



HAL
open science

Transplantation d'hépatocytes génétiquement modifiés : régénération hépatique et moyens d'amélioration de la prise de greffe hépatocytaire

Panagiotis Lainas

► **To cite this version:**

Panagiotis Lainas. Transplantation d'hépatocytes génétiquement modifiés : régénération hépatique et moyens d'amélioration de la prise de greffe hépatocytaire. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA114842 . tel-00746653

HAL Id: tel-00746653

<https://theses.hal.science/tel-00746653>

Submitted on 29 Oct 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

Ecole Doctorale : Innovation thérapeutique du fondamental à l'appliqué

Discipline: Sciences Chirurgicales

Année 2012

Série Doctorat N° 1190

**Equipe mixte Inserm U 972
Les cellules souches: de leurs niches aux
applications thérapeutiques**

THÈSE DE DOCTORAT

soutenu le 9 octobre 2012

par

Panagiotis LAÏNAS

**TRANSPLANTATION D'HÉPATOCTES GÉNÉTIQUEMENT
MODIFIÉS: RÉGÉNÉRATION HÉPATIQUE ET MOYENS
D'AMÉLIORATION DE LA PRISE DE GREFFE HÉPATOCTAIRE**

COMPOSITION DU JURY

Directeur de thèse : Pr Ibrahim DAGHER (Hôpital Antoine-Béclère, Clamart)
Co-directeur de thèse : Dr Anne WEBER (INSERM U972, Villejuif)

Président du jury : Pr Dominique FRANCO (Hôpital Antoine-Béclère, Clamart)
Rapporteurs : Pr Olivier FARGES (Hôpital Beaujon, Clichy)
Dr Nicolas FERRY (ANSM, Saint-Denis)

Examineur : Pr Olivier SCATTON (Hôpital Saint-Antoine, Paris)



John E. McClusky

« Quant au rusé Prométhée il l'attacha par des nœuds indissolubles et douloureux ; puis il envoya contre lui un aigle aux ailes étendues qui rongeaient son foie immortel ; il en renaissait autant durant la nuit ce que l'oiseau aux larges ailes en avait dévoré pendant le jour. »

« Théogonie » d'Hésiode (750-700 av. J.-C.)

(D'après John Elias Skandalakis « Surgical Anatomy - the embryologic and anatomic basis of Modern Surgery », 2004 , volume II, p.1005. Permission accordée par Professeur Lee Skandalakis, Université d'Emory, Atlanta, GA, Etats-Unis d'Amérique).

Je tiens tout d'abord à remercier le directeur de cette thèse, le **Professeur Ibrahim Dagher**, de m'avoir fait confiance, puis pour m'avoir guidé, encouragé, conseillé, tout en me laissant une grande liberté et en me faisant l'honneur de me déléguer plusieurs responsabilités dont j'espère avoir été à la hauteur. Je te remercie pour ton amitié et ton soutien. C'est un immense privilège d'être ton élève. Je t'exprime ma gratitude et ma profonde admiration.

Je ne sais comment exprimer ma gratitude au **Professeur Dominique Franco** pour plusieurs raisons. Premièrement, pour m'avoir fait l'honneur d'être le Président de mon jury de thèse. Ensuite, pour sa gentillesse et tous ses conseils durant ces années. Et enfin, pour ce matin du 9 mars 2005 quand, jeune étudiant en médecine, je l'ai rencontré pour la première fois. Professeur, je vous remercie d'avoir changé ma vie, je vous en serai toujours reconnaissant.

Mes remerciements vont également au **Docteur Anne Weber**, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, de m'avoir donné tous les moyens nécessaires pour faire aboutir ce projet de recherche et cette thèse doctorale et pour son encadrement en recherche. Chère Anne, je vous remercie pour ce magnifique voyage dans le monde de la recherche.

Ma gratitude va également au **Professeur Olivier Farges** et au **Docteur Nicolas Ferry** qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi qu'au **Professeur Olivier Scatton** qui est l'examineur de cette thèse. Je vous remercie du fond de mon cœur.

Je tiens aussi à remercier le **Docteur Hadrien Tranchart** pour ses précieuses remarques, nos conversations interminables sur la chirurgie et la recherche et ses blagues durant nos expérimentations. Mais surtout pour son soutien et pour notre amitié qui durera pour toujours.

Je remercie tous ceux sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est : aussi bien par les discussions que j'ai eu la chance de tenir avec eux, leurs suggestions ou contributions. Je pense ici en particulier au **Professeur Danièle Pariente**, qui m'a transmis ses connaissances sur l'embolisation portale avec calme et gentillesse ; au **Docteur Tuan Huy Nguyen**, qui m'impressionne par son travail et ses différents projets sur les lentivirus ; à **Sylvie Mainot** et à **Marie-Thérèse Groyer** pour leurs contributions et tous les moments que nous avons passé ensemble dans cette belle unité de recherche. Je vous en remercie profondément.

J'exprime ma reconnaissance à tous les membres de l'ancienne unité INSERM U 804 pour l'accueil qu'ils m'ont toujours réservé : **Anne Dubart, Michèle Hadchouel, Marie Garcia, Thomas Touboul, Jean-Paul Delgado, Lyes Boudechiche, Julie Branger, Yacine Laabi, Sébastien Corbineau, Amelie Martinez**, je vous remercie pour les merveilleux moments passés ensemble.

Le **Docteur Delphine Holopherne** et toute l'équipe du Centre de Boisbonne et de l'Ecole Vétérinaire de Nantes pour leur compétences, leur soutien et leur gentillesse durant nos expériences chez le singe ; les **Docteurs Patrick Gonin** et **Karim Benihoud** à l'Institut Gustave Roussy pour leur aide sur notre projet lapin ; le **Docteur Rodi Courie** pour les informations récentes sur les maladies métaboliques du foie ; et le **Docteur Angel Osorio** pour son logiciel de volumétrie hépatique PTM3D et sa disponibilité.

Je voudrais aussi remercier tous les chirurgiens du Service de Chirurgie Digestive Minimale Invasive de l'Hôpital Antoine-Béclère (**Docteurs Dimitrios Tzanis, Stefano Ferretti, Niaz Devaquet, Guillaume Pourcher**) ainsi que mes co-internes (**Romain Amato, Paul Moulin, Gwenole Kermarrec, Antoine Dautruche**) pour leur soutien et patience durant les semaines de rédaction de cette thèse.

Je voudrais enfin exprimer ma reconnaissance au **Professeur Petros Mirilas**, de m'avoir donné l'occasion à mes 20 ans de travailler avec lui et de m'avoir guidé dans mes premiers pas dans le monde de la recherche médicale et de la microchirurgie expérimentale. Cher Petros, je te remercie pour ces 4 ans d'apprentissage et de bonheur.

Parce qu'une thèse ne se fait pas seulement par le travail qui suit, je voudrais remercier ma famille pour la confiance qu'elle m'a toujours accordé.

Ma sœur **Vassiliki**, qui m'impressionnait quand j'étais adolescent avec ses livres de médecine et ses connaissances et qui a été la raison qui m'a poussé vers la médecine. Je te remercie pour ton amour et ton soutien.

Et enfin, mes parents, **Vassilios** et **Efi**, pour m'avoir toujours guidé et soutenu. Vous avez toujours fait des sacrifices pour moi et je vous en remercie. Vous êtes formidables, je vous admire et je vous aime. Je vous dédie cette thèse en témoignage de gratitude et d'estime.

TABLE DES MATIERES

-	LISTE DES ABRÉVIATIONS	9
-	LISTE DES FIGURES	11
-	LISTE DES TABLEAUX	13
-	AVANT PROPOS	14
-	PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION	
-	CHAPITRE I : L'hypercholestérolémie familiale et les autres maladies métaboliques héréditaires hépatiques	18
	1.1 L'hypercholestérolémie familiale de type IIA	19
	1.1.1 Le récepteur aux LDL et l'hypercholestérolémie familiale	19
	1.1.2 Physiopathologie	21
	1.1.3 Les traitements actuels chez l'homme	23
	1.1.4 Les modèles animaux de l'hypercholestérolémie familiale	25
	1.2 Autres maladies métaboliques héréditaires du foie	27
	1.2.1 Maladies métaboliques sans accumulation hépatique de métabolites	27
	1.2.1.1 Maladie de Crigler-Najjar	27
	1.2.1.2 Déficit en Ornithine Carbamyltransférase	28
	1.2.2 Maladies métaboliques de « surcharge »	29
	1.2.2.1 Déficit en α1-antitrypsine	29
	1.2.2.2 Maladie de Wilson	31
	1.2.2.3 Hémochromatose primitive	33
	1.2.2.4 Tyrosinémie de type I	34

-	CHAPITRE II : Approches thérapeutiques des maladies métaboliques héréditaires du foie	37
	2.1 La transplantation hépatique	38
	2.2 La xéno greffe	45
	2.3 Foie artificiel et bioartificiel	47
	2.4 Thérapie cellulaire et thérapie génique	51
	2.5 Transplantation d'hépatocytes – Les essais cliniques	56
	2.5.1 Transplantation d'hépatocytes pour insuffisances hépatiques chroniques et aiguës	56
	2.5.2 Transplantation d'hépatocytes pour déficits métaboliques hépatiques	63
-	CHAPITRE III : Les vecteurs lentiviraux	69
	3.1 Les vecteurs rétroviraux	71
	3.1.1 Généralités	71
	3.1.2 Cycle cellulaire des rétrovirus	72
	3.1.3 Structure et organisation génomique des rétrovirus	73
	3.2 Les lentivirus	74
	3.2.1 Caractéristiques et structure des lentivirus	74
	3.2.2 Les vecteurs lentiviraux développés à partir de HIV-1	78
	3.2.3 Récentes améliorations des vecteurs lentiviraux	78
	3.2.4 Les vecteurs lentiviraux dans la thérapie génique du foie	82
-	CHAPITRE IV : Transplantation d'hépatocytes : moyens d'amélioration de la prise de greffe hépatocytaire	85
	4.1 Induction de la prise de greffe hépatocytaire par une importante lésion du foie receveur	86
	4.1.1 Modèles de destruction physique et/ou chimique	87
	4.1.2 Inhibition du cycle cellulaire des hépatocytes natifs	87
	4.2 Manipulations génétiques	88
	4.2.1 Modèles de « génotoxicité » du foie receveur	88

4.2.2	Augmentation de la compétitivité des hépatocytes transplantés	89
4.3	Moyens d'induction d'une régénération hépatique et d'une amélioration de la prise de greffe hépatocytaire	90
4.3.1	Facteurs de croissance	95
4.3.2	Hépatectomie partielle et régénération hépatique	96
4.3.3	La ligature portale partielle	97
4.3.4	L'embolisation portale partielle	100
-	OBJECTIFS	105
-	DEUXIEME PARTIE : RESULTATS	
I.	<u>Régénération hépatique et cinétique de revascularisation portale après embolisation portale partielle réversible chez le macaque.</u>	108
1.	Présentation de l'article	109
2.	<u>Lainas P, Boudechiche L, Osorio A, Coulomb A, Weber A, Pariente D, Franco D, Dagher I</u> Liver regeneration and recanalization time course following reversible portal vein embolization. J Hepatol 2008; 49:354-362	111
3.	Discussion de l'article	120
II.	<u>Efficacité de prise de greffe hépatocytaire et expression du transgène à long terme suite à une embolisation portale réversible chez le macaque.</u>	123
1.	Présentation de l'article	124
2.	<u>Dagher I, Nguyen TH, Groyer-Picard MT, Lainas P, Mainot S, Guettier C, Pariente D, Franco D, Weber A</u> Efficient hepatocyte engraftment and long-term transgene Expression after reversible portal embolization in nonhuman primates. Hepatology 2009; 49:950-959	126
3.	Discussion de l'article	136

III.	<u>Thérapie génique ex vivo pour le traitement des maladies métaboliques du foie : avancées dans la transplantation d'hépatocytes et les vecteurs rétroviraux.</u>	139
	1. Présentation de l'article	140
	2. Nguyen TH, Mainot S, <u>Lainas P</u> , Franco D, Dagher I, Weber A Ex vivo liver-directed gene therapy for the treatment of metabolic diseases: advances in hepatocyte transplantation and retroviral vectors. Curr Gene Ther 2009; 9:136-149	141
	3. Discussion de l'article	155
-	DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	157
-	BIBLIOGRAPHIE	162

LISTE DES ABREVIATIONS

MMHH : Maladies Métaboliques Héritaires Hépatiques
LDL : Low Density Lipoprotein
R-LDL : récepteur aux lipoprotéines de basse densité humain
r-ldl : récepteur aux lipoprotéines de basse densité animal
A1AT : α_1 -antitrypsine
CHC : carcinome hépatocellulaire
FAH : fumarylacétoacétate hydrolase
NTBC : 2-(2Nitro-4-TrifluorométhylBenzoyl)-1,3-Cyclohexanédione
OTC : Ornithine TransCarbamylase
MARS : Molecular Adsorbent Recycling System
FPSA : Fractionated Plasma Separation and Adsorption
AAV: Adeno-Associated Virus
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
SIDA : Syndrome de l'Immunodéficience Acquise
IRD : Infantile Refsum Disease
LTR : Long Terminal Repeats
gag : group specific antigen
pol : polymérase
env : enveloppe
rev : regulator of viral expression
cppt : central polypurine tract
CTS : Central Termination Sequence
SIN : Self-INactivating
RRE : Rev Response Element
WPRE : Woodchuck hepatitis virus Posttranscriptional Regulatory Element
apoAII : apolipoprotéine AII
X-SCID-1 : X-linked Severe Combined Immunodeficiency Type 1
LCR : Locus Control Region
GFP : Green Fluorescent Protein

LISTE DES ABREVIATIONS

hFIX : human Factor IX

GMP : Good Manufacturing Practices

CCl₄ : tetrachlorure de carbone

TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α

IL6 : Interleukine 6

EGF : Epidermal Growth Factor

TGF- α : Transforming Growth Factor- α

HGF : Hepatocyte Growth Factor

KGF : Keratocyte Growth Factor

BrdU : BRomoDÉoxyURidine

EPP : Embolisation Portale Partielle

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Particule de lipoprotéine de basse densité (LDL).

Figure 2. Métabolisme des chylomicrons, VLDL et LDL.

Figure 3. Professeur Yoshio Watanabe (1926-2008) avec le modèle animal de l'hypercholestérolémie familiale portant son nom.

Figure 4. Professeur Thomas E. Starzl avant la première transplantation hépatique chez l'Homme en 1963.

Figure 5. Evolution du nombre de greffes hépatiques en France après 1986.

Figure 6. Nombre des nouvelles inscriptions en liste nationale d'attente en France entre 2005 et 2010.

Figure 7. Durée d'attente avant greffe hépatique selon la période d'inscription.

Figure 8. Nombre des greffes avec donneur vivant en France entre 2005 et 2010.

Figure 9. Survie globale du receveur après greffe hépatique (1993-2009).

Figure 10. Courbe de survie du receveur hépatique selon la période de greffe.

Figure 11. Organes et tissus pour lesquels la xéno greffe pourrait être appliquée comme thérapie potentielle.

Figure 12. La thérapie cellulaire pour les MMHH.

Figure 13. Cycle répliatif des rétrovirus.

Figure 14. Organisation du génome du VIH-1 et de la séquence LTR. gag (group specific antigen) : protéines de structure ; pol (polymérase) : transcriptase inverse, protéase, intégrase ; env (enveloppe) : Gp120, gp41 (fusion) ; tat (Transactivator) : régulateur positif de la transcription ; rev (regulator of viral expression) : export des transcrits non épissés hors du noyau ; vif (viral infectivity) : empêche la désamination de l'ADN viral ; vpr (viral protein R) : transport de l'ADN au noyau, augmente la production virale et contrôle le cycle cellulaire) ; vpu (viral protein U) : réduit l'expression du CD4 ; nef (negative-regulation factor) : augmente l'infectivité et réduit l'expression du CD4.

Figure 15. Illustration retrouvée sur un vase ancien représentant le mythe de Prométhée.

Figure 16. Schéma récapitulatif de la régénération hépatique avec les différents facteurs de croissance et cytokines activés et impliqués.

Figure 17. Evénements survenant dans les premières 60 minutes après hépatectomie partielle.

Figure 18. Evénements survenant entre 1 et 48 heures après hépatectomie partielle.

Figure 19. Cinétique de régénération des différents types cellulaires après hépatectomie de 70% chez le rat.

Figure 20. Hépatocytes en division ayant incorporé le BrdU 9 jours après ligature portale partielle chez le macaque.

Figure 21. Cinétique de l'augmentation du volume du foie résiduel fonctionnel et degré d'hypertrophie après EPP chez des patients non-cirrhotiques. La zone colorée en bleu (J22-J56) illustre la période stable (plateau) durant laquelle l'augmentation du volume hépatique résiduel était très faible.

Figure 22. Effet de l'EPP sur la prise de greffe hépatocytaire. Image de fluorescence directe (à gauche) et de superposition fluorescence-microscope optique (à droite). Hépatocytes marqués au Hoechst 15 jours après EPP à l'Histoacryl® sur coupe hépatique d'un lobe non-embolisé. La flèche indique un espace porte.

Figure 23. Marquage de la connexine-32, protéine des jonctions intercellulaires retrouvée entre les hépatocytes transplantés mais aussi avec les hépatocytes résidents.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Evolution de la liste d'attente et devenir des candidats en greffe hépatique.

Tableau 2. Nombre des décès et des sorties pour aggravation de la maladie avant greffe sur la liste d'attente depuis 2005 chez les malades en attente d'une greffe hépatique.

Tableau 3. Patients traités pour insuffisance hépatique aiguë par des approches de foie artificiel.

Tableau 4. Maladies hépatiques pour lesquelles un protocole clinique de transplantation d'hépatocytes a été réalisé.

Tableau 5. Quelques exemples de protocoles et résultats des essais cliniques de transplantation d'hépatocytes pour insuffisance hépatique chronique ou aiguë.

Tableau 6. Protocoles et résultats des essais cliniques de transplantation d'hépatocytes pour déficits métaboliques du foie.

AVANT PROPOS

AVANT PROPOS

La transplantation d'hépatocytes est un procédé séduisant pour remplacer les cellules déficientes dans un foie anatomiquement normal. Dans les maladies métaboliques héréditaires hépatiques, où les hépatocytes sont déficitaires alors que l'architecture et la vascularisation du foie sont normales, la thérapie cellulaire présente un potentiel espoir thérapeutique. Dans ces maladies, le remplacement d'un pourcentage restreint (5 à 10%) d'hépatocytes déficients par des hépatocytes normaux pourrait rétablir durablement la fonction métabolique. Les résultats des essais cliniques d'allogreffe ou d'autogreffe d'hépatocytes génétiquement modifiés sont moins concluants, montrent une prise de greffe insuffisante et, dans la plupart des études, un effet thérapeutique transitoire. Ces résultats dévoilent qu'il est nécessaire de développer des modèles précliniques plus poussés.

Notre équipe de recherche est impliquée depuis des années dans la mise au point d'approches précliniques de thérapie génique pour le traitement des maladies métaboliques du foie, et en particulier de l'hypercholestérolémie familiale, par transplantation d'hépatocytes génétiquement modifiés ou non. Un modèle de transplantation d'hépatocytes isolés chez le primate a été élaboré. Ce modèle nous a permis de détecter les facteurs d'échec et les limites de la transplantation d'hépatocytes chez le grand animal. Le principal objectif de ce travail a été d'étudier les moyens d'induire une importante régénération hépatique et une prise de greffe hépatocytaire significative afin de développer dans un futur proche une nouvelle approche de transplantation d'hépatocytes génétiquement modifiés ex vivo pour le traitement de l'hypercholestérolémie familiale.

Dans les prochains chapitres, les sujets suivants seront abordés : i) l'hypercholestérolémie familiale et les autres maladies métaboliques du foie ; ii) les approches thérapeutiques pour ces maladies ainsi que les essais cliniques de thérapie cellulaire et génique ; iii) les vecteurs lentiviraux, qui sont les vecteurs sûrs et efficaces utilisés dans nos études pour véhiculer et transférer le gène manquant dans les hépatocytes ; iv) la transplantation d'hépatocytes et les moyens existants pour améliorer la prise de greffe hépatocytaire.

Ensuite, les résultats de nos travaux seront présentés et discutés en détail : i) l'embolisation portale partielle réversible comme moyen peu invasif et efficace d'induction de la prolifération hépatocytaire et de l'hypertrophie du foie non-embolisé ; ii) la présentation de notre approche de thérapie génique ex vivo par autotransplantation d'hépatocytes génétiquement modifiés chez le macaque ; iii) les récents progrès et les étapes limitantes actuelles de la thérapie génique ainsi que l'éventuelle application de notre approche en clinique.

**PREMIERE PARTIE :
INTRODUCTION**

CHAPITRE I

L'HYPERCHOLESTEROLEMIE

FAMILIALE ET LES AUTRES MALADIES

METABOLIQUES HEREDITAIRES

HEPATIQUES

Les maladies métaboliques héréditaires hépatiques (MMHH) sont des maladies rares qui peuvent être symptomatiques dès la naissance ou l'enfance. Elles sont nombreuses et peuvent être réparties en deux catégories: i) les maladies métaboliques consécutives à une anomalie génétique entraînant une modification de la fonction de l'hépatocyte sans accumulation hépatique de métabolites, et ii) les maladies métaboliques de « surcharge » entraînant une atteinte hépatocytaire par accumulation de protéines ou de métaux. La majorité des MMHH ne se manifestent qu'à l'âge adulte. Cependant, elles ont parfois une évolution sévère mettant en jeu le pronostic vital dès l'enfance. Les traitements actuels sont souvent palliatifs visant à améliorer la qualité de vie et parfois à améliorer la survie des patients.

Notre équipe de recherche est impliquée depuis des années dans la mise au point d'approches précliniques de thérapie génique pour le traitement des MMHH, et en particulier de l'hypercholestérolémie familiale, par transplantation d'hépatocytes/progéniteurs hépatiques génétiquement modifiés ou non. Cette maladie métabolique, liée à une anomalie génétique hépatique sans atteinte directe du foie, est le sujet principal de ce chapitre.

1.1 L'hypercholestérolémie familiale de type IIA

1.1.1 Le récepteur aux LDL et l'hypercholestérolémie familiale

L'hypercholestérolémie familiale est une maladie génétique, autosomique dominante, due à une mutation du gène codant le récepteur aux lipoprotéines de basse densité (R-LDL) [1]. Les premiers mécanismes responsables de l'hypercholestérolémie familiale ont été identifiés dans les années 1970 par les travaux exceptionnels de Brown et Goldstein [2-6]. Ces travaux leur ont permis de recevoir le prix Nobel de médecine en 1985 [7, 8].

Les lipoprotéines de basse densité (LDL) sont un groupe de lipoprotéines de types et de tailles variables (18 à 25 nm de diamètre), qui transportent le cholestérol, libre ou estérifié, dans le sang et à travers le corps pour l'apporter aux cellules (**Figure 1**). Elles sont captées par un récepteur spécifique, le R-LDL, qui fixe les particules LDL plasmatiques formant des complexes ligands/récepteurs qui sont ensuite internalisés. Le gène du R-LDL est localisé sur le bras court du chromosome 19. La mutation du récepteur cellulaire des particules LDL est directement responsable de l'augmentation du LDL cholestérol dans la circulation sanguine. Ce récepteur est présent sur l'ensemble des cellules de l'organisme, mais est plus fréquemment exprimé au niveau du foie. Ceci explique qu'environ deux tiers des LDL soient catabolisées au niveau hépatique.

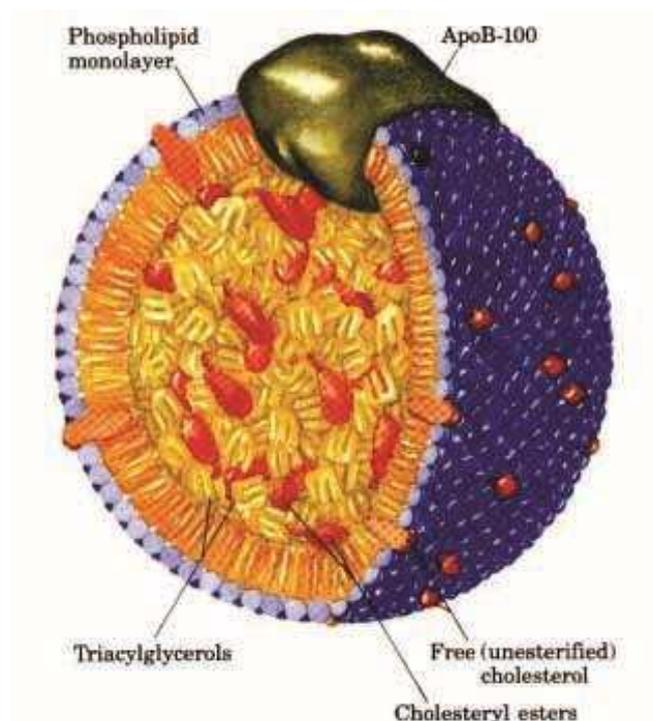


Figure 1. Particule de lipoprotéine de basse densité (LDL) (dans <http://www.bioinfo.org.cn/book/biochemistry/chapt20/675-1.jpg>).

Il existe plusieurs mutations du gène du R-LDL et deux formes de la maladie. La forme hétérozygote de l'hypercholestérolémie familiale se caractérise par l'élévation isolée des concentrations sériques du cholestérol transporté par les LDL (en moyenne

le double de la normale), pouvant se compliquer d'insuffisance coronarienne après 40 ans [9]. Sa prévalence avoisine 1 sujet sur 500, ce qui la place parmi les maladies monogéniques les plus fréquentes dans les pays développés [10]. Elle est responsable de la classique xanthomatose familiale tendineuse, caractérisée par la présence des xanthomes qui sont le plus souvent simples à mettre en évidence sur les tendons d'Achille ou sur les extenseurs de la main. De plus, une étude récente a montré que la présence de xanthomes était un puissant facteur prédictif du risque cardiovasculaire [11].

La deuxième forme de l'hypercholestérolémie familiale est la forme homozygote. Les mutations de classe 1 sont caractérisées par l'absence de récepteur détecté immunologiquement. La classe "allèle nul", définissant l'homozygote «récepteur nul», est par définition la plus grave. La fréquence de l'anomalie génétique est de $1/10^6$ individus [12]. Elle est caractérisée par une augmentation considérable du taux plasmatique du LDL-cholestérol et du cholestérol total (jusqu'à 16g/l). Les patients homozygotes développent une hyperlipidémie majeure accompagnée dans la grande majorité des cas par des dépôts de cholestérol sur l'endothélium des vaisseaux et en extravasculaire sous forme de xanthomes et xanthélasmas [13]. En l'absence de traitement, ces malades ont un important risque d'infarctus massif à un très jeune âge et leur décès survient souvent avant l'âge de 20 ans [14, 15]. L'identification précoce des ces malades est très importante car un traitement initié tôt réduit considérablement le risque cardiovasculaire [16].

1.1.2 Physiopathologie

Le métabolisme du cholestérol passe par plusieurs voies (**Figure 2**), et tout d'abord la voie exogène où les lipides alimentaires et ceux excrétés dans la bile sont captés par la paroi intestinale et véhiculés vers le foie sous forme de chylomicrons [17]. La voie endogène est la voie où le cholestérol fabriqué de novo par le foie est excrété (avec des triglycérides) par celui-ci sous forme de Very Low Density Lipoprotein (VLDL) [18] qui vont subir de nombreuses modifications dans le plasma pour aboutir à la formation

des LDL riches en cholestérol estérifié. Dans le cas de l'hypercholestérolémie, la demi-vie des particules LDL est allongée par diminution de leur captation du fait d'une diminution ou d'une absence des R-LDL. Les signes de l'hypercholestérolémie sont une oxydation et une augmentation du taux des LDL plasmatiques ainsi qu'une augmentation de la synthèse du cholestérol et de VLDL dans les hépatocytes en l'absence de régulation négative du cholestérol normalement internalisé par le récepteur. A long terme, le risque de pathologie cardiovasculaire est important. Des lésions athéromateuses se forment progressivement et conduisent à la thrombose.

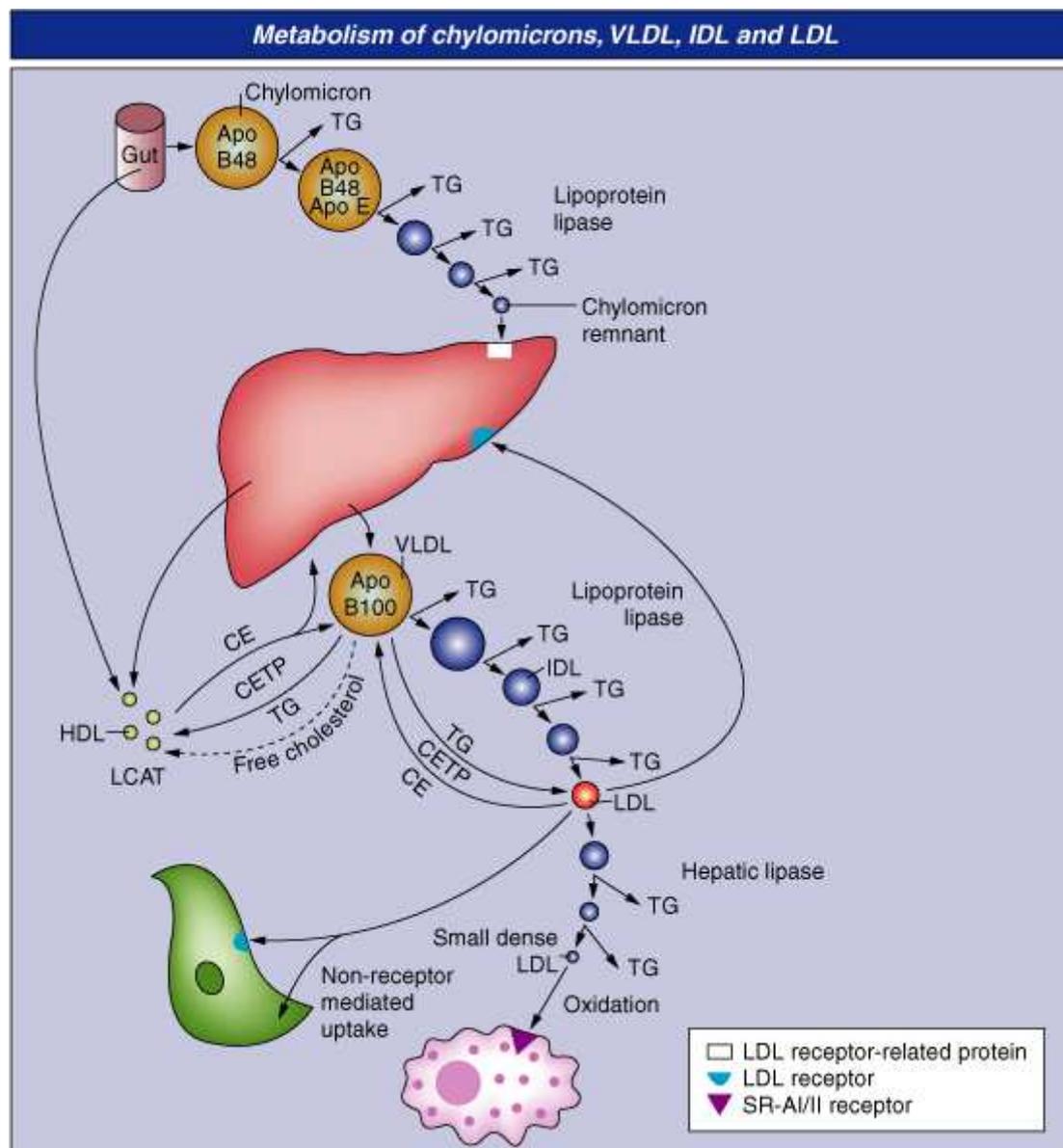


Figure 2. Métabolisme des chylomicrons, VLDL et LDL (dans Chylomicron metabolism, http://www.cmglinks.com:80/asa/lectures/Part_2/lecture/2.htm).

1.1.3 Les traitements actuels chez l'homme

Les traitements existants ont pour but de réduire le taux de LDL plasmatique. Malgré ces traitements, l'espérance de vie de malades hétérozygotes dépasse rarement la cinquième décennie [19]. Le régime associé au traitement médicamenteux peut réduire le taux plasmatique du cholestérol-LDL et le risque cardio-vasculaire des malades hétérozygotes possédant une quantité suffisante de R-LDL [20]. Il existe plusieurs agents pharmaceutiques permettant de réduire le taux du cholestérol plasmatique :

- La cholestyramine est une résine chélatrice des sels biliaires. Elle entraîne une baisse du LDL-cholestérol de l'ordre de 20% et a longtemps été le traitement de référence des sujets atteints de la forme familiale. Elle est actuellement moins utilisée et on lui préfère un traitement par statine qui a montré des effets thérapeutiques importants. Elle peut être prescrite en monothérapie en seconde intention suite à une intolérance aux statines ou en association avec d'autres hypolipémiants [15].

- Le colesevelam est une résine récemment développée dont l'efficacité est voisine de celle de la cholestyramine, mais dont la tolérance est nettement meilleure [21].

- Les dérivés des fibrates et l'acide nicotinique sont à exclure dans la forme homozygote de l'hypercholestérolémie familiale car leur efficacité sur la baisse du LDL-cholestérol ainsi que sur l'incidence des événements cardiovasculaires est réduite [15].

- L'acide nicotinique (Niaspan) entraîne une diminution de 20% du LDL cholestérol et en parallèle une augmentation de 20% du cholestérol-HDL [22]. L'utilisation de ce produit est actuellement limitée par une tolérance médiocre (flushs fréquents, même si les flushs ont tendance à se réduire avec une utilisation prolongée).

- Les statines sont clairement le traitement de référence des formes familiales [23]. Ce sont des inhibiteurs compétitifs de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl(HMG)-CoA réductase, l'enzyme clé de la voie de synthèse endogène du cholestérol par les hépatocytes [23]. L'inhibition de cette enzyme mène à une baisse de la concentration intracellulaire de cholestérol, ce qui a pour effet une surexpression du R-LDL, qui vient alors combler le déficit intracellulaire en cholestérol par du cholestérol plasmatique. La diminution de la synthèse endogène du cholestérol diminue aussi la

production hépatique de particules de VLDL limitant ainsi la cascade VLDL/LDL dès son origine. Cela entraîne une baisse du cholestérol-LDL plasmatique de l'ordre de 25 à 55% et une baisse significative des triglycérides [24-26]. La baisse du cholestérol amène une stabilisation et une régression des plaques d'athérosclérose. Les statines ont aussi des effets pléiotropes indépendants de la baisse de la cholestérolémie : des effets anti-inflammatoires, des effets anti-thrombotiques et une diminution de la prolifération des cellules musculaires lisses dans les artères [27]. Les statines sont généralement bien tolérées par les patients. Des effets indésirables sont présents dans moins de 1% des cas : constipation, diarrhée, dyspepsie, flatulences, nausées, céphalées, myalgies et asthénies [28]. Toutes les statines peuvent être utilisées, mais les niveaux élevés de LDL-cholestérol font que les deux statines les plus puissantes sont plus souvent privilégiées (atorvastatine et rosuvastatine) [29].

- L'ezetimibe (Ezetrol) est un médicament visant l'inhibition de l'absorption intestinale du cholestérol alimentaire et biliaire [30]. La baisse de l'absorption intestinale du cholestérol est environ 50% et elle est accompagnée par une hausse compensatoire de la synthèse du cholestérol. Ainsi, l'ezetimibe provoque une baisse d'environ 20% du cholestérol-LDL plasmatique [31]. Puisque l'ezetimibe reste au niveau de l'intestin sans passer en circulation, il peut être combiné à une statine sans occasionner de risque d'interaction médicamenteuse [32-34]. Cependant, son effet sur la réduction du risque de survenue de maladies cardiovasculaires reste discuté, les seules études retrouvant cette diminution ayant été faites en association avec une statine [35, 36]. Les effets secondaires observés chez les patients prenant de l'ezetimibe sont la fatigue, les céphalées, les douleurs abdominales, la constipation, la diarrhée et les myalgies.

- Le mipomersen est un oligonucléotide antisens dirigé contre le RNA de l'apolipoprotéine B en développement. Il inhibe la synthèse de l'apolipoprotéine B, et entraîne une baisse du LDL-cholestérol de plus de 20% [37, 38].

Chez les malades homozygotes, la LDL-aphérèse bimensuelle est le seul traitement possible. Elle constitue un traitement de choix pour les patients hétérozygotes chez qui les traitements pharmacologiques n'ont que peu d'effets. Ce traitement consiste en une

précipitation extracorporelle des particules LDL à l'aide d'héparine et en une filtration du précipitat obtenu. Cette technique permet une réduction du cholestérol-LDL de l'ordre 60% [39], mais reste très contraignante [40]. En pratique, le traitement conventionnel associant régime, statine, ezetimibe et LDL-aphérèse normalise le cholestérol chez environ la moitié des patients. L'option pour les autres est d'augmenter la fréquence des aphérèses à une séance par semaine. Toutefois cette augmentation génère un inconfort, un absentéisme scolaire ou au travail qui deviennent difficilement compatibles avec une vie normale [41].

Aujourd'hui, la transplantation hépatique orthotopique est le seul traitement qui permet de traiter les patients homozygotes, mais elle est limitée par la pénurie de greffons hépatiques et la nécessité d'une immunosuppression à vie. Pour faire face à cette pénurie d'organes, des protocoles de thérapie cellulaire ou génique ont été développés pour le traitement de l'hypercholestérolémie familiale, offrant une perspective qui permettrait de remplacer uniquement les cellules responsables du déficit enzymatique et de laisser intact le foie. La transplantation d'hépatocytes, soit par autogreffe de cellules génétiquement modifiées soit par allogreffe, aurait l'avantage d'être une procédure mieux tolérée que la transplantation hépatique orthotopique et de laisser en place le foie du receveur. Néanmoins, ces approches restent dans un contexte expérimental à ce jour [42].

1.1.4 Les modèles animaux de l'hypercholestérolémie familiale

Le modèle animal de l'hypercholestérolémie familiale le plus couramment utilisé est la souris *rldl*^{-/-} [43]. Ce sont des souris C57Bl/6 déficientes pour le gène du r-ldl qui, à la différence des patients atteints de la forme homozygote de la maladie, développent une hypercholestérolémie seulement lorsqu'elles sont soumises à un régime très riche en lipides pendant une longue durée. Ces dernières années, les souris *rldl*^{-/-} ont été utilisées dans des études *in vivo* de transduction d'hépatocytes par des vecteurs adénoviraux et adéno-associés [43-50].

Le seul vrai modèle animal de la maladie humaine est le lapin Watanabe (**Figure 3**), dont le gène r-ldl est muté [51, 52]. Ce modèle a permis d'évaluer un grand nombre d'approches thérapeutiques comme la thérapie génique ex vivo à l'aide des vecteurs rétroviraux [53, 54], la thérapie génique in vivo à l'aide de vecteurs adénoviraux [55-57], la thérapie génique in vivo à l'aide de vecteurs lentiviraux [58] ou encore la transplantation d'hépatocytes allogéniques après ligature portale partielle [59, 60] ou suite à des lésions d'ischémie-réperfusion [61].

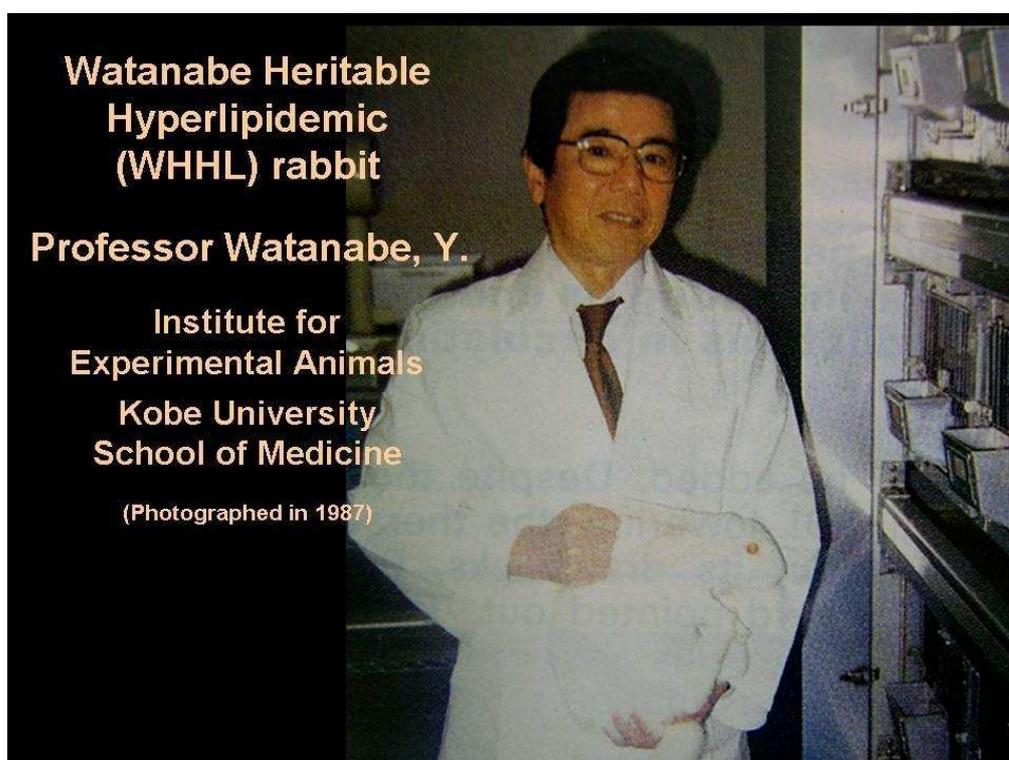


Figure 3. Professeur Yoshio Watanabe (1926-2008) avec le modèle animal de l'hypercholestérolémie familiale portant son nom (dans <http://www.med.kobe-u.ac.jp/iea/wol-1.html>).

