagner, B. & Sibilis, M. (2007) The Egf Receptor Is Required for Efficient Liver Regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 17081-17086.
- Nathwani, A.C., Rosales, C., McIntosh, J., Rastegarlar, G., Nathwani, D., Raj, D., Nawathe, S., Waddington, S.N., Bronson, R., Jackson, S., Donahue, R.E., High, K.A., Mingozzi, F., Ng, C.Y., Zhou, J., Spence, Y., McCarville, M.B., Valentine, M., Allay, J., Coleman, J., Sleep, S., Gray, J.T., Nienhuis, A.W. & Davidoff, A.M. (2011) Long-Term Safety and Efficacy Following Systemic Administration of a Self-Complementary Aav Vector Encoding Human Fix Pseudotyped with Serotype 5 and 8 Capsid Proteins. *Mol Ther*. 19(5):876-85
- Neubauer, K., Saile, B. & Ramadori, G. (2001) Liver Fibrosis and Altered Matrix Synthesis. *Can J Gastroenterol*, 15, 187-193.
- Nguyen, T.H., Bellodi-Privato, M., Aubert, D., Pichard, V., Myara, A., Trono, D. & Ferry, N. (2005a) Therapeutic Lentivirus-Mediated Neonatal in Vivo Gene Therapy in Hyperbilirubinemic Gunn Rats. *Mol Ther*, 12, 852-859.
- Nguyen, T.H., Mai, G., Villiger, P., Oberholzer, J., Salmon, P., Morel, P., Buhler, L. & Trono, D. (2005b) Treatment of Acetaminophen-Induced Acute Liver Failure in the Mouse with Conditionally Immortalized Human Hepatocytes. *J Hepatol*, 43, 1031-1037.

- Nguyen, T.H., Aubert, D., Bellodi-Privato, M., Flageul, M., Pichard, V., Jaidane-Abdelghani, Z., Myara, A. & Ferry, N. (2007) Critical Assessment of Lifelong Phenotype Correction in Hyperbilirubinemic Gunn Rats after Retroviral Mediated Gene Transfer. *Gene Ther*, 14, 1270-1277.
- Oe, S., Lemmer, E.R., Conner, E.A., Factor, V.M., Leveen, P., Larsson, J., Karlsson, S. & Thorgeirsson, S.S. (2004) Intact Signaling by Transforming Growth Factor Beta Is Not Required for Termination of Liver Regeneration in Mice. *Hepatology*, 40, 1098-1105.
- Oh, S.H., Witek, R.P., Bae, S.H., Zheng, D., Jung, Y., Piscaglia, A.C. & Petersen, B.E. (2007) Bone Marrow-Derived Hepatic Oval Cells Differentiate into Hepatocytes in 2-Acetylaminofluorene/Partial Hepatectomy-Induced Liver Regeneration. *Gastroenterology*, 132, 1077-1087.
- Ohashi, K., Park, F. & Kay, M.A. (2002) Role of Hepatocyte Direct Hyperplasia in Lentivirus-Mediated Liver Transduction in Vivo. *Hum Gene Ther*, 13, 653-663.
- Oinonen, T. & Lindros, K.O. (1998) Zonation of Hepatic Cytochrome P-450 Expression and Regulation. *Biochem J*, 329 (Pt 1), 17-35.
- Omori, N., Evarts, R.P., Omori, M., Hu, Z., Marsden, E.R. & Thorgeirsson, S.S. (1996) Expression of Leukemia Inhibitory Factor and Its Receptor During Liver Regeneration in the Adult Rat. *Lab Invest*, 75, 15-24.
- Overturf, K., Al-Dhalimy, M., Tanguay, R., Brantly, M., Ou, C.N., Finegold, M. & Grompe, M. (1996) Hepatocytes Corrected by Gene Therapy Are Selected in Vivo in a Murine Model of Hereditary Tyrosinaemia Type I. *Nat Genet*, 12, 266-273.
- Overturf, K., al-Dhalimy, M., Ou, C.N., Finegold, M. & Grompe, M. (1997) Serial Transplantation Reveals the Stem-Cell-Like Regenerative Potential of Adult Mouse Hepatocytes. *Am J Pathol*, 151, 1273-1280.
- Paku, S., Schnur, J., Nagy, P. & Thorgeirsson, S.S. (2001) Origin and Structural Evolution of the Early Proliferating Oval Cells in Rat Liver. *Am J Pathol*, 158, 1313-1323.
- Panduro, A., Shalaby, F., Weiner, F.R., Biempica, L., Zern, M.A. & Shafritz, D.A. (1986) Transcriptional Switch from Albumin to Alpha-Fetoprotein and Changes in Transcription of Other Genes During Carbon Tetrachloride Induced Liver Regeneration. *Biochemistry*, 25, 1414-1420.
- Paradis, V., Youssef, N., Dargere, D., Ba, N., Bonvoust, F., Deschatrette, J. & Bedossa, P. (2001) Replicative Senescence in Normal Liver, Chronic Hepatitis C, and Hepatocellular Carcinomas. *Hum Pathol*, 32, 327-332.