1.2 Autres maladies métaboliques héréditaires du foie

1.2.1. Maladies métaboliques sans accumulation hépatique de métabolites

1.2.1.1 Maladie de Crigler-Najjar

La maladie de Crigler-Najjar est une maladie autosomique récessive très rare (incidence de $1/10^6$ naissances environ) liée à un déficit complet de l'activité hépatique de la bilirubine uridinediphosphate glucuronosyltransférase [62]. Elle se manifeste dès les premières heures de la vie par un ictère intense à bilirubine non conjuguée avec un risque précoce d'encéphalopathie grave [63]. L'examen clinique est normal mais les examens biologiques montrent une hyperbilirubinémie non conjuguée intense [64]. On distingue deux types de la maladie de Crigler-Najjar selon la réponse de l'hyperbilirubinémie non conjuguée au traitement inducteur par le phénobarbital [64, 65] : le type I, autosomique récessif, le plus sévère, ne répond pas au traitement, les enfants atteints doivent rester sous photothérapie 10 à 12 heures par jour jusqu'à une éventuelle transplantation hépatique, seul traitement curatif actuel de la maladie [66]. Dans le type II, autosomique récessif ou dominant, le phénobarbital permet une baisse de l'hyperbilirubinémie de 60% à 70%. Le diagnostic définitif repose sur la mise en évidence du déficit enzymatique au niveau hépatique (biopsie après l'âge de 3 mois) et concerne un groupe de protéines qui conjuguent la bilirubine [67]. Il y a une importante hétérogénéité génétique de la maladie [68-73]. L'absence d'activité de la bilirubine uridinediphosphate glucuronosyltransférase ne permet pas de conjuguer la bilirubine en bilirubine monoglucuronide ou bilirubine diglucuronide [74]. Les hépatocytes se surchargent donc en bilirubine et l'excrètent dans le sang. Des taux de bilirubine 10 à 12 fois supérieur à la normale sont observés dans le sérum des patients de type I et 3 à 4 fois pour les patients de type II [64].

Il existe un modèle animal de la maladie de Crigler-Najjar de type I, le rat Gunn [75, 76]. Des essais de thérapie génique ex vivo et in vivo ont eu lieu en utilisant des adénovirus [77-81], des rétrovirus [82-86], des lentivirus [87-91], des vecteurs inertes [92] ou encore des chimères ADN/ARN [93]. Quelques essais de thérapie cellulaire,

basés sur la transplantation d'hépatocytes, ainsi que plus récemment, des essais sur la transplantation d'hépatocytes fœtaux, ont été menés [94-97]. Enfin, des vecteurs lentiviraux codant la protéine manquante injectés via la veine porte des rats Gunn ont permis récemment la normalisation du taux de bilirubine à long terme chez ce modèle animal [91, 98].

1.2.1.2 Déficit en Ornithine Carbamyltransférase

Le déficit en ornithine carbamyltransférase (OTC) est un déficit enzymatique très fréquent transmis sur le mode récessif ou dominant lié au chromosome X avec une incidence d'une personne sur 30 000. Il s'agit d'une maladie due à une anomalie du cycle de l'urée. Ce cycle a principalement lieu dans le foie et son rôle est de transformer les dérivés azotés issus du métabolisme des protéines et des acides aminés en composés excrétables [99]. Cette maladie est due à une mutation dans le gène codant pour l'OTC, une enzyme mitochondriale du cycle de l'urée qui transforme l'ornithine et le carbamoylphosphate en citrulline [100]. Cette pathologie se manifeste dès la naissance pour le sexe masculin et pendant l'enfance pour le sexe féminin. Chez les filles, la gravité de la maladie dépend de l'inactivation du chromosome X muté. Chez les filles hétérozygotes, le déficit peut être asymptomatique ou conduire à une maladie de gravité variable allant du simple dégoût pour les protéines aux vomissements chroniques, retard de croissance, hypotonie, retard psychomoteur, accès de comas hyperammonémiques ou anomalies psychiatriques [101]. Le déficit enzymatique complet s'exprime toujours chez les garçons hémizygotés par un coma hyperammonémique néonatal très grave et souvent mortel [100]. L'accumulation d'ammoniaque, une neurotoxine affectant le système nerveux central provoque des troubles de la conscience et une hépatomégalie [102]. Le diagnostic repose sur l'hyperammonémie et sur la chromatographie des acides aminés montrant une hypocitrullinémie majeure associée à l'élévation de l'alanine, lysine et glutamine [103]. Il existe le plus souvent une excrétion élevée d'acide orotique au moment de l'accès au coma. La confirmation du diagnostic nécessite le dosage enzymatique sur biopsie hépatique ou intestinale. Les objectifs thérapeutiques sont de contrôler les symptômes et prévenir la neurotoxicité grâce à la transformation de l'azote en

composés excrétables [104]. Il est important de détecter la maladie par un diagnostic anténatal car le traitement de cette maladie est indispensable dès la naissance, et doit se poursuivre à vie [105]. Certaines formes sévères ont été traitées avec succès par la transplantation hépatique [106, 107] ou par transplantation initial d'hépatocytes combinée à une transplantation hépatique 6 mois après [108].

La thérapie génique a aussi été développée pour le traitement du déficit en OTC. Un modèle animal de la maladie, les souris *spf/ash* déficientes pour le gène de l'OTC, a permis de développer une approche de thérapie génique *in vivo* à l'aide de vecteurs rétroviraux [109, 110], adénoviraux [111-114], adéno-associés [115-118], mais aussi une approche de thérapie cellulaire basée sur la transplantation d'hépatocytes allogéniques [119]. Malheureusement, le décès d'un jeune homme pendant un essai clinique de thérapie génique pour le traitement du déficit en OTC suite à une injection adénovirale via l'artère hépatique droite a freiné considérablement le développement de cette approche chez l'Homme [120, 121].

1.2.2 Maladies métaboliques de « surcharge »

1.2.2.1 Déficit en α_1 -antitrypsine

Le déficit en α_1 -antitrypsine (A1AT), décrit pour la première fois en 1963, constitue l'une des maladies héréditaires récessives les plus fréquentes parmi les individus d'origine caucasienne [122, 123]. La fréquence de l'anomalie génétique est de 1/2000-5000 individus [124]. La α_1 -antitrypsine est une glycoprotéine sérique synthétisée et sécrétée en majorité par les hépatocytes [125, 126]. Son gène codant est localisé sur le chromosome 14 [127]. Ce gène est polymorphe et ses allèles ont été classés en normaux (M), déficients (Z, S) et nuls [128]. Les personnes de phénotype nul-nul, Z-nul ou ZZ risquent de développer la maladie [129]. La principale fonction de cette protéine est d'inhiber l'élastase libérée par les polynucléaires neutrophiles, particulièrement lors d'épisodes inflammatoires ou infectieux. Chez le sujet sain, le poumon est protégé de l'action de l'élastase des polynucléaires neutrophiles par la

présence en quantité importante d'A1AT dont la concentration sérique est comprise entre 0,9 et 2 g/l. Chez les sujets présentant un déficit en A1AT (concentration sérique < 0,8 g/l), le déséquilibre entre les concentrations locales d'élastase et d'A1AT aboutit à la dégradation de la structure pulmonaire et au développement d'un emphysème même chez les non-fumeurs [130, 131]. C'est donc comme une cause d'emphysème pulmonaire précoce chez l'adulte, que cette maladie a été initialement décrite [132]. La concentration plasmatique de l'A1AT est déterminée par les 2 allèles du gène codant pour la protéine. Les variantes de déficits en A1AT peuvent être classées en 3 catégories : i) normaux : caractérisés par des concentrations sériques d'A1AT normales (0.9 à 2 g/l) ; ii) déficitaires : concentrations d' α_1 -antitrypsine < 0.8 g/l ; iii) nul : pas d'A1AT détectée dans le sang. L'atteinte hépatique est avant tout observée chez les sujets homozygotes et a été mise en évidence chez l'enfant [133]. Au niveau moléculaire, ce phénotype correspond à une mutation ponctuelle substituant une lysine à une glutamine en position 342 [134, 135] dans le gène codant pour l'A1AT. Cette substitution entraîne une modification du repliement de la protéine et de son stockage dans le réticulum endoplasmique. L'accumulation de l'A1AT dans le réticulum endoplasmique provoquerait la formation d'agrégats. Les agrégats seraient ensuite détruits par la machinerie autophagique provoquant ainsi des lésions du réticulum endoplasmique [136].

L'atteinte hépatique est caractérisée par une cholestase ou des anomalies du bilan hépatique en période néonatale [123], présentes dans 43% des individus ZZ [137]. Un déficit en α_1 -antitrypsine peut également se traduire chez l'enfant et l'adulte par une cirrhose ou une insuffisance hépatique [138]. L'évolution vers la cirrhose qui peut nécessiter une transplantation hépatique est peu fréquente (environ 3%). Mais la cirrhose touche environ 13% des patients ayant un bilan hépatique perturbé [139-145]. La prédisposition au cancer liée au déficit en lui même reste controversée. Certaines études ont estimé le risque de cancer du foie à 20% alors que d'autres ne décrivent aucun hépatocarcinome chez une quarantaine de malades homozygotes [145-150].

Pour rendre la fonction pulmonaire optimale, des médicaments beta-adrénergiques et anticholinergiques à courte durée d'action sont administrés [129]. Les inhalateurs-

doseurs constituent la forme d'administration la plus privilégiée. Les corticoïdes par voie orale sont réservés aux crises aiguës accompagnées de toux et d'expectorations et sont limités à des traitements de courte durée d'une à deux semaines. Pour toutes les crises avec expectorations purulentes, une antibiothérapie d'instauration précoce est recommandée. Un traitement agressif des infections peut aider à diminuer la formation de toute atteinte pulmonaire supplémentaire due à un afflux de granulocytes neutrophiles au sein des alvéoles.

Un modèle de souris transgénique pour la protéine A1AT humaine a montré que les animaux atteints ne développaient pas de cirrhose mais pouvaient présenter un carcinome hépatocellulaire (CHC) [151, 152]. Ce modèle n'a été que peu utilisé dans une optique de correction métabolique. Il a servi à mettre au point des protocoles de thérapie cellulaire et génique [153-157].

1.2.2.2 Maladie de Wilson

La maladie de Wilson, ou dégénérescence hépatolenticulaire progressive, est une affection génétique, autosomique récessive, caractérisée par une accumulation toxique de cuivre dans l'organisme, essentiellement dans le foie et le système nerveux central [158]. Cette maladie a été décrite pour la première fois par le Dr Samuel Alexander Kinnier Wilson en 1912 [159]. Depuis, plusieurs études ont été effectuées révélant les anomalies génétiques et les défauts biochimiques associés à cette maladie [160-163]. C'est une maladie rare, avec une incidence d'environ 1 individu sur 30 000 en France. Elle est due à des mutations du gène de l'ATPase de type P (chromosome 13) permettant l'élimination du cuivre dans la bile [164]. Ce déficit entraîne une diminution de l'excrétion biliaire de cuivre, une diminution de la synthèse de la céruléoplasmine, une protéine qui permet le transport du cuivre dans le sang circulant, ainsi qu'une surcharge hépatocytaire en cuivre [165-167]. Les manifestations hépatiques peuvent être précoces (dès l'âge de 5 ans) et débutent par une hépatomégalie ou une élévation des transaminases. Si le traitement adéquat n'est pas entrepris, l'atteinte hépatique peut évoluer selon quatre modalités : une hépatite aiguë,

une hépatite fulminante, une hépatite chronique active ou encore une cirrhose [168]. La cirrhose survient plus tardivement. Elle est pratiquement constante chez les sujets ayant des manifestations neurologiques. Les trois principaux tableaux neurologiques, souvent associés entre eux, sont un syndrome dystonique généralisé ou focal avec parfois des mouvements choréiques, un tremblement intentionnel et d'attitude parfois associé à une ataxie et un syndrome parkinsonien [169]. Chez les patients adultes, des symptômes neuropsychiatriques, comme des syndromes dépressifs, affection bipolaire et dysthymie peuvent apparaître par dépôt du métal dans le système nerveux central [170]. Des troubles hématologiques (anémie hémolytique), des manifestations rénales (lithiases, tubulopathies), osteoarticulaires (ostéomalacie, ostéoporose, arthropathies), cardiaques (arythmies et cardiomyopathies), endocriniennes (troubles de la glycorégulation, dysménorrhées) et la présence de l'anneau péricornean de Kayser-Fleischer au niveau oculaire peuvent faire partie de la symptomatologie de la maladie [169, 171-175].

Le traitement doit être initié le plus rapidement possible. Les apports en cuivre doivent être restreints en privilégiant des aliments pauvres en cuivre [171]. Mais le régime en lui même n'est pas suffisant. Le traitement médicamenteux de référence depuis 2005 est essentiellement la D-pénicillamine (Trolovol) qui se combine avec le cuivre ionique et permet son excrétion urinaire [176]. Le triéthylène tétramine dihydrochloride (Trientine) a aussi des propriétés chélatrices du cuivre, en augmentant son excrétion urinaire et en diminuant son absorption intestinal [177]. En cas d'hépatite fulminante ou cirrhose décompensée, la transplantation reste le seul traitement [178-180]. La survie post-transplantation est très bonne, avec un taux de survie d'environ 80% à 5 ans et aucune récurrence de la maladie n'a été observée chez ces patients après transplantation. Les cas de CHC ou cholangiocarcinome dans la maladie de Wilson sont rares par rapport aux cas de cirrhose. Une dizaine de cas ont été publiés [181-183]. Ces tumeurs sont survenues après un retour à la normale du taux de cuivre suite à un traitement des patients par des agents chélateurs d'ions [183]. Le cuivre semble donc avoir un rôle protecteur qui a par ailleurs été mis en évidence au cours de la carcinogénèse chimique chez le rat [184]. Les patients sont donc confrontés

à deux problèmes : la maladie caractérisée par un surplus de cuivre dans le foie provoque à long terme une hépatite fulminante mais son traitement semble entraîner le développement de CHC.

Trois modèles de la maladie sont disponibles chez le rat. Ils présentent des mutations ou des délétions du gène responsable de la maladie [185-187]. Les symptômes induits concernent tous une homéostasie anormale du cuivre hépatique sans atteindre le stade de cirrhose ou de neurodégénérescence comme chez l'Homme. Chez le rat Long Evans Cinnamon, des approches de transplantation d'hépatocytes syngéniques ont été développées en vue de corrections métaboliques [188-190].

1.2.2.3 Hémochromatose primitive

L'hémochromatose idiopathique est une affection génétique (transmission autosomale récessive) due à une anomalie congénitale et héréditaire du métabolisme du fer qui provoque une surcharge en fer des différents organes (le foie en particulier) avec réaction scléreuse [191]. Le gène responsable de la maladie est situé sur le bras court du chromosome 6 au voisinage du locus A du système HLA. La mutation la plus fréquente correspond à la substitution d'une cystéine par une tyrosine (C282Y) [192]. Cette molécule atypique semble former un hétérodimère avec la β 2-microglobuline [193, 194] qui présente une haute affinité pour le récepteur de la transferrine [195, 196]. Ce complexe diminue l'affinité du récepteur pour la transferrine qui transporte le fer dans le sang [197] et aboutit à une accumulation de fer dans les hépatocytes ainsi que dans d'autres cellules. Il existe cliniquement une atteinte hépatique, cutanée (pigmentation), pancréatique (diabète insulino-dépendant), cardiaque ou endocrinienne, et plus rarement articulaire (arthropathies) [191].

Chez des patients suivis pendant une dizaine d'années, la fréquence d'apparition de CHC a été estimée à 10% [198]. Le délai entre le diagnostic d'hémochromatose et celui de la tumeur variait de 5 à 14 ans [199]. Le rôle de la surcharge en fer est controversé puisque les cancers du foie sont exceptionnels au cours des surcharges en

fer secondaires aux hémolyses chroniques, comme la thalassémie ou la sphérocytose [200]. Cependant, le rôle direct du fer est suggéré par l'observation de tumeurs en l'absence de cirrhose et par la mise en évidence d'une surcharge en fer plus importante chez les patients présentant un CHC [201-203]. Il existe plusieurs modèles d'animaux de l'hémochromatose primitive qui nous ont permis de mieux comprendre cette maladie et développer des protocoles expérimentales pour son éventuel traitement [204, 205].

Plus le diagnostic sera précoce, plus le traitement sera efficace [206]. Une alimentation équilibrée, sans réduire les apports en fer mais sans supplémentation en fer et en évitant l'alcool qui peut aggraver les lésions du foie, permet de limiter les complications [207]. La saignée est actuellement le seul moyen efficace qui permet aux patients d'éviter les complications de l'hémochromatose [191]. Elle consiste à faire un prélèvement de sang de 400 ml chez la femme et de 500ml chez l'homme. La saignée est pratiquée chaque semaine jusqu'à la normalisation du taux de ferritine et de fer : c'est le traitement d'attaque. La fréquence des ponctions est ensuite espacée à chaque mois, voire trimestrielle puis maintenue à vie. Dans certains cas, on utilise un traitement par chélateur du fer, administré par voie intraveineuse. De travaux concernant l'hepcidine, un peptide jouant sur la régulation négative de l'absorption du fer, ouvrent des possibilités pour développer des traitements à base d'agents efficaces sur le maintien de l'homéostasie de l'absorption de fer [208-211].

1.2.2.4 Tyrosinémie de type I

La tyrosinémie de type 1 est une maladie génétique liée à un déficit enzymatique de la cascade du catabolisme de la tyrosine. C'est une maladie métabolique rare de transmission autosomique récessive. Son incidence est de 1/100.000 personnes. Elle est caractérisée par une atteinte rénale et hépatique et doit son nom à l'accumulation dans le foie de la tyrosine et de ses dérivés [212]. Le déficit enzymatique de la fumarylacétoacétate hydrolase (FAH) entraîne une accumulation de composés toxiques résultant du métabolisme de la tyrosine comme la succinylacétone. On en

distingue une forme aiguë à début précoce entre 15 jours et 3 mois après la naissance où l'insuffisance hépatocellulaire avec ictère, œdème, ascite, hémorragie, domine le tableau et aboutit rapidement au décès en l'absence de traitement et même parfois malgré lui. Dans la forme chronique, le début est plus tardif, l'évolution plus indolente. La cirrhose nodulaire, la tubulopathie, le rachitisme vitamino-résistant, le défaut de croissance, l'hypoglycémie et l'hypokaliémie sont les signes principaux. Le décès survient généralement avant l'âge de 5 ans, souvent à l'occasion d'une infection ou de la constitution d'un hépatome. Le diagnostic de cette maladie métabolique rare repose sur le dosage de l'activité de FAH dans les fibroblastes et sur la présence de succinylacétone dans les urines. Ces deux examens permettent un diagnostic anténatal. La survenue d'un CHC est possible dans l'évolution. Un CHC a été découvert chez 35 à 71% des enfants atteints de cette maladie et ayant bénéficié d'une transplantation hépatique [213, 214]. Le seul traitement actuel est le NTBC (2-(2nitro-4-trifluorométhylbenzoyl)-1,3-cyclohexanédione) associé à un régime pauvre en phénylalanine et tyrosine. Le NTBC est un inhibiteur du catabolisme de la tyrosine en amont de la FAH, qui permet de retarder l'indication d'une transplantation [215-217]. Dans un modèle murin de la maladie le traitement par le NTBC n'a pas prévenu l'apparition d'un CHC [218]. La transplantation hépatique reste le seul traitement lorsqu'une tumeur hépatique est déjà présente au moment du diagnostic, dans les cas compliqués d'hépatite fulminante ou dans les cas d'hépatopathie chronique répondant pas au traitement par NTBC [219].

Pour mieux comprendre les mécanismes de cette maladie et mettre au point des stratégies thérapeutiques, deux modèles animaux ont pu être développés [220-222]. Le premier a consisté à introduire l'ADNc de la FAH chez une souris mutante porteuse d'une délétion de 4 Mb sur le chromosome 7 (souris albinos létale). Le caractère létal de la mutation étant dû au déficit en FAH, l'introduction du transgène permet la survie des souris [223, 224]. Une des lignées obtenues avait un niveau d'expression de la FAH d'environ 4%, comparable à celui des malades tyrosinémiques et peut de ce fait constituer un bon modèle. Le second modèle a été obtenu par l'invalidation du gène de la FAH. Cette invalidation à l'état homozygote est létale mais le traitement par le NTBC a permis d'obtenir des souris homozygotes viables. Environ 50% de ces souris

développent un CHC. Ce modèle devrait permettre d'étudier l'apparition et les mécanismes de la carcinogenèse [223]. Il a déjà permis d'établir des protocoles de thérapie génique ex vivo et in vivo [62, 212, 225-228] et a été le premier modèle à permettre l'étude du repeuplement hépatique après transplantation d'hépatocytes syngéniques et l'étude de la transdifférenciation de cellules hématopoïétiques [229].

CONCLUSIONS

Les maladies métaboliques héréditaires hépatiques sont donc réparties en maladies génétiques entraînant ou non une accumulation de métabolites anormaux dans le foie. Dans le premier cas, l'utilisation en clinique de la transplantation d'hépatocytes ne paraît pas intéressante en raison d'un risque d'atteinte de novo du foie repeuplé. En revanche, dans le deuxième cas, les MMHH liées à un trouble de la fonction hépatocytaire sans accumulation, la transplantation d'hépatocytes isolés (génétiquement modifiés ou non) présente un véritable intérêt clinique. L'hypercholestérolémie familiale, la maladie de Crigler-Najjar et le déficit en OTC sont donc les cibles potentielles de ce traitement. Le remplacement d'un pourcentage restreint d'hépatocytes déficients par les hépatocytes normaux pourrait rétablir durablement la fonction métabolique. Plusieurs études expérimentales et quelques essais cliniques ont été réalisés pour le traitement de ces maladies et seront détaillés dans les chapitres suivants.

CHAPITRE II

APPROCHES THERAPEUTIQUES DES

MALADIES METABOLIQUES

HEREDITAIRES DU FOIE

2.1 La transplantation hépatique

Le foie est le seul organe ayant une capacité de régénération. Il est possible aujourd'hui de réaliser une transplantation hépatique à partir d'un greffon partiel prélevé chez un donneur vivant, appartenant à la famille proche du receveur. Cependant, le plus fréquemment, le greffon provient d'un donneur déclaré en état de mort encéphalique. La transplantation hépatique orthotopique s'est largement développée durant ces dernières années et des progrès ont été réalisés dans la technique de transplantation, la connaissance et la prise en charge de la récurrence de la maladie initiale sur le greffon, les traitements immunosuppresseurs et antiviraux et la meilleure maîtrise de l'immunosuppression.

Depuis la première transplantation hépatique orthotopique réalisée en 1963 par l'équipe de Thomas Starzl (**Figure 4**) à Denver, Colorado chez un enfant de 3 ans souffrant d'une insuffisance hépatique terminale suite à une atresie biliaire [230], cette technique s'est largement diffusée et aujourd'hui plus de 7000 transplantations hépatiques sont réalisées annuellement dans le monde.

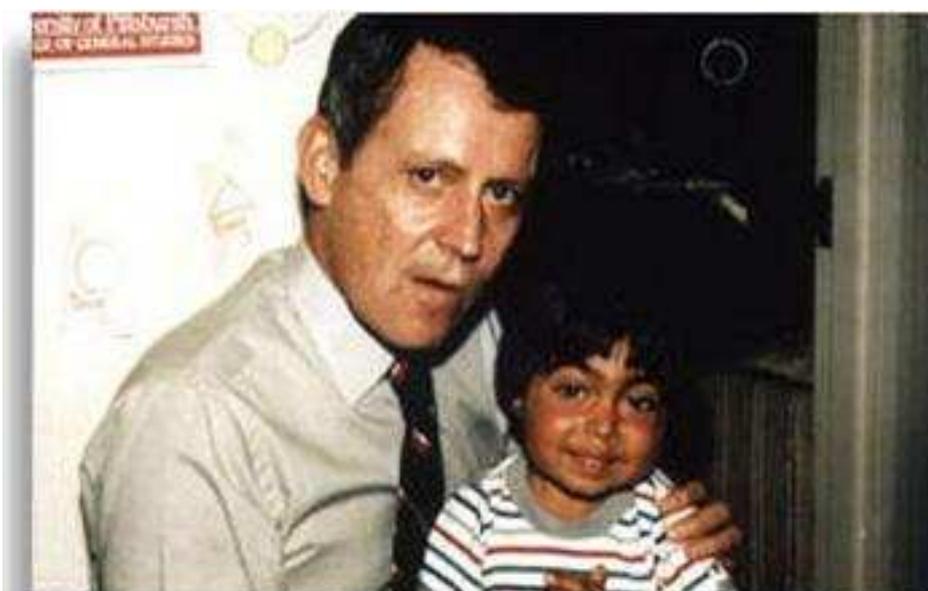


Figure 4. Professeur Thomas E. Starzl avant la première transplantation hépatique chez l'Homme en 1963 (dans <http://www.transplantations.com/Historique/historique.htm>).

En France, jusqu'au 31 décembre 2010, l'activité cumulée de greffe hépatique était de 18 591, dont 423 greffes réalisées à partir de donneurs vivants apparentés depuis 1998. En même temps, le nombre estimé de malades porteurs d'un greffon fonctionnel au 31 décembre 2010 était de 9 844 [231]. Mille quatre vingt-douze greffes hépatiques ont été réalisées en France en 2010 contre 1047 en 2009, 1011 en 2008, 1061 en 2007, 1037 en 2006 et 1024 en 2005 (**Figure 5**). Le nombre de patients nouvellement inscrits en attente d'une greffe de foie en 2010 a augmenté (1579 inscriptions contre 1466 en 2009, 1372 en 2008 et 1346 en 2007) (**Tableau 1**).

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Liste d'attente							
Malades restant en attente au 1 ^{er} janvier de chaque année	474	486	540	574	669	806	932
Nouveaux inscrits dans l'année	1219	1300	1346	1372	1466	1579	
Décédés dans l'année	63	123	116	107	136	169	
% de décès parmi les inscrits*	3,7%	6,9%	6,2%	5,5%	6,4%	7,1%	
Sortis de la liste d'attente	120	86	135	159	146	192	
<i>dont sortis de la liste d'attente pour aggravation</i>	49	31	51	85	81	112	
Greffes	1024	1037	1061	1011	1047	1092	
<i>dont greffes avec donneur vivant apparentés</i>	49	36	18	10	12	17	
<i>dont greffes avec donneur décédé après arrêt cardiaque</i>						3	
Greffes (pmh)	16,6	16,7	16,8	15,9	16,4	16,9	

* receveurs en attente au 1^{er} janvier de l'année en cours + nouveaux inscrits
pmh : par million d'habitant

Tableau 1. Evolution de la liste d'attente et devenir des candidats en greffe hépatique (d'après le site de l'Agence de Biomédecine 2012 [231]).

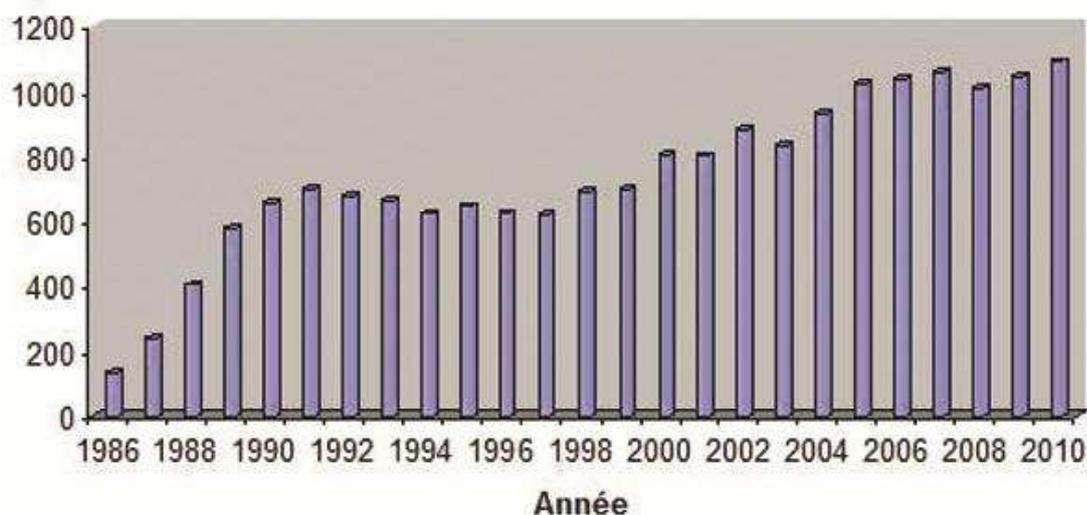


Figure 5. Evolution du nombre de greffes hépatiques en France après 1986.

La progression du taux de nouveaux inscrits par million habitants enregistrés a atteint un niveau record de 7,7% en un an et de 29,5% en 5 ans alors que la hausse de ce taux n'atteignait pas les 2% en 2007 et 2008. La tendance évolutive s'exprime à la fois au travers : (1) du nombre de patients en attente de greffe en début d'année (806 début 2010), auquel s'ajoute (2) le nombre de nouveaux inscrits au cours de l'année (1579 en 2010) pour former (3) un total de candidats (2385 pour l'année 2010) (**Tableau 1**). On observe depuis plusieurs années une augmentation des nouvelles inscriptions en liste nationale d'attente (**Figure 6**).

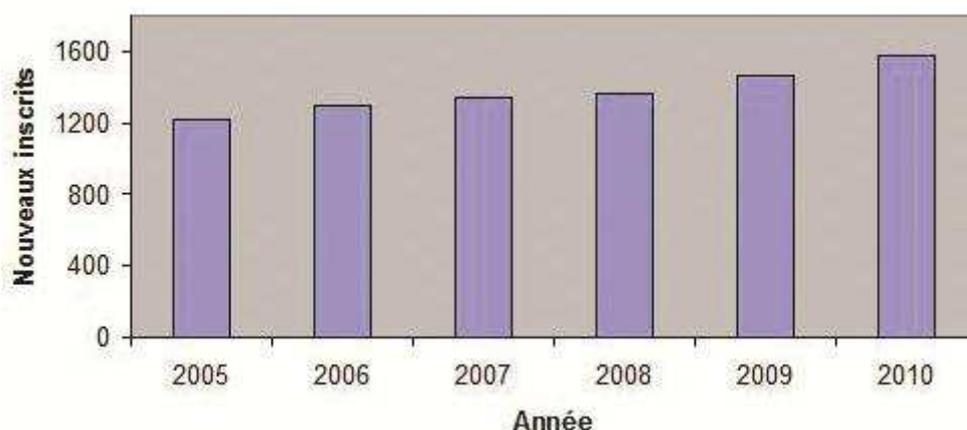


Figure 6. Nombre des nouvelles inscriptions en liste nationale d'attente en France entre 2005 et 2010.

Au 1^{er} janvier 2010, 806 patients restaient en attente d'une greffe de foie (**Tableau 1**). A ces patients en attente se sont donc ajoutées au cours de l'année 2010, les 1579 nouvelles inscriptions. Au total, on dénombrait ainsi 2385 candidatures à la greffe hépatique pour 2010 [231].

Parmi les 1092 greffes hépatiques réalisées en 2010, on en dénombre 75 (6,8%) chez des enfants de moins de 16 ans, dont 9 seulement à partir de donneurs vivants apparentés. L'indication de la transplantation était une maladie métabolique chez 26 malades (2,4%) inscrits en 2010 contre 42 malades (4,1%) en 2005 [231].

Estimée sur l'ensemble de la cohorte des malades inscrits entre 2007 et 2010 à l'exclusion des malades inscrits en super urgence et des greffes issues de donneurs vivants apparentés, la durée médiane de séjour en liste d'attente avant greffe hépatique a augmenté significativement par rapport à la période 2003-2006 (4,7 mois contre 3,6 mois) (**Figure 7**). Plus de 100 malades décèdent chaque année en attente de greffe. En 2010, 281 malades sont sortis de la liste d'attente : 169 à cause d'un décès et 112 à cause d'une aggravation de la maladie (**Tableau 2**).

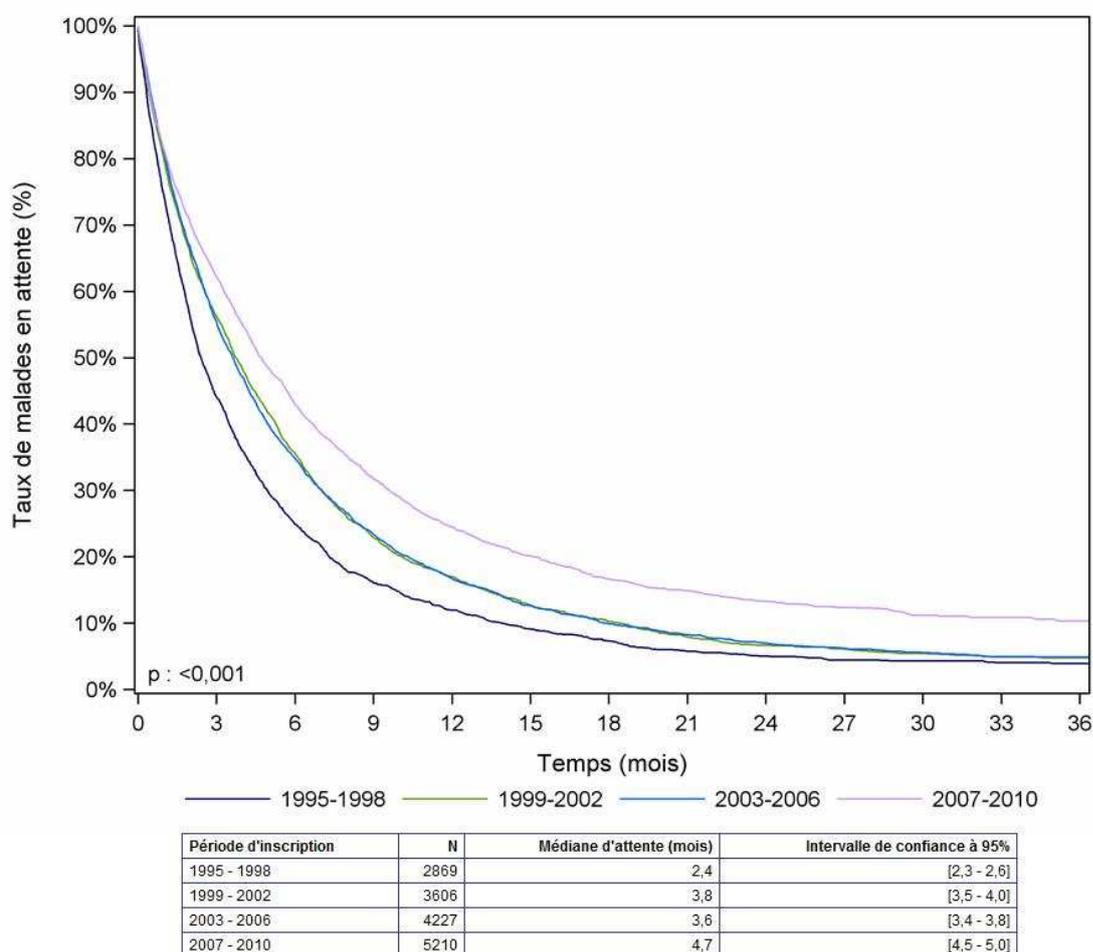


Figure 7. Durée d'attente avant greffe hépatique selon la période d'inscription (*d'après le site de l'Agence de Biomédecine 2012 [231]*).

	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Evolution sur le nombre de décès uniquement						
Nombre total de décès	63	123	116	107	136	169
Pourcentage de décès parmi les inscrits*	3,7%	6,9%	6,2%	5,5%	6,4%	7,1%
Décès parmi les nouveaux inscrits	38	95	82	90	97	121
Pourcentage de décès parmi les nouveaux inscrits	3,1%	7,3%	6,1%	6,6%	6,6%	7,7%
Taux d'incidence (nombre de décès pour 1 000 patients x année)	135,8	228,2	213,8	171,8	184,2	194,0
Evolution sur le nombre de décès et les sorties de liste pour aggravation						
Nombre total de décès ou aggravation	112	154	167	192	217	281
Pourcentage de décès ou aggravation parmi les inscrits*	6,6%	8,6%	8,9%	9,9%	10,2%	11,8%
Décès ou aggravation parmi les nouveaux inscrits	63	112	109	133	135	168
Pourcentage de décès ou aggravation parmi les nouveaux inscrits	5,2%	8,6%	8,1%	9,7%	9,2%	10,6%
Taux d'incidence (DC + AG)	241,4	285,7	307,7	308,2	293,9	322,5

*receveurs en attente au 1er janvier de l'année + nouveaux inscrits.

Tableau 2. Nombre des décès et des sorties pour aggravation de la maladie avant greffe sur la liste d'attente depuis 2005 chez les malades en attente d'une greffe hépatique (*d'après le site de l'Agence de Biomédecine 2012 [231]*).

Le partage hépatique permet une augmentation du nombre de greffons disponibles. Ainsi, le partage entre équipes adultes et pédiatriques est devenu une pratique régulière. Les greffons droits destinés aux adultes donnent des résultats comparables à ceux des greffons entiers. Le nombre de greffes réalisées à partir de foies partagés en 2010 était de 80, dont 33 chez des enfants, nombre nettement diminué par rapport à 2007 et 2008. Enfin, le nombre de greffons issus de donneurs vivants est en baisse depuis 2005, avec seulement 17 transplantations hépatiques par donneurs vivants effectuées en 2010, dont 9 chez des enfants de moins de 16 ans (**Figure 8**). Ceci est probablement due aux risque chirurgical minime mais non nul chez le donneur (0,5% de mortalité et près de 10% de morbidité).

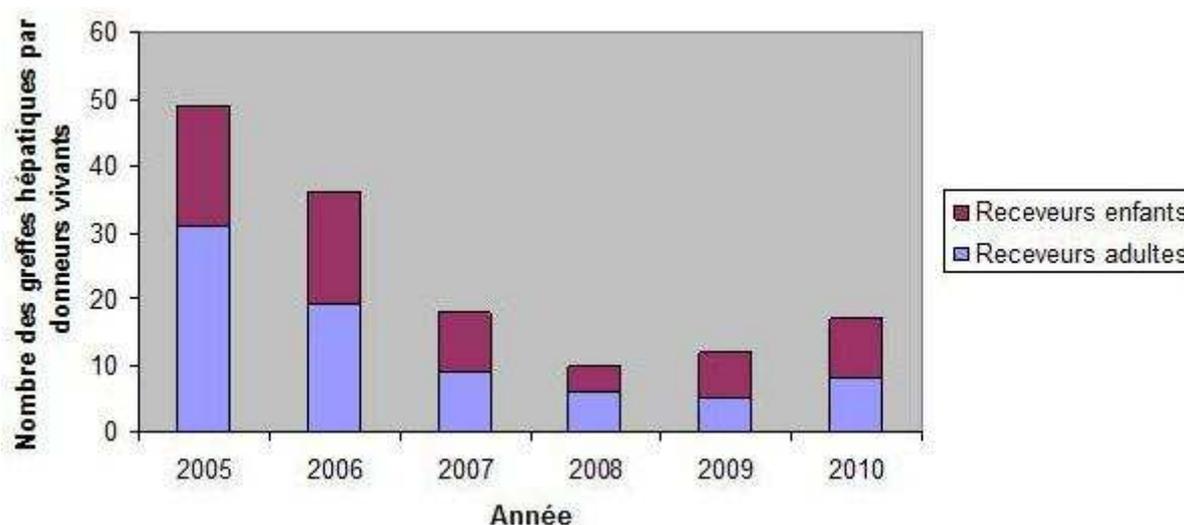


Figure 8. Nombre des greffes avec donneur vivant en France entre 2005 et 2010.

Au total, ces données laissent penser que la couverture des besoins est incomplète malgré le recours aux techniques de partage hépatique et de donneurs vivants. Le contexte global de la greffe hépatique est donc celui d'une pénurie de greffons qui s'est accentuée, avec des besoins qui sont supérieurs aux possibilités de greffe du fait de l'augmentation du nombre total de candidats. Les 1 092 greffons disponibles en 2010 n'ont couvert les besoins que de 45,8% des 2 385 candidats à la greffe (contre 60,5% en 2005, 52,0% en 2008 et 49,0% en 2009), soit 2,2 candidats pour un greffon utilisable dans l'année (contre 1,7 en 2005).

Globalement, la survie du receveur après une greffe hépatique réalisée entre 1993 et 2009 est de 92,6% à un mois, 83,8% à un an, de 72,3% à cinq ans et 62,3% à dix ans (**Figure 9**). L'analyse univariée de la survie montre une amélioration significative des résultats selon les cohortes de malades greffés ($p < 0,001$) avec une survie à 1 mois et à un an significativement meilleure pour la cohorte 2005-2009 par rapport à celle de 1995-1999 (**Figure 10**). Elle montre aussi une différence significative dans les résultats selon l'indication, l'âge du receveur et le degré d'urgence ($p < 0,001$). La survie après retransplantation est significativement meilleure s'il s'agit d'une retransplantation tardive (plus de 3 mois après la greffe initiale).

A la pénurie de greffons et la mortalité liée à la transplantation s'ajoutent les effets secondaires et les complications de l'exposition prolongée au traitement immunosuppresseur ainsi que le risque d'insuffisance rénale ou d'hypertension artérielle [232]. S'ajoutent aussi le risque de tumeurs de novo, initialement sous-estimé et particulièrement élevé après transplantation pour cirrhose alcoolique [233, 234].

De plus, la transplantation hépatique n'est pas accessible dans de nombreux pays pour des raisons économiques ou culturelles [235]. En effet, le coût de la transplantation hépatique reste très élevé dépassant les 150000 € par malade [236]. Cette thérapie reste donc chère, grevée d'importants effets secondaires et limitée par une pénurie de greffons.

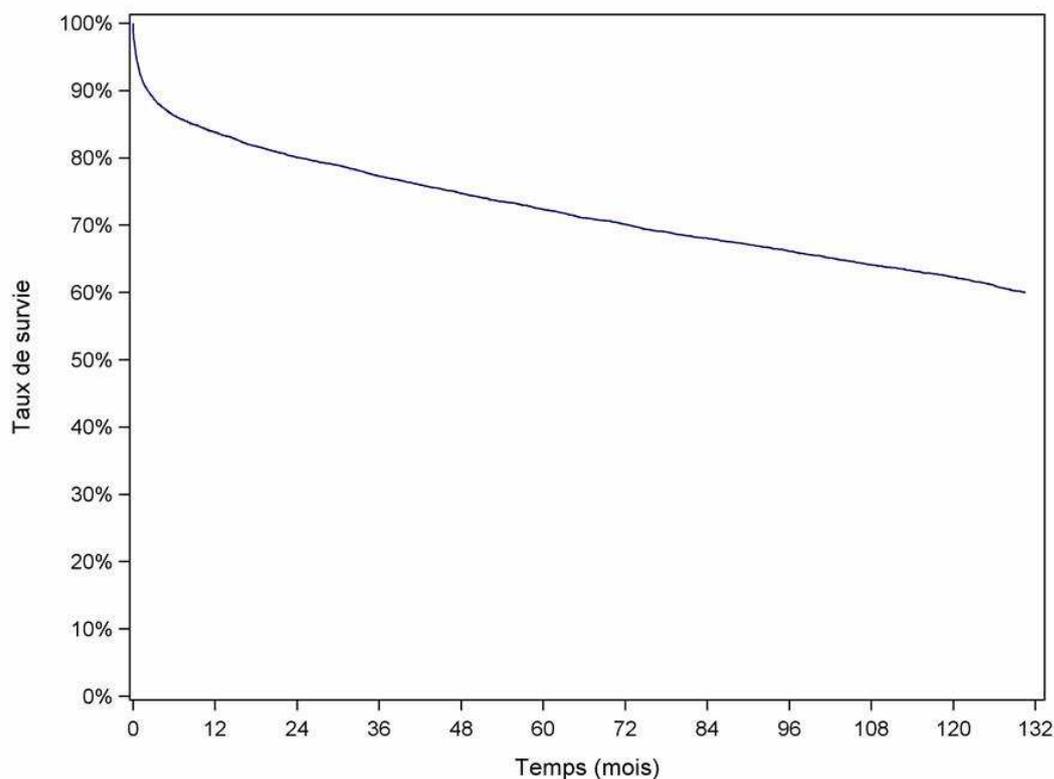


Figure 9. Survie globale du receveur après greffe hépatique (1993-2009) (d'après le site de l'Agence de Biomédecine 2012 [231]).