- Paranjpe, S., Bowen, W.C., Bell, A.W., Nejak-Bowen, K., Luo, J.H. & Michalopoulos, G.K. (2007) Cell Cycle Effects Resulting from Inhibition of Hepatocyte Growth Factor and Its Receptor C-Met in Regenerating Rat Livers by Rna Interference. *Hepatology*, 45, 1471-1477.
- Paranjpe, S., Bowen, W.C., Tseng, G.C., Luo, J.H., Orr, A. & Michalopoulos, G.K. (2010) Rna Interference against Hepatic Epidermal Growth Factor Receptor Has Suppressive Effects on Liver Regeneration in Rats. *Am J Pathol*, 176, 2669-2681.
- Park, F., Ohashi, K., Chiu, W., Naldini, L. & Kay, M.A. (2000) Efficient Lentiviral Transduction of Liver Requires Cell Cycling in Vivo. *Nat Genet*, 24, 49-52.
- Park, F., Ohashi, K. & Kay, M.A. (2003) The Effect of Age on Hepatic Gene Transfer with Self-Inactivating Lentiviral Vectors in Vivo. *Mol Ther*, 8, 314-323.
- Petersen, B.E., Goff, J.P., Greenberger, J.S. & Michalopoulos, G.K. (1998) Hepatic Oval Cells Express the Hematopoietic Stem Cell Marker Thy-1 in the Rat. *Hepatology*, 27, 433-445.
- Petersen, B.E., Bowen, W.C., Patrene, K.D., Mars, W.M., Sullivan, A.K., Murase, N., Boggs, S.S., Greenberger, J.S. & Goff, J.P. (1999) Bone Marrow as a Potential Source of Hepatic Oval Cells. *Science*, 284, 1168-1170.
- Petersen, B.E., Grossbard, B., Hatch, H., Pi, L., Deng, J. & Scott, E.W. (2003) Mouse A6-Positive Hepatic Oval Cells Also Express Several Hematopoietic Stem Cell Markers. *Hepatology*, 37, 632-640.
- Pfeifer, A., Kessler, T., Yang, M., Baranov, E., Kootstra, N., Cheresch, D.A., Hoffman, R.M. & Verma, I.M. (2001) Transduction of Liver Cells by Lentiviral Vectors: Analysis in Living Animals by Fluorescence Imaging. *Mol Ther*, 3, 319-322.
- Pibiri, M., Ledda-Columbano, G.M., Cossu, C., Simbula, G., Menegazzi, M., Shinozuka, H. & Columbano, A. (2001) Cyclin D1 Is an Early Target in Hepatocyte Proliferation Induced by Thyroid Hormone (T3). *Faseb J*, 15, 1006-1013.
- Picanco-Castro, V., Fontes, A.M., Heinz, S., Tonn, T. & Covas, D.T. (2008) The Chimeric Cytokine Hyper-Il-6 Enhances the Efficiency of Lentiviral Gene Transfer in Hepatocytes Both in Vitro and in Vivo. *Biotechnol Lett*, 30, 215-220.
- Picard, C., Lambotte, L., Starkel, P., Sempoux, C., Saliez, A., Van Den Berge, V., de Saeger, C. & Horsmans, Y. (2003) Retrorsine: A Kinetic Study of Its Influence on Rat Liver Regeneration in the Portal Branch Ligation Model. *J Hepatol*, 39, 99-105.
- Pichard, V., Aubert, D. & Ferry, N. (2001) Efficient Retroviral Gene Transfer to the Liver in Vivo Using Nonpolypeptidic Mitogens. *Biochem Biophys Res Commun*, 286, 929-935.

- Pichard, V., Bellodi-Privato, M., Gournay, J. & Ferry, N. (2006) Mixed Hematopoietic Molecular Chimerism Results in Permanent Transgene Expression from Retrovirally Transduced Hepatocytes in Mice. *J Gene Med*, 8, 425-432.
- Pichard, V. & Ferry, N. (2008) Origin of Small Hepatocyte-Like Progenitor in Retrorsine-Treated Rats. *J Hepatol*, 48, 368-369.
- Pichard, V., Aubert, D. & Ferry, N. (2009) Direct in Vivo Cell Lineage Analysis in the Retrorsine and 2aaf Models of Liver Injury after Genetic Labeling in Adult and Newborn Rats. *PLoS One*, 4, e7267.
- Podevin, G., Otta, E., Nguyen, J.M., Pichard, V., Aubert, D., Moullier, P. & Ferry, N. (2004) Factors Influencing Immune Response after in Vivo Retrovirus-Mediated Gene Transfer to the Liver. *J Gene Med*, 6, 16-21.
- Ponder, K.P., Melniczek, J.R., Xu, L., Weil, M.A., O'Malley, T.M., O'Donnell, P.A., Knox, V.W., Aguirre, G.D., Mazrier, H., Ellinwood, N.M., Sleeper, M., Maguire, A.M., Volk, S.W., Mango, R.L., Zweigle, J., Wolfe, J.H. & Haskins, M.E. (2002) Therapeutic Neonatal Hepatic Gene Therapy in Mucopolysaccharidosis Vii Dogs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 13102-13107.
- Poss, K.D., Wilson, L.G. & Keating, M.T. (2002) Heart Regeneration in Zebrafish. *Science*, 298, 2188-2190.
- Preisegger, K.H., Factor, V.M., Fuchsbichler, A., Stumptner, C., Denk, H. & Thorgeirsson, S.S. (1999) Atypical Ductular Proliferation and Its Inhibition by Transforming Growth Factor Beta1 in the 3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-Dihydrocollidine Mouse Model for Chronic Alcoholic Liver Disease. *Lab Invest*, 79, 103-109.
- Prizan-Ravid A, Elis E, Laham-Karam N, Selig S, Ehrlich M, Bacharach E. (2010) The Gag cleavage product, p12, is a functional constituent of the murine leukemia virus pre-integration complex. *PLoS Pathog*. 11;6(11):e1001183.
- Puppi, J., Guillonneau, C., Pichard, V., Bellodi-Privato, M., Cuturi, M.C., Anegon, I. & Ferry, N. (2004) Long Term Transgene Expression by Hepatocytes Transduced with Retroviral Vectors Requires Induction of Immune Tolerance to the Transgene. *J Hepatol*, 41, 222-228.
- Rappaport, A.M., Borowy, Z.J., Loughheed, W.M. & Lotto, W.N. (1954) Subdivision of Hexagonal Liver Lobules into a Structural and Functional Unit; Role in Hepatic Physiology and Pathology. *Anat Rec*, 119, 11-33.
- Rhim, J.A., Sandgren, E.P., Palmiter, R.D. & Brinster, R.L. (1995) Complete Reconstitution of Mouse Liver with Xenogeneic Hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 4942-4946.