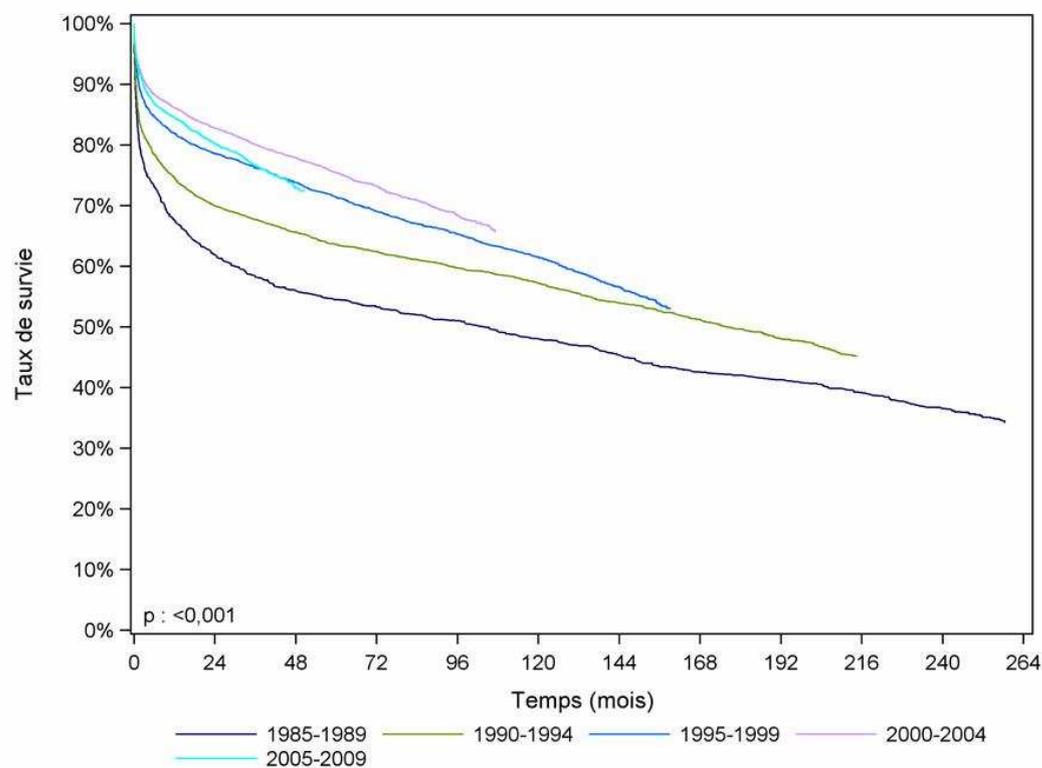


Figure 10. Courbe de survie du receveur hépatique selon la période de greffe (d'après le site de l'Agence de Biomédecine 2012 [231]).

2.2 La xénogreffe

La xénogreffe ou xénotransplantation, transplantation d'organes ou des tissus entre espèces différentes, est depuis peu à nouveau envisagée pour suppléer la pénurie de greffons humains, malgré des contraintes immunologiques, physiologiques, infectieuses et éthiques. Quand un organe animal est transplanté chez un Homme, un rejet suraigu se développe très rapidement. Actuellement, ce rejet peut être facilement maîtrisé, mais le retour ou la persistance des anticorps conduit à l'apparition d'un rejet vasculaire de la xénogreffe au bout de plusieurs jours à plusieurs semaines. Ce rejet constitue actuellement le principal obstacle à une xénotransplantation clinique [237].

Les deux cas de xénotransplantation hépatique clinique avec des greffons de babouin réalisés à Pittsburgh par l'équipe de Thomas Starzl [238, 239] ainsi que celui avec un greffon de porc réalisé par Makowka et al à Los Angeles [240] ont montré que des progrès indiscutables avaient été accomplis par rapport aux expériences initiales. Toutefois, ces cas isolés, soldés au final par des échecs, n'ont pas pu occulter les obstacles majeurs associés à cette approche. Ces résultats ont montré que le risque de rejet immunologique de ces xénogreffes est loin d'être contrôlé. En plus, le risque lié à la transmission à l'Homme d'agents pathogènes d'origine animale, ou zoonose, constitue un des obstacles principaux auquel se heurte la xénotransplantation [241-243]. Malgré ces incertitudes, une transplantation d'hépatocytes de porc a eu lieu aux Etats Unis. L'équipe de Fox a transplanté $1,6 \times 10^9$ hépatocytes de porc en intra-splénique chez un malade de 56 ans qui est décédé d'une complication septique (I Fox, communication orale, Freiburg, novembre 2003).

Aujourd'hui, le porc (**Figure 11**) pourrait devenir une source importante des tissus ou des cellules, mais il faudra toujours surpasser les problèmes immunologiques associés à la xénotransplantation [244]. La transplantation d'organes provenant de porcs génétiquement modifiés chez des primates n'est pas limitée par la réponse immunitaire ou cellulaire mais par d'autres problèmes, comme le développement d'une microangiopathie thrombotique du greffon ou la coagulation intravasculaire disséminée [245-248]. Pour résoudre ces problèmes, des porcs exprimant un ou

plusieurs gènes humains thromborégulateurs ou anti-inflammatoires sont en cours de développement [244]. Les résultats précliniques de la transplantation des cellules porcines, comme les îlots de Langerhans ou les hépatocytes, sont nettement plus encourageants que la transplantation d'organes, avec une survie supérieure de un an dans tous les cas [249, 250]. En plus, le risque de transfert d'un microorganisme infectieux au receveur est minime [251].

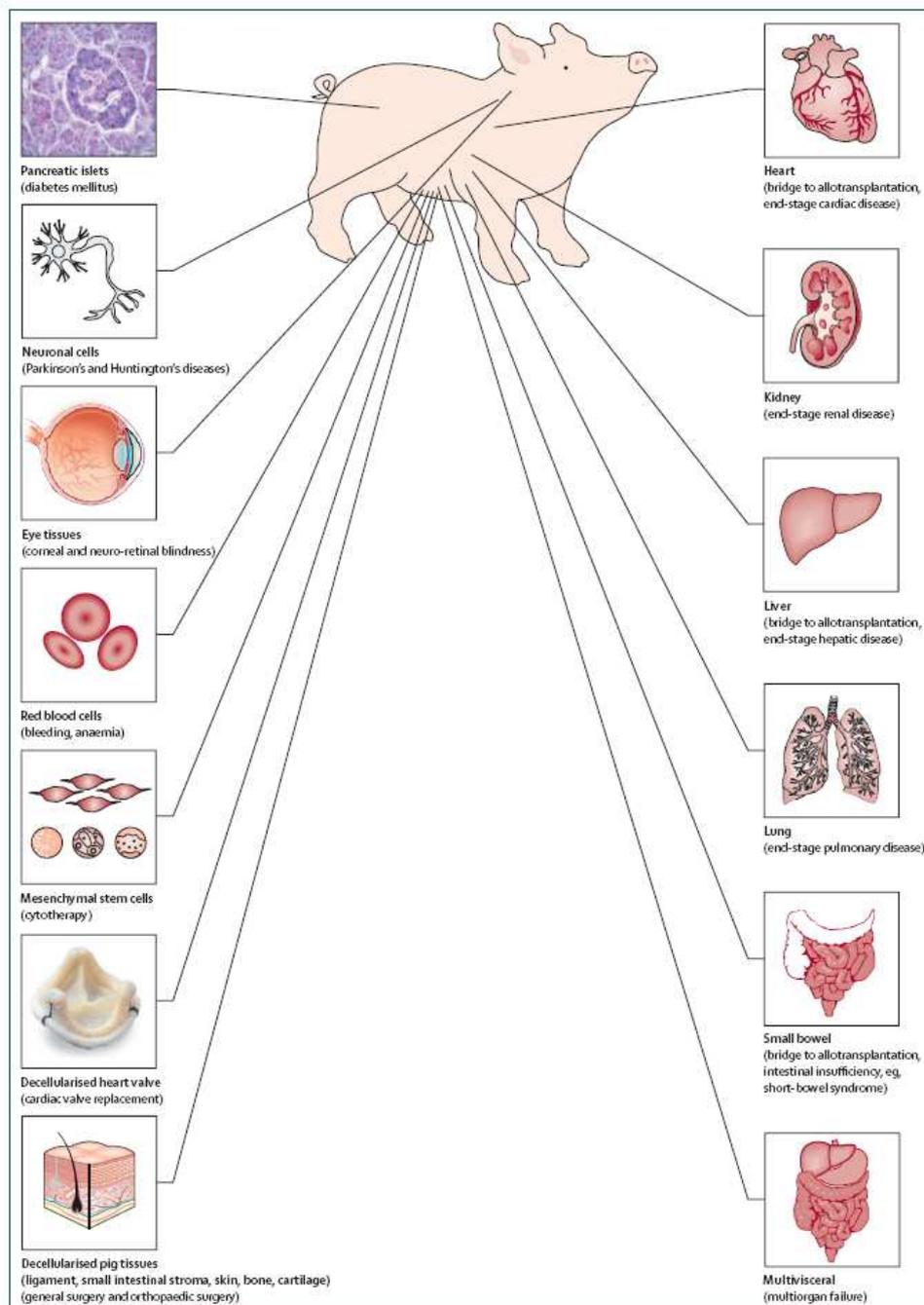


Figure 11. Organes et tissus pour lesquels la xéno greffe pourrait être appliquée comme thérapie potentielle (d'après Eksler et al, Lancet 2012 [244]).

2.3 Foie artificiel et bioartificiel

Une assistance hépatique artificielle pourrait être un moyen de suppléance en cas d'insuffisance hépatique aiguë. Cette assistance permettrait d'attendre la régénération hépatique ou une transplantation hépatique. Il existe deux types de systèmes de suppléance hépatique : i) le foie artificiel, purement mécanique ; ii) le foie bio-artificiel, un système artificiel contenant des cellules hépatiques vivantes [252]. Au cours des 30 dernières années, de nombreux essais de foies artificiels ou bioartificiels ont été menés.

Les premières tentatives de foie artificiel sans cellules comme l'hémodialyse, la plasmaphérèse ou l'hémofiltration ont été décevantes (**Tableau 3**). Aucun de ces traitements n'a amélioré la survie des patients ayant une insuffisance hépatique aiguë [253, 254]. Aujourd'hui, la suppléance artificielle du foie repose essentiellement sur des techniques d'épuration rénale extracorporelle modifiées, utilisées chez les patients atteints d'insuffisance hépatique pour tenter d'en pallier, au moins en partie, les conséquences. Les systèmes artificiels le plus utilisés de dialyse à l'albumine sont l'épuration extracorporelle à l'albumine (Molecular Adsorbent Recycling System ; système MARS) et la suppléance hépatique par adsorption et dialyse (Fractionated Plasma Separation and Adsorption, FPSA ; système Prometheus).

Support System	No. of Patients	Neurologic Improvement			Survival
		Yes	No	Unknown	
Hemodialysis ^{4,5}	65	33	17	15	17 (26%)
Hemofiltration ^{6,7}	15	10	5	0	8 (53%)
Exchange transfusion ⁸⁻¹²	48	24	16	8	9 (19%)
Plasma exchange ¹³⁻¹⁵	32	15	17	0	7 (22%)
Resin hemoperfusion ^{17,18}	9	5	4	0	0 (0%)
Charcoal perfusion ²⁰⁻²³	278	73	101	104	116 (42%)

Tableau 3. Patients traités pour insuffisance hépatique aiguë par des approches de foie artificiel (*d'après* Stockmann et al, Ann Surg 2000 [254]).

Le système d'épuration extracorporelle à l'albumine MARS est un système sans cellules utilisant une membrane couverte d'albumine et quasi imperméable aux protéines. Ce système utilisé pour la première fois en 1999, a été évalué essentiellement chez des malades ayant une insuffisance hépatique aiguë sur hépatopathie chronique. Il a permis une baisse significative de la bilirubine et une amélioration de l'hémodynamique des malades en insuffisance hépatique grave [255] ainsi qu'une diminution d'encéphalopathie hépatique dans certaines études [256, 257]. Ce dispositif est certes capable d'évacuer les produits de dégradation du sang, il n'est toutefois pas en mesure de se substituer au foie pour produire les substances vitales [258].

Le système de suppléance hépatique par adsorption et dialyse Prometheus permet l'élimination des toxines hydrosolubles et des toxines liées à l'albumine en deux étapes distinctes [259]. Dans un premier temps, le sang total du patient passe dans un filtre Albuflow (nouveau filtre à fibres creuses). Le filtre Albuflow retient les solutés de haut poids moléculaire ainsi que les éléments figurés sanguins et filtre ainsi l'albumine. Celle-ci est ensuite perfusée au travers de colonnes d'adsorption (Prometh® 01 et Prometh® 02) dans lesquelles les toxines liées à l'albumine sont adsorbées par la résine à haute affinité. L'albumine native est ensuite restituée au patient. De cette façon, l'utilisation d'albumine exogène n'est pas nécessaire. Dans un second temps, les toxines hydrosolubles sont éliminées de manière efficace par dialyse (ex : l'ammoniaque qui joue un rôle important dans les manifestations cliniques et l'évolution de l'encéphalopathie hépatique, ainsi que l'urée et les autres substances s'accumulant en cas de syndrome hépatorénal). L'avantage de ce système 2 en 1 est son montage simple et rapide (45 minutes) permettant ainsi d'intervenir au plus vite (ex : une évolution critique vers une encéphalopathie hépatique) [260].

Ces deux systèmes peuvent avoir plusieurs applications : décompensation d'insuffisance chronique, encéphalopathie hépatique, prurit cholestatique, syndrome hépatorénal, hépatite alcoolique aiguë, intoxication (ex : overdose médicamenteuse, intoxication aux champignons), insuffisance hépatique aiguë, attente de transplantation hépatique [261, 262]. Cependant, malgré les nombreuses applications et avantages de

ces deux systèmes, des études récentes ont montré qu'aucun n'a été capable de diminuer le taux de mortalité chez les patients ayant une insuffisance hépatique car le foie n'est pas uniquement un filtre mais un organe essentiellement de synthèse et de métabolisme [263].

C'est la raison pour laquelle les dispositifs plus récents en cours de développement contiennent des cellules hépatiques vivantes. Plusieurs techniques sont à l'étude :

- La première est l'utilisation de foies extracorporels d'animaux. Elle consiste à faire circuler le sang du malade à travers un foie entier de porc [254]. Mais ce protocole est limité dans sa durée avec l'apparition de phénomènes de rejet entraînant un non fonctionnement du foie de l'animal après 6 ou 7 heures. Sur le plan clinique, une amélioration neurologique transitoire a été notée [264], mais une hypotension artérielle et une thrombopénie ont été observés. Le développement de cette technique est aussi limité par la nécessité de disposer à proximité de plusieurs animaux d'élevage scientifique pour un patient et par le contexte d'urgence qui rend difficile l'obtention des critères suffisants de sécurité sanitaire.

- La seconde consiste à utiliser des systèmes de foie bioartificiel où le sang du patient est "épuré" sur une membrane d'hémodialyse ou d'hémofiltration semi-perméable dans laquelle sont placés au niveau de l'espace extracapillaire des hépatocytes [252]. Ces protocoles sont actuellement en développement expérimental chez l'animal et l'Homme et se heurtent à de multiples obstacles. Les hépatocytes humains primaires sont difficiles à maintenir en culture et perdent progressivement leurs fonctions métaboliques. De plus, cette source de cellules reste limitée. L'utilisation d'hépatocytes provenant de foie tumoral ou de foie d'hépatopathie virale présente un risque et les hépatocytes provenant de greffons non transplantés sont généralement de mauvaise qualité. Des hépatocytes humains dérivés de lignées tumorales comme la lignée hepG2 dérivée d'hépatoblastome ont donc été utilisés. Ces cellules ont une croissance spontanée illimitée et elles ont été utilisées chez l'Homme [265, 266]. Les résultats n'ont pas été concluants probablement en raison de la perte de fonctionnalité de ces hépatocytes. S'ajoute à ceci le problème éthique concernant le risque de contact entre le patient et les lignées de cellules tumorales et le risque de transmission à

l'homme. D'autres systèmes contenant des hépatocytes d'origine animale se sont développés avec des cellules porcines. Deux techniques ont été développées, par Gerlach [267] et par Démétriou [268]. Un autre procédé est basé sur l'immobilisation d'hépatocytes de porc sur des membranes recouvertes de billes d'alginate et placés dans des bioréacteurs [269, 270]. Ce procédé a permis dans des essais chez le porc d'améliorer de façon significative les signes d'hépatite fulminante laissant présager une utilisation potentielle dans le traitement d'insuffisance hépatique aiguë chez l'Homme [271, 272]. A part les problèmes immunologiques de rejet et de formation de xénoanticorps, l'obstacle principal à cette approche reste la transmission virale du rétrovirus porcin endogène ou d'autres virus encore inconnus.

En France, Samuel et al. [273] ont évalué un foie bioartificiel (HepatAssist2000) [274] chez des patients atteints d'hépatite fulminante inscrits sur la liste de transplantation hépatique en super-urgence. Le plasma du patient passait à travers un filtre à charbon puis à travers un filtre à fibres creuses (capillaires) contenant des hépatocytes de porc. Ces hépatocytes cryopréservés ont subi les tests de sécurité microbiologique et virale avant toute utilisation. Cette étude a montré une amélioration significative de l'état neurologique des malades traités ainsi qu'une diminution du taux sanguin de bilirubine et des transaminases.

Malgré des avancées considérables dans le domaine du foie artificiel et bioartificiel pour le traitement des maladies hépatiques, des limites existent dans les deux approches [275]. En ce qui concerne le foie bioartificiel, le manque de sources d'hépatocytes est un problème essentiel. L'hépatite fulminante est actuellement la meilleure indication pour l'utilisation de foies bioartificiels. La place d'un système de support hépatique bioartificiel extracorporel dans le traitement de l'insuffisance hépatique aiguë sera à évaluer avec des systèmes plus performants utilisant probablement des cellules souches humaines ou des hépatocytes humains immortalisés [276]. Ces approches seront certainement développées avec des membranes plus efficaces et moins risquées. Le foie bioartificiel reste cependant un outil temporaire permettant de passer une phase aiguë et ne fait pas actuellement partie des traitements

envisageables pour les maladies métaboliques héréditaires hépatiques. La réalisation d'essais cliniques est nécessaire afin d'évaluer ces approches et trouver les solutions nécessaires pour pouvoir utiliser ces systèmes couramment en clinique [277].

2.4 Thérapie cellulaire et thérapie génique

La thérapie cellulaire hépatique s'affirme de plus en plus comme une alternative prometteuse à la transplantation hépatique orthotopique. Elle peut se faire selon deux approches : i) allogénique : une allotransplantation d'hépatocytes normaux d'un donneur dans le foie malade du receveur ; ii) autologue : autotransplantation d'hépatocytes du patient génétiquement modifiés ex vivo pour restaurer un phénotype normal. La transplantation hépatocytaire présenterait plusieurs avantages par rapport à la transplantation d'organes, surtout pour le traitement des MMHH ou les thérapeutiques précédemment décrites sont souvent contraignantes (**Figure 12**). Il s'agit d'une technique plus simple et moins invasive, car les cellules pourraient être injectées via des cathéters par la veine mésentérique supérieure ou inférieure directement dans le système porte du malade [278]. Elle pourrait aussi être répétée si nécessaire [279, 280] ou également prolonger les délais d'attente de greffon hépatique pour les patients en attente de transplantation. Les hépatocytes peuvent être cryopréservés et donc être disponibles à la demande dans les cas d'allotransplantation [281, 282]. La transplantation d'hépatocytes isolés pourrait pallier la pénurie de greffons car un même donneur pourrait donner des hépatocytes à plusieurs receveurs [283]. Dans le cas d'hépatocytes génétiquement modifiés, ceux-ci peuvent être génétiquement modifiés in vitro afin d'exprimer des fonctions spécifiques. Enfin, la thérapie cellulaire serait associée à une faible mortalité, morbidité et à un plus faible coût que la transplantation hépatique [281, 284]. Des succès récents ont été obtenus par transplantation de cellules et laissent présager que la thérapie cellulaire sera une orientation thérapeutique d'avenir [284, 285]. Par ailleurs, outre les applications cliniques, sur un plan fondamental, la repopulation hépatique par transplantation hépatocytaire a suscité un intérêt considérable pour la recherche sur le fonctionnement hépatique [279, 286-288].

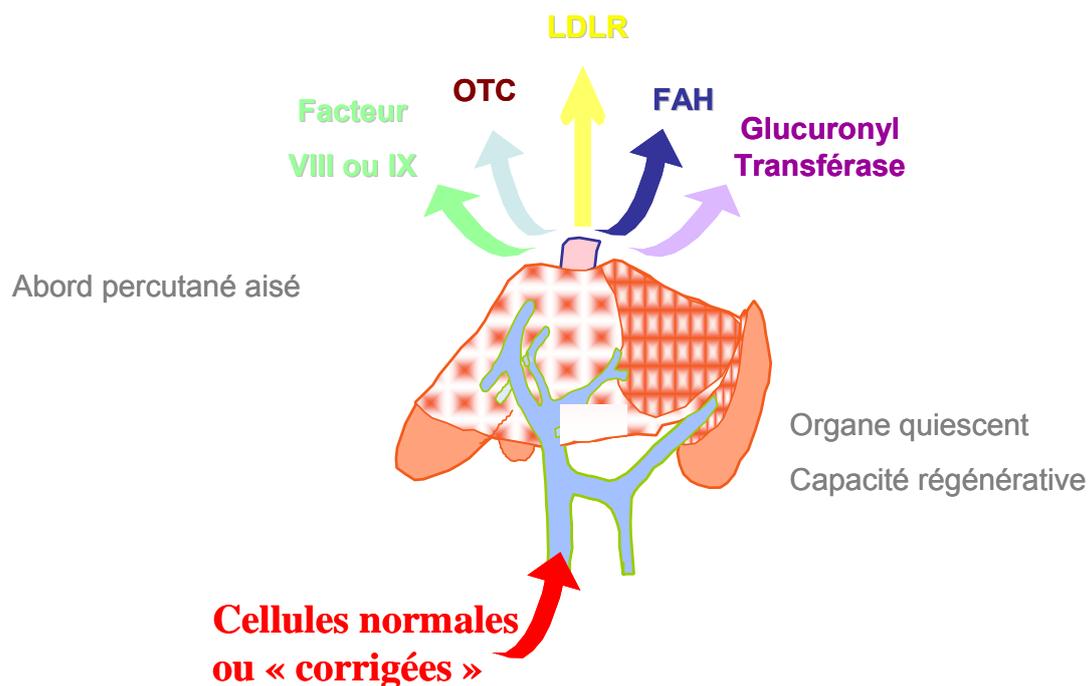


Figure 12. La thérapie cellulaire pour les MMHH.

Le champ potentiel d'application de la transplantation d'hépatocytes, génétiquement modifiés ou non, est vaste [107, 281, 284, 289-295]. Parmi les applications potentielles figureraient : le traitement des hépatites fulminantes et chroniques ; le traitement de déficits métaboliques d'origine génétique tels que la maladie de Wilson, le déficit en α_1 -antitrypsine, les lipidoses (maladie de Niemann-Pick, maladie de Gaucher), l'amyloïdose familiale et la tyrosinémie héréditaire de type-1 ; les défauts de la coagulation comme les hémophilies A (déficit en Facteur VIII) et B (déficit en Facteur IX); et enfin, les déficits métaboliques héréditaires comme l'hypercholestérolémie familiale, le syndrome de Crigler-Najjar de type-1 et le déficit en OTC qui pourraient être traités par transplantation d'hépatocytes allogéniques ou l'autotransplantation d'hépatocytes génétiquement modifiés (thérapie génique).

La thérapie génique des MMHH peut être envisagée selon deux approches : i) la thérapie génique in vivo, visant à transférer directement dans les hépatocytes, dans

l'organisme, un gène véhiculé par un vecteur viral recombinant ou inerte afin de corriger un déficit chez le patient ; ii) la thérapie génique ex vivo, visant à prélever des hépatocytes du foie d'un patient, transférer un gène à l'aide de vecteurs viraux dans ces cellules in vitro et les réimplanter ensuite dans l'organisme. Cette approche comporte donc une étape de transplantation d'hépatocytes avec les difficultés, les limites et les moyens d'amélioration de celle-ci.

Le foie est le carrefour de nombreuses fonctions métaboliques, il est richement vascularisé et doté d'une importante capacité de régénération. Ces caractéristiques font des MMHH une cible privilégiée à la thérapie génique in vivo ou ex vivo [296]. En dehors des tentatives de faisabilité et de marquage, les premiers essais cliniques de thérapie génique ont initialement été restreints à des cas extrêmement graves pour lesquels les alternatives thérapeutiques classiques étaient inefficaces ou inexistantes. Dans cette approche, le vecteur utilisé pour véhiculer et introduire aux hépatocytes le gène manquant joue un rôle fondamental.

Les vecteurs adénoviraux, virus à ADN, font partie des outils de transfert de gène les plus puissants. Ils sont caractérisés par une forte résistance des particules virales, des hauts titres viraux et un large spectre d'infection [297]. Ces vecteurs ont été principalement utilisés pour des protocoles in vivo. Le taux de transduction avoisine les 100% lorsque l'on cible le foie. Les limites restent l'immunogénicité des adénovirus et l'instabilité de l'expression du transgène [298]. En effet, ces vecteurs ne s'intègrent pas dans le génome de la cellule hôte mais restent sous forme épisomale et le transgène est rapidement perdu dans les cellules en division. En 1999, un essai clinique in vivo de phase I pour le traitement de 18 patients atteints d'un déficit en OTC qui se déroulait à l'hôpital Universitaire de Pennsylvanie a été brutalement interrompu suite au décès de Jesse Gelsinger, un jeune malade de 18 ans [121]. Dans cet essai, l'adénovirus recombinant portant le gène humain de l'OTC était injecté via l'artère hépatique droite pour mieux cibler le foie. Quelques heures seulement après avoir reçu une dose de l'adénovirus, ce malade a développé une réponse immune qui a conduit à un choc anaphylactique et une défaillance multiviscérale. Il est mort 98

heures après l'injection adénovirale. Cette toxicité des adénovirus injectés *in vivo* a été attribuée à l'activation et la destruction des cellules de Kupffer [299]. Afin de réduire la réponse immunitaire, plusieurs études ont été réalisées avec des vecteurs dérivés de virus adeno-associés (Adeno-Associated Virus, AAV). Ces parvovirus à ADN linéaire ont la particularité de favoriser une intégration de leur génome toujours au même endroit dans le chromosome 19 [300, 301]. Une insertion non contrôlée pouvant entraîner d'importants désordres dans la fonction cellulaire, ces vecteurs ont été fortement développés pour leur potentiel sécuritaire bien qu'ils ne soient capables que de transférer des petits gènes. Longtemps considérés comme inoffensifs, à l'inverse des vecteurs adénoviraux, leur développement et utilisation en clinique ont été favorisés depuis quelques années [302-304]. Le décès au cours de l'été 2007 d'un patient dans un essai clinique de traitement de la polyarthrite rhumatoïde par des vecteurs dérivés de l'AAV, due à une histoplasmosse disséminée, a permis aussi désormais aux détracteurs de cette stratégie de pointer le doigt sur ce type de vecteur [305, 306]. Il faut noter que les vecteurs dérivés des AAV ont été testés dans de nombreuses approches thérapeutiques avec des succès obtenus, principalement entre 2007 et 2010, lors d'essais de traitements d'une forme d'amaurose congénitale de Leber de modèles animaux canins et finalement de jeunes patients [307-310]. Aujourd'hui, il est possible de produire des AAV recombinants qui semblent être performants pour le transfert de gènes dans les cellules quiescentes comme les hépatocytes [311].

La thérapie génique chez l'Homme a historiquement débuté avec des vecteurs rétroviraux, virus à ARN. Ces vecteurs dérivés du génome de rétrovirus oncogènes murins ont une efficacité aujourd'hui bien documentée [312, 313]. L'infection par un rétrovirus implique une étape de rétrotranscription de l'ARN en un fragment d'ADN qui pourra être associé (étape d'intégration) aux chromosomes après pénétration dans le noyau cellulaire. Une combinaison de protéines virales et de protéines de la cellule cible assure cette étape de transfert des molécules d'ADN du cytoplasme cellulaire vers le noyau et l'intégration dans le génome de l'hôte. Une fois intégré, le génome du rétrovirus sous sa forme ADN est stable et transmis de manière mendélienne comme n'importe quel gène de la cellule. Ils présentent trois avantages majeurs pour

l'introduction d'un gène dans une cellule : i) ils peuvent être produits en l'absence de toutes particules virales sauvages susceptibles de provoquer une dissémination incontrôlée du génome recombinant [314] ; ii) ils ne véhiculent pas de séquences codantes d'origine virale qui pourraient induire une réponse immune ou un effet cytopathogène vis à vis de la cellule génétiquement modifiée ; iii) ils permettent une intégration stable du transgène dans le génome de la cellule hôte, conduisant au maintien théorique des séquences transduites dans la descendance de cette cellule. Leur principale limitation est la nécessité d'une division cellulaire dans les heures suivant la pénétration de la particule virale dans la cellule cible [315]. Cette division est nécessaire à l'intégration dans le génome des complexes pré-intégratifs formés au cours de l'étape de transcription reverse. Cette limitation concerne particulièrement les hépatocytes qui sont quiescents dans un foie normal.

Les lentivirus sont des rétrovirus à génome complexe présentant des similitudes dans leur structure génétique, le cycle de réplication et les interactions biologiques avec leurs hôtes respectifs [316, 317]. L'utilisation de vecteurs lentiviraux dérivés du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) présente un intérêt certain. Ces virus recombinants ont les mêmes propriétés que les rétrovirus murins mais ils peuvent également transduire les cellules quiescentes, comme les hépatocytes [318-321]. La mise au point de vecteurs recombinants, inoffensifs et performants développés aujourd'hui, devrait permettre d'augmenter largement le taux de transduction d'hépatocytes humains. Ce type de vecteur est actuellement utilisé dans notre projet pré-clinique pour le traitement de l'hypercholestérolémie familiale par autotransplantation d'hépatocytes génétiquement modifiés ex vivo.

2.5 Transplantation d'hépatocytes – Les essais cliniques

Le succès de nombreux modèles de transplantation d'hépatocytes établis chez l'animal a encouragé le passage aux essais cliniques. Toutefois, depuis plus de dix ans seulement quelques essais cliniques pour certaines indications ont été réalisés

(**Tableau 4**). Ces premiers essais cliniques ont eu pour but d'évaluer l'efficacité, ainsi que l'innocuité de la procédure. Les deux principaux groupes d'indications ont été les hépatites fulminantes et les maladies métaboliques héréditaires [290]. Dans les cas d'hépatite fulminante, l'indication a été posée, en absence d'une thérapie alternative, à cause de l'indisponibilité immédiate d'un greffon hépatique afin de pallier les fonctions du foie défaillant. Dans les cas de déficit métabolique du foie, la transplantation hépatocytaire constitue un compromis entre l'irréversibilité de la transplantation d'organes, avec les risques chirurgicaux associés, la nécessité d'une immunosuppression et l'exigence d'une thérapie sûre, simple et efficace [288]. Les premiers essais de thérapie cellulaire hépatique ont produit des résultats encourageants, ouvrant des perspectives prometteuses, mais ils ont également montré les étapes limitantes de cette approche.

2.5.1 Transplantation d'hépatocytes pour insuffisances hépatiques chroniques et aiguës (Tableau 5)

Les premiers essais cliniques de thérapie cellulaire pour le traitement d'insuffisances hépatiques chroniques consistaient en une autotransplantation par injection intrasplénique d'hépatocytes isolés à partir du lobe gauche [322]. D'autres patients ont subi une allotransplantation d'hépatocytes isolés à partir de greffons hépatiques sains. Chez trois enfants, l'injection d'hépatocytes dans la rate ou le foie a permis une réduction significative de l'ammoniémie et l'amélioration clinique de l'encéphalopathie jusqu'à six semaines, en attendant la disponibilité d'un greffon hépatique. Cette procédure a permis le rétablissement complet de deux des trois

Tableau 4. Maladies hépatiques pour lesquelles un protocole clinique de transplantation d'hépatocytes a été réalisé.

Déficits métaboliques héréditaires

Syndrome de Crigler-Najjar de type I

Hypercholestérolémie familiale

Déficit en facteur VII

Maladie de stockage du glycogène de type I

Maladie de Refsum

Cholestase intrahépatique familiale

Déficit en α_1 -antitrypsine

Déficit du cycle de l'urée

 Déficit en OTC

 Citrullinémie

 Déficit en lyase argininosuccinate

Insuffisance hépatique aiguë (fulminante)

 Médicamenteuse

 Virale

 Idiopathique

 Alimentaire

 Postopératoire

Insuffisance hépatique chronique

 Virale

 Alcoolique

enfants traités [323]. Chez les adultes, sept patients (un infecté par le virus de l'hépatite C, un atteint d'un déficit en A1AT et 5 avec une cirrhose alcoolique) atteints de cirrhose et une encéphalopathie avancée non contrôlée par des médicaments, ont subi une allotransplantation d'hépatocytes en intrasplénique [279, 289]. Chez le patient infecté par le virus de l'hépatite C, la présence d'hépatocytes transplantés, formant des structures avec jonctions cellulaires normales, a été observée dans la rate quelques jours après transplantation. L'essai d'allotransplantation d'hépatocytes chez le patient atteint d'un déficit en A1AT n'a pas été concluant car il a subi une transplantation hépatique deux jours après l'injection cellulaire. Quant aux cinq patients atteints de cirrhose alcoolique, ils ne montraient soit aucun bénéfice thérapeutique, soit une réduction significative de l'ammoniémie et de l'encéphalopathie jusqu'à 33 jours post-transplantation [287]. Le bénéfice thérapeutique obtenu avec la transplantation d'hépatocytes pour le traitement de l'insuffisance hépatique n'est pas évident. La réponse à la transplantation d'hépatocytes chez les patients avec une hépatopathie chronique n'a pas rencontré jusqu'à présent le même degré d'amélioration de leur état clinique comparé aux études expérimentales chez l'animal [287, 322]. Une amélioration clinique a été observée chez quelques patients mais elle a toujours été transitoire. Une des explications pourrait se trouver dans la voie d'injection des cellules. En effet, il a été montré en expérimental que la voie d'administration d'hépatocytes influence leur intégration et leur fonctionnement [324]. Ces essais cliniques ont également soulevé plusieurs autres questions, dont la quantité des cellules nécessaires pour observer un effet thérapeutique significatif, le site et la fréquence de transplantation.

En ce qui concerne les insuffisances hépatiques aiguës, la transplantation d'hépatocytes a été proposée comme un traitement provisoire jusqu'à disponibilité d'un greffon hépatique. Initialement, cette approche a été réalisée chez des patients atteints d'hépatite fulminante, présentant une encéphalopathie de grade élevé et une défaillance multi-organe en attente de transplantation hépatique [323, 325]. Jusqu'à présent, plus de 30 patients ont été traités à travers le monde pour une insuffisance

Indications	Type d'hépatocytes	Nombre	Voie d'administration	Suivi	Référence
Insuffisances Hépatiques Chroniques					
- Cirrhose (n=10)	Hépatocytes autologues fraîchement isolés	$2 \times 10^7 - 2 \times 10^8$	Intrasplénique	Survie plus longue, supérieure à 10 mois pour seulement un patient	Mito et al [322]
- Cirrhose alcoolique (n=3)	ND	ND	Intraportale	Patients vivants 4 ans après la procédure	Strom et al [323]
- Cirrhose alcoolique (n=2) - Hépatite chronique VHC (n=1)	Hépatocytes cryopréservés allogéniques	ND	Intrasplénique	Décès	Strom et al [287]
Insuffisances Hépatiques Aiguës					
- Hépatite fulminante (n=7)	Hépatocytes humains fœtaux poolés par groupe sanguin	$6 \times 10^7 / \text{kg}$	Intrapéritonéale	Hépatite médicamenteuse ; survie de tous les patients avec une encéphalopathie de grade III (n=2)	Habibullah et al [326]
- Hépatite fulminante (n=3)	Hépatocytes cryopréservés	$4 \times 10^7 - 2.8 \times 10^9$	Intraportale	Hépatite médicamenteuse ; décès	Soriano et al [290]
- Hépatite fulminante (n=11)	Hépatocytes allogéniques cryopréservés	$4 \times 10^8 - 1 \times 10^9$	Intraportale ou intrasplénique	Hépatite médicamenteuse, virale ou postopératoire ; transplantation hépatique (n=6), 1 en rémission et 4 décès	Strom et al [287]
- Hépatite fulminante (n=5)	Hépatocytes cryopréservés pendant 18 mois	$1.3 \times 10^9 - 1 \times 10^{10}$	Intraportale	Hépatite médicamenteuse ou virale ; décès à 12 jours (n=4) et 72 heures (n=1)	Bilir et al [325]
- Hépatite fulminante (n=1)	Hépatocytes allogéniques	8.8×10^8	Intraportale	Hépatite virale ; rémission totale	Fisher et al [327]
- Hépatite fulminante (n=1)	Hépatocytes allogéniques	4.9×10^9	Intraportale	Hépatite alimentaire; rémission complète et arrêt d'immunosuppression à 12 semaines	Schneider et al [328]

Tableau 5. Quelques exemples de protocoles et résultats des essais cliniques de transplantation d'hépatocytes pour insuffisance hépatique chronique ou aiguë.

Indications	Type d'hépatocytes	Nombre	Voie d'administration	Suivi	Référence
Maladies métaboliques					
- Hypercholestérolémie familiale (n=5)	Hépatocytes transfectés in vitro avec le cDNA du récepteur aux LDL humain par vecteurs rétroviraux	$1 \times 10^9 - 3 \times 10^9$	Intrapéritonéale	Réduction > 20% du LDL-cholestérol chez trois patients, expression du transgène <5% > 4 mois	Grossman et al [329, 330]
- Déficit en A1AT (n=2) - Déficit en OTC (n=1)	Hépatocytes cryopréservés	$2.2 \times 10^7 - 1 \times 10^9$	Intraportale	Déficit en OTC : décès par pneumonie 42 jours après Déficit A1AT : transplantation hépatique orthotopique à J4	Strom et al [287, 323]
- Déficit en OTC (n=1)	Hépatocytes fraîchement isolés	5.3×10^9	Intraportale	Baisse temporaire de l'hyperammoniémie pour 11 jours, transplantation orthotopique hépatique à la fin	Horslen et al [331, 332]
- Syndrome Crigler-Najjar (n=1)	Hépatocytes allogéniques fraîchement isolés	7.5×10^9	Intraportale	3 injections / 24 heures ; diminution de 50% de la bilirubine totale ; transplantation hépatique orthotopique à 4 ans	Fox et al [333]
- Maladie de stockage du glycogène type I (n=1)	Hépatocytes allogéniques	2×10^9	Intraportale	Régime normal 9 mois après transplantation, 7 heures sans épisode d'hypoglycémie	Muraca et al [334]
- Maladie de Refsum (n=1)	Mélange d'hépatocytes fraîchement isolés et cryopréservés	2×10^9	Intraportale	8 injections ; à 18 mois, diminution de 40% de l'acide pipecholique et de 36% du ratio des acides gras c26-c22	Sokal et al [335]

Tableau 6. Protocoles et résultats des essais cliniques de transplantation d'hépatocytes pour déficits métaboliques du foie.