- Rogler, L.E. (1997) Selective Bipotential Differentiation of Mouse Embryonic Hepatoblasts in Vitro. *Am J Pathol*, 150, 591-602.
- Romero-Gallo, J., Sozmen, E.G., Chytil, A., Russell, W.E., Whitehead, R., Parks, W.T., Holdren, M.S., Her, M.F., Gautam, S., Magnuson, M., Moses, H.L. & Grady, W.M. (2005) Inactivation of Tgf-Beta Signaling in Hepatocytes Results in an Increased Proliferative Response after Partial Hepatectomy. *Oncogene*, 24, 3028-3041.
- Rosenberg, D., Ilic, Z., Yin, L. & Sell, S. (2000) Proliferation of Hepatic Lineage Cells of Normal C57bl and Interleukin-6 Knockout Mice after Cocaine-Induced Periportal Injury. *Hepatology*, 31, 948-955.
- Rountree, C.B., Wang, X., Ge, S., Barsky, L., Zhu, J., Gonzales, I. & Crooks, G.M. (2007) Bone Marrow Fails to Differentiate into Liver Epithelium During Murine Development and Regeneration. *Hepatology*, 45, 1250-1260.
- Rudolph, K.L., Chang, S., Millard, M., Schreiber-Agus, N. & DePinho, R.A. (2000) Inhibition of Experimental Liver Cirrhosis in Mice by Telomerase Gene Delivery. *Science*, 287, 1253-1258.
- Ryan, R.F., Schultz, D.C., Ayyanathan, K., Singh, P.B., Friedman, J.R., Fredericks, W.J. & Rauscher, F.J., 3rd (1999) Kap-1 Corepressor Protein Interacts and Colocalizes with Heterochromatic and Euchromatic Hp1 Proteins: A Potential Role for Kruppel-Associated Box-Zinc Finger Proteins in Heterochromatin-Mediated Gene Silencing. *Mol Cell Biol*, 19, 4366-4378.
- Salmon, P., Arrighi, J.F., Piguët, V., Chapuis, B., Zubler, R.H., Trono, D. & Kindler, V. (2001) Transduction of Cd34+ Cells with Lentiviral Vectors Enables the Production of Large Quantities of Transgene-Expressing Immature and Mature Dendritic Cells. *J Gene Med*, 3, 311-320.
- Samakoglu, S., Bohl, D. & Heard, J.M. (2002) Mechanisms Leading to Sustained Reversion of Beta-Thalassemia in Mice by Doxycycline-Controlled Epo Delivery from Muscles. *Mol Ther*, 6, 793-803.
- Samuel, A. & Jago, M.V. (1975) Localization in the Cell Cycle of the Antimitotic Action of the Pyrrolizidine Alkaloid, Lasiocarpine and of Its Metabolite, Dehydroheliotridine. *Chem Biol Interact*, 10, 185-197.
- Sato, H., Koiwai, O., Tanabe, K. & Kashiwamata, S. (1990) Isolation and Sequencing of Rat Liver Bilirubin Udp-Glucuronosyltransferase Cdna: Possible Alternate Splicing of a Common Primary Transcript. *Biochem Biophys Res Commun*, 169, 260-264.