Indications	Type d'hépatocytes	Nombre	Voie d'administration	Suivi	Référence
Maladies métaboliques (suite)					
- Déficit en OTC (n=1)	ND	5.1x10 ⁸	Veine ombilicale	Amélioration clinique avec un régime protéique normal, transplantation hépatique orthotopique à 7 mois	Mitry et al [336]
- Déficit facteur VII de coagulation (n=2)	Mélange d'hépatocytes fraîchement isolés et cryopréservés	1x10 ⁹ + 2.2x10 ⁹	Intraportale	Réduction de 80% en facteur VII exogène, perte de l'effet thérapeutique quelques mois après, transplantation hépatique orthotopique à 6 mois	Dhawan et al [337]
- Syndrome Crigler-Najjar (n=1)	Mélange d'hépatocytes fraîchement isolés et cryopréservés	4.3x10 ⁹	Intraportale	9 injections en 2 semaines et une à trois mois ; diminution de 40% de la bilirubine totale à 9 mois	Hughes et al [338]
- Syndrome Crigler-Najjar (n=1)	Hépatocytes allogéniques fraîchement isolés	7.5x10 ⁹	Intraportale	Diminution de 50% de la bilirubine totale ; transplantation hépatique orthotopique à 4 mois	Ambrosino et al [339]
- Cholestase intrahépatique familiale (n=2)	Hépatocytes allogéniques fraîchement isolés	3x10 ⁸	Intraportale	Pas d'amélioration, transplantation orthotopique du foie à 5 et 14 mois, respectivement	Hughes et al [338]
- Maladie de stockage du glycogène type Ib (n=1)	Trois injections d'hépatocytes allogéniques	2x10 ⁹ + 1x10 ⁹ + 3x10 ⁹	Intraportale	Disparition d'épisodes d'hypoglycémie, régime normal, activité enzymatique normale à J20 et J250	Lee et al [340]
- Crigler-Najjar (n=1) - Déficit en OTC (n=1) - Maladie de stockage du glycogène type Ia (n=1) - Tyrosinémie type I (n=1)	Hépatocytes allogéniques cryopréservés	NF	Intraportale	- Crigler-Najjar: amélioration de l'état clinique, diminution de la bilirubine totale - Déficit en OTC: diminution d'hyperammoniémie - Maladie de stockage du glycogène type Ia : absence d'épisodes d'hypoglycémie en post-injection - Tyrosinémie type I: stabilisation des paramètres biochimiques, transplantation hépatique orthotopique quelques semaines plus tard	Ribes-Koninckx et al [107]

Tableau 6 (SUITE). Protocoles et résultats des essais cliniques de transplantation d'hépatocytes pour déficits métaboliques du foie.

hépatique aiguë par transplantation d'hépatocytes allogéniques [290]. Dix enfants atteints d'hépatite aiguë d'origine virale, idiopathique ou médicamenteuse ont reçu des injections d'hépatocytes allogéniques, principalement via la veine porte, avec mise en place d'une immunosuppression. Deux des patients pédiatriques ont été en rémission complète sans recours à une transplantation hépatique, alors que pour trois autres cette procédure a permis de pallier avec succès la défaillance hépatique en attendant un greffon [287, 290]. Malgré une défaillance multiviscérale associée à une atteinte hépatique sévère, huit de dix enfants ont manifesté une amélioration nette de leur état clinique [290, 341]. Plus de 20 patients adultes atteints d'hépatites aiguës d'étiologies diverses associés à une défaillance multiviscérale, ont été traités par cette approche [287, 290, 325, 327]. Quelque soit l'étiologie, la transplantation d'hépatocytes allogéniques a permis d'améliorer l'état clinique de la majorité des patients qui attendait un greffon hépatique. Pour certains elle a même permis une rémission complète de leur maladie. Cependant, il est très difficile d'estimer le bénéfice réel apporté par la transplantation d'hépatocytes dans le traitement d'insuffisances hépatiques aiguës car malgré l'utilisation de cette approche, la mortalité de ces patients reste très élevée (> 40%). En plus, environ la moitié des patients qui ont reçu une transplantation d'hépatocytes allogéniques ont subi une transplantation hépatique orthotopique dans un deuxième temps. L'indication de la transplantation d'hépatocytes pour l'insuffisance hépatique aiguë reste actuellement sujette à controverse car le faible nombre des cas réalisés, l'important avancement de la maladie chez les patients traités, les différentes indications, les différents sites d'injection cellulaire et les différents protocoles cliniques et préparation des cellules transplantés ne permettent pas d'en tirer une conclusion finale.

Cependant, des résultats très encourageants ont été rapportés très récemment par l'équipe d'Anil Dhawan au *King's College Hospital* de Londres en utilisant la technique d'implantation intrapéritonéale d'hépatocytes humains encapsulés dans des microbilles d'alginate [281]. La technique de microencapsulation d'hépatocytes avait été optimisée pour un passage en clinique et des expériences *in vitro* avaient montré une persistance de la sécrétion d'albumine et du facteur VII pendant deux semaines

quand les microbilles se trouvaient dans une culture contenant du liquide d'ascite des patients atteints d'insuffisance hépatique [281]. En utilisant cette approche, ces microbilles contenant d'hépatocytes encapsulés ont été implantées en intrapéritonéale chez un enfant de 8 mois atteint d'une insuffisance hépatique aiguë d'origine virale. Ainsi, les hépatocytes ont été isolés du système immunitaire et la mise en place d'une immunosuppression n'a pas été nécessaire. Les cellules injectées ont créé un « foie temporaire » qui sécrétait les protéines vitales et métabolisait toutes les toxines produites. Quelques semaines plus tard, le foie de l'enfant a repris sa fonction complète et l'enfant a été guéri sans subir une transplantation hépatique orthotopique. Les résultats de cette première mondiale sont impressionnants. Toutefois, la réalisation d'un large essai clinique est nécessaire pour la validation finale de cette approche thérapeutique.

2.5.2 Transplantation d'hépatocytes pour déficits métaboliques hépatiques

Les rares protocoles cliniques de transplantation cellulaire réalisés à ce jour pour le traitement de déficits métaboliques hépatiques ont porté sur très peu de patients, en grande majorité des enfants (**Tableau 6**).

Un des premiers essais cliniques a été réalisé chez une jeune fille de 10 ans atteinte de la maladie de Crigler-Najjar de type I [333]. Ce cas a été un des premiers exemples de l'utilité de la transplantation d'hépatocytes pour le traitement des MMHH. Les hépatocytes ont été isolés à partir d'un donneur âgé de 5 ans dont le foie n'a pas pu être utilisé pour une transplantation hépatique à cause d'une absence de receveur compatible pour la taille et le groupe sanguin. L'injection via la veine porte de 7.5 milliards d'hépatocytes en trois injections réparties sur 24 heures a été bien tolérée. La masse d'hépatocytes transplantés a été équivalente à environ 5% de la masse hépatique totale calculée. La fonctionnalité des cellules transplantées a été démontrée par la diminution de moitié de la concentration sanguine de bilirubine 11 mois après, malgré des fluctuations durant les trois premiers mois. L'activité enzymatique de la bilirubine uridinediphosphate glucuronosyltransférase mesurée sur des biopsies hépatiques est passée de 0,4% à 5,5% de l'activité normale. En outre, les séances quotidiennes de

photothérapie ont pu être réduites de 12 à 6 heures. Cependant, seul un faible bénéfice clinique a été obtenu et ceci malgré la persistance des cellules transplantées pour plus de trois ans et demi. Pour cette raison, la patiente a subi une transplantation hépatique au bout de quatre ans [290]. Cette importante étude a démontré l'innocuité de la procédure, a conduit en une amélioration phénotypique nette du déficit métabolique et a confirmé la faisabilité et efficacité de la transplantation hépatocytaire pour le traitement de déficits métaboliques congénitaux d'origine hépatique. Cependant, il n'y a pas eu de normalisation de la concentration sanguine de bilirubine. Suite à la réussite partielle de cet essai clinique, d'autres patients atteints du syndrome Crigler-Najjar de type 1 ont été traités par transplantation d'hépatocytes allogéniques, fraîchement isolés ou cryopréservés [107, 331, 338, 339].

Les déficits métaboliques liés au cycle de l'urée ont été aussi traités par transplantation d'hépatocytes avec un succès relatif. Un enfant présentant un déficit héréditaire en OTC a subi la transplantation fractionnée de 5.3×10^9 hépatocytes au cours de 23 premiers jours après sa naissance [332]. Entre le 20^{ème} et 31^{ème} jour une normalisation de l'ammoniémie a été atteinte et la prise alimentaire de protéines a été normalisée et le traitement suspendu. Le 31^{ème} jour un épisode d'hyperammoniémie a obligé la réintroduction du traitement médical. L'hyperammoniémie a été attribuée à un rejet de greffe, la concentration sanguine de l'immunosuppresseur étant devenue subthérapeutique au moment de la rechute.

L'équipe de Strom a rapporté en 1997 une transplantation d'hépatocytes chez 7 malades. Six des sept receveurs ont bénéficié de la transplantation pour une insuffisance hépatique aiguë; le septième malade présentait un déficit en OTC. Un milliard d'hépatocytes ont été isolés d'un foie pédiatrique qui n'a pas été donné pour une transplantation à cause de lésions traumatiques du foie droit. Les hépatocytes ont été perfusés par ponction percutanée de la veine porte à la vitesse de 2 ml/minute. La perfusion s'est passée sans incident. Le taux d'ammoniémie s'est normalisé en 48 heures. L'activité enzymatique OTC, qui était nulle avant la transplantation, a atteint $0,4 \mu\text{mol/g/minute}$ (correspondant à 0,3-0,5% de l'activité OTC normale). Vingt-huit jours après la transplantation, l'hyperammoniémie s'est majorée avec des

concentrations atteignant 378 $\mu\text{mol/L}$. Une nouvelle transplantation de 700×10^6 hépatocytes préalablement congelés a été réalisée. Le patient est resté dans un état de coma malgré la correction de son état métabolique et est décédé d'une bronchopneumonie aiguë 42 jours après la première transplantation hépatocytaire. L'autopsie ne montrait pas de thrombose porte, pas d'infection hépatique ni d'autres complications pouvant être en rapport avec la transplantation d'hépatocytes [287].

Le traitement du déficit en A1AT par allotransplantation d'hépatocytes a été tenté chez un enfant de 18 semaines, atteint d'une cirrhose hépatique [287, 331] et chez une adulte exprimant une forme mutée de la protéine, atteinte d'une insuffisance hépatique chronique diagnostiquée [323]. Ces essais cliniques n'ont pas été concluants car les deux patients ont subi une transplantation de foie quelques jours après. Néanmoins, la présence de la forme normale de A1AT a été observée dans la circulation sanguine de la patiente peu après la transplantation cellulaire [341].

Parmi les quelques patients ayant été traités par allotransplantation d'hépatocytes pour des déficits métaboliques hépatiques figurent aussi deux frères atteints d'un déficit congénital en facteur VII de la coagulation [337]. Ils ont chacun reçu via la veine porte une injection de cellules fraîchement isolées et cryopréservées, équivalente à environ 5% de la masse hépatique totale. Une réduction de 80% des besoins de substitution en facteur VII exogène a été constatée, avant que les deux patients ne subissent une transplantation de foie réduit six mois plus tard à cause de la perte de l'effet thérapeutique.

Une patiente présentant un déficit en Glucose-6-phosphatase (Glucogen Storage Disease type-1a) a été également traitée par transplantation d'hépatocytes allogéniques [334]. Ce cas présente une particularité car la patiente était âgée de 47 ans. L'activité glucose-6-phosphatase était indétectable sur la biopsie hépatique. Les signes cliniques comportaient une hypoglycémie sévère, une acidose lactique, et une hypertriglycéridémie. Le traitement nécessitait un gavage nocturne par une sonde nasogastrique et des repas diurnes toutes les 3 heures pour maintenir une glycémie au-dessus de 3,5 mmol/L. L'injection de deux milliards d'hépatocytes en deux séances de

4 heures a été bien tolérée. Après transplantation de l'équivalent de 1% de la masse hépatique totale, la patiente pouvait tolérer des périodes de jeûne de 7 heures en maintenant une glycémie supérieure à 3,5 mmol/L et une production de lactate diminuée. La triglycéridémie a chuté à 7 mmol/L après la transplantation et fluctuait entre 10 et 15 mmol/L. La transplantation d'hépatocytes génétiquement normaux correspondant à seulement 1% de la masse hépatocytaire totale a induit une correction partielle des anomalies métaboliques, qui a persisté 9 mois. La transplantation hépatocytaire a été aussi utilisée dans le traitement de la maladie de stockage du glycogène type Ib [340]. Trois injections intraportales d'hépatocytes allogéniques (2 milliards à J1, 1 milliard à J7 et 3 milliard à J30) ont été réalisées chez un patient présentant ce déficit métabolique. Les épisodes d'hypoglycémie ont disparu même après la reprise d'un régime alimentaire normal et une normalisation de l'activité enzymatique manquante a été notée.

Il y a 9 ans, l'équipe belge de Sokal [335] a réalisé une allotransplantation chez une fillette de 4 ans ayant une maladie du métabolisme du peroxyosome ou Infantile Refsum Disease (IRD). L'IRD est une maladie congénitale autosomale récessive. Elle est due à un déficit de la bêta-oxydation des chaînes longues d'acides gras, de la biosynthèse du plasmalogène et des acides biliaires et du catabolisme de l'acide pipécolique. Les manifestations cliniques sont digestives et du système nerveux central. La malade âgée de 4 ans développait une baisse de l'ouïe et de l'acuité visuelle sévères et un retard de croissance. Les hépatocytes ont été isolés à partir du foie de deux donneurs de sexe masculin, ceux du premier donneur ont été isolés et acheminés de Chicago à Bruxelles et ceux du deuxième ont été congelés. 1,1 milliard d'hépatocytes frais viables à 50% (équivalent de 5% de la masse hépatique) ont été transplantés le premier jour en deux perfusions successives de 30 minutes. Huit-cents cinquante millions d'hépatocytes congelés dont la viabilité était supérieure à 90% ont été perfusés biquotidiennement du 3^{ème} au 6^{ème} jour. Une amélioration rapide de l'état métabolique avec une disparition des acides biliaires anormaux a été notée et observée jusqu'à 18 mois. Par contre, il n'y a pas eu d'amélioration de l'état neurologique.

La transplantation de 0.3×10^9 hépatocytes fraîchement isolés chez deux enfants atteints de cholestase familiale intrahépatique n'a apporté aucun bénéfice thérapeutique [338]. L'échec de l'opération a été attribué à la découverte inattendue d'une fibrose hépatique avancée au moment de la transplantation hépatique orthotopique 5 et 14 mois, respectivement, après injection cellulaire. Il est probable que dans cette situation un traitement plus précoce aurait pu améliorer le bénéfice thérapeutique.

Récemment, Ribes-Koninckx et al à Valence [107] ont réalisé un protocole de transplantation intraportale d'hépatocytes allogéniques chez quatre patients atteints de maladies métaboliques du foie (syndrome de Crigler-Najjar, déficit en OTC, tyrosinémie de type I, maladie de stockage du glycogène de type Ia). L'indication pour la transplantation hépatocytaire a été posée par la gravité de la maladie et le degré de détérioration de la qualité de vie des patients par rapport aux avantages que cette procédure pourrait apporter. Tous les patients ont eu une amélioration de leur état clinique, et dans le cas du patient souffrant de tyrosinémie de type I une transplantation hépatique orthotopique a été réalisée par la suite.

En ce qui concerne l'hypercholestérolémie familiale, Wilson et al. en 1991 ont transduit in vitro des hépatocytes primaires de lapins Watanabe (modèle de l'hypercholestérolémie familiale) avec un taux de 30%. Ces hépatocytes (2% de la masse hépatocytaire) ont été réinjectés chez l'animal par voie splénique. Le résultat a été une diminution de 30 à 50% en moyenne du cholestérol plasmatique avec une expression hépatique du récepteur aux LDL de l'ordre de 2%, stable pendant plus de 6 mois [53]. Compte tenu des résultats obtenus chez le lapin Watanabe, le premier essai clinique de transplantation d'hépatocytes corrigés ex vivo par transfert de gènes a été réalisé aux Etats-Unis par l'équipe de Wilson pour traiter 5 patients homozygotes ayant une hypercholestérolémie familiale, âgés de 7 à 41 ans [329, 330]. Deux patients étaient récepteurs négatifs. L'isolement des hépatocytes était fait à partir d'une lobectomie gauche. Les hépatocytes isolés ont été transduits avec des rétrovirus recombinants codant pour le gène du R-LDL selon le protocole mis au point chez le lapin. Le taux moyen de transduction était de 20%. Un à 3 milliards de cellules génétiquement modifiées ont été autotransplantées par voie portale. Pendant la

transplantation des hépatocytes, une élévation transitoire de la pression portale a été notée, mais il n'y a pas eu de thrombose portale. Des réductions significatives des concentrations en cholestérol total, LDL, et apolipoprotéine B ont été obtenues chez 3 malades sur 5, parmi lesquels les 2 malades récepteurs négatifs. Mais l'impact clinique du traitement, évalué en comparant les concentrations sériques du cholestérol et des LDL après réintroduction des traitements par voie orale, a été significatif chez un seul malade. Seul le premier malade publié avait un recul de 18 mois. La présence d'hépatocytes exprimant le transgène dans son foie, mis en évidence par une méthode d'hybridation in situ a été confirmée 4 mois après le traitement et évaluée à 1 cellule sur 10 000. Les autres malades n'avaient qu'un recul de 4 mois quand l'étude a été arrêtée. Ces résultats n'ont donc pas mis clairement en évidence une corrélation entre la diminution des LDL plasmatiques et une augmentation de l'activité des récepteurs aux LDL. Des problèmes liés au faible taux de transduction d'hépatocytes primaires et probablement au choix des séquences régulatrices gouvernant l'expression du transgène persistent. Ce travail a cependant démontré la faisabilité et la bonne tolérance de l'approche de thérapie génique ex vivo pour le traitement de l'hypercholestérolémie familiale chez l'Homme.

CONCLUSIONS

Il est clair aujourd'hui que les premiers essais clinique de transplantation d'hépatocytes pour le traitement de déficits métaboliques d'origine hépatique ont démontré la faisabilité de cette approche, sa tolérance, son innocuité et sa pertinence [342]. Cependant, étant donné le caractère transitoire et partiel de la correction, le bénéfice clinique à long terme reste à démontrer. De plus, les rares essais cliniques de transplantation cellulaire déjà conduits ont montré qu'il restait de nombreux obstacles à surmonter avant de pouvoir appliquer cette technique chez l'Homme de façon efficace et à plus grande échelle. Le retour vers la recherche préclinique et le développement de nouveaux protocoles de transplantation cellulaire et génique (en utilisant des vecteurs viraux plus performants et avec l'amélioration de la prise de greffe), notamment chez le gros animal, a été indispensable ces dernières années.

CHAPITRE III

LES VECTEURS LENTIVIRAUX

Depuis plusieurs années, les approches de thérapie cellulaire pour le traitement de certaines maladies métaboliques du foie offrent la perspective de remplacer les cellules touchées par un déficit enzymatique en laissant intacte l'architecture hépatique. La transplantation d'hépatocytes génétiquement modifiés par un vecteur viral semble être une approche attrayante, surtout pour les déficits héréditaires, ayant l'avantage théorique d'être une procédure moins invasive que la transplantation hépatique orthotopique et qui ne nécessiterait pas une immunosuppression à vie. Certaines règles doivent être suivies lorsqu'il est question de créer un projet de thérapie génique à l'aide d'un vecteur viral, car l'utilisation d'un vecteur viral peut entraîner certains problèmes, parfois même fatals. Pour commencer, l'efficacité du vecteur utilisé pour le transfert génique doit être démontrée *in vitro*. Ensuite, l'étude devra montrer son efficacité et son innocuité *in vivo*, premièrement dans un modèle de petit animal et puis chez le grand animal, avant d'envisager son application chez l'Homme.

Quand un protocole de thérapie génique pour le traitement d'une maladie est mis au point, le choix du vecteur est primordial. Plusieurs paramètres importants doivent être pris en considération dans ce choix : la facilité de production et d'obtention de titres viraux, le besoin de transfert dans un type cellulaire spécifique, l'efficacité de transfert du gène, la capacité d'infecter les cellules quiescentes ou en prolifération, la durée d'expression du transgène, la nécessité d'intégration du transgène dans le génome de l'hôte, la toxicité du vecteur et enfin son immunogénicité. Tous ces paramètres doivent être méticuleusement étudiés et abordés car la moindre erreur sur l'un d'entre eux pourrait conduire à un échec. Aujourd'hui, le plus important obstacle de l'application de la thérapie génique dans la clinique est le développement de vecteurs sûrs et efficaces pour transférer le matériel génétique dans les cellules [343].

Plusieurs modèles de systèmes viraux de transfert de gènes existent, mais les adénovirus, les virus adéno-associés et les rétrovirus sont plus couramment utilisés pour la thérapie génique. Ce chapitre est centré sur les rétrovirus et plus spécialement

sur les lentivirus (du latin lentus, lent), une famille de rétrovirus principalement utilisés par notre équipe de recherche dans notre projet préclinique pour le traitement de l'hypercholestérolémie familiale. Les caractéristiques, les avantages ainsi que les récentes améliorations des lentivirus seront analysés. Enfin, leur rôle en thérapie génique ainsi que leurs applications en clinique seront discutés.

3.1 Les vecteurs rétroviraux

3.1.1 Généralités

Les rétrovirus (Retroviridae) constituent une famille hétérogène de virus à enveloppe, à développement exclusivement cellulaire, affectant les organismes vertébrés [344]. La réplication du génome des rétrovirus, molécule ARN monocaténaire, par un intermédiaire d'ADN double brin intégré dans le génome de la cellule hôte (provirus) constitue la spécificité des rétrovirus. Les vecteurs dérivés de rétrovirus se sont révélés comme très prometteurs pour la thérapie génique [345]. Il y a deux sous-familles de rétrovirus selon la classification du Comité International de Taxonomie des Virus: les orthorétrovirus (Orthoretrovirinae) et les spumarétrovirus (Spumaretrovirinae) [346]. Précédemment, sur la base de critères de pathogénicité, l'ancienne classification distinguait trois sous-familles : les rétrovirus oncolytiques (Oncovirinae, pouvant induire des sarcomes, carcinomes, lymphomes et leucémies), les lentivirus (Lentivirinae) et les spumavirus (Spumavirinae, virus non pathogènes qui provoquent infections inapparentes chez les animaux) [347]. Les lentivirus sont des virus pathogènes initialement isolés chez l'animal. Ils sont responsables d'immunodéficiences et des maladies neurodégénératives acquises à évolution lente. Les virus d'immunodéficience humaine de type 1 et 2 (Human Immunodeficiency Virus 1, VIH-1 ; Human Immunodeficiency Virus 2, VIH-2) appartiennent à cette famille [348-351].

3.1.2 Cycle cellulaire des rétrovirus

Les rétrovirus ont un cycle de réplication relativement simple (**Figure 13**). Sa compréhension a joué un rôle décisif dans le choix de ces vecteurs dans la thérapie génique. Le virion rétroviral pénètre dans la cellule par fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique de la cellule hôte. Au cours de la migration virale vers le noyau, la rétrotranscriptase virale (transcriptase inverse) transcrit le génome viral en ADN bicaténaire et linéaire au sein d'un complexe nucléoprotéique (complexe de pré-intégration). La reverse transcription comprend un mécanisme avec deux « sauts » moléculaires de la transcriptase inverse de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' de la matrice virale, aboutissant à la duplication des séquences situées aux extrémités de l'ARN viral. Ce mode de réplication a pour conséquence de produire un ADN viral double brin linéaire significativement plus long que le génome viral aux extrémités 5' et 3'. Les séquences répétées, en tandem, aux extrémités de l'ADN viral résultant de ce processus sont nommées « longues séquences répétées terminales » (Long Terminal Repeats, LTR).

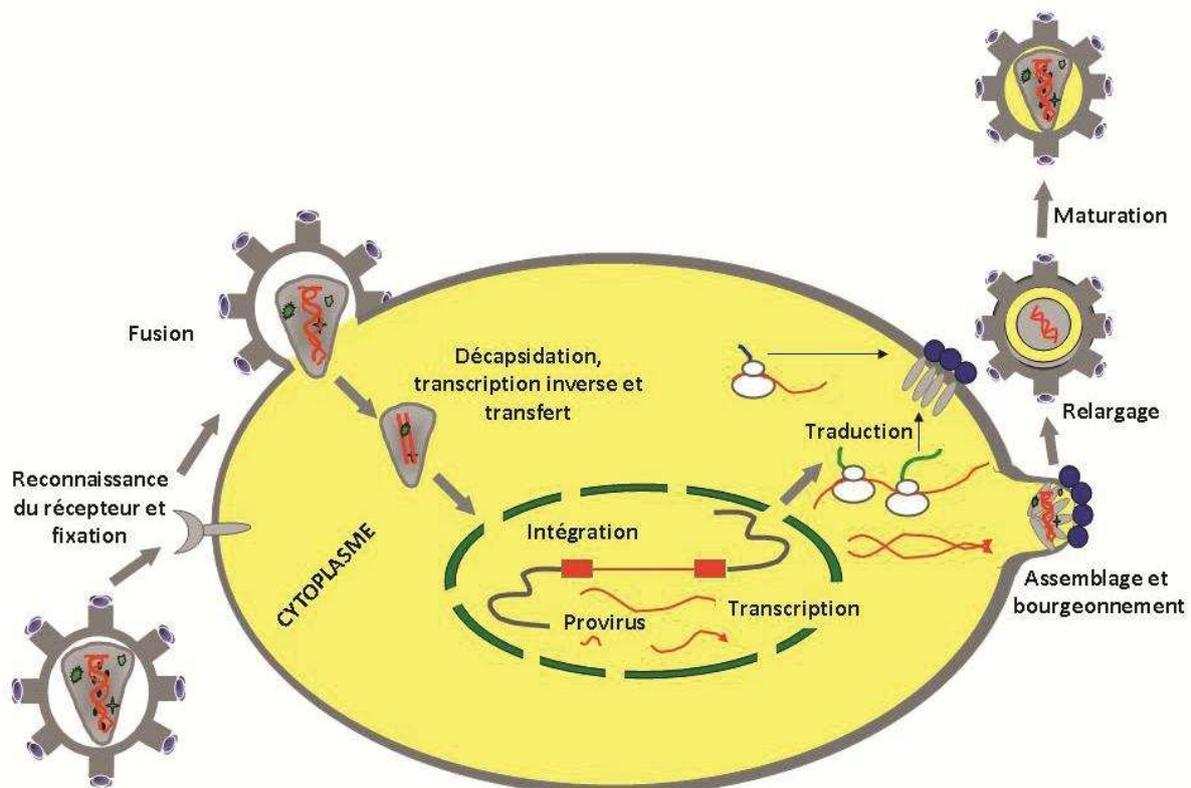


Figure 13. Cycle réplcatif des rétrovirus.

Les complexes proviraux pénètrent dans le noyau des cellules hôtes par deux mécanismes très différents. L'entrée nucléaire des oncorétrovirus simples se produit uniquement lorsque l'enveloppe nucléaire est désorganisée, elle est par conséquent dépendante de la prolifération des cellules hôtes. En revanche, certains rétrovirus complexes, comme les lentivirus, peuvent entrer dans le noyau de cellules en arrêt mitotique, par un mécanisme d'import actif à travers les pores nucléaires. Ces différences jouent un rôle très important sur le choix du type de vecteur rétroviral qui se fait en fonction de l'état du cycle cellulaire des cellules ciblées.

Après l'entrée dans le noyau, l'ADN rétroviral s'intègre et se maintient théoriquement indéfiniment dans le génome de la cellule hôte sous forme intermédiaire de provirus. A partir de la forme intermédiaire provirale le rétrovirus transcrit les nouveaux ARN viraux constituant à la fois l'ARN génomique et la matrice pour la synthèse des protéines de structure de la particule rétrovirale. Cette forme intermédiaire d'ADN mime les gènes du génome nucléaire des cellules hôtes et détourne la machinerie enzymatique d'expression génique de ces dernières pour l'expression de leur propre programme génétique. Les éléments de séquences rétrovirales agissant en cis, nécessaires au contrôle de la machinerie transcriptionnelle de l'hôte pour permettre l'expression génique à partir d'un provirus, sont situés dans les LTR proviraux. Les rétrovirus à génome complexe possèdent des facteurs additionnels agissant en trans jouant un rôle d'activateurs de la transcription provirale. Enfin, après synthèse des protéines virales dans le cytoplasme de la cellule hôte et l'assemblage de la particule rétrovirale, les virions sont libérés dans l'espace extracellulaire par bourgeonnement, sans destruction de la cellule.

3.1.3 Structure et organisation génomique des rétrovirus

Les particules rétrovirales ont une forme variable, allant d'une forme sphérique à une forme pléiomorphe. Les virions mesurent de 80 à 100 nm de diamètre. Ils sont constitués d'une enveloppe, d'une nucléocapside et d'une capsid. La capsid virale est entourée d'une bicouche lipidique, dérivée de la membrane plasmique de la cellule

hôte et dont la composition est proche de cette dernière. Cette membrane lipidique contient la glycoprotéine rétrovirale. La capside forme une coque protéique renfermant un complexe nucléoprotéique (nucléoïde) comportant le génome rétroviral. La capside contient le génome rétroviral diploïde, constitué de deux molécules d'ARN monocaténaire et de protéines régulatrices et à activité enzymatique, nécessaire à l'infection de la cellule hôte, propres à chaque rétrovirus. La taille des monomères d'ARN génomique varie selon les rétrovirus entre 7000 et 11000 nt.

Tous les rétrovirus possèdent trois gènes codant pour les protéines virales majeures : gag, pol et env. Gag code pour les protéines de structure du virion, formant la matrice, la capside et le complexe nucléoprotéique. Pol code pour les enzymes virales essentielles, comme la transcriptase inverse et l'intégrase. Enfin, env code pour la glycoprotéine de l'enveloppe virale (**Figure 14**).

Les rétrovirus à génome simple, dont le prototype est le virus de la leucémie de Moloney (Moloney Murine Leukemia Virus), ne contiennent que les gènes codant pour les protéines majeures. En revanche, les rétrovirus à génome complexe comme les lentivirus, dont le prototype est l'VIH-1, possèdent en plus des gènes accessoires et de régulation (**Figure 14**). L'expression de tous les provirus rétroviraux est régulée au niveau transcriptionnel par les séquences contenues dans les LTR, spécifiques à chaque rétrovirus. Après traduction des messagers viraux, les protéines virales synthétisées et les ARN génomiques, non épissés, sont assemblés dans les particules virales libérées dans le milieu extérieur par bourgeonnement à partir de la membrane plasmique.

3.2 Les lentivirus

3.2.1 Caractéristiques et structure des lentivirus

Les lentivirus sont constitués d'une famille de rétrovirus à génome complexe présentant des similitudes dans leur structure génétique, le cycle de répllication et les

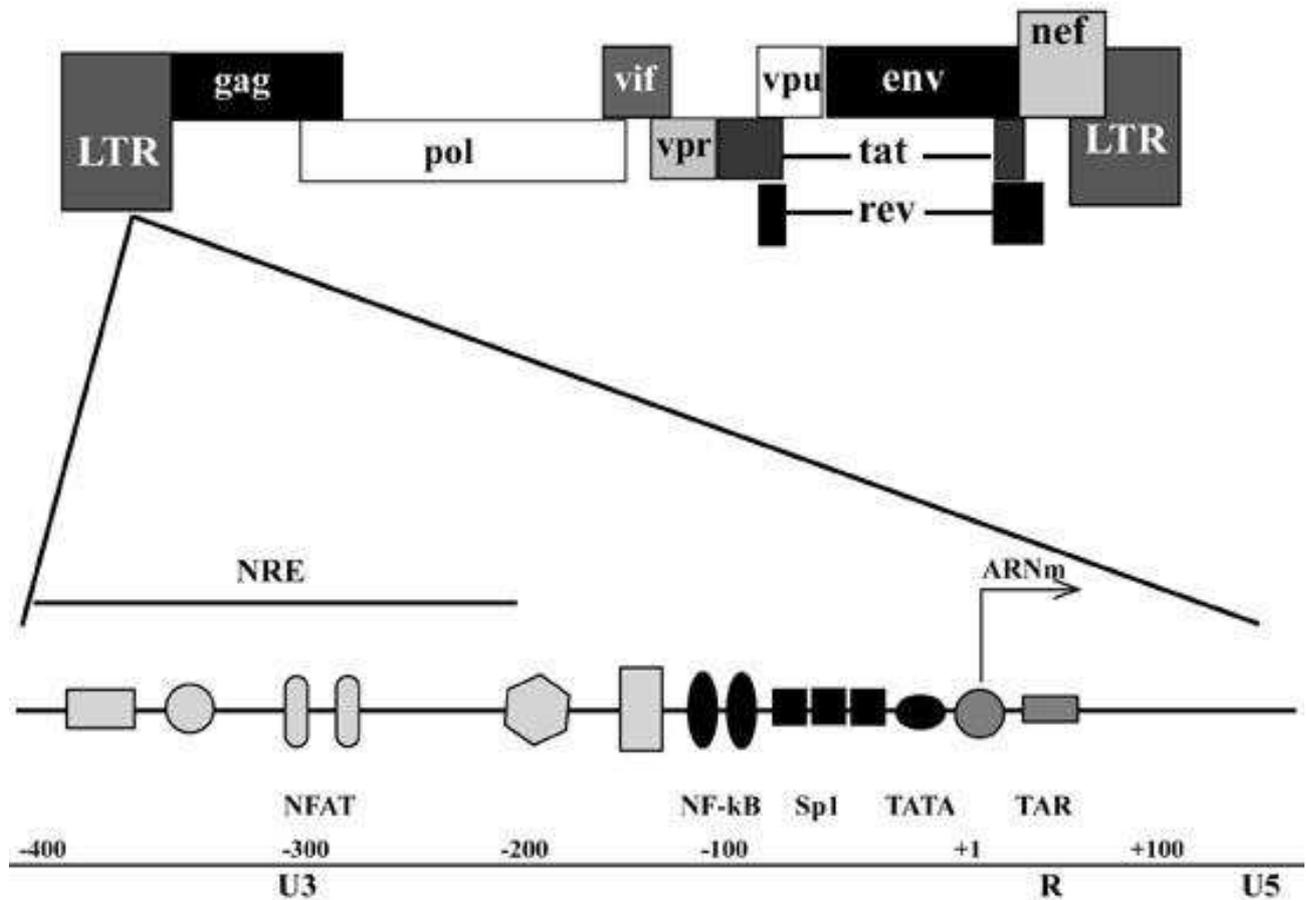


Figure 14. Organisation du génome du VIH-1 et de sa séquence LTR. gag (group specific antigen) : protéines de structure ; pol (polymérase) : transcriptase inverse, protéase, intégrase ; env (enveloppe) : Gp120, gp41 (fusion) ; tat (Transactivator) : régulateur positif de la transcription ; rev (regulator of viral expression) : export des transcrits non épissés hors du noyau ; vif (viral infectivity) : empêche la désamination de l'ADN viral ; vpr (viral protein R) : transport de l'ADN au noyau, augmente la production virale et contrôle le cycle cellulaire) ; vpu (viral protein U) : réduit l'expression du CD4 ; nef (negative-regulation factor) : augmente l'infectivité et réduit l'expression du CD4 (dans <http://archimede.bibl.ulaval.ca/archimede/fichiers/22933/ch02.html>).

interactions biologiques avec leur hôtes respectifs [316, 317]. Ils sont responsables du développement de maladies lentes et progressives chez leurs hôtes respectifs [316]. Chez l'homme, les lentivirus VIH-1 et VIH-2, affectant le système nerveux central et le système immunitaire, entraînent à long terme une neurodégénérescence et provoquent le Syndrome de l'Immunodéficience Acquise (SIDA) [348, 352, 353]. Il est étonnant que ces deux virus, le VIH-1 isolé et séquencé au début des années 1980

[348-350, 354, 355] et le VIH-2 isolé quelques années plus tard en Afrique de l'Ouest chez des patientes atteintes du SIDA [351, 356], soient très distincts en ce qui concerne leur séquence génomique [357, 358], la fonction de certaines de leurs protéines virales et dans leur pathogénicité [359-361].

Les vecteurs lentiviraux sont dotés de plusieurs caractéristiques les qualifiant d'excellents candidats pour les approches de thérapie génique chez l'Homme [362, 363] : large capacité de clonage, intégration stable dans le génome des cellules cibles, absence des réponses immunes et surtout infection des cellules quiescentes. Les premiers vecteurs lentiviraux ont été dérivés de VIH-1 [318, 364-366]. Cependant, même si les vecteurs dérivés de VIH-1 présentent un grand intérêt pour la thérapie génique, leur innocuité est une préoccupation majeure. Les risques potentiels de recombinaisons du virus et de génération subséquente de lentivirus pouvant se répliquer (Replication Competent Lentivirus) [362], ont mené au développement de vecteurs dérivés d'autres lentivirus [367-377]. Cependant, jusqu'à présent la majorité des systèmes lentiviraux de transfert de gènes ont été développés sur la base de VIH-1, car il est de loin le lentivirus le plus étudié et le mieux caractérisé [378, 379]. Aujourd'hui, plusieurs vecteurs dérivés de VIH-1 sont utilisés dans des essais cliniques pour différentes maladies, comme la β -thalassémie et l'adrénoleukodystrophie [380-382].

Les génomes des lentivirus, comme ceux de tous les autres rétrovirus, ont conservé les trois gènes gag, pol et env [317, 383]. Mais contrairement aux rétrovirus à génome simple, les lentivirus contiennent en plus une série de gènes régulant le cycle répliatif viral (tat et rev) et des facteurs de virulence variables selon les différents lentivirus (par exemple vpr, vif, vpu et nef pour VIH-1) (**Figure 14**).

Une des caractéristiques remarquables des lentivirus est leur capacité à infecter les cellules quiescentes [384-386]. Cette propriété en combinaison de leur intégration stable dans le génome nucléaire de la cellule hôte en a fait des outils très attractifs pour le transfert de gènes in vitro et in vivo [387, 388] dans différents types de cellules :

neurones, hépatocytes, myocytes [318, 389-391], cellules photoréceptrices de la rétine [392], cellules souches hématopoïétiques [318, 364, 366, 393-395], cellules pancréatiques [396], cellules de l'épithélium des voies respiratoires [397] ou plus récemment cellules souches embryonnaires [398-400]. Cette capacité des lentivirus à infecter d'une manière efficace les cellules quiescentes résulte notamment d'une spécificité du génome lentiviral : la présence d'une deuxième séquence polypurine en position centrale (central polypurine tract, cppt) en plus de celle présente à la limite 5' du LTR 3' commune à tous les rétrovirus. Cette séquence se situe à la région de pol codant pour l'intégrase de VIH-1 et d'autres lentivirus [355, 358, 401, 402]. Ce cppt crée, au cours de la transcription inverse du génome ribonucléique des lentivirus en ADN double brin, un deuxième site d'initiation de la synthèse du brin (+) [403, 404]. Cette étape différencie les lentivirus des autres rétrovirus. La synthèse discontinue du brin (+) de l'ADN proviral par la reverse transcriptase est initiée au niveau de deux tracts de polypurines [403-408]. Le brin (+) en amont, initié à partir du 3' ppt, est allongé jusqu'au cppt et par déplacement de la synthèse du brin jusqu'à un site voisin localisé 80 à 100 nt en aval, dénommé site de terminaison central (Central termination sequence, CTS). Le CTS est extrêmement efficace dans la terminaison d'élongation de l'ADN par la reverse transcriptase du VIH-1, alors que la reverse transcriptase fait seulement une pause au niveau du CTS, en absence de déplacement de la synthèse du brin [409-411]. L'étape se termine par un déplacement de la synthèse du brin d'environ 99 nucléotides au centre du génome, générant une structure d'ADN en triple hélice, avec des segments de deux brins positifs chevauchants, le troisième formant un battant (flap) [409, 412]. Même si il n'est pas essentiel pour la réplication de VIH-1 sauvage *in vivo* [413], la synthèse de ce flap central paraît importante pour la réplication de VIH-1 dans les cellules quiescentes, étant donné que les mutants altérant sa formation sont déficients pour la réplication [404, 409].

Cette structure en triple hélice est impliquée dans la translocation du complexe viral de préintégration du cytoplasme vers le noyau, à travers les pores nucléaires [414]. Le complexe de préintégration de VIH-1 peut pénétrer dans le noyau via les pores nucléaires par un mécanisme actif grâce à des signaux de localisation nucléaire [415-

419]. En effet, VIH-1 possède plusieurs signaux distincts, partiellement redondants, chacun individuellement ayant la capacité de diriger la translocation du complexe intermédiaire de préintégration à travers le pore nucléaire. Ce mécanisme d'import actif serait également le mécanisme principal d'import du complexe de préintégration dans les cellules en cycle [420].

3.2.2 Les vecteurs lentiviraux développés à partir de VIH-1

Le développement de vecteurs lentiviraux dérivés de VIH-1 a constitué un grand challenge. La pathogénicité de ce virus est très importante et il était nécessaire de créer des virus incompetents pour la réplication. Les vecteurs lentiviraux non réplcatifs de base sont dépourvus de tous les gènes lentiviraux. Le vecteur lentiviral contient les sequences cis régulatrices nécessaires au transfert de gènes : les LTR, le Ψ (signal d'encapsulation lentiviral), la séquence de réponse Rev (Rev Response Element, RRE), les tracts polypurines et l'unité de transcription transgénique. Les systèmes lentiviraux d'encapsulation apportent en trans les protéines virales, de structure et enzymatiques, requises à l'assemblage des particules virales non réplcatives fonctionnelles, dans les cellules productrices et les facteurs nécessaires à l'infection productive dans les cellules cibles.

3.2.3 Récentes améliorations des vecteurs lentiviraux

Une avancée très importante, qui a permis l'utilisation des lentivirus en sécurité, a été la génération des vecteurs lentiviraux « auto-inactivés » (Self-INactivating, SIN) dérivés de VIH-1. Ceci a été effectué dans deux laboratoires par délétion soit d'un segment de 133pb ou pratiquement la totalité de la région U3 (400pb) du LTR 3' du vecteur [421, 422]. De cette façon, l'activité transcriptionnelle du LTR qui pourrait être délétère si l'intégration provirale conduisait à la dérégulation involontaire de gènes cellulaires a été surpassée [423]. Les vecteurs lentiviraux de type SIN ne possèdent aucune activité transcriptionnelle à partir du promoteur situé dans le LTR 5' dans les cellules hôtes. En même temps, aucune perte significative dans les titres viraux n'a été observée. Ces résultats ont été un pas très important vers la construction de vecteurs sûrs et applicables en clinique. Les vecteurs lentiviraux de type SIN présentent aussi

un risque réduit d'activation insertionnelle d'oncogènes cellulaires [424]. Un dernier avantage de ces vecteurs est la possibilité de concevoir des lentivirus recombinants, dont l'expression est tissu-spécifique et régulée par des systèmes inductibles tétracycline-dépendants [425, 426].

L'efficacité d'expression des transgènes codant pour les protéines thérapeutiques est une condition primordiale pour la réussite des approches de thérapie génique. Pour atteindre cet objectif, des éléments cis régulateurs, intervenant soit au niveau de la transcription, soit au niveau des modifications post-transcriptionnelles de l'ARN dans le noyau ou le cytoplasme ou bien sur la demi-vie et l'activité de la protéine exprimée, peuvent être incorporées dans le vecteur. Trois types de modules cis-régulateurs ont montré une importance particulière : i) les sites d'épissage (placés en amont de la région non traduite et qui promettent l'export de l'ARNm et sa traduction) [427-431] ; ii) les éléments d'export nucléaire d'ARN rétroviraux (constitutive RNA transport elements) [432-436]; iii) les éléments de régulation post-transcriptionnelle des virus de la famille hepadnavirus (hepadnaviral posttranscriptional regulatory element), comme le Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element (WPRE) qui permet d'une façon très efficace d'augmenter significativement l'expression des transgènes en agissant indépendamment de la transcription ou de l'épissage et pourrait améliorer l'expression du transgène par modification de la polyadénylation, l'export nucléaire de l'ARN ou sa traduction [437-439].