- Schmitt, F., Remy, S., Dariel, A., Flageul, M., Pichard, V., Boni, S., Usal, C., Myara, A., Laplanche, S., Anegon, I., Labrune, P., Podevin, G., Ferry, N. & Nguyen, T.H. (2010) Lentiviral Vectors That Express Ugt1a1 in Liver and Contain Mir-142 Target Sequences Normalize Hyperbilirubinemia in Gunn Rats. *Gastroenterology*, 139, 999-1007, 1007 e1001-1002.
- Schroder, A.R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J.R. & Bushman, F. (2002) Hiv-1 Integration in the Human Genome Favors Active Genes and Local Hotspots. *Cell*, 110, 521-529.
- Schultz, D.C., Friedman, J.R. & Rauscher, F.J., 3rd (2001) Targeting Histone Deacetylase Complexes Via Krab-Zinc Finger Proteins: The Phd and Bromodomains of Kap-1 Form a Cooperative Unit That Recruits a Novel Isoform of the Mi-2alpha Subunit of Nurd. *Genes Dev*, 15, 428-443.
- Seki, E., Tsutsui, H., Iimuro, Y., Naka, T., Son, G., Akira, S., Kishimoto, T., Nakanishi, K. & Fujimoto, J. (2005) Contribution of Toll-Like Receptor/Myeloid Differentiation Factor 88 Signaling to Murine Liver Regeneration. *Hepatology*, 41, 443-450.
- Sell, S. (1978) Distribution of Alpha-Fetoprotein- and Albumin-Containing Cells in the Livers of Fischer Rats Fed Four Cycles of N-2-Fluorenylacetamide. *Cancer Res*, 38, 3107-3113.
- Sell, S. & Salman, J. (1984) Light- and Electron-Microscopic Autoradiographic Analysis of Proliferating Cells During the Early Stages of Chemical Hepatocarcinogenesis in the Rat Induced by Feeding N-2-Fluorenylacetamide in a Choline-Deficient Diet. *Am J Pathol*, 114, 287-300.
- Seo, M.J., Suh, S.Y., Bae, Y.C. & Jung, J.S. (2005) Differentiation of Human Adipose Stromal Cells into Hepatic Lineage in Vitro and in Vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 328, 258-264.
- Seppen, J., Rijnberg, M., Cooreman, M.P. & Oude Elferink, R.P. (2002) Lentiviral Vectors for Efficient Transduction of Isolated Primary Quiescent Hepatocytes. *J Hepatol*, 36, 459-465.
- Seppen, J., van der Rijt, R., Looije, N., van Til, N.P., Lamers, W.H. & Oude Elferink, R.P. (2003) Long-Term Correction of Bilirubin Udp glucuronyltransferase Deficiency in Rats by in Utero Lentiviral Gene Transfer. *Mol Ther*, 8, 593-599.
- Sherman, M.P. & Greene, W.C. (2002) Slipping through the Door: Hiv Entry into the Nucleus. *Microbes Infect*, 4, 67-73.
- Shupe, T.D., Piscaglia, A.C., Oh, S.H., Gasbarrini, A. & Petersen, B.E. (2009) Isolation and Characterization of Hepatic Stem Cells, Or "Oval Cells," From Rat Livers. *Methods Mol Biol*, 482, 387-405.

- Si-Tayeb, K., Noto, F.K., Sepac, A., Sedlic, F., Bosnjak, Z.J., Lough, J.W. & Duncan, S.A. (2010) Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Simple Transient Transfection of Plasmid DNA Encoding Reprogramming Factors. *BMC Dev Biol*, 10, 81.
- Song, G., Sharma, A.D., Roll, G.R., Ng, R., Lee, A.Y., Blelloch, R.H., Frandsen, N.M. & Willenbring, H. (2010) Micromas Control Hepatocyte Proliferation During Liver Regeneration. *Hepatology*, 51, 1735-1743.
- Sonza, S., Maerz, A., Deacon, N., Meanger, J., Mills, J. & Crowe, S. (1996) Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication Is Blocked Prior to Reverse Transcription and Integration in Freshly Isolated Peripheral Blood Monocytes. *J Virol*, 70, 3863-3869.
- Spitzer, D., Hauser, H. & Wirth, D. (1999) Complement-Protected Amphotropic Retroviruses from Murine Packaging Cells. *Hum Gene Ther*, 10, 1893-1902.
- Srour, M.A., Fechner, H., Wang, X., Siemetzki, U., Albert, T., Oldenburg, J., Hanfland, P., Poller, W., Brackmann, H.H. & Schwaab, R. (2003) Regulation of Human Factor Ix Expression Using Doxycycline-Inducible Gene Expression System. *Thromb Haemost*, 90, 398-405.
- Steiling, H., Wustefeld, T., Bugnon, P., Brauchle, M., Fassler, R., Teupser, D., Thiery, J., Gordon, J.I., Trautwein, C. & Werner, S. (2003) Fibroblast Growth Factor Receptor Signalling Is Crucial for Liver Homeostasis and Regeneration. *Oncogene*, 22, 4380-4388.
- Stieger, K., Le Meur, G., Lasne, F., Weber, M., Deschamps, J.Y., Nivard, D., Mendes-Madeira, A., Provost, N., Martin, L., Moullier, P. & Rolling, F. (2006) Long-Term Doxycycline-Regulated Transgene Expression in the Retina of Nonhuman Primates Following Subretinal Injection of Recombinant Aav Vectors. *Mol Ther*, 13, 967-975.
- Stieger, K., Belbellaa, B., Le Guiner, C., Moullier, P. & Rolling, F. (2009) In Vivo Gene Regulation Using Tetracycline-Regulatable Systems. *Adv Drug Deliv Rev*, 61, 527-541.
- Strey, C.W., Markiewski, M., Mastellos, D., Tudoran, R., Spruce, L.A., Greenbaum, L.E. & Lambris, J.D. (2003) The Proinflammatory Mediators C3a and C5a Are Essential for Liver Regeneration. *J Exp Med*, 198, 913-923.
- Sun, C., Jin, X.L. & Xiao, J.C. (2006) Oval Cells in Hepatitis B Virus-Positive and Hepatitis C Virus-Positive Liver Cirrhosis: Histological and Ultrastructural Study. *Histopathology*, 48, 546-555.
- Sung, M.W., Yeh, H.C., Thung, S.N., Schwartz, M.E., Mandeli, J.P., Chen, S.H. & Woo, S.L. (2001) Intratumoral Adenovirus-Mediated Suicide Gene Transfer for Hepatic Metastases from Colorectal Adenocarcinoma: Results of a Phase I Clinical Trial. *Mol Ther*, 4, 182-191.

- Szulc, J., Wiznerowicz, M., Sauvain, M.O., Trono, D. & Aebischer, P. (2006) A Versatile Tool for Conditional Gene Expression and Knockdown. *Nat Methods*, 3, 109-116.
- Tada, K., Roy-Chowdhury, N., Prasad, V., Kim, B.H., Manchikalapudi, P., Fox, I.J., van Duijvendijk, P., Bosma, P.J. & Roy-Chowdhury, J. (1998) Long-Term Amelioration of Bilirubin Glucuronidation Defect in Gunn Rats by Transplanting Genetically Modified Immortalized Autologous Hepatocytes. *Cell Transplant*, 7, 607-616.
- Tashiro, S. (2009) Mechanism of Liver Regeneration after Liver Resection and Portal Vein Embolization (Ligation) Is Different? *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 16, 292-299.
- Tateno, C., Carreiro, M.P. & Hixson, D.C. (2010) Endogenous and Transplanted Small Hepatocytes in Retrorsine-Treated/Partially Hepatectomized Rat Liver Show Differences in Growth, Phenotype, and Proximity to Clusters of Gamma-Glutamyl Transpeptidase-Positive Host Hepatocytes. *J Histochem Cytochem*, 58, 61-72.
- Tateno, C., Takai-Kajihara, K., Yamasaki, C., Sato, H. & Yoshizato, K. (2000) Heterogeneity of Growth Potential of Adult Rat Hepatocytes in Vitro. *Hepatology*, 31, 65-74.
- Taub, R., Greenbaum, L.E. & Peng, Y. (1999) Transcriptional Regulatory Signals Define Cytokine-Dependent and -Independent Pathways in Liver Regeneration. *Semin Liver Dis*, 19, 117-127.
- Theise, N.D., Badve, S., Saxena, R., Henegariu, O., Sell, S., Crawford, J.M. & Krause, D.S. (2000a) Derivation of Hepatocytes from Bone Marrow Cells in Mice after Radiation-Induced Myeloablation. *Hepatology*, 31, 235-240.
- Theise, N.D., Nimmakayalu, M., Gardner, R., Illei, P.B., Morgan, G., Teperman, L., Henegariu, O. & Krause, D.S. (2000b) Liver from Bone Marrow in Humans. *Hepatology*, 32, 11-16.
- Thomas, C.E., Schiedner, G., Kochanek, S., Castro, M.G. & Lowenstein, P.R. (2000) Peripheral Infection with Adenovirus Causes Unexpected Long-Term Brain Inflammation in Animals Injected Intracranially with First-Generation, but Not with High-Capacity, Adenovirus Vectors: Toward Realistic Long-Term Neurological Gene Therapy for Chronic Diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 7482-7487.
- Tian, G., Liu, J. & Sui, J. (2009) A Patient with Huge Hepatocellular Carcinoma Who Had a Complete Clinical Response to P53 Gene Combined with Chemotherapy and Transcatheter Arterial Chemoembolization. *Anticancer Drugs*, 20, 403-407.
- Timchenko, N.A., Wilde, M., Kosai, K.I., Heydari, A., Bilyeu, T.A., Finegold, M.J., Mohamedali, K., Richardson, A. & Darlington, G.J. (1998) Regenerating Livers of Old Rats Contain High Levels of C/Ebalpha That Correlate with Altered Expression of Cell Cycle Associated Proteins. *Nucleic Acids Res*, 26, 3293-3299.

- Toietta, G., Mane, V.P., Norona, W.S., Finegold, M.J., Ng, P., McDonagh, A.F., Beaudet, A.L. & Lee, B. (2005) Lifelong Elimination of Hyperbilirubinemia in the Gunn Rat with a Single Injection of Helper-Dependent Adenoviral Vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 3930-3935.
- Tonkin, J.N., Knight, B., Curtis, D., Abraham, L.J. & Yeoh, G.C. (2008) Bone Marrow Cells Play Only a Very Minor Role in Chronic Liver Regeneration Induced by a Choline-Deficient, Ethionine-Supplemented Diet. *Stem Cell Res*, 1, 195-204.
- Tsai, K.C., Liao, Z.K., Yang, S.J., Lin, W.L., Shieh, M.J., Hwang, L.H. & Chen, W.S. (2009) Differences in Gene Expression between Sonoporation in Tumor and in Muscle. *J Gene Med*, 11, 933-940.
- Tsuruga, Y., Kiyono, T., Matsushita, M., Takahashi, T., Kasai, N., Matsumoto, S. & Todo, S. (2008) Effect of Intrasplenic Transplantation of Immortalized Human Hepatocytes in the Treatment of Acetaminophen-Induced Acute Liver Failure Scid Mice. *Transplant Proc*, 40, 617-619.
- Tuczek, H.V., Fritz, P., Wagner, T., Braun, U., Grau, A. & Wegner, G. (1981) Synthesis of Alpha-Fetoprotein (Afp) and Cell Proliferation in Regenerating Livers of Nmri Mice after Partial Hepatectomy. An Immunohistochemical and Autoradiographic Study with 3h-Thymidine. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 38, 229-237.
- Underhill, C., Qutob, M.S., Yee, S.P. & Torchia, J. (2000) A Novel Nuclear Receptor Corepressor Complex, N-Cor, Contains Components of the Mammalian Swi/Snf Complex and the Corepressor Kap-1. *J Biol Chem*, 275, 40463-40470.
- Van Buren, G., 2nd, Yang, A.D., Dallas, N.A., Gray, M.J., Lim, S.J., Xia, L., Fan, F., Somcio, R., Wu, Y., Hicklin, D.J. & Ellis, L.M. (2008) Effect of Molecular Therapeutics on Liver Regeneration in a Murine Model. *J Clin Oncol*, 26, 1836-1842.
- Van Eyken, P., Sciot, R., Paterson, A., Callea, F., Kew, M.C. & Desmet, V.J. (1988) Cytokeratin Expression in Hepatocellular Carcinoma: An Immunohistochemical Study. *Hum Pathol*, 19, 562-568.
- Van Hul, N.K., Abarca-Quinones, J., Sempoux, C., Horsmans, Y. & Leclercq, I.A. (2009) Relation between Liver Progenitor Cell Expansion and Extracellular Matrix Deposition in a Cde-Induced Murine Model of Chronic Liver Injury. *Hepatology*, 49, 1625-1635.