Un autre objectif principal de la thérapie génique hépatique, en particulier *in vivo*, est l'expression tissu-spécifique du transgène thérapeutique. Le transfert de gène sélectif peut être atteint par la transduction spécifique des hépatocytes par un virus portant une protéine d'enveloppe permettant la reconnaissance de récepteurs à la surface des cellules parenchymateuses [440] ou bien en utilisant un virus recombinant dérivé d'un virus hépatotrope [441]. Pour les lentivirus, dont le tropisme naturel n'est pas hépatique, les deux stratégies envisageables sont la substitution de la protéine d'enveloppe par une protéine enveloppe hétérologue d'un virus hépatotrope ou alternativement le ciblage de l'expression transgénique au niveau transcriptionnel avec

des promoteurs hépatospécifiques. Aujourd'hui, cette dernière stratégie est l'option de choix pour obtenir une expression hépatospécifique du transgène. Initialement, des promoteurs viraux ont été utilisés pour exprimer les transgènes [442]. Mais si ce promoteur était exprimé *in vitro*, il était rapidement réprimé *in vivo* [443, 444]. L'activité de promoteurs viraux initialement étudiés était très hétérogène et l'expression du transgène a été souvent atténuée ou même éteinte à long terme *in vivo* [443, 445-448]. C'est pourquoi d'autres promoteurs ont été évalués pour leur capacité à maintenir l'expression des transgènes *in vivo* de manière hépatospécifique. Les deux promoteurs privilégiés initialement ont été le promoteur du gène de l'albumine [89, 321] et le promoteur du gène codant pour l'A1AT humaine [449-451]. D'autres promoteurs hépatospécifiques présentent également un intérêt potentiel, comme celui du gène humain de l'apolipoprotéine AII (apoAII) [452], de l'hémopexine [445], le gène de la transthyrétine murine [88] et les promoteurs de cytochromes P450 humains et murins [453].

Un problème majeur qui a émergé après les premiers protocoles cliniques de thérapie génique a été le risque de mutagenèse insertionnelle. La survenue de deux événements particulièrement graves en 2002 et 2003 a entraîné la suspension temporaire de nombreux protocoles de thérapie génique en cours à travers le monde. Deux enfants traités dans le cadre du protocole de thérapie génique pour l'immunodéficience sévère combinée de type 1 liée au chromosome X (X-linked Severe Combined Immunodeficiency Type 1, X-SCID-1) mené à l'hôpital Necker de Paris ont présenté des symptômes de syndrome lymphoprolifératif aigu, liés au transfert de gènes [454-456]. Deux ans après l'annonce de ces deux premiers cas, alors que d'autres essais analogues se déroulaient en parallèle en Grande Bretagne et aux Etats-Unis, et que par ailleurs aux Etats-Unis le procès concernant le jeune homme décédé cinq ans plus tôt au cours de l'essai de thérapie génique pour le déficit en OTC se terminait [121], le groupe de Paris a annoncé avoir diagnostiqué un troisième cas de leucémie résultant également du transfert de gènes [457]. Ce fut les premiers cas de transformation maligne iatrogène. L'analyse des clones lymphoblastiques des deux premiers cas de leucémie a émis l'hypothèse qu'ils résultaient d'événements de mutagenèse

insertionnelle dans le locus LMO2, un facteur de transcription nécessaire à hématopoïèse normale [458-461]. Si le premier cas de leucémie dans l'essai clinique Parisien a été considéré comme un incident isolé [462], l'annonce du deuxième cas a eu un impact retentissant au niveau international. Tous les essais cliniques similaires en cours en Europe et en Amérique du Nord ont été immédiatement suspendus [463-465]. Même si aucun effet indésirable n'a été observé dans les essais cliniques similaires pour le traitement d'une autre forme de SCID (ADA-SCID) [466] ce revers a soulevé de sérieuses inquiétudes concernant l'innocuité de cette approche [467]. Jusqu'à l'annonce de deux cas de leucémie, 9 sur 11 malades traités étaient considérés comme guéris [463]. La survenue des leucémies était en partie surprenante car aucune étude préclinique utilisant cette approche chez l'animal n'avait constaté une tendance à l'oncogenèse. Ces événements ont eu un impact global très négatif vis-à-vis de la thérapie génique. A cette même époque il a été découvert qu'encore un enfant traité dans le cadre de ce protocole clinique, ne présentant aucune pathologie clinique, portait la même intégration rétrovirale dans le locus LMO2 [468]. En 2004, l'essai clinique a repris en France et aux Etats-Unis avec des précautions supplémentaires et un suivi plus strict des patients [469]. Les trois cas de transformation maligne iatrogène, ont clairement illustré le risque de mutagenèse insertionnelle due à l'intégration de vecteurs rétroviraux, menant à la réévaluation des données expérimentales des essais précliniques et cliniques impliquant des vecteurs rétroviraux. Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont été conduites depuis et ont éclairci le problème de mutagenèse insertionnelle [470-477]. L'intégration préférentielle des vecteurs de type MLV dans les régions proches des promoteurs augmenterait le risque d'oncogenèse pour plusieurs raisons [478]: le vecteur pourrait interagir directement avec un promoteur ou une séquence régulatrice et ainsi modifier l'expression du gène ; le promoteur rétroviral pourrait lui-même contrôler l'expression du gène ; l'intégration du vecteur pourrait modifier la structure locale de la chromatine et ainsi influencer indirectement l'expression du gène. En revanche, les lentivirus recombinants, dont l'intégration se fait sans une préférence particulière pour les régions d'initiation de la transcription, seraient moins prédisposés à la mutagenèse insertionnelle. Ces études ont montré que l'intégration des vecteurs dérivés des oncorétrovirus et des lentivirus

pouvait conduire à une mutagenèse insertionnelle mais celle-ci n'entraînerait pas forcément une prolifération cellulaire maligne. Une explication a été proposée par le groupe de Claudio Bordignon [479]. Les intégrations interférant avec le fonctionnement normal des cellules seraient délétères, plutôt que de promouvoir une expansion clonale *in vivo*. En outre, il serait également important d'évaluer non seulement les effets de l'intégration provirale, mais aussi les effets secondaires de l'expression du transgène [480]. D'autre part, le vecteur serait soumis à l'influence de son environnement qui pourrait perturber son fonctionnement. Il est important de rechercher des approches permettant d'isoler le vecteur de son environnement et cela indépendamment de son site d'intégration. Les insulateurs sont des séquences d'ADN régulatrices, agissant *in cis*, dont le rôle est de protéger l'activité d'un promoteur de l'interférence des éléments de régulation environnants [481]. Ils ont été identifiés dans différents espèces [482, 483]. Parmi les insulateurs connus le plus étudié est le cHS4 du Locus Control Region (LCR) du gène de la β -globine de poulet [483]. L'étude de ce LCR a permis d'identifier des segments de quelques centaines de kilobases suffisantes pour attribuer une protection contre l'extinction du transgène à long terme *in vitro* [484]. C'est pourquoi plusieurs équipes ont eu recours aux insulateurs dans un contexte rétroviral ou lentiviral *in vitro* et *in vivo* [400, 485-488]. L'élément de séquence cHS4 du LCR de la globine de poulet possède deux propriétés définissant un insulateur : il prévient l'effet d'un enhancer externe sur un promoteur, lorsqu'il est placé entre les deux, et il forme une barrière contre l'effet de position sur le chromosome lorsqu'il encadre le gène rapporteur intégré.

3.2.4 Les vecteurs lentiviraux dans la thérapie génique du foie

Les hépatocytes primaires adultes de nombreuses espèces de mammifères – rat [489-491], souris [320, 321, 492], lapin [58], porc [493, 494] – et de l'Homme [490, 495] ainsi que des cellules progénitrices hépatiques humaines [496] et de rat [491] comptent parmi les nombreux types de cellules primaires permissives à la transduction par des lentivirus recombinants dérivés de VIH-1. Cette caractéristique des vecteurs lentiviraux combinée à leur capacité d'intégration stable dans le génome des cellules transduites a favorisé le développement et la mise au point de nombreux protocoles de transduction

d'hépatocytes *in vivo*. Mais initialement les conclusions des diverses études sur la transduction des hépatocytes *in situ* par les vecteurs lentiviraux étaient controversées. Tandis que certains résultats laissaient penser que la transduction efficace des hépatocytes *in vivo* nécessiterait leur mise en cycle [497] et que la séquestration des particules lentivirales par les cellules de Kupffer [498] handicaperait une telle approche, l'équipe de Luigi Naldini a montré un niveau élevé de transduction d'hépatocytes de souris après administration systémique de lentivirus [321]. Mais cette équipe a également mis en évidence la transduction de cellules hépatiques non parenchymateuses et une dissémination systémique des particules virales, en particulier dans la rate et la moelle osseuse. Ultérieurement, ils ont montré que l'expression ubiquitaire de transgènes, soit à localisation intracellulaire (GFP ; Green Fluorescent Protein) soit exprimant une protéine sécrétée dans la circulation générale (hFIX), après administration systémique chez l'animal immunocompétent était limitée par l'induction d'une réponse immune de type humorale et cellulaire spécifique au transgène. La mise en place de cette réponse immune menait à l'élimination progressive des cellules transduites dans le cas de la GFP ou du produit du transgène comme hFIX, lorsque celui-ci est excrété dans la circulation [499]. L'expression hépatospécifique a limité la réponse immune dans les deux cas (GFP et hFIX) permettant l'expression stable du transgène. Parmi les explications avancées étaient la faible expression des transgènes dans les cellules présentatrices d'antigènes ou un effet tolérogène induit par l'expression hépatospécifique du transgène [500, 501]. La protection conférée par l'expression hépatospécifique était toutefois incomplète. Une variabilité inter-souche et inter-individu a été observée. Ainsi, un promoteur hépatospécifique n'a pas empêché une réponse immunitaire cytotoxique éliminant les hépatocytes transduits. Une fuite de l'expression du transgène à partir du promoteur hépatospécifique dans les cellules présentatrices d'antigènes serait responsable de l'induction d'une réponse immune. Les risques potentiels de dissémination systémique non contrôlée du lentivirus suggèrent que le développement d'approches de thérapie génique *ex vivo* serait préférable pour le foie, afin de permettre la transduction sélective d'hépatocytes et pour diminuer le risque d'une réponse immunitaire contre le transgène consécutive à la transduction accidentelle des cellules de Kupffer *in vivo*.

Cette approche a été utilisée par quelques équipes dans le cadre des projets pour le traitement des MMHH.

CONCLUSIONS

Actuellement, les vecteurs lentiviraux s'imposent comme les vecteurs de référence et sont largement utilisés dans des applications nécessitant une expression stable du transgène à long terme. Les perspectives de développement comprennent entre autres la mise au point de méthodes de production de lentivirus à grande échelle, la mise au point des stratégies d'intégration ciblée des lentivirus et l'amélioration de l'expression ciblée des vecteurs lentiviraux *in vivo*. Au cours des dernières années, l'intérêt pour les vecteurs lentiviraux dans de nombreux modèles de thérapie génique n'a pas faibli, notamment dans les modèles de traitement des maladies héréditaires comme les β -thalassémies [502], la maladie de Fabry [503], la mucopolysaccharidose de type I [504], le syndrome de Crigler-Najjar de type I [505] ou les dystrophies musculaires [506].

Des vecteurs lentiviraux sont même récemment entrés en application clinique. Les procédures de production, de purification et les tests de biosécurité des lentivirus recombinants ont été adaptés aux normes GMP (Good Manufacturing Practices) et ont été finalement approuvés par les autorités sanitaires américaines [507, 508]. Mais pour l'instant les études impliquant des lentivirus se sont généralement arrêtées à un niveau préclinique et les premiers essais cliniques – essai de phase I/II anti-VIH de VIRxSYS aux Etats-Unis [509], essai de phase I/II pour les hémoglobinopathies (β -thalassémie/drépanocytose) de Genetix Pharmaceuticals à Paris [380, 381], essai phase I/II pour l'adrénoleucodystrophie liée au chromosome X à l'hôpital de Saint-Vincent de Paul à Paris [382, 510] – pourront éventuellement démontrer l'intérêt réel et le potentiel de vecteurs lentiviraux en thérapie génique clinique.

CHAPITRE IV

TRANSPLANTATION D'HEPATOCYTES : MOYENS D'AMELIORATION DE LA PRISE DE GREFFE HEPATOCYTAIRE

L'efficacité limitée de la transplantation d'hépatocytes isolés dans le traitement des MMHH semble liée au faible pourcentage de la masse hépatocytaire reconstituée par les hépatocytes définitivement greffés et fonctionnels. Ce faible pourcentage d'hépatocytes transplantés fonctionnels explique en partie les résultats incomplets détaillés dans le chapitre II de l'introduction. Dans la majorité des cas, une amélioration clinique transitoire a été parfois observée ainsi que des résultats métaboliques incomplets [281, 284, 290]. Parallèlement aux premiers essais cliniques, de nombreux modèles animaux ont été développés pour étudier les facteurs pouvant augmenter le pourcentage d'hépatocytes greffés. Ces modèles se sont développés selon trois axes : i) induction de la prise de greffe par une importante lésion hépatique ; ii) manipulations génétiques visant à augmenter la capacité de prolifération d'hépatocytes destinés à la transplantation ; iii) moyens d'induction de régénération hépatique suffisante pour améliorer la prise de greffe des cellules transplantées. Il a été même souvent nécessaire d'utiliser une combinaison de ces techniques pour induire une prise de greffe hépatocytaire [511, 512]. La totalité de ces expériences ont fait remarquer le rôle essentiel de la régénération hépatique pour la réussite de la transplantation d'hépatocytes et ont aussi conduits à l'émergence de deux notions fondamentales de cette approche : « l'espace physiologique » et « l'avantage sélectif » [278, 513].

4.1 Induction de la prise de greffe hépatocytaire par une importante lésion du foie receveur

Plusieurs modèles visent à détruire ou à léser les hépatocytes natifs et créer ainsi un « espace physiologique » pour le développement des hépatocytes transplantés. Certains modèles associent la destruction des hépatocytes natifs à une stimulation de la régénération hépatique et une augmentation de la prise de greffe hépatocytaire. Cependant, ces modèles ne sont en aucun cas transposables chez l'Homme.

4.1.1 Modèles de destruction physique et/ou chimique

L'induction d'une toxicité hépatocytaire aiguë du foie receveur par l'utilisation du tetrachlorure de carbone (CCl₄) crée un « espace physiologique » pour le développement des hépatocytes transplantés et favorise ainsi leur prolifération [514, 515]. Dix jours après la transplantation d'hépatocytes isolés dans des foies de souris traitées au CCl₄, leur nombre était 4 fois plus élevé que chez les souris contrôles [516]. Ceci était bien le résultat de la multiplication des hépatocytes transplantés car leur nombre était initialement identique dans les deux groupes. L'utilisation de phénobarbital associée au CCl₄ induit une cirrhose avec une insuffisance hépatocellulaire chronique. Dans ces conditions, la transplantation d'hépatocytes isolés a permis chez le rat une amélioration des fonctions métaboliques et une prolongation de la survie des animaux ayant une cirrhose décompensée irréversible [517]. D'autres agents ont été étudiés comme les rayons X. Le préconditionnement du foie receveur par la radiothérapie seule ou associée à une hépatectomie [518] ou à une ischémie hépatique transitoire [519] a montré une amélioration des résultats de la transplantation d'hépatocytes dans ces modèles animaux.

4.1.2 Inhibition du cycle cellulaire des hépatocytes natifs

La rétroisine est un alcaloïde qui provoque un arrêt de la prolifération des hépatocytes en phase G₂ et G₂/M tout en maintenant leur potentiel métabolique [520]. Le blocage de la prolifération des hépatocytes de l'hôte permet de « défavoriser » ceux-ci en présence d'un stimulus de la régénération hépatocytaire. Des rats recevant la rétroisine survivent ainsi à une hépatectomie de 70% tout en créant un stimulus régénératif exclusivement dirigé vers les cellules transplantées. En deux mois, à partir d'une transplantation de 1 à 2 millions d'hépatocytes positifs pour la protéine CD26 dans des rats déficients pour la même protéine, 40 à 60% d'hépatocytes étaient remplacés par les cellules transplantées chez des rats femelles et plus de 95% chez les mâles [521]. Il est donc possible de repeupler le foie grâce un système impliquant un inhibiteur de mitose et un stimulus régénératif. L'utilisation simultanée de la rétroisine et d'une destruction chimique du foie receveur par du CCl₄ chez la souris ou le rat [511] provoque aussi une destruction des hépatocytes natifs et un blocage de leur

prolifération. Cette association a permis une prolifération principalement des hépatocytes transplantés et la repopulation par ces derniers de 50 % du foie receveur [512]. Une autre association utilisée est celle de la rétrovirus avec des hormones ou des facteurs de croissance. Ainsi l'hormone T3 a démontré son potentiel de stimulation de la repopulation de foies de rats traités par la rétrovirus en remplaçant en partie le rôle de l'hépatectomie [522]. Récemment, une équipe japonaise a montré que des cellules souches ou des cellules progénitrices hépatiques transplantées chez des rats traités par la rétrovirus pouvaient se différencier en hépatocytes matures et conduire à une repopulation partielle du foie [523].

4.2 Manipulations génétiques

Il s'agit des modèles expérimentaux qui confèrent un « avantage sélectif » aux hépatocytes transplantés. Ces modèles soit imitent certaines MMHH soit visent à augmenter la capacité de prolifération d'hépatocytes destinés à la transplantation. Toutefois, ils ne peuvent pas être appliqués chez l'Homme.

4.2.1 Modèles de « génotoxicité » du foie receveur

Ce sont principalement les modèles animaux correspondant à certaines maladies métaboliques héréditaires du foie humain. De nombreux modèles de souris transgéniques ont permis d'établir la notion que les hépatocytes adultes transplantés ne proliféraient que dans des situations où ils avaient un avantage sélectif/prolifératif sur les hépatocytes résidents [524]. Les souris *mdr2*^{-/-} sont le modèle animal de la cholestase intrahépatique familiale progressive. L'absence de sécrétion des phospholipides dans la bile de ces animaux provoque une toxicité hépatocytaire. La transplantation d'hépatocytes *mdr2*^{+/+} permet une repopulation stable de 21% du foie des souris *mdr2*^{-/-} et permet ainsi un rétablissement de la sécrétion de phospholipides [525]. Les souris déficientes pour la FAH, modèle de la tyrosinémie de type I, ont été utilisées par plusieurs équipes pour étudier la localisation des hépatocytes transplantés et suivre le repeuplement du foie par les hépatocytes FAH⁺ [225, 227]. La transplantation de seulement 1000 hépatocytes « corrigés » a permis la reconstitution

du foie déficient prouvant ainsi que les hépatocytes transplantés possèdent un important avantage prolifératif par rapport aux hépatocytes natifs. Sandgren et al. [526] ont développé en 1991 un modèle de souris transgéniques en introduisant le gène de l'urokinase (uPA) sous contrôle du promoteur de l'albumine, souris Alb-uPA. Ces animaux mourraient de saignements incontrôlés et leur foie présentait des signes d'inflammation, de nécrose et un faible nombre d'hépatocytes matures. Cette équipe a démontré la repopulation du foie de ces souris par des hépatocytes normaux [527]. La même équipe a par la suite prouvé la complète reconstitution du foie de souris Alb-uPA immunodéficientes par la xénotransplantation d'hépatocytes de rat [528].

4.2.2 Augmentation de la compétitivité des hépatocytes transplantés

Certaines études ont visé à augmenter la capacité de prolifération des hépatocytes destinés à la transplantation. L'amélioration du potentiel prolifératif des hépatocytes transplantés les rend plus compétitifs par rapport aux hépatocytes natifs. Le gène $p27^{Kip1}$ est un régulateur de kinases cycline-dépendantes et joue un rôle de régulation négative de la prolifération cellulaire. L'utilisation des hépatocytes provenant de souris knock-out pour le gène $p27^{Kip1}$ a montré un niveau élevé d'activité de synthèse d'ADN de ces hépatocytes en culture. La transplantation de ces hépatocytes isolés montre une meilleure prolifération in vivo et un repeuplement du foie suffisant pour prévenir une insuffisance hépatique chez des souris FAH [529].

Une équipe française a utilisé des hépatocytes de souris transgéniques pour le gène Bcl2 et donc résistants lors de leur transplantation dans un foie de souris ayant des injections hebdomadaires d'un anticorps agoniste Fas dans le but d'induire une apoptose massive du foie. Les hépatocytes endogènes sont donc lésés et les hépatocytes transplantés sont résistants grâce à l'expression de Bcl2. Cette étude a donné aux hépatocytes transplantés un avantage sélectif par rapport aux cellules endogènes permettant une repopulation du foie de l'ordre de 10 à 16% [530].

4.3 Moyens d'induction d'une régénération hépatique et d'une amélioration de la prise de greffe hépatocytaire

La capacité remarquable de régénération du foie suite à une lésion est connue depuis des siècles [531]. Dès l'Antiquité, cette capacité était mentionnée dans la mythologie grecque à travers la punition infligée au Titan Prométhée par Zeus pour avoir dérobé le « savoir divin » (le feu sacré de l'Olympe) et l'avoir transmis à l'humanité et ainsi nous avoir enseigné la civilisation et les arts. Prométhée fut enchaîné par Héphaïstos à un rocher au sommet du Mont Caucase, exposé aux rayons brûlants du soleil où un aigle (ou un vautour, selon les sources) lui dévorait le foie avant de s'envoler à la tombée de la nuit (**Figure 15**). Selon le mythe, le foie régénérait en une nuit seulement, renouvelant ainsi de jour en jour le calvaire du supplicié, jusqu'à ce qu'Hercule le délivre de nombreuses années plus tard [532].

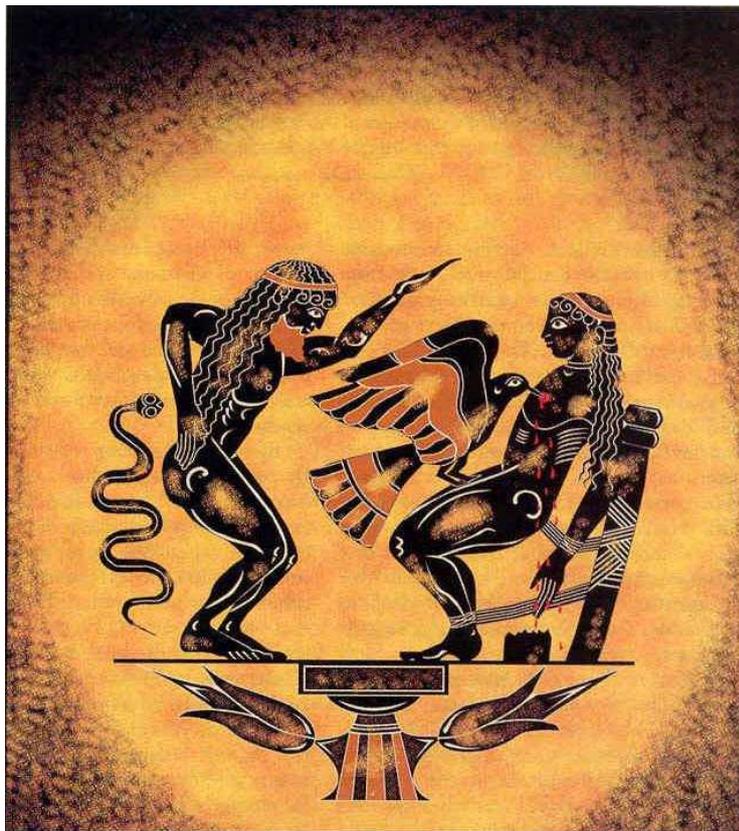


Figure 15. Illustration retrouvée sur un vase ancien représentant le mythe de Prométhée.

La régénération hépatique est la capacité du foie à reconstituer sa masse tissulaire et sa fonction hépatique après une agression telle qu'un traumatisme, une résection partielle ou une occlusion portale. Cette régénération ne se fait pas dans le sens d'une reconstitution anatomique de la partie lésée mais plutôt d'une reconstitution de la masse hépatocytaire globale initiale dans le but d'une normalisation de la fonction hépatique. Après une hépatectomie partielle par exemple, le lobe réséqué du foie ne se reconstitue pas; à la place, le tissu hépatique résiduel s'hypertrophie pour retrouver le volume total initial [533, 534]. Le volume hépatique optimal est prédéterminé et finement régulé [238, 535]. Une fois ce volume atteint, la régénération s'arrête. Il est intéressant de noter que dans une transplantation hépatique orthotopique chez l'Homme, le greffon régénère rapidement s'il est de petite taille, alors qu'il s'atrophie s'il est de trop grand volume par rapport au receveur. Le foie est ainsi capable de retrouver son volume optimal par rapport à la masse corporelle et ceci par un équilibre entre d'une part la synthèse d'ADN et les mitoses et d'autre part probablement par l'apoptose.

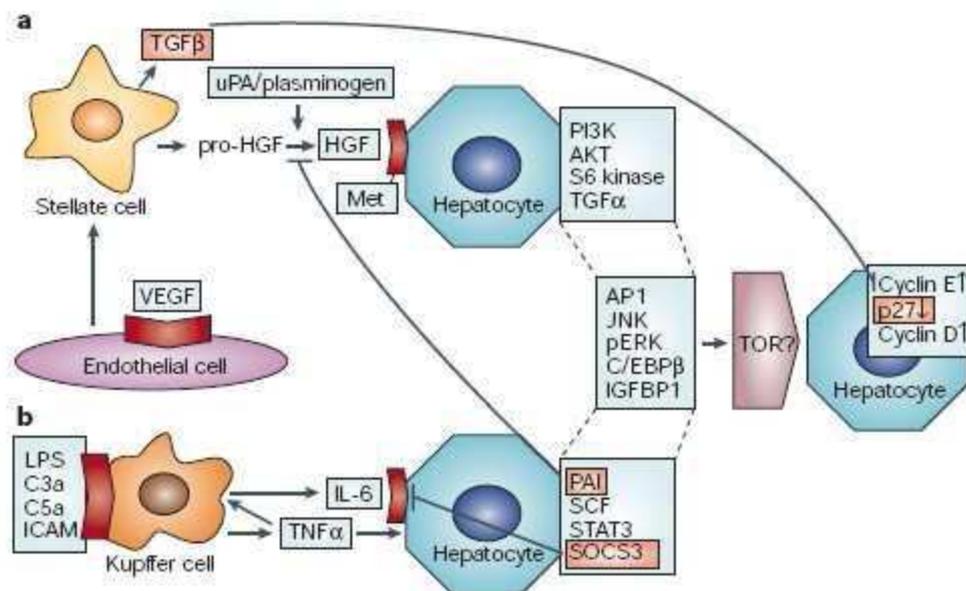


Figure 16. Schéma récapitulatif de la régénération hépatique avec les différents facteurs de croissance et cytokines activés et impliqués.

Cette régénération se déroule en plusieurs phases se succédant sur un mode de cascade orchestrée par le relargage de cytokines, de facteurs de croissance puis d'inhibiteurs (**Figure 16**) sans que les mécanismes impliqués dans l'arrêt de croissance ne soient complètement élucidés [533, 536-541].

La régénération hépatique débute avec la phase d'initiation ou d'induction. La majorité des hépatocytes sont à l'état de base quiescents et requièrent une « amorce » pour déclencher leur division. Un certain nombre de facteurs impliqués dans la régénération sont présents dans la circulation, même lorsque celle-ci n'est pas stimulée, suggérant que les hépatocytes ne réagissent pas à ces facteurs que lorsqu'ils sont initiés. Cette première étape est commandée par une série de gènes, qui agissent dans les minutes suivant l'hépatectomie. Précocement au cours de cette première phase, le relargage de certaines cytokines induit une activation génique appropriée. Les cellules de Kupffer secrètent le Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), ainsi que l'Interleukine 6 (IL6) [542-544] (**Figure 17**). Le TNF- α se retrouve rapidement en grande quantité dans le sang suivi par l'IL6. Chez des souris invalidées pour le gène du récepteur au TNF- α , une hépatectomie partielle induit une sévère insuffisance hépatique due à un manque de régénération [545, 546]. Seule l'injection d'IL6 permet de restaurer un phénotype normal. Le TNF- α induit l'activation d'un facteur de transcription, le NF- κ B qui cible le gène de l'IL6 dans les cellules de Kupffer. L'IL6, ainsi produite, se retrouve dans le sang à de fortes concentrations et induit l'activation de STAT3. Chez les souris invalidées IL6^{-/-}, la régénération est anormale au niveau de son amplitude qui est 4 à 5 fois plus faible, de plus l'activation du facteur STAT3 est réduite ce qui démontre son implication dans la mise en cycle des hépatocytes [547].

La phase suivante de régénération hépatique, phase de progression ou de régénération proprement dite, est dépendante de la synthèse de facteurs de croissance. Les molécules les plus importantes sont l'Epidermal Growth Factor (EGF), le Transforming Growth Factor- α (TGF- α) et l'Hepatocyte Growth Factor (HGF) [548] (**Figure 18**).

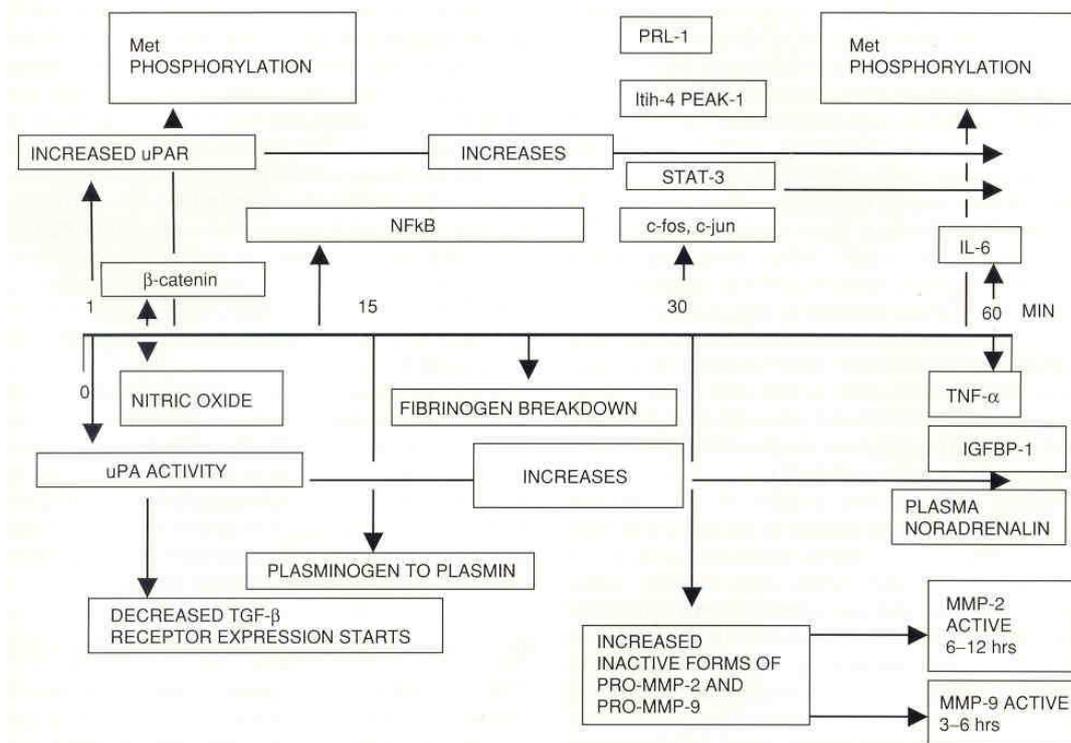


Figure 17. Événements survenant dans les premières 60 minutes après hépatectomie partielle (d'après Mangnall et al, Liver Int 2003 [548]).

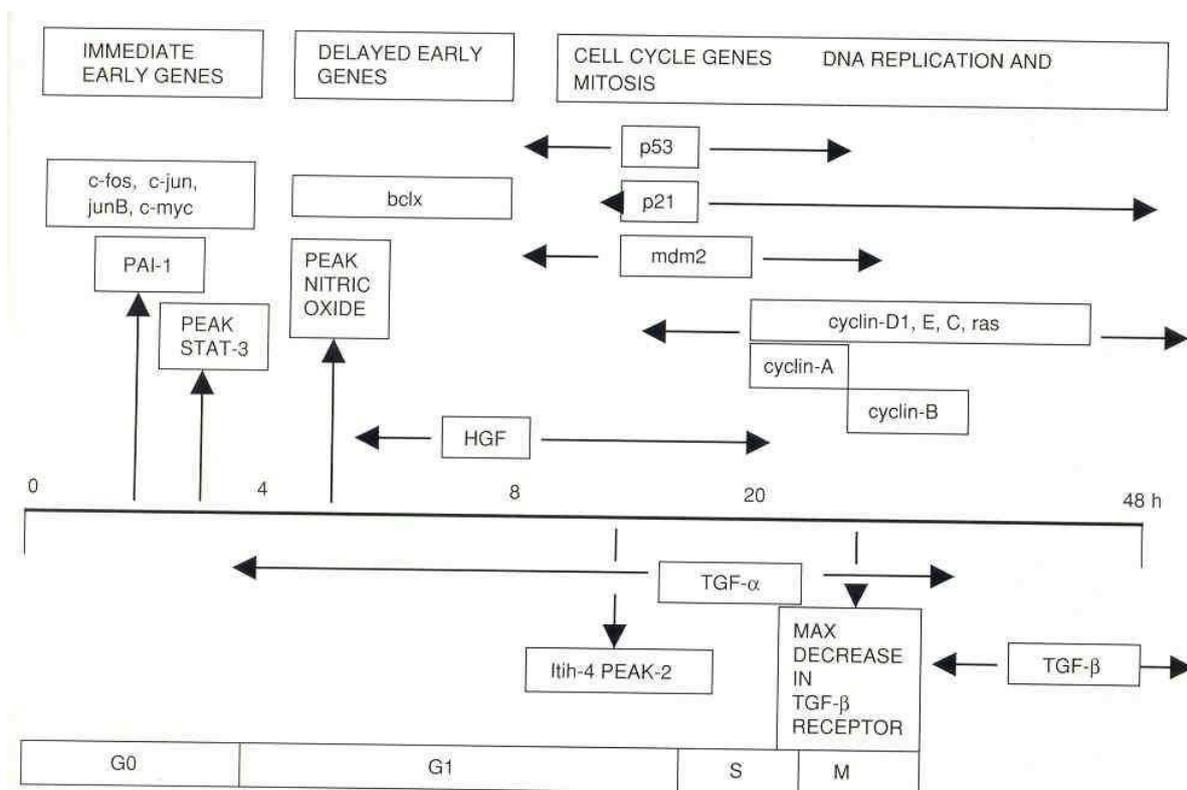


Figure 18. Événements survenant entre 1 et 48 heures après hépatectomie partielle (d'après Mangnall et al, Liver Int 2003 [548]).

Le récepteur à l'EGF serait présent sur tous les types cellulaires hépatiques et son nombre doublerait quelques heures après une hépatectomie. L'EGF serait donc un des premiers facteurs actifs dans la régénération hépatique [549]. L'EGF semble initier le processus de réplication des hépatocytes et accentuer l'action du TGF- α dont la production semble être induite par le TNF- α . Le TGF- α est synthétisé sous forme d'un précurseur de 160 acides aminés dans les hépatocytes et fonctionne de façon autocrine. Il est donc assimilé à un pseudo récepteur avant d'être clivé en une forme active de 50 acides aminés. Il présente une homologie de 30% avec l'EGF et se fixe donc sur le récepteur à l'EGF avec une affinité 4 à 5 fois plus faible. Cependant, son action sur la réplication de l'ADN des hépatocytes est supérieure à celle de l'EGF [550, 551]. L'HGF est principalement produit par les cellules de Ito mais aussi par les cellules de Küpffer et les cellules endothéliales [552]. Dans les premières heures suivant l'hépatomie, la concentration d'HGF et d'urokinase plasmatique augmentent rapidement. L'urokinase peut ainsi se fixer à son récepteur présent sur les hépatocytes. Sa concentration est maximale une heure après hépatectomie chez le rat [548]. Cette liaison entraîne une activation du plasminogène en plasmine qui active à son tour des métalloprotéases telles que la collagénase qui dégradent la matrice extracellulaire pour relarguer de nombreuses protéines. Ainsi, l'HGF séquestré est libéré, ce qui permet un clivage de ses monomères pour former de l'HGF actif [553]. Ce dernier induit l'expression de son propre récepteur c-met et de celui de l'urokinase dans les hépatocytes ce qui permet une amplification du signal.

La régénération hépatique sans contrôle conduirait à une hypertrophie du foie. Cependant, cet organe est doué d'une homéostasie finement régulée vraisemblablement par une induction d'apoptose compensatrice, qui est la dernière phase de la régénération hépatique [537, 554]. Quelques études ont permis de déterminer que les hépatocytes, en réponse aux facteurs de croissance EGF et HGF, produisent de l'activine A et que les cellules de Ito secrètent du TGF- β 1 ainsi que deux membres de la famille des TGF- β facteurs d'apoptose [555-557]. Les cellules de Küpffer et les cellules endothéliales produisent de l'interleukine-1 β qui semble

participer également au contrôle négatif de la régénération hépatique [558]. Alors que l'étude des phases de régénération a permis d'identifier un certain nombre de facteurs impliqués dans ce processus, le contrôle moléculaire exact de cette apoptose compensatrice reste encore à élucider [548].

Il existe de nombreux procédés pour induire une régénération hépatique et favoriser ainsi une augmentation de la prise de greffe et la prolifération des hépatocytes transplantés.

4.3.1 Facteurs de croissance

Une régénération hépatique peut être induite en injectant des facteurs de croissance. En 1996, le Keratocyte Growth Factor (KGF) a été utilisé chez la souris [559]. Quarante-huit heures après l'injection de KGF la prolifération hépatocytaire, mesurée par l'incorporation de BrdU, était augmentée de 40 fois. En 1998, Patjin et al ont injecté à des souris de l'HGF pendant 5 jours (5 mg/Kg/jour) [560]. La masse hépatique a augmenté de 140 %. Le pic de prolifération pendant l'injection d'HGF, mesuré à l'aide du BrdU, était à 48 heures. Kosai et al [561], chez le rat, ont aussi induit une régénération hépatique en injectant 5 fois 500 mg/kg de rHGF. Récemment, notre équipe a montré que l'injection de HGF juste avant la transplantation d'hépatoblastes humains chez des souris nouveau-nés induit le transfert des hépatoblastes des espaces portes au parenchyme hépatique [562]. Les résultats de ces études expérimentales utilisant des facteurs de croissance paraissent intéressants. Ils doivent cependant être tempérés et considérés avec réserve. En effet, les quantités importantes d'HGF nécessaires dans ce modèle animal rendent les procédures difficilement transposables à l'Homme (5 mg/kg correspond à 350 mg pour un Homme de 70 kg). De plus, il existe potentiellement un risque carcinogène après administration de facteurs de croissance à fortes doses [561, 563]. Une autre étude chez le chien a utilisé une perfusion portale de faibles doses d'HGF (0,25 µg/kg) et démontrait une augmentation de la synthèse d'ADN et du poids du foie. Cependant dans cette étude la perfusion d'HGF était associée à une hépatectomie de 30% [564].

Dans notre modèle de primate, l'injection de 25 µg/kg d'HGF par voie portale induit une régénération hépatocytaire (résultats non publiés).

4.3.2 Hépatectomie partielle et régénération hépatique

L'hépatectomie de 70% a été la résection hépatique la plus utilisée chez l'animal. Elle constitue le modèle de référence pour l'étude de la régénération hépatique par hypertrophie compensatrice. Après hépatectomie, les segments hépatiques restants s'hypertrophient pour permettre à l'organe d'atteindre sa taille initiale. La prolifération des hépatocytes commence au niveau des zones périportales pour s'étendre vers les zones péricentrales [565]. Chaque hépatocyte effectue en moyenne une à deux divisions puis chaque type de cellules non parenchymateuses entre à son tour en division (**Figure 19**).

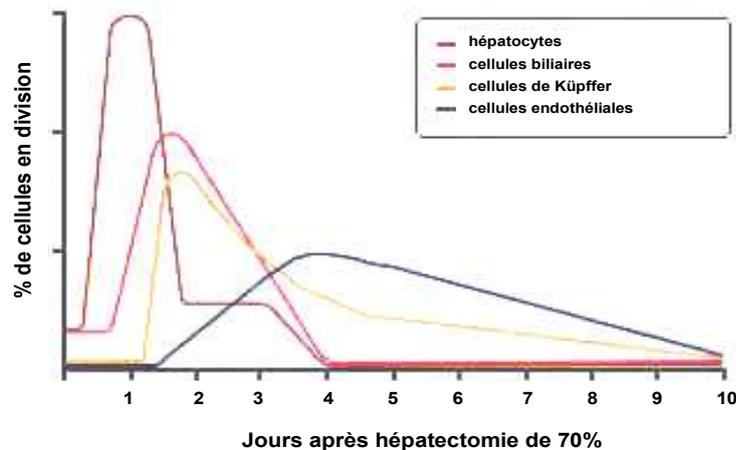


Figure 19. Cinétique de régénération des différents types cellulaires après hépatectomie de 70% chez le rat (*d'après* Michalopoulos et al, Science 1997 [539]).

Plusieurs études ont évalué la cinétique de régénération après hépatectomie pour différentes espèces animales [541]. La régénération complète prend plusieurs jours et pendant cette période les cellules ne se divisent pas toutes en même temps. Il existe de façon plus ou moins marquée selon l'espèce, un pic de régénération pendant lequel un

nombre maximal de cellules entrent en même temps en division. L'ensemble des données montre qu'il existe une importante variation inter-espèce sur le moment et le niveau du pic de prolifération. Chez la souris, le pic de division des hépatocytes après hépatectomie est à 48 heures [566, 567]. Chez le rat, le pourcentage d'hépatocytes en division est plus important entre 20 et 24 heures après une hépatectomie de 75% [568]. Chez le chien, la synthèse d'ADN est maximale trois jours après une hépatectomie [569]. Chez cet animal, il a été montré que la cinétique de régénération était la même après hépatectomie de 72% et de 44%, mais que la régénération, mesurée par la synthèse d'ADN estimée par incorporation de thymidine tritiée, était quatre fois plus importante après une hépatectomie de 72% que de 44%.

4.3.3 La ligature portale partielle

Les résultats insuffisants obtenus à ce jour après transplantation d'hépatocytes pourraient être améliorés par stimulation intense de la prolifération des cellules transplantées dans le foie. Chez l'animal, le modèle d'une hépatectomie partielle a été largement utilisé dans ce but [566, 567, 569-574]. Il a été montré qu'une hépatectomie de 70% est capable d'induire une régénération hépatique suffisante [541]. Cependant, la réalisation d'une hépatectomie de 70% est une intervention majeure qui ne peut en aucun cas être réalisée dans cette indication chez l'Homme.