- Van Thiel, D.H., Gavaler, J.S., Kam, I., Francavilla, A., Polimeno, L., Schade, R.R., Smith, J., Diven, W., Penkrot, R.J. & Starzl, T.E. (1987) Rapid Growth of an Intact Human Liver Transplanted into a Recipient Larger Than the Donor. *Gastroenterology*, 93, 1414-1419.
- VandenDriessche, T., Vanslembrouck, V., Goovaerts, I., Zwinnen, H., Vanderhaeghen, M.L., Collen, D. & Chuah, M.K. (1999) Long-Term Expression of Human Coagulation Factor Viii and Correction of Hemophilia a after in Vivo Retroviral Gene Transfer in Factor Viii-Deficient Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 10379-10384.
- VandenDriessche, T., Thorrez, L., Naldini, L., Follenzi, A., Moons, L., Berneman, Z., Collen, D. & Chuah, M.K. (2002) Lentiviral Vectors Containing the Human Immunodeficiency Virus Type-1 Central Polypurine Tract Can Efficiently Transduce Nondividing Hepatocytes and Antigen-Presenting Cells in Vivo. *Blood*, 100, 813-822.
- Vanheule, E., Fan, Y.D., Van Huysse, J., Meester, D., Olievier, K., Praet, M., de Hemptinne, B. & Colle, I. (2011) Expression of Placental Growth Factor in Regenerating Livers after Partial Hepatectomy in the Rat. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 23, 66-75.
- Vassilopoulos, G., Wang, P.R. & Russell, D.W. (2003) Transplanted Bone Marrow Regenerates Liver by Cell Fusion. *Nature*, 422, 901-904.
- Vig, P., Russo, F.P., Edwards, R.J., Tadrous, P.J., Wright, N.A., Thomas, H.C., Alison, M.R. & Forbes, S.J. (2006) The Sources of Parenchymal Regeneration after Chronic Hepatocellular Liver Injury in Mice. *Hepatology*, 43, 316-324.
- Wagers, A.J., Sherwood, R.I., Christensen, J.L. & Weissman, I.L. (2002) Little Evidence for Developmental Plasticity of Adult Hematopoietic Stem Cells. *Science*, 297, 2256-2259.
- Wang, G.L., Shi, X., Salisbury, E., Sun, Y., Albrecht, J.H., Smith, R.G. & Timchenko, N.A. (2007) Growth Hormone Corrects Proliferation and Transcription of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in Livers of Old Mice Via Elimination of Ccaat/Enhancer-Binding Protein Alpha-Brm Complex. *J Biol Chem*, 282, 1468-1478.
- Wang, H., Iakova, P., Wilde, M., Welm, A., Goode, T., Roesler, W.J. & Timchenko, N.A. (2001) C/Ebpalphalpha Arrests Cell Proliferation through Direct Inhibition of Cdk2 and Cdk4. *Mol Cell*, 8, 817-828.
- Wang, L., Calcedo, R., Wang, H., Bell, P., Grant, R., Vandenberghe, L.H., Sanmiguel, J., Morizono, H., Batshaw, M.L. & Wilson, J.M. (2010) The Pleiotropic Effects of Natural Aav Infections on Liver-Directed Gene Transfer in Macaques. *Mol Ther*, 18, 126-134.
- Wang, P., Cong, M., Liu, T.H., Yang, A.T., Cong, R., Wu, P., Tang, S.Z., Xu, Y., Wang, H., Wang, B.E., Jia, J.D. & You, H. (2010) Primary Isolated Hepatic Oval Cells Maintain Progenitor Cell Phenotypes after Two-Year Prolonged Cultivation. *J Hepatol*, 53, 863-871.

- Wang, X., Foster, M., Al-Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M. & Grompe, M. (2003a) The Origin and Liver Repopulating Capacity of Murine Oval Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 Suppl 1, 11881-11888.
- Wang, X., Willenbring, H., Akkari, Y., Torimaru, Y., Foster, M., Al-Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M., Olson, S. & Grompe, M. (2003b) Cell Fusion Is the Principal Source of Bone-Marrow-Derived Hepatocytes. *Nature*, 422, 897-901.
- Wang, Y.P., Fu, P.P. & Chou, M.W. (2005) Metabolic Activation of the Tumorigenic Pyrrolizidine Alkaloid, Retrorsine, Leading to DNA Adduct Formation in Vivo. *Int J Environ Res Public Health*, 2, 74-79.
- Wege, H., Muller, A., Muller, L., Petri, S., Petersen, J. & Hillert, C. (2007) Regeneration in Pig Livers by Compensatory Hyperplasia Induces High Levels of Telomerase Activity. *Comp Hepatol*, 6, 6.
- Weglarz, T.C. & Sandgren, E.P. (2000) Timing of Hepatocyte Entry into DNA Synthesis after Partial Hepatectomy Is Cell Autonomous. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 12595-12600.
- Weir, E., Chen, Q., DeFrances, M.C., Bell, A., Taub, R. & Zarnegar, R. (1994) Rapid Induction of Mrnas for Liver Regeneration Factor and Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-1 in Primary Cultures of Rat Hepatocytes by Hepatocyte Growth Factor and Epidermal Growth Factor. *Hepatology*, 20, 955-960.
- White, I.N., Mattocks, A.R. & Butler, W.H. (1973) The Conversion of the Pyrrolizidine Alkaloid Retrorsine to Pyrrolic Derivatives in Vivo and in Vitro and Its Acute Toxicity to Various Animal Species. *Chem Biol Interact*, 6, 207-218.
- Willenbring, H., Bailey, A.S., Foster, M., Akkari, Y., Dorrell, C., Olson, S., Finegold, M., Fleming, W.H. & Grompe, M. (2004) Myelomonocytic Cells Are Sufficient for Therapeutic Cell Fusion in Liver. *Nat Med*, 10, 744-748.
- Williams, D.A. & Baum, C. (2003) Medicine. Gene Therapy--New Challenges Ahead. *Science*, 302, 400-401.
- Wiznerowicz, M., Jakobsson, J., Szulc, J., Liao, S., Quazzola, A., Beermann, F., Aebischer, P. & Trono, D. (2007) The Kruppel-Associated Box Repressor Domain Can Trigger De Novo Promoter Methylation During Mouse Early Embryogenesis. *J Biol Chem*, 282, 34535-34541.
- Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. & Felgner, P.L. (1990) Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in Vivo. *Science*, 247, 1465-1468.

- Wu, P.C., Lai, V.C., Fang, J.W., Gerber, M.A., Lai, C.L. & Lau, J.Y. (1999) Hepatocellular Carcinoma Expressing Both Hepatocellular and Biliary Markers Also Expresses Cytokeratin 14, a Marker of Bipotential Progenitor Cells. *J Hepatol*, 31, 965-966.
- Wu, X., Li, Y., Crise, B. & Burgess, S.M. (2003) Transcription Start Regions in the Human Genome Are Favored Targets for Mlv Integration. *Science*, 300, 1749-1751.
- Xia, X.G., Zhou, H., Zhou, S., Yu, Y., Wu, R. & Xu, Z. (2005) An Rnai Strategy for Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis Caused by Mutant Cu,Zn Superoxide Dismutase. *J Neurochem*, 92, 362-367.
- Xu, R., Sun, X., Tse, L.Y., Li, H., Chan, P.C., Xu, S., Xiao, W., Kung, H.F., Krissansen, G.W. & Fan, S.T. (2003) Long-Term Expression of Angiostatin Suppresses Metastatic Liver Cancer in Mice. *Hepatology*, 37, 1451-1460.
- Yadav, N., Kanjirakkuzhiyil, S., Kumar, S., Jain, M., Halder, A., Saxena, R. & Mukhopadhyay, A. (2009) The Therapeutic Effect of Bone Marrow-Derived Liver Cells in the Phenotypic Correction of Murine Hemophilia A. *Blood*, 114, 4552-4561.
- Yamada, Y., Kirillova, I., Peschon, J.J. & Fausto, N. (1997) Initiation of Liver Growth by Tumor Necrosis Factor: Deficient Liver Regeneration in Mice Lacking Type I Tumor Necrosis Factor Receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 1441-1446.
- Yamanaka, N., Okamoto, E., Kawamura, E., Kato, T., Oriyama, T., Fujimoto, J., Furukawa, K., Tanaka, T., Tomoda, F. & Tanaka, W. (1993) Dynamics of Normal and Injured Human Liver Regeneration after Hepatectomy as Assessed on the Basis of Computed Tomography and Liver Function. *Hepatology*, 18, 79-85.
- Yang, F., Huang, X., Yi, T., Yen, Y., Moore, D.D. & Huang, W. (2007) Spontaneous Development of Liver Tumors in the Absence of the Bile Acid Receptor Farnesoid X Receptor. *Cancer Res*, 67, 863-867.
- Yang, L., Li, S., Hatch, H., Ahrens, K., Cornelius, J.G., Petersen, B.E. & Peck, A.B. (2002) In Vitro Trans-Differentiation of Adult Hepatic Stem Cells into Pancreatic Endocrine Hormone-Producing Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 8078-8083.
- Yang, W., Yan, H.X., Chen, L., Liu, Q., He, Y.Q., Yu, L.X., Zhang, S.H., Huang, D.D., Tang, L., Kong, X.N., Chen, C., Liu, S.Q., Wu, M.C. & Wang, H.Y. (2008) Wnt/Beta-Catenin Signaling Contributes to Activation of Normal and Tumorigenic Liver Progenitor Cells. *Cancer Res*, 68, 4287-4295.
- Yasui, O., Miura, N., Terada, K., Kawarada, Y., Koyama, K. & Sugiyama, T. (1997) Isolation of Oval Cells from Long-Evans Cinnamon Rats and Their Transformation into Hepatocytes in Vivo in the Rat Liver. *Hepatology*, 25, 329-334.