L'occlusion portale partielle est une approche moins invasive. Cette obstruction portale peut être provoquée par une ligature chirurgicale ou par une embolisation endoluminale à l'aide de produits variés et combinés. L'occlusion d'une branche de la veine porte est utilisée en clinique pour augmenter le volume du foie résiduel avant hépatectomie dans les cas de cancer hépatique [575-595]. La morbidité de cette approche reste faible. La technique la plus répandue en clinique est l'embolisation portale par voie percutanée transhépatique mais il n'existe aucun argument pour la privilégier à la ligature portale en terme de régénération hépatique, sous réserve de ne pas tarder à réaliser une hépatectomie en cas de ligature portale du fait du développement d'une circulation collatérale porto-portale [577, 596]. En effet, trois études rétrospectives ont montré que la cinétique et le degré d'hypertrophie des

territoires respectés étaient comparables dans les deux groupes des malades [589-591]. En clinique, le choix entre la ligature et l'embolisation portale dépend de la stratégie chirurgicale et le geste d'exérèse de la tumeur hépatique : une embolisation portale est utilisée quand l'hépatectomie peut être faite en un temps et une ligature portale lorsqu'on opte pour une résection hépatique en deux temps (métastases hépatiques synchrones ou bilobaires) [577].

Plusieurs études expérimentales ont montré que la transplantation d'hépatocytes réalisée en association à l'induction d'une régénération hépatique par ligature portale partielle, stimulait la prolifération des hépatocytes transplantés et permettait une correction plus efficace et à long terme des déficits métaboliques [60, 597, 598]. Il a été montré que la ligature portale réalisée avant la transplantation d'hépatocytes était plus efficace qu'une ligature faite 24h après la transplantation et plus efficace qu'une transplantation de 20 fois plus de cellules sans ligature portale [599].

Notre équipe a réalisé plusieurs études en utilisant cette approche. En 1997, nous avons rapporté que la ligature portale de 70% chez le rat induisait un maximum de prolifération hépatocytaire et régénération hépatique entre 24 et 44 heures avec un nombre d'hépatocytes en division d'environ 12% [600]. Quatre ans plus tard, nous avons obtenu chez le macaque *Cynomolgus* un taux maximum de cellules greffées représentant au mieux 2% de la masse hépatocytaire totale après l'autotransplantation de 400 millions d'hépatocytes génétiquement modifiés dans le foie [513]. Ce pourcentage étant trop faible pour s'attendre à un résultat métabolique quelconque, nous avons mis au point et évalué la régénération hépatique dans les territoires non ligaturés après ligature portale de 70% dans le même modèle de primate. Après ligature de la branche portale gauche et de celle du secteur antéro-médian droit, nous avons constaté une prolifération hépatocytaire faible, qui variait entre 0.1% et 5.3% dans les lobes non ligaturés (**Figure 20**). Nous avons ensuite réalisé une évaluation volumétrique des lobes ligaturés et non ligaturés deux mois après la ligature portale par une IRM hépatique. Le volume des lobes non ligaturés a augmenté de 36% du volume du foie total à 56% après ligature portale. Quatre singes

ont eu une transplantation d'hépatocytes après ligature portale. Ils ont bien toléré l'intervention et la transplantation d'hépatocytes isolés. Les hépatocytes étaient marqués par un colorant nucléaire fluorescent le Hoechst, ou marqués génétiquement (transfert du gène Lac Z exprimant la β -galactosidase). Le pourcentage d'hépatocytes greffés 7 et 15 jours après la transplantation était faible, de l'ordre de 0,5 à 1.5%.

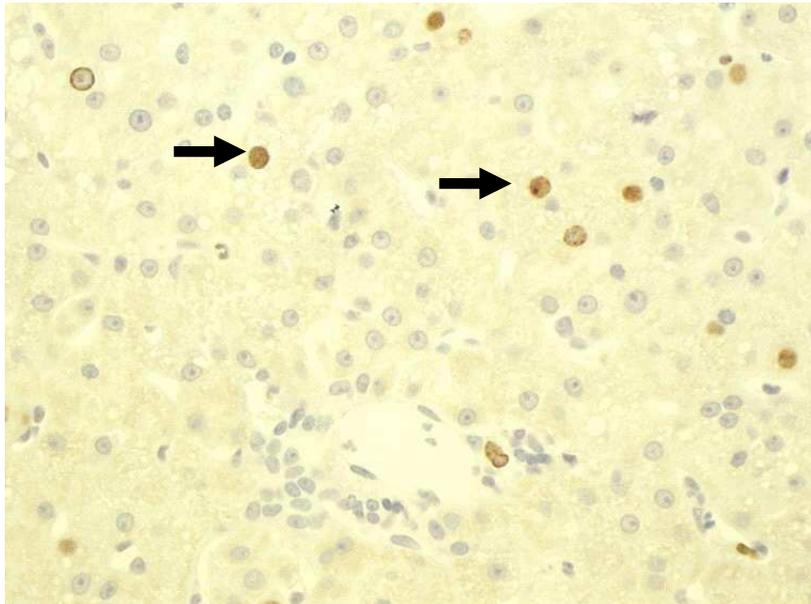


Figure 20. Hépatocytes en division ayant incorporé le BrdU 9 jours après ligature portale partielle chez le macaque.

Malgré la standardisation de chaque étape de notre protocole d'autotransplantation d'hépatocytes chez le primate, nos résultats en utilisant la ligature portale comme moyen d'induction de la régénération hépatique ont été décevants en termes de prolifération hépatocytaire et de pourcentage d'hépatocytes transplantés. Le faible stimulus régénératif induit par la ligature portale partielle pouvait être expliqué par la formation de collatérales intra-parenchymateuses et une reprise de la vascularisation portale distale à la ligature. Nous avons observé ce phénomène sur les portographies précoces (J7) de certains singes. Une étude faite chez le porc a également démontré une recanalisation complète du territoire portal ligaturé [601]. Cette recanalisation a aussi été rapportée en clinique humaine due à des collatérales portales chez un

malade qui a eu une ligature portale droite en vue d'une hypertrophie gauche et qui a nécessité par la suite une embolisation portale [596].

4.3.4 L'embolisation portale partielle

L'embolisation portale partielle (EPP) est un procédé pouvant permettre une obstruction endoluminale à l'aide des différents produits (éthanol, colle type « fibrin glue », particules d'alcool polyvinyle et coils, association des particules de n-butylcyanoacrylate et d'huile iodée) [602-607]. A la différence de la ligature portale, cette obstruction concerne bien dans la majorité des cas les branches distales plus que les proximales d'un territoire portal. En clinique, les indications d'une EPP avant une hépatectomie pour cancer du foie reposent principalement sur la volumétrie du volume fonctionnel résiduel sur scanner abdominal injecté.

L'efficacité de l'EPP en clinique est appréciée par l'augmentation de ce volume à quatre semaines après la procédure, moment où la régénération hépatique a presque atteint son maximum. En effet, il a été montré en clinique que la régénération hépatique suite à une EPP définitive chez des patients non-cirrhotiques est composée par une période précoce de régénération intense qui dure 3 semaines, suivie par une période de stable augmentation (plateau) du volume résiduel fonctionnel hépatique (**Figure 21**) [608].

Broering et al en 2002 ont comparé l'embolisation à la ligature portale avant une hépatectomie droite étendue et ont montré une hypertrophie plus importante du lobe gauche et une durée d'hospitalisation plus courte après EPP [583]. Dans un plan expérimental, des études ont montré une hypertrophie plus importante du volume hépatique respecté après EPP qu'après ligature portale chez le lapin, le porc et le macaque [278, 609, 610]. Plus récemment, trois études rétrospectives ont montré que la cinétique et le degré d'hypertrophie des territoires respectés étaient comparables dans les deux groupes des malades [589-591]. Cependant, l'EPP reste moins invasive que la ligature portale, elle ne nécessite pas une anesthésie générale et elle est utilisée

en clinique pour induire une atrophie d'un territoire hépatique avant sa résection et une hypertrophie du foie résiduel.

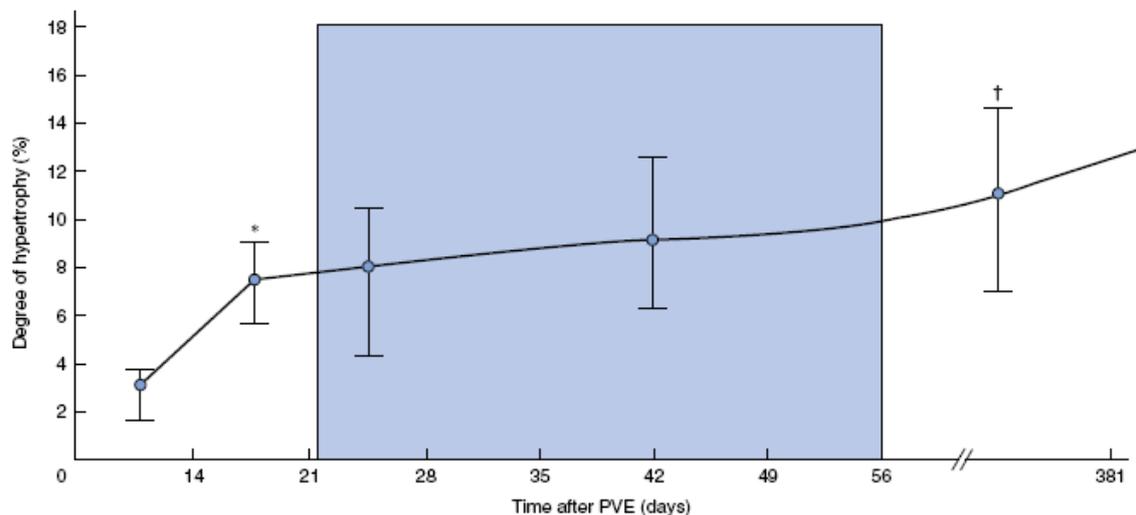


Figure 21. Cinétique de l'augmentation du volume du foie résiduel fonctionnel et degré d'hypertrophie après EPP chez des patients non-cirrhotiques. La zone colorée en bleu (J22-J56) illustre la période stable (plateau) durant laquelle l'augmentation du volume hépatique résiduel était très faible (dans Ribero et al, Br J Surg 2007 [608]).

C'est pour ces raisons que nous avons opté pour l'EPP dans nos projets expérimentaux d'autotransplantation d'hépatocytes isolés. En 2006, nous avons publié une étude sur huit singes qui ont eu une EPP par une colle biologique (l'Histoacryl® ou n-butylcyanoacrylate) [278]. Un singe au début de notre expérience est mort d'une thrombose portale complète à cause d'un reflux de colle dans le secteur postérieur du foie droit. Les sept autres animaux ont bien supporté tout le protocole expérimental. La pression était monitorée pendant l'embolisation et la transplantation des hépatocytes. Elle s'élevait légèrement pour revenir progressivement au chiffre de base. L'étude histologique à court terme ne montrait pas de phénomène inflammatoire important ; on observait une dilatation des sinusoides les premiers jours après l'embolisation. Les biopsies hépatiques à 9 mois montraient une architecture hépatique normale sans signes d'hyperplasie nodulaire régénérative. La régénération hépatique était plus importante qu'après ligature portale du même territoire. Le pourcentage d'hépatocytes en division était de 23.5% à J3 et 11.2% à J7 dans les segments non embolisés. Cette

prolifération hépatocytaire était donc importante et précoce, elle était maximale trois jours après l'embolisation et diminuait progressivement. Cette cinétique de régénération était en accord avec ce qui a déjà été démontré dans un modèle de porc où la plus grande part de la régénération avait eu lieu avant J12 [611].

Trois singes ont eu par la suite une autotransplantation d'hépatocytes isolés après EPP à l'Histoacryl®. Le protocole expérimental était le suivant : lobectomie latérale gauche pour l'isolement des hépatocytes, cathéterisation chronique de la veine porte, EPP, marquage des hépatocytes au Hoechst puis autotransplantation via une chambre implantable mise en sous cutané et reliée au cathéter portal. Des biopsies hépatiques ont été faites 7 et 15 jours après la transplantation. Nous avons noté une nette amélioration du pourcentage d'hépatocytes marqués qui variait entre 8 et 12% après EPP par rapport à 1 à 2% après ligature portale. Ce pourcentage est resté stable entre J7 et J15 témoignant de la prolifération de ces hépatocytes transplantés à la même vitesse que les hépatocytes résidents. Cette prolifération des hépatocytes transplantés a été prouvée sur des coupes histologiques sériées marquées au Hoechst et au BrdU (**Figure 22**). Nous avons également prouvé l'intégration de ces hépatocytes par un marquage de la connexine-32, protéine des jonctions intercellulaires (**Figure 23**). Ce marquage a été retrouvé entre les hépatocytes transplantés mais aussi avec les hépatocytes résidents.

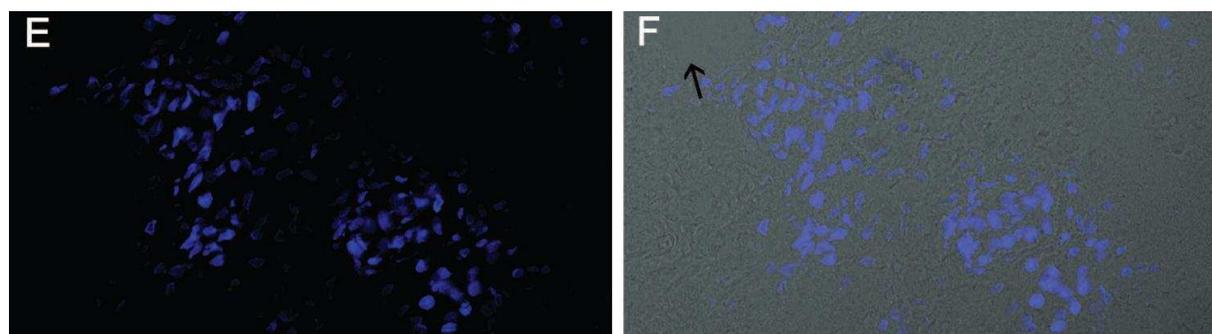


Figure 22. Effet de l'EPP sur la prise de greffe hépatocytaire. Image de fluorescence directe (à gauche) et de superposition fluorescence-microscope optique (à droite). Hépatocytes marqués au Hoechst 15 jours après EPP à l'Histoacryl® sur coupe hépatique d'un lobe non-embolisé. La flèche indique un espace porte (*d'après* Dagher et al, Transplantation 2006 [278]).

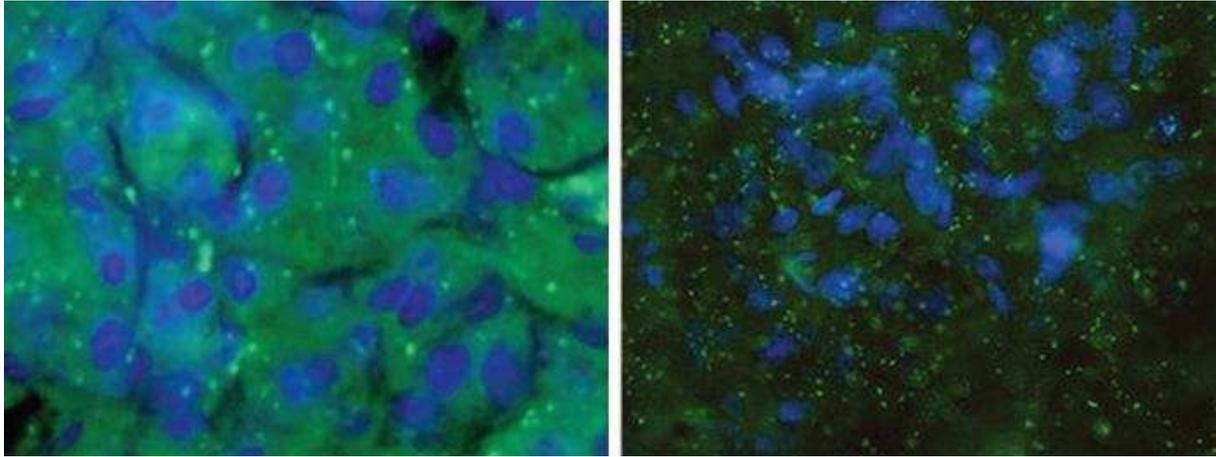


Figure 23. Marquage de la connexine-32, protéine des jonctions intercellulaires retrouvée entre les hépatocytes transplantés mais aussi avec les hépatocytes résidents. (d'après Dagher et al, Transplantation 2006 [278]).

Les résultats que nous avons obtenu après autotransplantation d'hépatocytes grâce à une EPP préalable étaient très encourageants. En effet, il est connu qu'un pourcentage d'hépatocytes normaux de l'ordre de 7 à 8 % est capable de rétablir une fonction métabolique [278]. Notre approche, en nous permettant d'atteindre cet objectif, pourrait être une approche très prometteuse dans le traitement des MMHH et notamment dans notre protocole de thérapie génique pour le traitement de l'hypercholestérolémie familiale.

CONCLUSION

Même s'il existe de nombreux procédés pour favoriser la prise de greffe hépatocytaire, peu d'entre eux sont transposables à l'Homme car ils présentent des risques importants ou mal évalués. Parmi les procédés visant à favoriser la prise de greffe et la prolifération des hépatocytes transplantés, la ligature portale partielle pourrait avoir un intérêt mais reste invasive. Cependant, l'EPP est une technique moins invasive que la ligature portale et couramment utilisée aujourd'hui en clinique. Son important effet sur l'amélioration de la prise de greffe hépatocytaire démontré dans nos études expérimentales, font de l'EPP une technique envisageable dans le cadre d'un essai clinique de transplantation d'hépatocytes pour le traitement des MMHH chez

l'Homme. En effet, il est connu que le remplacement par des hépatocytes normaux de 5 à 10% des hépatocytes natifs peut suffire pour obtenir un résultat métabolique et clinique. L'éventuelle utilisation de l'EPP dans notre protocole d'autotransplantation d'hépatocytes génétiquement modifiés *ex vivo* pour le traitement de l'hypercholestérolémie familiale nous a conduit par la suite à centrer notre recherche sur les moyens permettant de rendre ce protocole expérimental encore moins invasif. Pour cette raison, nous avons remplacé l'EPP définitive par une EPP réversible ou transitoire.

OBJECTIFS

OBJECTIFS

L'efficacité limitée de la transplantation d'hépatocytes isolés dans le traitement des MMHH semble en partie liée au faible pourcentage de la masse hépatocytaire reconstituée par les hépatocytes définitivement greffés et fonctionnels. De nombreux modèles animaux ont été développés pour étudier les facteurs pouvant augmenter le nombre et le pourcentage d'hépatocytes transplantés. Cependant, la majorité de ces modèles ne sont pas transposables en clinique humaine car ils présentent des risques importants ou mal évalués pour les patients. En plus, le traitement des maladies métaboliques hépatiques ne nécessite pas une repopulation aussi importante du foie et un pourcentage de l'ordre de 5 à 10% d'hépatocytes normaux devrait suffire pour assurer une fonction métabolique.

Les principaux objectifs de ce travail ont été d'étudier des moyens peu invasifs pour induire une importante régénération hépatique et une prise de greffe hépatocytaire significative dans le but de développer une nouvelle approche de transplantation d'hépatocytes génétiquement modifiés ex vivo pour le traitement de l'hypercholestérolémie familiale.

Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet d'une EPP réversible sur la prolifération hépatocytaire et la régénération hépatique chez le macaque. Ensuite, nous avons appliqué cette EPP réversible pour évaluer la prise de greffe d'hépatocytes transduits par un vecteur lentiviral ainsi que l'expression à long terme du transgène dans notre modèle primate d'autotransplantation d'hépatocytes génétiquement modifiés ex vivo. Ces deux études ont été très importantes afin de pouvoir poursuivre notre projet clinique pour le traitement de l'hypercholestérolémie familiale par thérapie génique ex vivo dans le cadre d'un essai clinique de phase I/II.

**DEUXIEME PARTIE :
RESULTATS**

Liver regeneration and recanalization time course following reversible portal vein embolization

Panagiotis LAINAS, Lyes BOUDECHICHE, Angel OSORIO, Aurore COULOMB, Anne WEBER, Danièle PARIENTE, Dominique FRANCO, Ibrahim DAGHER

(J Hepatol 2008; 49:354-362 [612])

PRESENTATION DE L'ARTICLE

L'embolisation portale partielle (EPP) définitive est une technique fréquemment utilisée chez l'Homme. L'occlusion d'une branche portale par EPP définitive provoque des changements hémodynamiques et la sécrétion de médiateurs humoraux qui induisent une prolifération hépatocytaire dans le territoire hépatique non embolisé et une atrophie du territoire hépatique embolisé [613]. Ainsi, cette technique est couramment utilisée en pratique clinique avant la réalisation d'une hépatectomie majeure, pour induire une augmentation du volume hépatique résiduel, particulièrement en cas de foie pathologique [576-586]. L'EPP est préférée à la ligature portale car elle est considérée comme moins invasive, ne nécessite pas une anesthésie générale et n'entraîne pas la création d'adhérences qui pourraient gêner l'hépatectomie à venir.

Nous avons montré dans notre modèle de primate que l'EPP définitive par l'Histoacryl® permet de concentrer les hépatocytes transplantés dans le territoire non embolisé et d'induire leur prolifération, ainsi que celle des hépatocytes résidents [278]. Les hépatocytes transplantés participent ainsi à la régénération du foie et leur pourcentage définitif par rapport à la masse hépatocytaire finale est significativement augmenté. La prolifération hépatocytaire après une EPP définitive débute très précocement et la régénération des segments non embolisés se produit essentiellement pendant les deux premières semaines [278, 608, 611]. Dans le cas où une résection ultérieure du territoire embolisé n'est pas effectuée, les risques de ce procédé d'obstruction veineuse définitive ne sont pas évalués. Le devenir d'un foie embolisé de façon définitive à l'Histoacryl® et son évolution histologique ne sont pas connus.

De nos jours, la prise en charge des cancers du foie nécessite fréquemment plusieurs interventions (chirurgicales ou radiologiques) [614, 615]. L'utilisation d'un produit résorbable pour effectuer une EPP réversible pourrait augmenter les possibilités thérapeutiques ultérieures. Cette technique pourrait aussi être utilisée chez les patients cirrhotiques car la diminution de la fonction hépatique serait transitoire. Enfin, l'EPP réversible pourrait être utilisée dans toutes les applications thérapeutiques où le foie embolisé ne nécessite pas d'être réséqué.

Cependant, l'efficacité de l'EPP réversible à induire une régénération hépatique n'a pas encore été prouvée. L'EPP par un produit résorbable a été utilisée dans quelques études rapportant une régénération hépatique insuffisante, probablement liée à une recanalisation précoce des branches portales [616, 617]. Toutes ces équipes utilisaient une gélatine résorbable sous forme de bandes (strips). Cette gélatine en bandes peut expliquer la recanalisation précoce des branches portales, du fait d'une embolisation proximale. Aucune de ces études ne précisait la durée exacte avant recanalisation portale.

Les buts de cette étude étaient donc :

- i) d'étudier la cinétique de prolifération hépatocytaire et la régénération hépatique dans notre modèle préclinique de primate, en utilisant comme produit d'embolisation une gélatine résorbable (Curaspon®) sous forme de poudre ;
- ii) de préciser la durée exacte de recanalisation des branches portales dans ce même modèle ;
- iii) de démontrer que l'EPP résorbable au Curaspon® poudre est une bonne technique d'embolisation qui pourrait s'appliquer dans notre projet clinique de transplantation d'hépatocytes pour le traitement de l'hypercholestérolémie familiale.

Liver regeneration and recanalization time course following reversible portal vein embolization[☆]

Panagiotis Lainas^{1,2,†}, Lyes Boudechiche^{1,†}, Angel Osorio³, Aurore Coulomb⁴, Anne Weber¹, Danièle Pariente^{1,5}, Dominique Franco^{1,2}, Ibrahim Dagher^{1,2,*}

¹Inserm U804, Univ. Paris-Sud, Kremlin-Bicêtre, France

²Department of General Surgery, Antoine Bécère Hospital, AP-HP, Clamart F-92140, France

³LIMSI-CNRS, Orsay, France

⁴Department of Pathology, Armand Trousseau Hospital, AP-HP, Paris F-75012, France

⁵Department of Pediatric Radiology, Bicêtre Hospital, AP-HP, Kremlin-Bicêtre F-94270, France

See Editorial, pages 313–315

Background/Aims: Permanent portal vein embolization (PVE) is a widely practised technique. The use of an absorbable material would be safer in clinical situations in which the embolized liver is not resected. We evaluated the efficiency of reversible PVE in terms of liver regeneration and analyzed the precise time course of portal recanalization.

Methods: Nine monkeys underwent PVE of the left and right anterior portal branches using powdered absorbable material. Repeated portograms were carried out until complete revascularization of the embolized liver. Hepatocyte proliferation rates were assessed by BrdU incorporation. Liver segment volumes were determined by CT scans performed before embolization, then 1 month and 1 year after embolization.

Results: Reversible PVE induced significant hepatocyte proliferation in the non-embolized segments ($13.5 \pm 1.0\%$, $10.5 \pm 0.8\%$ and $9.1 \pm 2.0\%$ of cells on days 3, 5 and 7, respectively). One month after the embolization, the non-embolized liver volume had increased from $38.4 \pm 1.3\%$ to $54.8 \pm 0.5\%$ of total liver volume. Proximal and complete revascularization occurred 6–8 and 12–16 days, respectively.

Conclusions: Reversible PVE efficiently induces liver regeneration. The use of absorbable material avoids long-term liver scarring. Such material may be suitable for several clinical indications, including cell transplantation.

© 2008 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Liver; Regeneration; Embolization; Hepatocyte proliferation; Gelfoam powder

Received 27 November 2007; received in revised form 15 January 2008; accepted 23 January 2008; available online 10 March 2008

Associate Editor: P.-A. Clavien

[☆] The authors declare that they do not have anything to disclose regarding funding from industries or conflict of interest with respect to this manuscript.

* Corresponding author. Address: Department of Surgery, Hôpital Antoine Bécère, 157 rue de la Porte de Trivaux, 92141 Clamart cedex, France. Tel.: +33 145374545; fax: +33 145374978.

E-mail address: ibrahim.dagher@abc.aphp.fr (I. Dagher).

[†] Equal first authors.

Abbreviations: PVE, portal vein embolization; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; GGT, gammaglutamyl transpeptidase; AP, alkaline phosphatase; BIL, total bilirubin; RAB, right anterior portal branch; RPB, right posterior portal branch; LB, left portal branch.

1. Introduction

Occlusion of one branch of the portal vein results in hemodynamic changes and the upregulation of various humoral mediators, leading to the atrophy of ipsilateral segments and hypertrophy of contralateral segments [1]. This approach is used before major hepatectomy, to induce hypertrophy of the remnant liver [2–6], particularly in cases of injured liver [7–9]. Portal vein occlusion may be achieved by percutaneous embolization or surgical ligation. Portal ligation induces significant hypertrophy of the non-ligated liver and is particularly interesting in patients with synchronous bilobar liver

metastases that cannot be completely resected within a single hepatectomy [10]. A two-step procedure has been proposed for these patients [11], and portal ligation can be included in the first step [10,12]. More generally, pre-operative portal vein embolization (PVE) is considered less invasive, because it does not require general anesthesia and avoids the risk of postoperative adhesions.

In clinical practice, a non-absorbable material is generally used for embolization, as it provides effective, permanent vascular occlusion. Long-term side effects are not taken into account because the embolized liver is generally removed. However, a multi-stage management of hepatic malignancies, including radiological, percutaneous and surgical techniques, is becoming increasingly common [13,14], and the use of an absorbable agent for PVE may increase the number of treatment combinations. For example, it might allow safer subsequent arterial chemo-embolization in cases in which the tumor spreads to the contralateral lobe. Reversible PVE may also be more suitable for cirrhotic patients, as the associated functional decline would be transient. In addition, we have used PVE before hepatocyte transplantation, to improve engraftment and induce hepatocyte proliferation in primates [15]. The use of an absorbable material for PVE would certainly be safer in similar clinical situations in which the embolized liver is not resected.

However, the efficiency of transient PVE to induce liver regeneration remains unclear. Liver regeneration following permanent embolization occurs rapidly, within 11–17 days [16–18]. The precise time course of regeneration after PVE has been evaluated in experimental studies showing early liver regeneration [15,19]. The use of reversible PVE to ensure vascular occlusion over 2 weeks should therefore induce the required hypertrophy without long-term deleterious effects. Reversible PVE has been used in a few clinical and experimental studies, but was reported to induce insufficient hepatic regeneration [20,21]. This was probably due to early revascularization of the embolized portal branches. Furthermore, none of these studies determined the precise time course of portal recanalization.

The aim of this study was to evaluate the effect of reversible PVE, using the powdered form of an absorbable gelatin sponge, on hepatocyte proliferation and the subsequent liver regeneration in a primate preclinical model. The exact time course of vascular recanalization was also assessed.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Nine female *Macaca mulatta* monkeys aged between 3 and 6 years and weighing 3.6 ± 0.5 kg were used for the experiments. The animals were housed at the *Institut National de Recherche Agronomique*

(INRA, Jouy-en-Josas, France) and tested negative for simian herpes virus, SRV, SIV and STLV. They received humane care and none of the animals was killed for experimental purposes. Experiments were carried out in accordance with the European legislation on animal care and experimentation [22].

2.2. Absorbable embolizing material

Reversible PVE was performed with the powdered form of an absorbable gelatin sponge (Curaspon[®], Curamedical, Zwaneburg, The Netherlands). Curaspon powder was dissolved in a 4:1 mixture of iodixanol (Visipaque[®] 320 mg/ml, Amersham Health, Pantin, France) and saline. About 0.5 ml of this mixture was used for each embolization step: (i) distal, and (ii) proximal embolization of the right anterior portal branch, (iii) distal, and (iv) proximal embolization of the left portal branch.

2.3. Reversible PVE and assessment of recanalization

Surgery was performed as previously described [15], under general anesthesia. Acetaminophen was used for analgesia (10 mg/kg orally every 6 h for 3 days). The inferior mesenteric vein was dissected and a 3-F introducer was inserted. An initial portogram was taken to map the portal branches before embolization (Fig. 1A). A 3-F angiographic microcatheter (Terumo Progreat[®], Guyancourt, France) was then pushed through the portal vein distally into the left branch. The embolizing mixture was progressively injected until complete obstruction of the distal branches was achieved. The microcatheter was pulled back to the start of the left portal branch and around 0.5 ml of the same mixture was injected to complete obstruction of its proximal part. Distal and proximal embolization of the right anterior branch were performed using the same technique. Another portogram was then performed to ensure the complete embolization and patency of the remaining portal branches (Fig. 1C). Portal pressure was monitored throughout embolization, and values before and after the embolization of the right anterior and left portal branches were noted. The introducer was then replaced by the 4.5-F venous catheter of a perfusion chamber (Celsite[®] 4.5-F, Braun Medical, Boulogne-Billancourt, France), placed subcutaneously in the left anterior thoracic region to make repeated access to the portal vein possible.

Liver function tests, including aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gamma glutamyl transpeptidase (GGT), alkaline phosphatase and total bilirubin, were performed before PVE, 4 h after embolization and 1, 2 and 3 days after embolization.

Portal recanalization was evaluated by successive portograms, using the subcutaneous chamber. A portogram was taken every 48 h, for each animal, until complete revascularization of the embolized liver was achieved. The time required for proximal (first-order portal branches) and distal (parenchymal) revascularization was noted.

2.4. Hepatocyte proliferation

Liver biopsies of the embolized and non-embolized segments were performed on days 3, 5 and 7, and 6 months after embolization. We assessed the progression of hepatocyte proliferation after reversible PVE by bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation on days 3, 5 and 7. BrdU (50 mg/kg) was infused via the subcutaneous chamber 4 h before biopsies. Immunostaining was carried out with a monoclonal anti-BrdU antibody (1:100 dilution; Bu20a, DakoCytomation, Trappes, France). Binding of the mouse primary antibody was detected with an indirect avidin-biotin peroxidase kit (DakoCytomation, Trappes, France). The peroxidase reaction was developed with 3'-diaminobenzidine (Beckman Coulter, Villepinte, France), and sections were counterstained with hematoxylin. For each biopsy, we analyzed 12 randomly selected sections, counting at least 800 hepatocytes in total. The percentage of hepatocytes undergoing division corresponds to the ratio of BrdU-positive hepatocytes to the total number of hepatocytes.

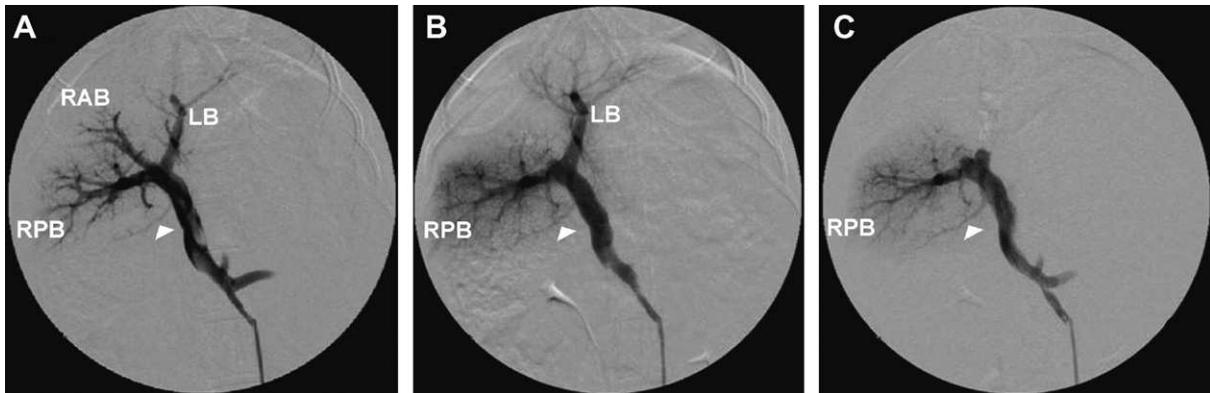


Fig. 1. Portograms (A) before reversible PVE with Curaspon powder, (B) after the embolization of the right anterior portal branch (RAB) and (C) after the embolization of the left portal branch (LB). The right posterior portal branch (RPB) and the main branch for segment I (Δ) remain patent.

2.5. Volumetric analysis

The monkeys underwent helical CT scans before reversible PVE, and then 4 weeks and 1 year after embolization. Serial scans were carried out at 0.5 cm intervals and were enhanced with an intravenous bolus injection of contrast. Volumes were assessed by two independent observers using PTM3D volumetry software [23,24]. We measured total, non-embolized (NE) and embolized (E) liver volumes. The proportions of the total liver volume that were non-embolized and embolized were calculated before and after embolization. Changes in NE and E liver volumes were expressed as hypertrophy and atrophy ratios, respectively. The following formula was used to calculate the hypertrophy ratio: $(NE \text{ postPVE} - NE \text{ prePVE}) / NE \text{ prePVE} \times 100$. Similarly, the atrophy ratio was calculated using the following formula: $(E \text{ prePVE} - E \text{ postPVE}) / E \text{ prePVE} \times 100$.

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism 4 Software (San Diego, CA, USA). All data are expressed as means \pm SEM. The Wilcoxon matched pairs test was used for comparisons, due to the small sample sizes. p -Values ≤ 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Tolerance of the procedures

The embolization of the left and right anterior portal branches was successfully carried out in all animals. A moderate leak of Curaspon powder was noted in the right posterior branch of one monkey, with no clinical repercussions. None of the animals developed portal vein thrombosis. One animal died on the day after surgery, due to a hemorrhage from the inferior mesenteric vein caused by the displacement of the catheter.

Portal pressure monitoring showed moderate changes, from 7.6 ± 0.8 mm Hg before embolization to 9.1 ± 1.4 mm Hg after the embolization of the right anterior branch, 10.8 ± 1.7 mm Hg after the embolization of the left portal branch and 8.1 ± 1.1 mm Hg 2 h after the end of surgery (Fig. 2A).

Serum AST and ALT levels increased transiently, returning to normal values 3 days after embolization.

Serum bilirubin, alkaline phosphatase and GGT levels did not change significantly (Fig. 2B).

Non-embolized segments were histologically normal on days 3, 5 and 7, and 6 months after embolization. Moderate sinusoidal dilation without cell necrosis was observed in the embolized segments 3 days after PVE (Fig. 2C).

3.2. Time course of recanalization after reversible PVE

Portograms taken immediately after embolization confirmed the complete obstruction of the left and right anterior portal branches, and the patency of the remaining portal branches (Fig. 1C). The exact times of proximal and distal recanalization of the right anterior and left portal branches are given in Table 1. The recanalization of the proximal portion of the right anterior and left portal branches (up to the first-order branches) occurred after 6.7 ± 0.4 and 7.5 ± 0.3 days, respectively (Fig. 3B). Complete revascularization of the embolized right anterior and left liver lobes was observed after 12.5 ± 0.7 and 13.7 ± 0.6 days, respectively (Fig. 3C).

3.3. Time course of hepatocyte proliferation after reversible PVE

Reversible PVE induced significant hepatocyte proliferation in the non-embolized segments, as assessed by BrdU incorporation (Fig. 4A). Proliferation rates were significantly higher in the non-embolized liver segments than in the embolized segments, at all time points: $13.5 \pm 1.0\%$ vs. $1.3 \pm 0.5\%$ on day 3, $10.5 \pm 0.8\%$ vs. $1.5 \pm 1.1\%$ on day 5 and $9.1 \pm 2.0\%$ vs. $1.3 \pm 0.6\%$ on day 7 after embolization ($p = 0.03$) (Fig. 4B).

3.4. Liver regeneration after reversible PVE

Changes in the liver volume after embolization were assessed on CT scans (Fig. 5A and B). Total liver volume was mostly unchanged by embolization

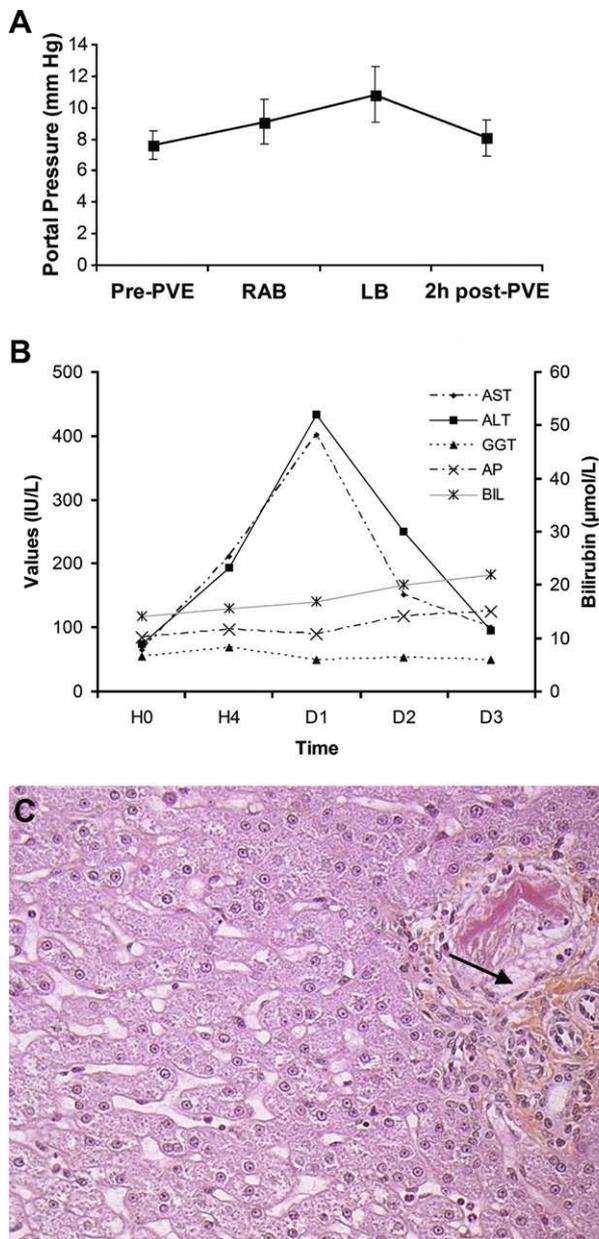


Fig. 2. (A) Portal pressure values before reversible PVE (pre-PVE), immediately after the embolization of the right anterior (RAB) and left (LB) portal branches and 2 h after the end of reversible PVE (2 h post-PVE). (B) Mean values of liver function tests before and up to 3 days after reversible PVE with Curaspon. H, hours; D, days; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; GGT, gamma glutamyl transpeptidase; AP, alkaline phosphatase; BIL, total bilirubin. (C) Histological analysis of the embolized segment III 3 days after PVE. Hematoxylin–eosin staining of a representative cryostat section of the embolized segment III showing the presence of Curaspon in the portal vessel (arrow) and sinusoidal dilation with no signs of necrosis 3 days after reversible PVE (magnification: 20 \times). [This figure appears in colour on the web.]

(71.0 \pm 4.8 and 70.1 \pm 4.2 ml before and 1 month after embolization, respectively; $p = 0.74$). The non-embolized liver volume increased from 27.4 \pm 2.4 ml before embolization to 38.4 \pm 2.3 ml after embolization ($p < 0.01$), whereas the embolized liver volume

Table 1
Time course of proximal and distal recanalization after reversible PVE

	Proximal recanalization (days)		Distal recanalization (days)	
	RAB	LB	RAB	LB
Monkey 1	8	8	16	16
Monkey 2	6	6	12	12
Monkey 3	6	8	12	14
Monkey 4	6	6	10	12
Monkey 5	8	8	14	14
Monkey 6	6	8	10	12
Monkey 7	8	8	14	16
Monkey 8	6	8	12	14
Mean \pm SEM	6.7 \pm 0.4	7.5 \pm 0.3	12.5 \pm 0.7	13.7 \pm 0.6

Abbreviations: PVE, portal vein embolization; RAB, right anterior portal branch; LB, left portal branch.

decreased from 43.6 \pm 2.7 ml before embolization to 31.7 \pm 2.0 ml after embolization ($p < 0.01$) (Fig. 5C). The percentage of the non-embolized liver volume to the entire liver volume increased from 38.4 \pm 1.3% before embolization to 54.8 \pm 0.5% after embolization ($p < 0.01$) (Table 2). The hypertrophy ratio of the non-embolized liver was 40.1% and the atrophy ratio of the embolized liver was 27.3%. Long-term volumetric analysis carried out 1 year after reversible PVE showed no significant change in the non-embolized and the embolized liver volumes (38.5 \pm 2.1 and 35.8 \pm 0.9 ml, respectively) with respect to those obtained 1 month after embolization.

4. Discussion

PVE is frequently used in clinical practice to induce hypertrophy of the remnant liver before major liver resections for hepatic tumors or hilar cholangiocarcinoma [2–7,25]. In such situations, permanent, non-reversible embolization is carried out with agents such as biological glue (cyanoacrylate) or absolute ethanol, as the embolized part of the liver is removed during surgery. However, new indications for PVE are currently emerging in patients for whom resection of the embolized liver may not ultimately be required. Temporary regeneration may be sought in multi-step approaches for liver cancer treatment, to improve cell and gene therapy [15,19], or even to induce lobar liver hypertrophy in living organ donors. In the present study, we evaluated the time course of portal revascularization after temporary PVE with Curaspon powder – an absorbable agent – and its efficiency for increasing hepatocyte proliferation and liver hypertrophy in a preclinical primate model.