- Yazigi, N.A., Carrick, T.L., Bucuvalas, J.C., Schmidt, C.S., Balistreri, W.F. & Bezerra, J.A. (1997) Expansion of Transplanted Hepatocytes During Liver Regeneration. *Transplantation*, 64, 816-820.
- Yovchev, M.I., Grozdanov, P.N., Joseph, B., Gupta, S. & Dabeva, M.D. (2007) Novel Hepatic Progenitor Cell Surface Markers in the Adult Rat Liver. *Hepatology*, 45, 139-149.
- Yovchev, M.I., Grozdanov, P.N., Zhou, H., Racherla, H., Guha, C. & Dabeva, M.D. (2008) Identification of Adult Hepatic Progenitor Cells Capable of Repopulating Injured Rat Liver. *Hepatology*, 47, 636-647.
- Zajicek, G., Oren, R. & Weinreb, M., Jr. (1985) The Streaming Liver. *Liver*, 5, 293-300.
- Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhbass, U., Montagnier, L. & Charneau, P. (2000) Hiv-1 Genome Nuclear Import Is Mediated by a Central DNA Flap. *Cell*, 101, 173-185.
- Zhang, F., Chen, X.P., Zhang, W., Dong, H.H., Xiang, S., Zhang, W.G. & Zhang, B.X. (2008) Combined Hepatocellular Cholangiocarcinoma Originating from Hepatic Progenitor Cells: Immunohistochemical and Double-Fluorescence Immunostaining Evidence. *Histopathology*, 52, 224-232.
- Zhang, S., Joseph, G., Pollok, K., Berthoux, L., Sastry, L., Luban, J. & Cornetta, K. (2006) G2 Cell Cycle Arrest and Cyclophilin a in Lentiviral Gene Transfer. *Mol Ther*, 14, 546-554.
- Zhou, X.F., Wang, Q., Chu, J.X. & Liu, A.L. (2006) Effects of Retrorsine on Mouse Hepatocyte Proliferation after Liver Injury. *World J Gastroenterol*, 12, 1439-1442.
- Zhou, Y. & Ratner, L. (2000) Phosphorylation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpr Regulates Cell Cycle Arrest. *J Virol*, 74, 6520-6527.
- Zhu, R.Z., Xiang, D., Xie, C., Li, J.J., Hu, J.J., He, H.L., Yuan, Y.S., Gao, J., Han, W. & Yu, Y. (2010) Protective Effect of Recombinant Human Il-1ra on Ccl4-Induced Acute Liver Injury in Mice. *World J Gastroenterol*, 16, 2771-2779.

Régénération hépatique en conditions normales et pathologiques : Analyse des lignages cellulaires et étude des effets sur la transduction lentivirale.

Résumé

Le foie a une extraordinaire capacité de régénération. Après hépatectomie partielle, chaque hépatocyte peut se diviser permettant ainsi la restauration de la masse hépatique. Chez le rongeur certaines drogues inhibent la prolifération hépatocytaire après hépatectomie. L'intoxication au 2-acétylaminofluorène (2-AAF) conduit à la prolifération hépatique de cellules progénitrices, les cellules ovales. L'administration de rétrorsine, conduit à la prolifération de SHPCs (Small Hepatocyte-Like Progenitor Cells). Le but de notre étude était de mieux comprendre l'origine ou le devenir de ces cellules en réalisant une étude de lignage cellulaire par marquage génétique. Nous avons montré qu'après intoxication à l'AAF, les cellules ovales restaurent la masse du foie en se différenciant en hépatocytes et en cellules des canaux biliaires, et qu'après intoxication à la rétrorsine, les cellules à l'origine de la régénération ne sont pas des cellules souches mais des hépatocytes résistants à la rétrorsine.

Pour traiter les maladies monogéniques métaboliques héréditaires, une des stratégies est d'utiliser le lentivirus recombinant mais il transduit mal les hépatocytes quiescents. Notre but était de mieux comprendre la relation entre l'efficacité de transduction lentivirale et le cycle cellulaire hépatique. En initiant le cycle cellulaire des hépatocytes avec de l'acide cholique, ou en le bloquant avant la mitose avec de la rétrorsine, nous avons observé une bonne transduction lentivirale. Ainsi, nous avons montré que les lentivirus recombinants infectent de façon efficace les hépatocytes en interphase et que la mitose n'est pas nécessaire pour la transduction lentivirale hépatocytaire.

Régénération hépatique, lignage cellulaire, cellules souches adultes, transfert de gènes, transduction lentivirale.

Liver regeneration in normal and pathological conditions: Analysis of cell lineages and study of the effects on lentiviral transduction

Abstract

Liver has an extraordinary regeneration capacity. After partial hepatectomy, each hepatocyte can divide allowing the restoration of the hepatic mass. In rodent some drugs inhibit hepatocyte proliferation after hepatectomy. Intoxication with 2-acetylaminofluorene (2-AAF) leads to the proliferation of hepatic progenitor cells, oval cells. Administration of retrorsine leads to the proliferation of SHPCs (Small Hepatocyte-Like Progenitor Cells). The aim of our study was to better understand the origin and fate of these cells by performing a study of cell lineage by genetic labelling. We showed that after intoxication with AAF, oval cells restore liver mass by differentiating into hepatocytes and biliary duct cells, and after retrorsine intoxication, the cells responsible for regeneration are not stem cells but retrorsine-resistant hepatocytes.

To treat monogenic inherited metabolic diseases, one possible strategy is to use recombinant lentivirus, but this vector poorly transduces quiescent hepatocytes. Our goal was to better understand the relationship between the lentiviral transduction efficiency and cell cycle in the liver. By initiating the cell cycle of hepatocytes with cholic acid, or by blocking it before mitosis with retrorsine, we observed a good lentiviral transduction. Thus, we showed that recombinant lentiviruses efficiently infect hepatocytes in interphase and that mitosis is not necessary for lentiviral transduction of hepatocytes.

Hepatic regeneration, cellular lineage, adult stem cells, gene transfer, lentiviral transduction.

Virginie Pichard-Inserm 948-Laboratoire de Biothérapies Hépatiques-CHU Hôtel-Dieu-NANTES.