Our aim was to embolize a volume of the liver, similar in percentage terms to that usually embolized in patients (approximately 60% of liver volume after right

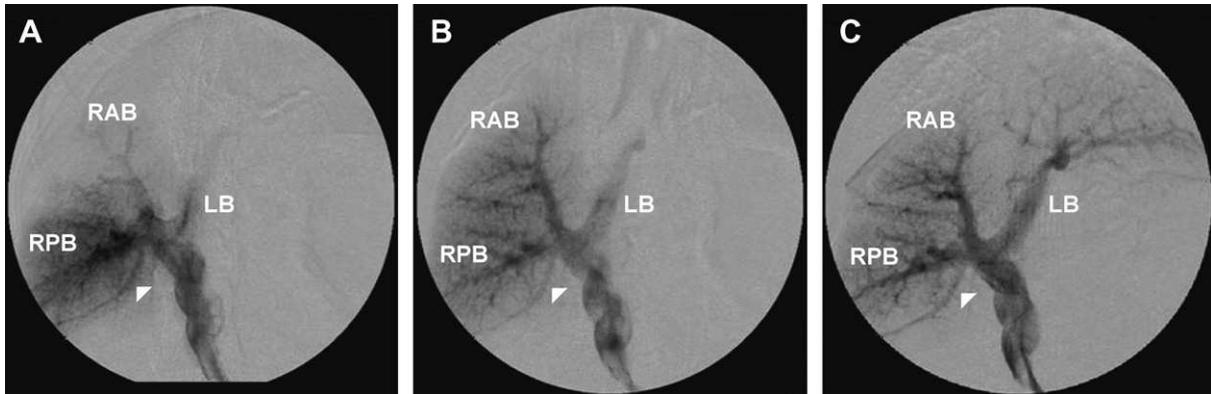


Fig. 3. Portograms of monkey M3. (A) The recanalization of the proximal portion of the left (LB) and right anterior (RAB) branches at post-embolization day 8. (B) Complete revascularization of the right anterior liver at post-embolization day 12. (C) Complete revascularization of the liver 2 weeks after reversible embolization. RPB, right posterior portal branch; Δ , main branch for segment I.

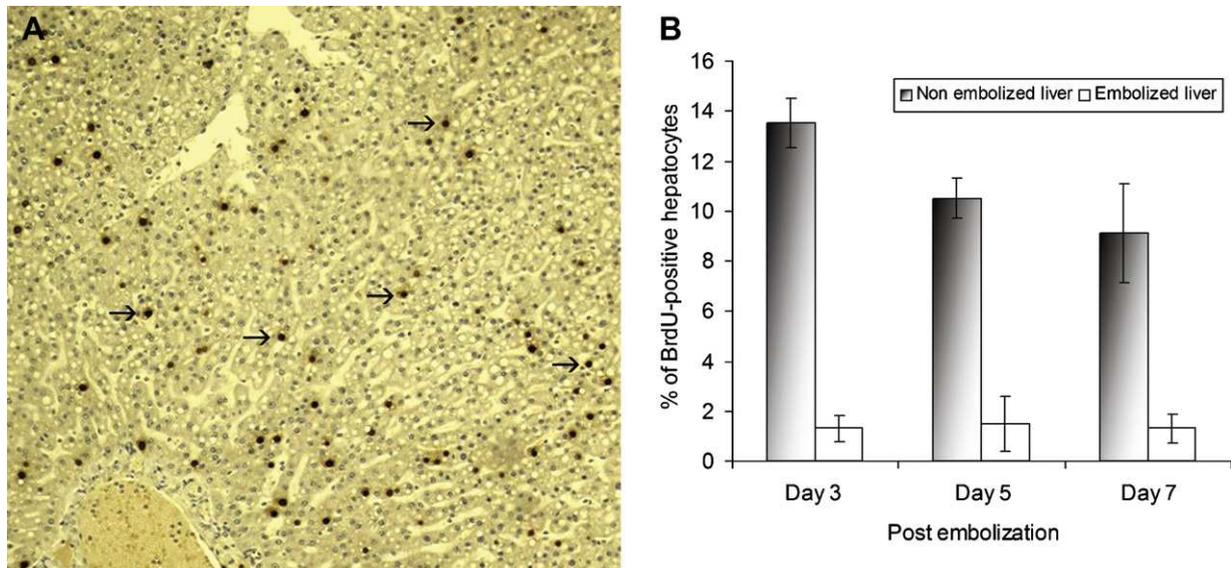


Fig. 4. Hepatocyte proliferation after reversible PVE. (A) Representative image of BrdU incorporation 3 days after embolization, showing numerous dividing hepatocytes (magnification: 10 \times). (B) Mean percentage of BrdU-labeled hepatocytes in the non-embolized and embolized liver segments on days 3, 5 and 7 after reversible PVE. [This figure appears in colour on the web.]

PVE). The monkey species studied has a portal branch distribution similar to that in humans, but with different relative volumes of liver segments and lobes. We therefore chose to embolize the left (30–35%) and right anterior (25–30%) portal territories. We found that the embolization of this volume with Curaspon powder was well tolerated by monkeys, confirming previous results with non-absorbable embolizing agents [15,19,26]. The increase in portal vein pressure during and after embolization with Curaspon was minor and transient, and was similar to that observed in studies using non-absorbable material [4,19,21,27]. No thrombosis of the portal trunk was observed. Moderate leakage of Curaspon during selective injection in one monkey did not result in portal thrombosis, suggesting that the small amount of gelatin sponge outside the embol-

ized territory was rapidly cleared. By contrast, the leakage of a non-absorbable agent may require angioplasty [26] and may even result in death [15]. Changes in serum transaminase levels were greater than those previously observed with cyanoacrylate in the same primate model [15]. The reason may be that Curaspon powder reaches more distal branches of the embolized segments than cyanoacrylate, resulting in more complete and immediate obstruction of the vascular bed. Nevertheless, the increase in serum transaminase levels was transient and serum levels returned to normal values within 3 days. Liver biopsies 15 days after embolization showed no inflammatory reactions in the portal spaces or hepatocyte necrosis. The use of Curaspon powder as an embolizing agent therefore proved safe.

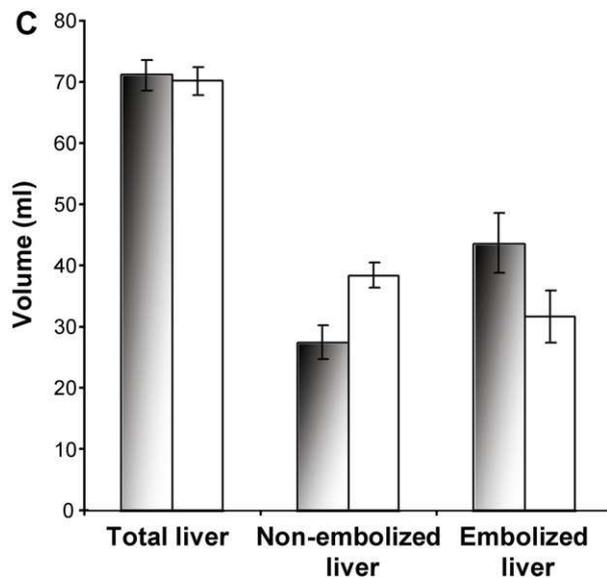
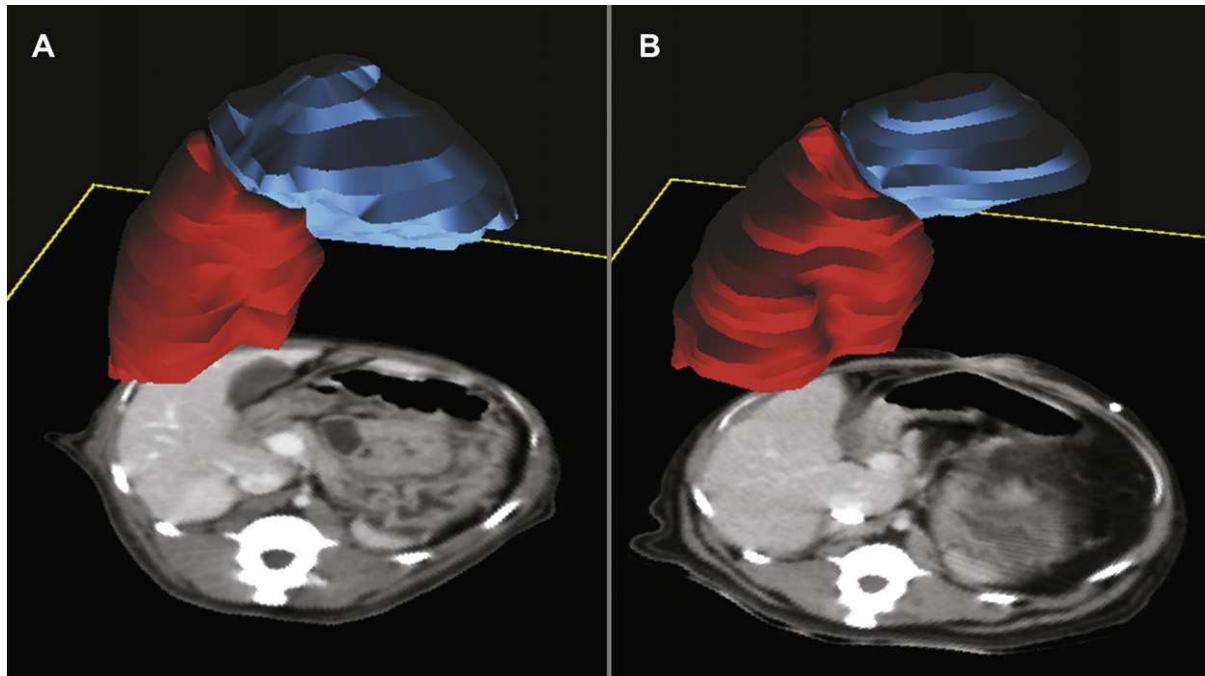


Fig. 5. (A and B) 3D imaging of non-embolized (red) and embolized (blue) liver before (A) and 1 month (B) after reversible PVE in one monkey. (C) Mean total, non-embolized and embolized liver volumes before (black) and after (white) reversible PVE. Hypertrophy and atrophy of the non-embolized and embolized liver, respectively, were found to be statistically significant. (This figure appears in colour on the web.)

Little is known about the time course of portal branch recanalization after embolization with absorbable material. In dogs, the complete recanalization of the portal bed was observed 4–8 weeks after PVE with large gelfoam strips. However, no intermediate results were reported [21]. In our study, the time course of recanalization was systematically evaluated by repeated portograms. The obstruction of the embolized portal segments remained complete for 6–8 days and recanalization occurred from the large proximal vein down-

wards. The recanalization of the embolized portal territory was complete after about 2 weeks. Our results therefore suggest that the use of Curaspon powder results in the wholly reversible embolization of the portal branches.

Permanent obstruction of the portal branches is known to induce hepatocyte proliferation in the non-obstructed liver. It has been shown in our primate model and, more generally, in both pigs and non-pathological human livers, that hepatocyte proliferation occurs

Table 2
Liver volumes before and after reversible PVE in monkeys

	Liver volumes before PVE			Liver volumes after PVE		
	NE (ml)	E (ml)	NE/Total (%)	NE (ml)	E (ml)	NE/Total (%)
Monkey 1	28.2	45.1	38.4	39.5	32.5	54.8
Monkey 2	32.6	53	38	44.9	38.4	53.9
Monkey 3	21.9	32.3	40.4	25.4	20.5	55.3
Monkey 4	24.8	43.7	36.2	42.1	34.5	55
Monkey 5	42.1	52.4	44.5	45	37.6	54.5
Monkey 6	21.9	47.5	31.5	33.4	30.6	52.2
Monkey 7	25.8	42.1	38	38.9	32.1	54.8
Monkey 8	22.2	33.1	40.1	37.9	27.7	57.8
Mean \pm SEM	27.4 \pm 2.4	43.6 \pm 2.7	38.4 \pm 1.3	38.4 \pm 2.3	31.7 \pm 2.0	54.8 \pm 0.5

Abbreviations: PVE, portal vein embolization; NE, non-embolized liver volume; E, embolized liver volume.

during the first 15 days following permanent PVE [15–19]. Although the obstruction of the portal branches was reversible and of short duration in our study, it efficiently induced hepatocyte division in the non-occluded liver segments. The rate of hepatocyte division peaked 3 days after embolization, decreasing thereafter. The time course of proliferation after reversible PVE was similar to that previously reported after permanent PVE with cyanoacrylate in the same experimental model [15]. The peak rate of hepatocyte division in the non-occluded segments was high and similar to that usually reported in the remnant liver after major hepatectomy [28,29].

Based on the results obtained in dogs, embolization with gelfoam was thought to be too transient for the induction of liver regeneration [21]. Gelfoam has therefore been used in combination with polyiodocanol or small coils, to ensure a sufficient embolization [20,30]. Our results suggest that the temporary obstruction of the portal branches with Curaspon powder results in hypertrophy of the non-occluded segments similar to that observed during the definitive obstruction of portal branches [7,14,20,21]. Hepatocyte division after reversible PVE resulted in a significant increase in non-embolized liver volume (approximately 40% in 1 month). In our study, liver hypertrophy was not transient and non-embolized liver volume did not decrease to pre-embolization levels, even 1 year after PVE. The efficiency of Curaspon powder may be related to the distal nature of venous obstruction. The frequently used gelfoam strips (10 mm \times 1 mm) obstruct larger portal branches, potentially leading to earlier reperfusion of the embolized lobe. This may account for the inability of PVE to induce compensatory liver hypertrophy in some studies [20,21]. Embolization with Curaspon powder could be considered to be the ultimate form of embolization: very distal with no immediate possibility of revascularization.

Partial portal occlusion by ligation or permanent PVE is a safe and effective method for inducing long-term regeneration of the non-occluded lobes of the liver

in humans [10,31]. Our experimental study demonstrates the safety and efficacy of reversible PVE for inducing hepatocyte proliferation and liver regeneration in the non-embolized segments. The time course of portal recanalization observed with Curaspon powder suggests that this technique is of potentially great importance in clinical practice, in situations in which short-term regeneration is required. For example, in multi-step management of hepatic malignancies [32,33], the use of an absorbable agent for embolization may well increase the number of different treatment combinations possible. Reversible PVE may also be preferred in the management of patients without cancers, in whom the embolized liver is not finally resected. This may well be the case in hepatocyte transplantation, which represents an interesting alternative to liver transplantation for the treatment of hereditary metabolic disorders [34–39]. We previously studied PVE with cyanoacrylate before hepatocyte transplantation. Permanent PVE induced cell proliferation and improved hepatocyte engraftment in primates [15]. The temporary blocking of endogenous hepatocyte proliferation in the occluded lobes following reversible PVE may provide a “physiological space” for the transplanted cells. The 2-week interval provided by the use of absorbable material for PVE should therefore allow the engraftment of transplanted cells without generating long-term scarring of the liver.

In conclusion, this is the first experimental report of the successful use of reversible PVE for the safe induction of significant hepatocyte proliferation and liver regeneration. These findings suggest that this method could reliably be used for clinical purposes, particularly in situations in which short-term regeneration is required.

Acknowledgments

This research was supported by the *Association Française contre les Myopathies (AFM)* and the Paris-Sud University. We thank Drs. Patrick Devauchelle

and Françoise Delisle (Service de Radiologie, Ecole Nationale Vétérinaire, Maisons-Alfort), Drs. Alexandre Laurent and Guy Germain (INRA, Jouy-en-Josas), for assistance in radiology and in the management of primates. P Lainas was supported by the AFM, L Boudechiche was supported by the Inserm (poste d'accueil).

References

- [1] Yokoyama Y, Nagino M, Nimura Y. Mechanisms of hepatic regeneration following portal vein embolization and partial hepatectomy: a review. *World J Surg* 2007;31:367–374.
- [2] Azoulay D, Raccuia JS, Castaing D, Bismuth H. Right portal vein embolization in preparation for major hepatic resection. *J Am Coll Surg* 1995;181:266–269.
- [3] Nagino M, Nimura Y, Kamiya J, Kondo S, Uesaka K, Kin Y, et al. Right or left trisegment portal vein embolization before hepatic trisegmentectomy for hilar bile duct carcinoma. *Surgery* 1995;117:677–681.
- [4] de Baere T, Roche A, Elias D, Lasser P, Lagrange C, Bousson V. Preoperative portal vein embolization for extension of hepatectomy indications. *Hepatology* 1996;24:1386–1391.
- [5] Hemming AW, Reed AI, Howard RJ, Fujita S, Hochwald SN, Caridi JG, et al. Preoperative portal vein embolization for extended hepatectomy. *Ann Surg* 2003;237:686–691.
- [6] Madoff DC, Abdalla EK, Vauthey JN. Portal vein embolization in preparation for major hepatic resection: evolution of a new standard of care. *J Vasc Interv Radiol* 2005;16:779–790.
- [7] Farges O, Belghiti J, Kianmanesh R, Regimbeau JM, Santoro R, Vilgrain V, et al. Portal vein embolization before right hepatectomy: prospective clinical trial. *Ann Surg* 2003;237:208–217.
- [8] Azoulay D, Castaing D, Krissat J, Smail A, Hargreaves GM, Lemoine A, et al. Percutaneous portal vein embolization increases the feasibility and safety of major liver resection for hepatocellular carcinoma in injured liver. *Ann Surg* 2000;232:665–672.
- [9] Tanaka H, Hirohashi K, Kubo S, Shuto T, Higaki I, Kinoshita H. Preoperative portal vein embolization improves prognosis after right hepatectomy for hepatocellular carcinoma in patients with impaired hepatic function. *Br J Surg* 2000;87:879–882.
- [10] Aussilhou B, Lesurtel M, Sauvanet A, Farges O, Dokmak S, Goasguen N, et al. Right portal vein ligation is as efficient as portal vein embolization to induce hypertrophy of the left liver remnant. *J Gastrointest Surg* 2008;12:297–303.
- [11] Adam R, Laurent A, Azoulay D, Castaing D, Bismuth H. Two-stage hepatectomy: a planned strategy to treat irresectable liver tumors. *Ann Surg* 2000;232:777–785.
- [12] Kianmanesh R, Farges O, Abdalla EK, Sauvanet A, Ruszniewski P, Belghiti J. Right portal vein ligation: a new planned two-step all-surgical approach for complete resection of primary gastrointestinal tumors with multiple bilateral liver metastases. *J Am Coll Surg* 2003;197:164–170.
- [13] Elias D, Debaere T, Roche A, Bonvallot S, Lasser P. Preoperative selective portal vein embolizations are an effective means of extending the indications of major hepatectomy in the normal and injured liver. *Hepatogastroenterology* 1998;45:170–177.
- [14] Jaeck D, Bachellier P, Nakano H, Oussoultzoglou E, Weber JC, Wolf P, et al. One or two-stage hepatectomy combined with portal vein embolization for initially nonresectable colorectal liver metastases. *Am J Surg* 2003;185:221–229.
- [15] Dagher I, Boudechiche L, Branger J, Coulomb-Lhermine A, Parouchev A, Sentilhes L, et al. Efficient hepatocyte engraftment in a nonhuman primate model after partial portal vein embolization. *Transplantation* 2006;82:1067–1073.
- [16] Nagino M, Nimura Y, Kamiya J, Kondo S, Uesaka K, Kin Y, et al. Changes in hepatic lobe volume in biliary tract cancer patients after right portal vein embolization. *Hepatology* 1995;21:434–439.
- [17] Harada H, Imamura H, Miyagawa S, Kawasaki S. Fate of the human liver after hemihepatic portal vein embolization: cell kinetic and morphometric study. *Hepatology* 1997;26:1162–1170.
- [18] Ribero D, Abdalla EK, Madoff DC, Donadon M, Loyer EM, Vauthey JN. Portal vein embolization before major hepatectomy and its effects on regeneration, resectability and outcome. *Br J Surg* 2007;94:1386–1394.
- [19] Duncan JR, Hicks ME, Cai SR, Brunt EM, Ponder KP. Embolization of portal vein branches induces hepatocyte replication in swine: a potential step in hepatic gene therapy. *Radiology* 1999;210:467–477.
- [20] Kaneko T, Nakao A, Takagi H. Clinical studies of new material for portal vein embolization: comparison of embolic effect with different agents. *Hepatogastroenterology* 2002;49:472–477.
- [21] Huang JY, Yang WZ, Li JJ, Jiang N, Zheng QB. Portal vein embolization induces compensatory hypertrophy of remnant liver. *World J Gastroenterol* 2006;12:408–414.
- [22] CEE 86/609. Official Journal of the EEC 18/102/1986;L 358:1–28.
- [23] Germain-Renaud C, Osorio A, Texier R. Interactive volume reconstruction and measurement on the grid. *Methods Inf Med* 2005;44:227–232.
- [24] Available from: <http://perso.limsi.fr/osorio/>.
- [25] Yamakado K, Takeda K, Matsumura K, Nakatsuka A, Hirano T, Kato N, et al. Regeneration of the un-embolized liver parenchyma following portal vein embolization. *J Hepatol* 1997;27:871–880.
- [26] Di Stefano DR, de Baere T, Denys A, Hakime A, Gorin G, Gillet M, et al. Preoperative percutaneous portal vein embolization: evaluation of adverse events in 188 patients. *Radiology* 2005;234:625–630.
- [27] Ko GY, Sung KB, Yoon HK, Kim JH, Weon YC, Song HY. Preoperative portal vein embolization with a new liquid embolic agent. *Radiology* 2003;227:407–413.
- [28] Kahn D, Stadler J, Terblanche J, van Hoorn-Hickman R. Thymidine kinase: an inexpensive index of liver regeneration in a large animal model. *Gastroenterology* 1980;79:907–911.
- [29] Nagy P, Teramoto T, Factor VM, Sanchez A, Schnur J, Paku S, et al. Reconstitution of liver mass via cellular hypertrophy in the rat. *Hepatology* 2001;33:339–345.
- [30] Tsuda M, Kurihara N, Saito H, Yamaki T, Shimamura H, Narushima Y, et al. Ipsilateral percutaneous transhepatic portal vein embolization with gelatin sponge particles and coils in preparation for extended right hepatectomy for hilar cholangiocarcinoma. *J Vasc Interv Radiol* 2006;17:989–994.
- [31] Broering DC, Hillert C, Krupski G, Fischer L, Mueller L, Achilles EG, et al. Portal vein embolization vs portal vein ligation for induction of hypertrophy of the future liver remnant. *J Gastrointest Surg* 2002;6:905–913.
- [32] Elias D, Santoro R, Ouellet JF, Osmak L, de Baere T, Roche A. Simultaneous percutaneous right portal vein embolization and left liver tumor radiofrequency ablation prior to a major right hepatic resection for bilateral colorectal metastases. *Hepatogastroenterology* 2004;51:1788–1791.
- [33] Jaeck D, Oussoultzoglou E, Rosso E, Greget M, Weber JC, Bachellier P. A two-stage hepatectomy procedure combined with portal vein embolization to achieve curative resection for initially unresectable multiple and bilobar colorectal liver metastases. *Ann Surg* 2004;240:1037–1049.

- [34] Grossman M, Rader DJ, Muller DW, Kolansky DM, Kozarsky K, Clark 3rd BJ, et al. A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia. *Nat Med* 1995;1:1148–1154.
- [35] Horslen SP, Fox IJ. Hepatocyte transplantation. *Transplantation* 2004;77:1481–1486.
- [36] Muraca M, Gerunda G, Neri D, Vilei MT, Granato A, Feltracco P, et al. Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a. *Lancet* 2002;359:317–318.
- [37] Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD. Hepatocyte transplantation for liver-based metabolic disorders. *J Inherit Metab Dis* 2006;29:431–435.
- [38] Fisher RA, Strom SC. Human hepatocyte transplantation: worldwide results. *Transplantation* 2006;82:441–449.
- [39] Weber A, Mahieu-Caputo D, Hadchouel M, Franco D. Hepatocyte transplantation: studies in preclinical models. *J Inherit Metab Dis* 2006;29:436–441.

DISCUSSION DE L'ARTICLE

Afin d'évaluer l'effet d'une EPP réversible sur la transplantation d'hépatocytes, nous avons utilisé notre modèle préclinique de primate. Ce travail nous a permis d'évaluer la cinétique de recanalisation portale suite à une EPP réversible par un produit résorbable, le Curaspon® en poudre, ainsi que son efficacité d'induire la prolifération hépatocytaire et l'hypertrophie du foie non-embolisé.

Notre but a été d'emboliser environ 60% du foie du singe, l'équivalent en pourcentage du volume hépatique d'une EPP droite chez l'homme. Pour cela, nous avons décidé d'emboliser la branche gauche (30-35% du volume hépatique) et la branche du secteur antérieur droit (25-30% du volume hépatique) de la veine porte des 9 macaques (*Macaca Mulatta*). L'EPP réversible par le Curaspon® a été bien tolérée par tous les animaux, sans importante augmentation de la pression portale durant ou après l'embolisation. Aucun cas de thrombose porte n'a été détecté. L'augmentation du niveau des transaminases sanguines était plus importante que celle observée dans notre précédente étude d'EPP par l'Histoacryl®, un produit non-résorbable, chez le même modèle animal [278]. La raison pour cette différence peut être que l'EPP au Cupaspon® en poudre provoque une obstruction veineuse plus complète s'étendant des branches portales principales jusqu'aux branches distales, de petits calibres, ayant comme résultat une obstruction complète au niveau des sinusoides et des plus importantes lésions directes au niveau des hépatocytes. Cependant, le niveau des transaminases dans notre étude est revenu à la normale trois jours après l'intervention. Des biopsies hépatiques effectuées 15 jours après l'EPP réversible ont démontré l'absence des réactions inflammatoires dans les espaces portes ainsi que

l'absence de nécrose hépatocytaire. Nous avons donc montré que l'EPP réversible au Curaspon® poudre est une technique faisable et sans danger chez le macaque.

La recanalisation hépatique après EPP au Curaspon® a été étudiée à l'aide de portographies successives. L'occlusion des segments embolisés restait complète pendant 6-8 jours et la recanalisation survenait de la partie proximale de la veine vers les sinusoides. La recanalisation complète du territoire portal était observée environ deux semaines après l'EPP. Nos résultats ont montré que l'EPP au Curaspon® poudre provoque une occlusion portale partielle entièrement réversible qui dure environ deux semaines, période durant laquelle la majeure partie de la régénération hépatique est notée [278, 606, 608, 611, 618].

Nous avons ensuite évalué l'efficacité de l'EPP réversible à induire une régénération hépatique. Dans notre étude, malgré la réversibilité et la courte durée de l'occlusion portale, elle a induit une prolifération hépatocytaire importante dans les segments hépatiques non-embolisés. Cette embolisation a permis une prolifération hépatocytaire de 13.5%, 10.5% et 9.1% au 3^{ème}, 5^{ème} et 7^{ème} jours, respectivement. Cette cinétique est très proche de celle que nous avons obtenu par l'EPP définitive à l'Histoacryl® dans le même modèle animal [278]. En plus, le taux maximum de prolifération hépatocytaire dans notre étude est similaire à celui après hépatectomie majeure dans d'autres études expérimentales [534, 619]. Des scanners effectués avant et après embolisation chez nos primates ont aussi montré une importante augmentation du volume du foie non-embolisé, de l'ordre de 40%, un mois après EPP réversible. Nous avons donc montré que la prolifération hépatocytaire après EPP réversible débute très précocement, la régénération des segments non-embolisés est importante et se produit essentiellement pendant les deux premières semaines après EPP.

Ce travail est la première étude expérimentale dans la littérature qui montre l'efficacité de l'EPP réversible à induire une importante prolifération hépatocytaire et régénération hépatique. L'hypertrophie des segments non-embolisés est similaire à celle après une EPP définitive. L'utilisation du Curaspon®, sous forme de poudre résorbable, peut être considérée comme la forme la plus évoluée d'embolisation : très distale, résorbable et qui dure suffisamment pour induire l'hypertrophie hépatique. La cinétique de recanalisation après EPP réversible suggère que cette technique pourrait être indiquée dans des situations cliniques nécessitant une régénération hépatique de courte durée, comme dans le traitement de cancers du foie en plusieurs étapes [577, 585, 620]. L'EPP réversible pourrait aussi avoir une indication dans des cas qui ne nécessitent pas une résection hépatique, comme la transplantation d'hépatocytes pour le traitement de maladies métaboliques du foie. L'atrophie des segments hépatiques embolisés après une EPP réversible pourrait créer « l'espace physiologique » nécessaire pour une importante prolifération d'hépatocytes transplantés sans la présence des lésions définitives du foie embolisé de façon temporaire.

Les résultats très encourageants de ce travail nous ont permis de procéder à l'étape suivante de notre protocole préclinique de transplantation d'hépatocytes pour le traitement de l'hypercholestérolémie familiale : la transplantation d'hépatocytes génétiquement modifiés ex vivo après une EPP réversible chez le singe.

Efficient hepatocyte engraftment and long-term transgene expression after reversible portal embolization in nonhuman primates

Ibrahim DAGHER, Tuan Huy NGUYEN, Marie-Thérèse GROYER-PICARD, Panagiotis LAINAS, Sylvie MAINOT, Catherine GUETTIER, Danièle PARIENTE, Dominique FRANCO, Anne WEBER

(Hepatology 2009; 49:950-959 [621])

PRESENTATION DE L'ARTICLE

Les deux problèmes majeurs liés à l'autotransplantation d'hépatocytes génétiquement modifiés *ex vivo* sont la faible efficacité de transduction hépatocytaire par les vecteurs viraux utilisés ainsi que le faible pourcentage d'hépatocytes greffés.

En ce qui concerne l'efficacité de transduction hépatocytaire, il existe aujourd'hui plusieurs vecteurs pour effectuer la transduction d'hépatocytes et introduire un gène manquant. Les vecteurs les plus efficaces pour un transfert génique sont les vecteurs lentiviraux, car ils ont la capacité de transduire des cellules quiescentes à un taux très élevé et s'intégrer dans le génome de la cellule-hôte. Ces vecteurs lentiviraux, dérivés du VIH-1, défectifs de type-SIN [380, 422, 622], ont un risque réduit de mutagenèse et ont été utilisés avec grand succès dans la transduction d'hépatocytes humains *ex vivo* [490, 495]. Nous avons aussi récemment démontré qu'un fragment de 911 paires de bases qui correspondait au promoteur du gène de l'apolipoprotéine A-II humain est actif dans les hépatocytes simiens après transduction par un vecteur lentiviral de type SIN [452].

L'autre étape limitante de la thérapie génique *ex vivo* est le faible pourcentage de cellules greffées dans le parenchyme hépatique suite à une transplantation hépatocytaire. Plusieurs modèles murins ont démontré une faible efficacité de greffe d'hépatocytes transplantés sans la présence d'un stimulus de régénération. En effet, dans ces modèles murins, plus de 70% de cellules restaient piégées dans les espaces portes après leur transplantation sans jamais arriver aux sinusoides hépatiques

[524, 623]. Une repopulation hépatique significative survient seulement quand les hépatocytes résidents sont détruits ou bloqués ainsi que quand les hépatocytes transplantés expriment un avantage sélectif sur les cellules résidentes. Cependant, ces approches utilisées chez les animaux ne peuvent en aucun cas être transposées en clinique.

Dans nos travaux antérieurs chez le macaque, nous avons démontré que l'EPP définitive améliore le pourcentage de prise de greffe d'hépatocytes transplantés [278]. Nous avons aussi démontré qu'une EPP réversible avec un matériel résorbable est capable d'induire une régénération hépatique du foie non-embolisé d'environ 40% en moyenne chez le même animal [612].

Dans cette étude nous avons mis en place les données acquises durant les dix dernières années de notre recherche pour développer une nouvelle approche d'autotransplantation d'hépatocytes génétiquement modifiés chez le macaque *Macaca Mulatta* après EPP réversible.

Les buts de notre étude ont été :

- i) d'évaluer l'effet de l'EPP réversible sur la prise de greffe d'hépatocytes marqués au Hoechst ou transduits par un vecteur lentiviral dans un modèle d'autotransplantation d'hépatocytes ;
- ii) d'évaluer l'expression à long terme du gène introduit et contrôlé par un promoteur hépatospécifique chez le macaque.

Efficient Hepatocyte Engraftment and Long-Term Transgene Expression After Reversible Portal Embolization in Nonhuman Primates

Ibrahim Dagher,^{1,2,3*} Tuan Huy Nguyen,^{4*} Marie-Thérèse Groyer-Picard,^{1,2*} Panagiotis Lainas,^{1,2,3} Sylvie Mainot,^{1,2} Catherine Guettier,^{2,5,7} Danièle Pariente,^{1,2,6} Dominique Franco,^{1,2,3} and Anne Weber^{1,2}

The feasibility of *ex vivo* gene therapy as an alternative to liver transplantation for the treatment of liver metabolic diseases needs to be analyzed in large animal models. This approach requires appropriate gene transfer vectors and effective hepatocyte engraftment. Lentiviral vectors have the ability to transduce nondividing differentiated cells, such as hepatocytes, and portal vein occlusion increases hepatocyte engraftment. We investigated whether reversible portal vein embolization combined with *ex vivo* lentivirus-mediated gene transfer is an effective approach for successful hepatocyte engraftment in nonhuman primates and whether the transgene remains expressed in the long term in transplanted hepatocytes *in situ*. Simian hepatocytes were isolated after left lobe resection, and the left and right anterior portal branches of animals were embolized with absorbable material. Isolated hepatocytes were labeled with Hoechst dye or transduced in suspension with lentiviruses expressing green fluorescent protein under the control of the human apolipoprotein A-II promoter and transplanted via the inferior mesenteric vein. The whole procedure was well tolerated. The embolized liver was revascularized within 2 weeks. The volume of nonembolized liver increased from 38.7% \pm 0.8% before embolization to 55.9% \pm 1% after embolization and hepatocytes significantly proliferated (10.5% \pm 0.4% on day 3 after embolization). Liver repopulation after transplantation with Hoechst-labeled hepatocytes was 7.4% \pm 1.2%. Liver repopulation was 2.1% \pm 0.2% with transduced hepatocytes, a proportion similar to that obtained with Hoechst-labeled cells, given that the mean transduction efficacy of simian hepatocyte population was 34%. Transgene expression persisted at 16 weeks after transplantation. **Conclusion:** We have developed a new approach to improve hepatocyte engraftment and to express a transgene in the long term in nonhuman primates. This strategy could be suitable for clinical applications. (HEPATOLOGY 2009;49:950-959.)

Orthotopic liver transplantation is the only available curative treatment for various liver diseases and genetic metabolic disorders. Owing to the limited availability of donor livers, alternative approaches such as hepatocyte transplantation have been proposed.^{1,2} However, the increasing organ shortage makes the supply

of tissue for cell transplantation very limited.³ There are often no unused donor livers available when a patient requires cell transplantation; most patients therefore receive cryopreserved cells, the functionality of which remains lower than that of freshly isolated hepatocytes.² Transplantation of *ex vivo* genetically modified autolo-

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; ApoA-II, apolipoprotein A-II; AST, aspartate aminotransferase; BIL, total bilirubin; GFP, green fluorescent protein; GGT, gamma glutamyl transferase; MFI, mean fluorescence intensity; MLV, Moloney leukemia virus; mPRE, mutated posttransductional regulatory element from woodchuck hepatitis virus; MOI, multiplicity of infection; RPVE, reversible portal vein embolization; SIN, self-inactivating; PVE, portal vein embolization; wPRE, wild-type posttransductional regulatory element from woodchuck hepatitis virus.

From the ¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité 972, Institut Fédératif de Recherche 93, Bicêtre Hospital, Kremlin-Bicêtre, France; ²Université Paris-Sud, Orsay, France; ³Department of Surgery, Antoine Bécère Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Clamart, France; ⁴INSERM Unité 948, Centre Hospitalier Universitaire Hôtel Dieu, Nantes, France; ⁵Department of Pathology, and ⁶Department of Pediatric Radiology, Bicêtre Hospital, AP-HP, Kremlin-Bicêtre, France; ⁷INSERM Unité 785, Villejuif, France.

Received August 16, 2008; accepted November 7, 2008.

This project was supported by Association Française contre les Myopathies (AFM) and INSERM. P. Lainas was supported by AFM.

*These authors contributed equally to this work.

gous hepatocytes is considered as an alternative strategy, which avoids the need for donor livers and the problems related to immunosuppression.⁴

However, this approach is hampered by the poor engraftment of transplanted hepatocytes in recipient livers and the low efficiency of hepatocyte transduction. To date, only one clinical trial has been carried out using autotransplantation of oncoretrovirally-transduced hepatocytes.⁵ Although such recombinant vectors, derived from murine Moloney leukemia virus (MLV), have been widely used to introduce genes in gene therapy clinical trials, transgene expression is frequently affected by the flanking host chromatin. MLV insertions can often result in gene silencing or variation of gene expression due to position effects, either immediately after insertion or following cell expansion in culture or *in vivo*.⁶⁻⁸ These problems represent a major challenge for the use of MLV vectors in the treatment of human diseases. The ability of lentiviral vectors to both transduce noncycling cells and to integrate into the host cell chromosome have made them suitable vectors for gene transfer, especially when a long-term effect is necessary. Advances in the generation of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)-derived lentiviral vectors have driven a number of recent breakthroughs. These vectors are self-inactivating (SIN) constructs, in which the viral enhancer and promoter in the U3 region of the 3' long terminal repeat are deleted, leading to inactivation of both long terminal repeats upon integration of the vector into the target cell genome.⁹⁻¹¹ This significantly reduces the risk of enhancer-mediated mutagenesis and enables the use of cellular promoters that may provide a physiological level of transgene expression. We and others have previously demonstrated that these third-generation HIV-1-derived lentiviral vectors transduce primary human hepatocytes efficiently.^{12,13} We recently demonstrated that fragment of 911 base pairs corresponding to the human apolipoprotein A-II (ApoA-II) 5' flanking regions was specifically active in simian hepatocytes transduced with SIN-lentiviral vector.¹⁴

Cell engraftment in the liver parenchyma is another limiting step for both *ex vivo* gene therapy and cell transplantation approaches. Numerous rodent models have demonstrated that the engraftment efficacy of hepatocytes is low, with up to 70% of transplanted rat hepatocytes remaining trapped in portal spaces.^{15,16} Significant

liver repopulation occurs only when resident hepatocytes are destroyed or blocked and when transplanted hepatocytes display a selective advantage over host cells. However, the procedures used in rodents cannot be used in patients.

Preoperative portal vein occlusion of diseased liver is routinely used to induce hypertrophy of the remnant normal liver, and consequently increases the number of cancer patients amenable to surgery.^{17,18} This can be achieved by two means: partial portal ligation or partial portal embolization.¹⁹ We previously compared these two procedures in cynomolgus monkeys. We demonstrated that permanent portal embolization induces liver regeneration and improves the engraftment of transplanted hepatocytes in these monkeys.^{20,21} We have also shown that a reversible portal vein embolization (RPVE) is sufficient to induce liver regeneration.²²

In this study, we developed a new approach for hepatocyte autotransplantation and examined the effect of RPVE on the efficacy of lentivirally-transduced hepatocyte engraftment in nonhuman primates, i.e., macaca monkeys. We also investigated the long-term expression of the transgene driven by a hepatic promoter. We found that RPVE efficiently promoted the engraftment of transduced hepatocytes, leading to significant repopulation. Engrafted hepatocytes still expressed the transgene driven by the human ApoA-II promoter 16 weeks after transplantation.

Materials and Methods

Animals. Monkeys (*Macaca mulatta*) were housed at the Institut National de la Recherche Agronomique, Jouy-en-Josas, or at the Boisbonne Center, Nantes, France, with agreement from the local Ethics Committee. They were seronegative for simian herpes virus, simian type D retrovirus, simian immunodeficiency virus, and simian T cell leukemia virus. All animals received humane care, and experiments were carried out in accordance with the guidelines of the French Ministry of Agriculture. We used seven monkeys, 3-6 years old, weighing 3.2-5.5 kg.

Left Lobe Resection and Reversible Portal Embolization. Surgery was performed as previously described.²¹ Briefly, monkeys were sedated by an intramuscular injection of ketamine and general anesthesia was induced in-

Address reprint requests to: Anne Weber, INSERM Unité 972, Hôpital de Bicêtre, 80 Avenue du Général Leclerc, Le Kremlin-Bicêtre, F-94276, France. E-mail: anne.weber@inserm.fr; fax: +33 1 49 59 19 59.

Copyright © 2008 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/hep.22739

Potential conflict of interest: Nothing to report.

travenously with propofol and sufentanil. A left lobectomy was carried out and the left lobe, corresponding to approximately 20% of the liver mass, was used for hepatocyte isolation.

RPVE was performed using an absorbable gelatin sponge (Curaspon; Curamedical, Zwaneburg, The Netherlands).²² A first portogram was taken to map the portal branches before embolization, using an introducer placed in the inferior mesenteric vein. Distal and proximal embolization of the left and right anterior portal branches were performed with a microcatheter selectively placed under fluoroscopic control. A second portogram was then performed to determine the success of complete embolization and the patency of the remaining portal branches. The introducer was then replaced by a 4.5-F venous catheter of a perfusion chamber (Celsite 4.5-F; Braun Medical, Boulogne-Billancourt, France), which was placed subcutaneously in the left anterior thoracic region to provide chronic access to the portal vein. Acetaminophen was used for postoperative analgesia.

Hepatocyte Proliferation and Liver Regeneration.

Dividing hepatocytes were detected by bromodeoxyuridine (BrdU) staining in liver biopsies at day 3 after embolization, from monkeys transplanted with Hoechst-labeled hepatocytes. BrdU (50 mg/kg body weight) was infused via the perfusion chamber 4 hours before liver biopsies were carried out. Immunostaining was carried out with a monoclonal anti-BrdU antibody (1:100 dilution; DakoCytomation). Binding of the mouse primary antibody was detected by an indirect avidin biotin peroxidase kit (DakoCytomation). The peroxidase reaction was carried out with 3'-diaminobenzidine (Beckman Coulter) and sections were counterstained with hematoxylin. Twelve sections were analyzed at different levels chosen randomly; at least 800 hepatocytes were counted in the different sections. The percentage of dividing hepatocytes corresponds to the ratio of BrdU-positive hepatocytes to total number of hepatocytes.

Changes in liver volumes were calculated on helical computed tomography scans performed before and 1 month after embolization (in National Veterinary School, Maisons-Alfort, France). Serial scans were carried out at 0.5 cm intervals and were enhanced with an intravenous bolus injection of contrast agent. Volumes were assessed by two independent observers, using PTM3D volumetry software.²³ The proportions of nonembolized to total liver volume were calculated.

Generation of Lentiviral Vectors. The vectors carry the enhanced green fluorescent protein (GFP) gene under the control of the human ApoA-II promoter. The pRRL-APOA-II-GFP and pRRL-APOA-II-GFP-wPRE vector plasmids were constructed from the pRRLSINFlap-GFP

backbone, (a kind gift from Genethon, Evry, France) by inserting the 911 base pairs of human APOA-II regulatory sequences. In the second plasmid, the wild-type post-transductional regulatory element from woodchuck hepatitis virus (wPRE) was included; in the third vector, wild-type PRE was replaced by mutated PRE (mPRE) containing mutations in the 5' sequences and the internal ATG of the truncated X protein present in the sequence (kindly provided by Dr. T. Hope, Northwestern University, Chicago, IL).

Concentrated lentivectors were produced by Vectalys (Toulouse, France) using transient quadritransfection of 293T cells with GFP lentiviral vector, a packaging plasmid encoding gagpol, a plasmid containing Rev, and a plasmid containing the vesicular stomatitis virus envelope G protein, followed by two rounds of ultrafiltration/diafiltration. Virus titration was carried out by real-time quantitative polymerase chain reaction on genomic DNA of serially-infected HCT116 cells using standard curves generated by serial dilution of lentiviral vector plasmid in HCT116 genomic DNA (Vectalys, France). Quantification of proviral sequences in the psi region was normalized to the human housekeeping albumin gene. Titration yielded a mean value of 0.5×10^9 to 1×10^9 infectious particles/mL.

Hepatocyte Isolation, Hoechst Labeling or Lentiviral Transduction, and Transplantation. Hepatocytes were isolated from the left lobe by two-step collagenase perfusion. Hepatocyte viability was determined by Trypan blue dye exclusion (viability greater than 95%). Cells were seeded onto Falcon Primaria culture dishes (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) at a density of 67,000 cells/cm² in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)/Ham F12 medium (Eurobio, Les Ulis, France) containing 10% fetal bovine serum (PAA Laboratories, Les Mureaux, France), glutamine, and antibiotics (Eurobio).

Freshly-isolated hepatocytes were either immediately labeled with the Hoechst fluorescent dye (incubation for 30 minutes at 37°C) in a serum-free culture medium containing $50 \mu\text{g}/10^7$ cells/mL of Hoechst 33258 (Sigma) or were transduced with recombinant APOA-II lentivirus (10^7 cells/mL) for 1 hour at 37°C in University of Wisconsin solution (ViaSpan; DuPont Pharmaceuticals, Newark, DE) containing $50 \mu\text{M}$ vitamin E succinate (Sigma-Aldrich, France). Before transplantation, transduced hepatocytes were washed five times in cell plating medium, then two times in DMEM/Ham F12 without phenol red. Cells were suspended in a saline solution at a cell density of 10^7 cells/mL. Samples of transduced and control hepatocytes were plated and cultured on collagen-coated plates as described.²⁰

Transduction efficiency was determined by fluorescence-activated cell sorting (FACS) and by fluorescence microscopy after 5 days of culture. Glycogen storage was assayed after 4 days of culture, using the Periodate-Schiff technique according to McManus. Transduced or Hoechst-labeled hepatocytes were suspended in 10^7 cells/mL of normal saline containing heparin (25 U/mL) and infused through the Baby-Port, at a flow rate of 2 mL/minute. Portal pressure was continuously monitored during hepatocyte infusion.

Detection of Simian Transplanted Hepatocytes. Short-term biopsies were performed at 14 days after transplantation of Hoechst-labeled or lentivirally-transduced hepatocytes. Long-term biopsies were performed on animals that underwent transplantation with transduced hepatocytes at 8 or 16 weeks after transplantation.

Cryostat sections of animals transplanted with Hoechst-labeled hepatocytes were analyzed using an Axio-mager A1 microscope (Carl Zeiss, Göttingen, Germany), lens EC Plan-Neofluar, 20 \times -NA 0.5.

Paraffin-embedded liver sections (5 μ m) were permeabilized with 0.1% Triton X-100. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% H₂O₂ in phosphate-buffered saline for 20 minutes. Sections were incubated with anti-GFP anti-mouse antibody (dilution 1:100) (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France) for 2 hours at room temperature, then incubated for 1 hour with sheep anti-mouse immunoglobulin linked to horseradish peroxidase (dilution 1:100; (Amersham). The peroxidase reaction was carried out with 3'-diaminobenzidine (DakoFrance, Trappes, France). Twenty sections of each nonembolized liver segment were analyzed at random levels, on different biopsies (magnification 20 \times); at least 1200 hepatocytes per biopsy were counted in the different sections.

Integration of the transplanted hepatocytes within liver plates was studied by detection of E-cadherin, a major adhesion protein in the liver. Paraffin sections (5 μ m) were fixed as for GFP antibody detection. Slides were pretreated with 10 mM citrate buffer (pH 6) at 96°C for 30 minutes, then with 1% bovine serum albumin in phosphate-buffered saline at room temperature for 1 hour. They were incubated overnight at 4°C with mouse monoclonal anti-human E-cadherin antibody (1:50 dilution; Dako) and then at room temperature for 1 hour with anti-mouse immunoglobulin linked to horseradish peroxidase. The peroxidase reaction was carried out with 3'-diaminobenzidine (DakoFrance). Sections were analyzed on a Leica DMR microscope and images were treated using Axiovision software.

Statistical Analysis. All data are expressed as the mean \pm standard error of the mean.

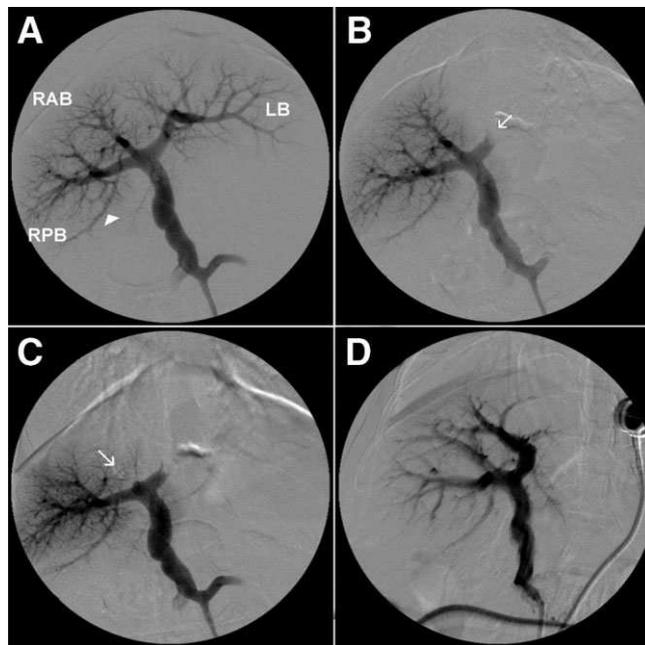


Fig. 1. Effects of RPVE with gelfoam were followed using successive portograms: (A) before RPVE and (B) after embolization of the left portal branch (LB) and (C) of the right anterior portal branch (RAB). Small arrows (\rightarrow) show the embolized portal branches. The right posterior portal branch (RPB) and the main branch for segment I (Δ) remain patent. (D) Portogram showing complete revascularization of RAB and partial revascularization of LB on day 12 after embolization.

Results

Safety of the Experimental Protocol: Left Lobe Resection, Reversible Embolization, Hepatocyte Transplantation. The left lobe resection and the embolization of the left and right anterior portal branches (approximately 50% of the portal territory) were performed safely in all animals. Recanalization of the embolized segments was observed between 12 and 16 days after RPVE (Fig. 1).

Portal pressure increased moderately and transiently during portal embolization and hepatocyte transplantation: portal pressure increased from 7.7 ± 0.7 mm Hg to 10.7 ± 0.9 mm Hg during RPVE, returning to normal values 2 hours after surgery; it then increased to 14.6 ± 2.3 mm Hg during transplantation, dropping significantly to 8.9 ± 0.9 mm Hg 2 hours after transplantation (Fig. 2A).

We measured serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels as established markers of hepatocyte injury, as well as gamma glutamyl transferase (GGT) and bilirubin. Serum levels of AST, ALT, and bilirubin increased transiently and returned to normal levels 5 days after embolization. GGT levels did not change significantly (Fig. 2B).

Histological analysis of embolized segments did not reveal any cell necrosis. We observed slight sinusoidal di-

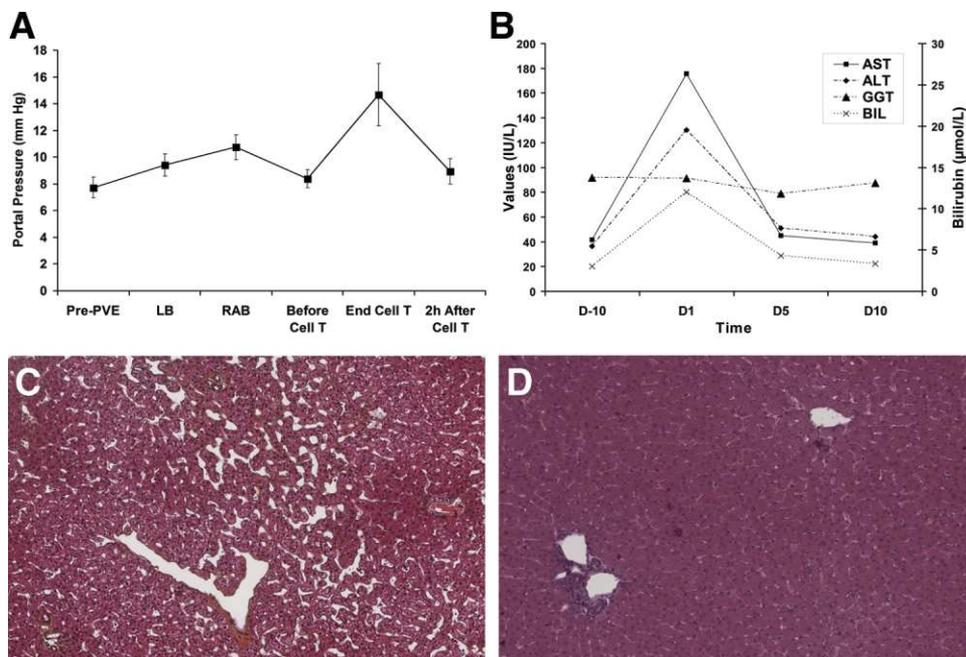


Fig. 2. Tolerance of the procedure. (A) Portal pressure before RPVE (pre-PVE), immediately after the embolization of the left (LB) and right anterior (RAB) portal branches, before hepatocyte transplantation (Before Cell T) (3 h post-PVE), at the end of hepatocyte transplantation (End Cell T), and 2 hours after hepatocyte transplantation (2h After Cell T). (B) Mean values of liver function tests after successive surgical interventions at different time points. H, hours; D, days; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; GGT, gamma glutamyl transferase; BIL, total bilirubin. (C) Histological analysis of embolized segment III at 14 days. Hematoxylin-eosin staining of a representative paraffin section showing residual sinusoidal dilatation. (D) Two months after embolization, embolized segments were histologically normal.

lations but did not detect any inflammatory reaction surrounding the gelfoam. On day 14, residual sinusoidal dilatations were still visible in some sections. Liver histology in embolized segments returned to normal within 2 months after embolization (Fig. 2C,D). No animals developed portal vein thrombosis.

Effects of Left Lobe Resection and RPVE on Hepatocyte Proliferation and Regeneration of the Non-embolized Segments. Computed tomography scan analysis carried out before and 1 month after the whole procedure showed hypertrophy of the nonembolized liver and atrophy of the embolized liver. The nonembolized liver volume had increased from 22.9 ± 1.5 mL to 33.7 ± 4.6 mL of the liver volume (Fig. 3A,B). The nonembolized segments represented $38.7\% \pm 0.8\%$ before surgery and $55.9\% \pm 1\%$ at 1 month after transplantation.

We characterized the regenerative response 3 days after surgery, corresponding to the hepatocyte proliferation peak observed in our previous study.²² We observed substantial hepatocyte proliferation in nonembolized segments (Fig. 3C). BrdU-positive hepatocytes represented $10.5\% \pm 0.4\%$ of total hepatocytes.

Hepatocyte Transduction. The pRRLSINFLAP vector is an advanced third-generation self-inactivating (SIN) and TAT-independent HIV-derived lentivector system harboring the cis-acting FLAP sequences.²⁴ One monkey was used for preliminary *in vitro* experiments. The left lobe was resected and perfused to determine the transduction efficacy of ApoA-II-GFP and ApoA-II-GFP-wPRE lentivectors. The maximum transduction ef-

ficacy was found at a multiplicity of infection (MOI) of 30 when the cells were incubated for 1 hour with the viruses. Notably, the level of GFP expression was five times lower when hepatocytes were transduced with the lentivector without wPRE (not shown). Therefore, simian hepatocytes isolated from monkeys to undergo transplantation were transduced with the ApoA-II-GFP-wPRE lentivectors at a MOI of 30. Figure 4E shows a diagram of the integrated form of ApoA-II-GFP-wPRE lentiviral vector.

The viability of simian hepatocytes was not significantly affected by incubation with lentivectors. Figure 4B illustrates a typical monolayer culture of transduced simian hepatocytes from a representative monkey. These cells have a well-preserved morphology, similar to that of control adherent cells (Fig. 4A). The ability to store glycogen was not altered by transduction in these cells (Fig. 4C). Maximum transduction efficiency was 45% in one monkey (Fig. 4D), confirmed by FACS analysis with a mean fluorescence intensity (MFI) of 99 at MOI of 30 (Fig. 4F). At MOI of 60, transduction efficiency decreased to 23% (Fig. 4G). FACS analysis of transduced hepatocytes from the three monkeys that underwent transplantation revealed that the mean transduction efficiency was 34%.

Finally, to optimize vector biosafety, we constructed a third vector containing a mutated PRE (mPRE) and compared the performance of the transgene with that of an identical lentiviral backbone in M6 hepatocytes (Fig. 4I). The MFI was 121, similar to that of hepatocytes transduced with APOA-II-GFP lentivector carrying wild-type PRE.

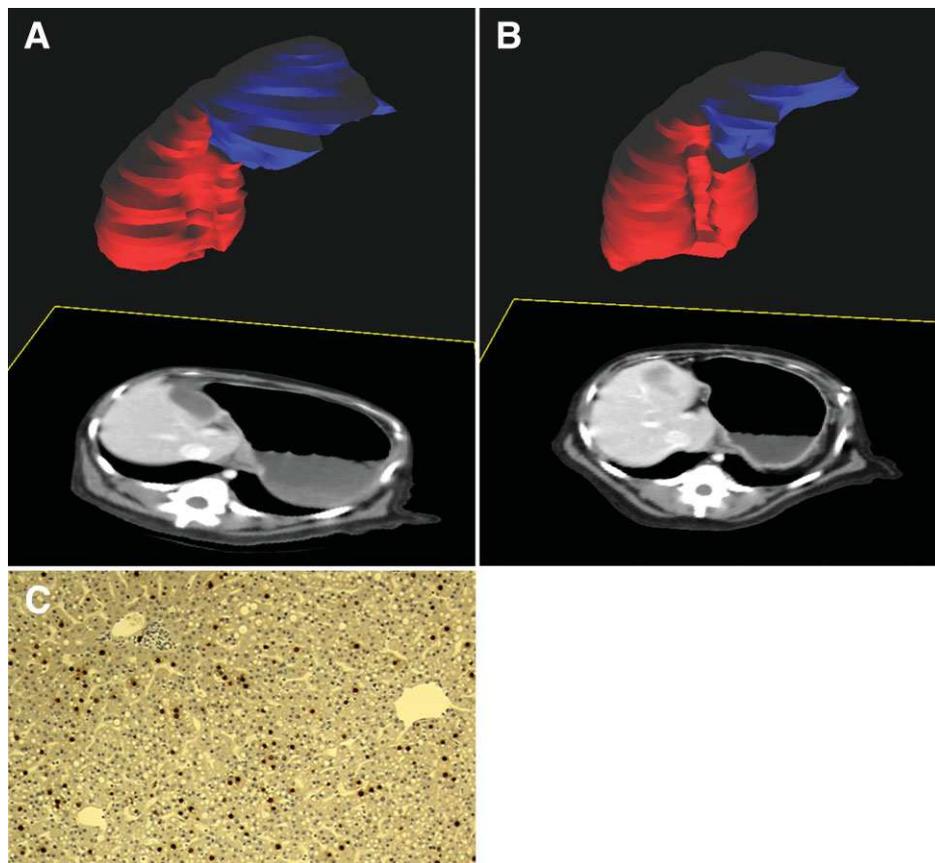


Fig. 3. RPVE induces compensatory hypertrophy of nonembolized segments. (A,B) Three-dimensional imaging of nonembolized liver (red), embolized liver and left liver lobe (blue), before and 4 weeks after embolization and lobectomy, showed hypertrophy of nonembolized segments and atrophy of embolized segments. (C) Hepatocyte division was measured by BrdU incorporation, revealed by immunoperoxidase with an antibody against BrdU. Representative staining showing BrdU incorporation in liver biopsies performed 3 days after embolization and hepatocyte transplantation. Results are from three different monkeys.

Short-Term Hepatocyte Engraftment. A first series of monkeys ($n = 3$) underwent transplantation with $3.2 \times 10^8 \pm 0.3 \times 10^8$ hepatocytes, 100% of which were labeled with Hoechst dye before transplantation.

On day 14 after transplantation, we found $7.4\% \pm 1.2\%$ Hoechst-labeled hepatocytes in the nonembolized segments (Fig. 5A,B). Transplanted hepatocytes were evenly distributed in nonembolized segments. Labeled hepatocytes were mostly located in the periportal regions, mainly as cell clusters. No labeled hepatocytes were observed in the embolized segments.

A second series of monkeys ($n = 3$) underwent transplantation with $3.0 \times 10^8 \pm 0.8 \times 10^8$ lentivirus-transduced hepatocytes. On day 14, the proportion of singlet engrafted hepatocytes was lower than that of clusters of hepatocytes (Fig. 5C,D). Transduced hepatocytes were evenly distributed within the parenchyma as small and large cell clusters, suggesting that transplanted cells had proliferated and had participated in liver regeneration. The percentage of GFP-expressing hepatocytes was $2.1\% \pm 0.2\%$. Figure 5C,D show representative fields of GFP-positive engrafted cells distributed within the monkey liver parenchyma.

To determine whether transplanted hepatocytes were truly integrated within liver parenchyma, we stained for

the presence of E-cadherin, a cell-cell adhesion molecule that ensures maintenance of tissue architecture. Figure 5E,F show that GFP-positive hepatocytes, together with resident neighboring hepatocytes, also express E-cadherin, which demonstrates their integration.

Long-Term Hepatocyte Engraftment and Transgene Expression. Long-term biopsies performed at 8 or 16 weeks on animals that underwent transplantation revealed clusters of GFP-positive hepatocytes (Fig. 6A-D). The mean percentage of hepatocytes successfully engrafted was $2.6\% \pm 0.9\%$ and $1.8\% \pm 0.2\%$ at 8 and 16 weeks, respectively. The proportion of cells producing GFP remained constant from day 14, showing that the human hepatic promoter was still active.

Discussion

Our study sought to determine the efficacy of a new strategy for ex vivo gene therapy. There are two major caveats to this approach, which we addressed directly. First, the efficiency of hepatocyte engraftment in nonconditioned livers is poor. Second, viral promoters are silenced or *in vivo* expression of cell promoters is low. Here, we used a clinically relevant animal model to address both of these issues. We demonstrated that the regeneration

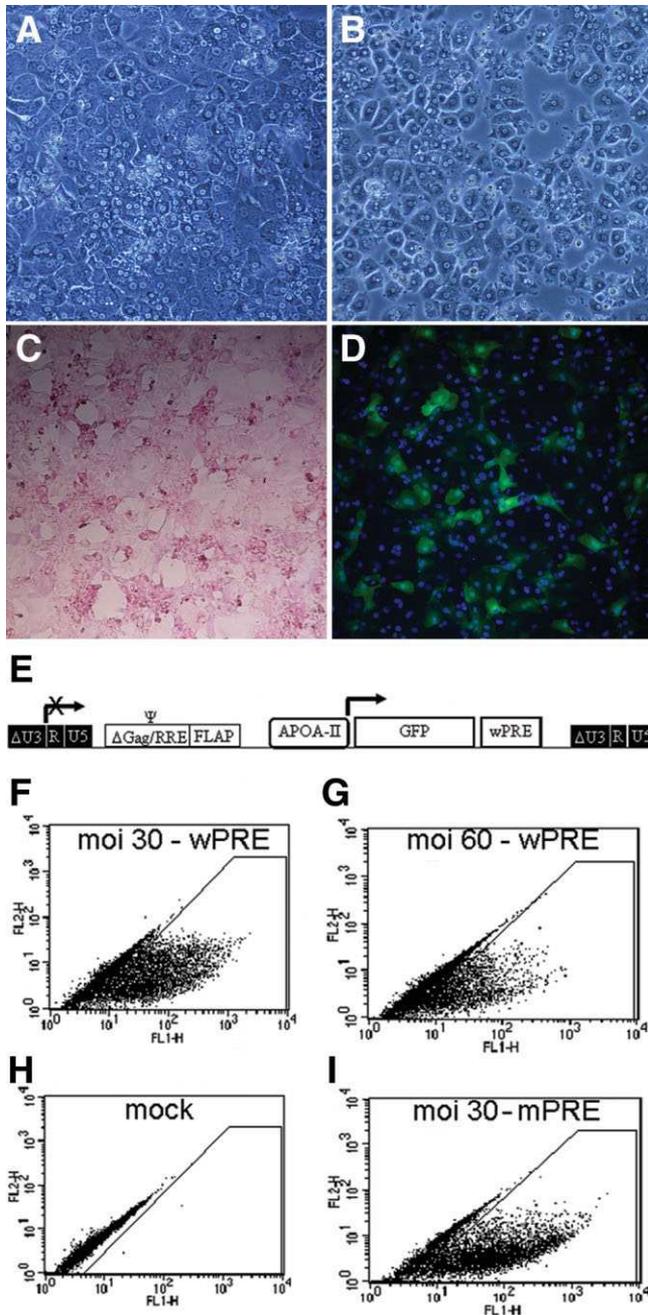


Fig. 4. Transduction of simian hepatocytes. (A,B) Morphology of control and transduced hepatocytes 4 days after plating. (C) Periodic-acid Schiff stain showed that transduced hepatocytes maintained the ability to store glycogen. (D) Representative field of GFP-expressing simian hepatocytes after transduction with ApoA-II-GFP-wPRE lentivector at MOI of 30. (E) Schematic representation of the proviral form of the ApoA-II-GFP-wPRE lentiviral vector. The HIV-1-derived, SIN lentivector expresses the GFP gene under the transcriptional control of human APOA-II regulatory sequences and carries either the wild-type PRE sequences (depicted) or the mutated PRE sequences. Flow cytometry analysis of hepatocytes transduced with ApoA-II lentivectors. (F,G) Cells were transduced with the vector carrying wPRE sequences at MOI of 30 or (I) mPRE sequences at MOI of 30. Both vectors displayed the same transduction efficacy (45%) and mean fluorescence intensity (MFI of 99 and 121) (F,I).

stimulus provided by reversible embolization is sufficient to increase liver repopulation efficiency in a normal liver, and the human APOA-II regulatory sequences allows long-term transgene expression in a lentiviral vector context. Previous studies have demonstrated that permanent portal occlusion results in liver regeneration of nonoccluded lobes in experimental models.²⁵⁻²⁸ Our previous data from monkeys suggests that permanent embolization using histoacryl, a biological glue, was efficient at inducing liver regeneration.²¹ In humans, portal embolization is performed before major hepatectomy, and the embolized liver is generally removed. The embolized liver is not to be removed for cell transplantation approaches, but the long-term effects of permanent portal occlusion with a nonabsorbable material in nonresected liver are not known. Therefore, the use of absorbable embolizing material before hepatocyte transplantation would be safer.

We chose to investigate the effect of the powdered form of a gelfoam on hepatocyte engraftment, instead of the widely used gelfoam strips which obstruct only larger portal branches. This procedure resulted in significant hypertrophy of nonembolized liver and hepatocyte proliferation, consistent with our previous findings.²²

Despite the transient increase in aminotransferase levels, we did not observe any inflammatory reaction or hepatocyte necrosis due to gelfoam and/or transduced transplanted cells. Inflammatory reaction and macrophage infiltration, following permanent PVE, has been shown to impair the regenerative response.²⁸

Proliferation of engrafted, Hoechst-labeled or transduced hepatocytes, was visualized by the presence of clusters 2 weeks after transplantation, suggesting that the cells were able to participate in liver regeneration after transplantation. Moreover, no clusters of cells were found trapped in the portal spaces, as found in previous studies.²⁰

One challenge to retrovirus-mediated gene transfer is the silencing or high variability of transgene expression from viral promoters due to methylation of cytosine-guanine dinucleotide sequences and the presence of cell-specific silencing factors.^{29,30} In addition, housekeeping gene promoters such as those of phosphoglycerate kinase and elongation factor 1-alpha, which have previously been used to regulate the expression of various transgenes *in vitro*, have recently been found to be silenced *in vivo* following the transplantation of transduced cells.^{31,32} To overcome this problem, we tested human APOA-II regulatory sequences, which we previously found to be expressed in transplanted mouse livers.¹⁴ This region has the advantage of being inducible by different factors, including hypolipidemic agents such as fibrates.³³ It is also activated, as are other genes directly involved in cholesterol

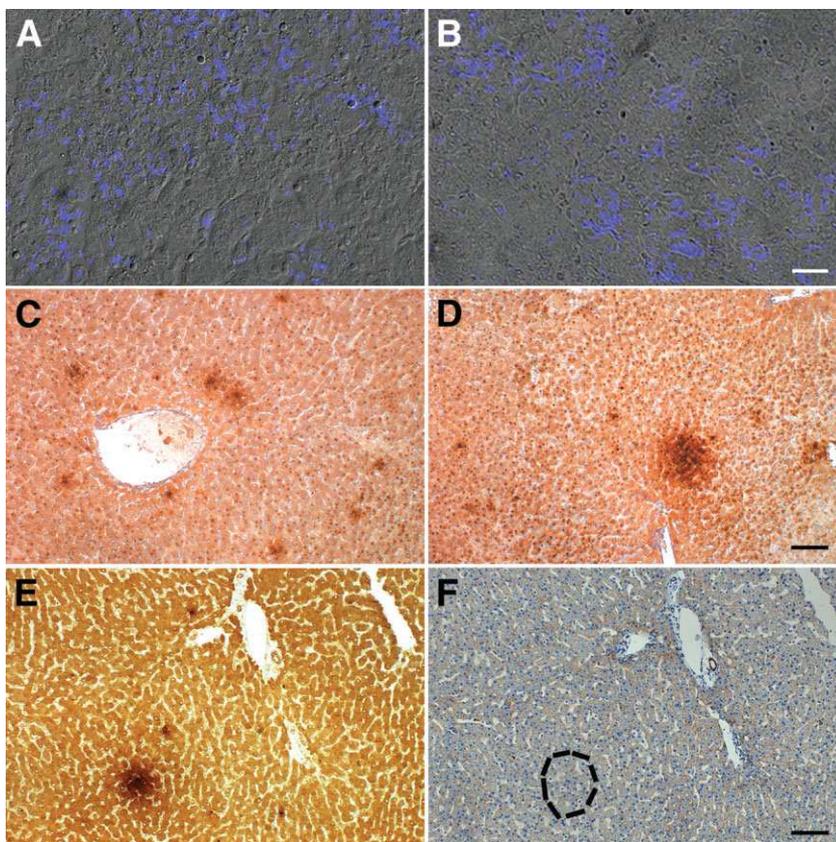


Fig. 5. Short-term engraftment of transplanted hepatocytes at day 14 after transplantation. (A,B) Fluorescent images of Hoechst-labeled hepatocytes. (C,D) Immunohistochemical staining with an antibody against GFP showing representative clusters of transplanted simian hepatocytes expressing GFP. Immunohistochemical staining of GFP and E-cadherin on serial sections showed that transduced hepatocytes staining positive for GFP (E) were also positive for E-cadherin (F). Scale bar = 50 μ m.

homeostasis, by sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs). SREBP2 mediates gene transactivation by statins, commonly used for the treatment of patients with familial hypercholesterolemia.

The wPRE is widely used inserted into the 3' untranslated region of coding sequences in oncoretroviral and

lentiviral vectors. This sequence stimulates the nuclear export of messenger RNAs to the cytoplasm and substantially increases gene expression in different cell types.^{34,35} In our study, the MFI and proportion of transduced hepatocytes were similar for both wPRE and mPRE. This suggests that the inclusion of mPRE in clinical vectors could

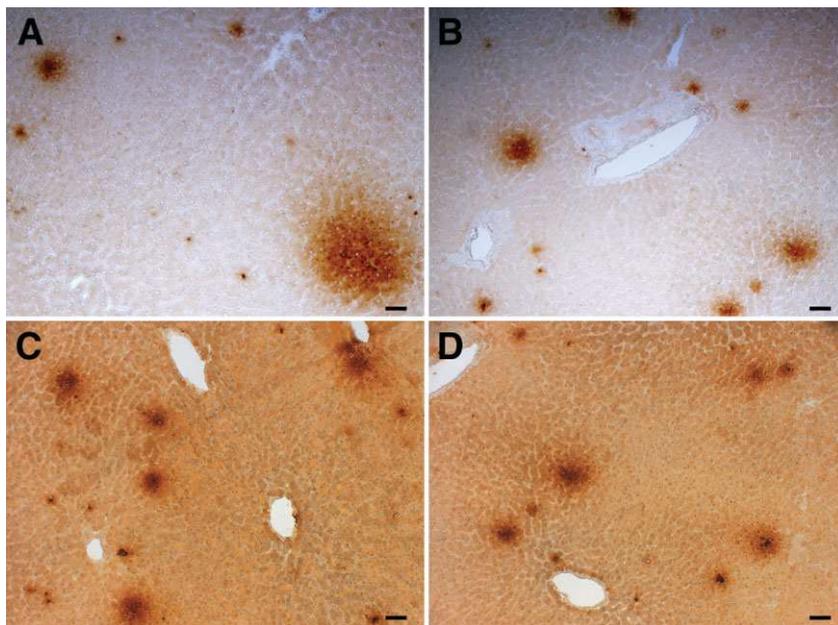


Fig. 6. GFP-positive hepatocytes were found in transplanted simian livers 2 months after transplantation. (A,B) Immunohistochemical staining of representative fields of transplanted simian hepatocytes producing GFP in nonembolized segment I and (C,D) segment VI. Scale bar = 50 μ m.

improve both vector biosafety and optimization of liver gene expression cassettes.

Concern has been raised about the use of lentiviral vectors for clinical applications. However, the lentiviral vectors used here contain no viral promoter or enhancer sequences that might transactivate genes upstream or downstream from integration sites. Lentiviral vectors of this type were recently used to transduce hematopoietic stem cells, which were subsequently infused back to macaques. These animals were alive at 1 to almost 3 years after transplantation, without side effects.³⁶

In addition, hepatocytes are terminally differentiated cells, which do not proliferate in a quiescent liver and renew at a very slow rate (<0.01%). However, we carried out an ultrasound examination on monkey 3 at 3 months after transplantation (data not shown) to ensure that transplanted livers remained normal. The liver was found to be homogeneous, with regular contours. The liver parenchyma segments were normal in appearance with no nodules. Moreover, we detected no splenomegaly or ascites. Analyses of blood samples including secreted alpha-fetoprotein determinations gave normal results. An independent laboratory (Genosafe, Evry, France) also carried out quantitative PCR to analyze lentiviral vector dissemination in various tissues and organs: testis, spleen, lungs, intestines, kidneys, bone marrow, brain, lymph nodes, muscle, and heart. No vector DNA was detected in any of the samples studied. Finally, no virus was detected in urine or blood.

Assuming that there are about 10^8 cells per gram of liver and that macaque livers weigh between 60 and 100 g, each liver in our study contained between 6×10^9 and 10×10^9 cells. Transplanted cells therefore accounted for between 1.5% and 4% of the total number of hepatocytes in livers.

Given that a mean of 35% of transplanted hepatocytes were transduced, 0.5%-1.3% of transduced cells would thus be engrafted if the efficiency of engraftment was 100%. However, with a loss of 50%-70% of hepatocytes after transplantation,¹⁵ we would expect <0.5% of GFP-expressing cells to be engrafted.

Our results showed that performing RPVE before transplantation significantly increased the proportion of engrafted transduced hepatocytes. Stimulation of the proliferation of these cells and that of resident hepatocytes thereby resulted in the repopulation of up to 2% of the liver. The liver repopulation with transduced hepatocytes was similar to that obtained with Hoechst-labeled hepatocytes, 100% of which were labeled. This also shows that our lentiviral transduction protocol did not impair the engraftment potential of isolated hepatocytes. With our experimental conditions, more than 90% of human hepa-

toocytes are transduced with lentivectors. We therefore expect a liver repopulation efficacy close to 6%-7% in patients.

We previously demonstrated the therapeutic proof-of-principle of the *ex vivo* approach in Gunn rats: when hepatocytes transduced in suspension with a lentiviral vector encoding bilirubin uridine diphosphate glucuronyltransferase were transplanted into these rats, a significant and long-term decrease in bilirubinemia was observed.³⁷

Correction of as little as 5% of the genetic deficiency is thought to be sufficient to obtain clinical improvement of many metabolic disorders, including familial hypercholesterolemia, caused by a defect in the low density lipoprotein receptor, for which a correction level of between 2% and 5% should be of benefit. Thus, transplantation with a small proportion of autologous freshly isolated transduced cells that proliferate *in situ* may be sufficient, particularly if transgene expression levels are high. Our results may also have implications for allogeneic cell transplantation strategies.

In conclusion, we have provided the first demonstration in a preclinical monkey model that selective temporary blocking of part of the liver with gelatin powder results in significant liver repopulation after transplantation of lentivirally-transduced hepatocytes. We also demonstrated that long-term expression of the transgene is obtained with human hepatic regulatory sequences. Our findings suggest that the whole procedure is safe and the absence of cell culture and thawing might be crucial for optimal hepatocyte engraftment. This study opens the way for phase I/II clinical trials of lentivirus-mediated *ex vivo* gene therapy for metabolic disorders.

Acknowledgment: The authors are grateful to Dr. P. Moullier and the teams from Boisbonne Center and the Veterinary School in Nantes (France) for their support and help in the experiments. We thank Drs. P. Devauchelle and F. Delisle (Service de Radiologie, Ecole Nationale Vétérinaire, Maisons-Alfort), Drs. G. Germain and A. Laurent for assistance in radiology and in the management of the primates (Institut National de la Recherche Agronomique, Jouy-en-Josas, France). We also thank Dr. A. Osorio (Centre National de la Recherche Scientifique, Orsay, France) for providing the PTM3D software and P. Leclerc and O. Trassard (Institut Fédératif de Recherche 93, Bicêtre, France) for help in art work.

References

1. Fisher RA, Strom SC. Human hepatocyte transplantation: worldwide results. *Transplantation* 2006;82:441-449.
2. Smets F, Najimi M, Sokal EM. Cell transplantation in the treatment of liver diseases. *Pediatr Transplant* 2008;12:6-13.

3. Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A. Hepatocyte transplantation in the treatment of liver diseases - future seems bright after all. *Pediatr Transplant* 2008;12:4-5.
4. Fischer A, Cavazzana-Calvo M. Gene therapy of inherited diseases. *Lancet* 2008;371:2044-2047.
5. Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, Stein EA, Engelhardt JF, Muller D, et al. Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat Genet* 1994;6:335-341.
6. Challita PM, Kohn DB. Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:2567-2571.
7. Ellis J. Silencing and variegation of gammaretrovirus and lentivirus vectors. *Hum Gene Ther* 2005;16:1241-1246.
8. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulfraat N, Leboulch P, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003;302:415-419.
9. Bank A, Dorazio R, Leboulch P. A phase I/II clinical trial of beta-globin gene therapy for beta-thalassemia. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1054:308-316.
10. Yee JK, Zaia JA. Prospects for gene therapy using HIV-based vectors. *Somat Cell Mol Genet* 2001;26:159-174.
11. Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, et al. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 1998;72:9873-9880.
12. Giannini C, Morosan S, Tralhao JG, Guidotti JE, Battaglia S, Mollier K, et al. A highly efficient, stable, and rapid approach for ex vivo human liver gene therapy via a FLAP lentiviral vector. *HEPATOLOGY* 2003;38:114-122.
13. Nguyen TH, Oberholzer J, Birraux J, Majno P, Morel P, Trono D. Highly efficient lentiviral vector-mediated transduction of nondividing, fully reimplantable primary hepatocytes. *Mol Ther* 2002;6:199-209.
14. Parouchev A, Nguyen TH, Dagher I, Mainot S, Groyer-Picard MT, Branger J, et al. Efficient ex vivo gene transfer into non-human primate hepatocytes using HIV-1 derived lentiviral vectors. *J Hepatol* 2006;45:99-107.
15. Gupta S, Rajvanshi P, Sokhi R, Slehria S, Yam A, Kerr A, et al. Entry and integration of transplanted hepatocytes in rat liver plates occur by disruption of hepatic sinusoidal endothelium. *HEPATOLOGY* 1999;29:509-519.
16. Grompe M. Principles of therapeutic liver repopulation. *J Inherit Metab Dis* 2006;29:421-425.
17. Farges O, Belghiti J, Kianmanesh R, Regimbeau JM, Santoro R, Vilgrain V, et al. Portal vein embolization before right hepatectomy: prospective clinical trial. *Ann Surg* 2003;237:208-217.
18. Makuuchi M, Thai BL, Takayasu K, Takayama T, Kosuge T, Gunven P, et al. Preoperative portal embolization to increase safety of major hepatectomy for hilar bile duct carcinoma: a preliminary report. *Surgery* 1990;107:521-527.
19. Aussilhou B, Lesurtel M, Sauvanet A, Farges O, Dokmak S, Goasguen N, et al. Right portal vein ligation is as efficient as portal vein embolization to induce hypertrophy of the left liver remnant. *J Gastrointest Surg* 2008;12:297-303.
20. Andreoletti M, Loux N, Vons C, Nguyen TH, Lorand I, Mahieu D, et al. Engraftment of autologous retrovirally transduced hepatocytes after intra-portal transplantation into nonhuman primates: implication for ex vivo gene therapy. *Hum Gene Ther* 2001;12:169-179.
21. Dagher I, Boudechiche L, Branger J, Coulomb-Lhermine A, Parouchev A, Sentilhes L, et al. Efficient hepatocyte engraftment in a nonhuman primate model after partial portal vein embolization. *Transplantation* 2006;82:1067-1073.
22. Lainas P, Boudechiche L, Osorio A, Coulomb A, Weber A, Pariente D, et al. Liver regeneration and recanalization time course following reversible portal vein embolization. *J Hepatol* 2008;49:354-362.
23. Germain-Renaud C, Osorio A, Texier R. Interactive volume reconstruction and measurement on the Grid. *Methods Inf Med* 2005;44:227-232.
24. Arhel NJ, Souquere-Besse S, Munier S, Souque P, Guadagnini S, Rutherford S, et al. HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *EMBO J* 2007;26:3025-3037.
25. Heinrich S, Jochum W, Graf R, Clavien PA. Portal vein ligation and partial hepatectomy differentially influence growth of intrahepatic metastasis and liver regeneration in mice. *J Hepatol* 2006;45:35-42.
26. Lorand I, Vons C, Nguyen T, Di Rico V, Coulomb A, Franco D, et al. Portal branch ligation induces efficient retrovirus-mediated gene delivery in rat liver. *J Gene Med* 2004;6:507-513.
27. Wilms C, Mueller L, Lenk C, Wittkugel O, Helmke K, Krupski-Berdien G, et al. Comparative study of portal vein embolization versus portal vein ligation for induction of hypertrophy of the future liver remnant using a mini-pig model. *Ann Surg* 2008;247:825-834.
28. Furrer K, Tian Y, Pfammatter T, Jochum W, El-Badry AM, Graf R, et al. Selective portal vein embolization and ligation trigger different regenerative responses in the rat liver. *HEPATOLOGY* 2008;47:1615-1623.
29. Lavie L, Kitova M, Maldener E, Meese E, Mayer J. CpG methylation directly regulates transcriptional activity of the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2). *J Virol* 2005;79:876-883.
30. Yao S, Sukonnik T, Kean T, Bharadwaj RR, Pasceri P, Ellis J. Retrovirus silencing, variegation, extinction, and memory are controlled by a dynamic interplay of multiple epigenetic modifications. *Mol Ther* 2004;10:27-36.
31. Chang AH, Stephan MT, Sadelain M. Stem cell-derived erythroid cells mediate long-term systemic protein delivery. *Nat Biotechnol* 2006;24:1017-1021.
32. Zhang F, Thornhill SI, Howe SJ, Ulaganathan M, Schambach A, Sinclair J, et al. Lentiviral vectors containing an enhancer-less ubiquitously acting chromatin opening element (UCOE) provide highly reproducible and stable transgene expression in hematopoietic cells. *Blood* 2007;110:1448-1457.
33. Vu-Dac N, Schoonjans K, Kosykh V, Dallongeville J, Fruchart JC, Staels B, et al. Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. *J Clin Invest* 1995;96:741-750.
34. Mastroyiannopoulos NP, Feldman ML, Uney JB, Mahadevan MS, Phylactou LA. Woodchuck post-transcriptional element induces nuclear export of myotonic dystrophy 3' untranslated region transcripts. *EMBO Rep* 2005;6:458-463.
35. Donello JE, Loeb JE, Hope TJ. Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J Virol* 1998;72:5085-5092.
36. Trobridge GD, Beard BC, Gooch C, Wohlfahrt M, Olsen P, Fletcher J, et al. Efficient transduction of pigtailed macaque hematopoietic repopulating cells with HIV-based lentiviral vectors. *Blood* 2008;111:5537-5543.
37. Nguyen TH, Birraux J, Wildhaber B, Myara A, Trivin F, Le Coulter C, et al. Ex vivo lentivirus transduction and immediate transplantation of uncultured hepatocytes for treating hyperbilirubinemic Gunn rat. *Transplantation* 2006;82:794-803.

DISCUSSION DE L'ARTICLE

Dans cette étude, nous avons confirmé que l'EPP réversible au Curaspon® est un stimulus efficace pour la prolifération hépatocytaire et pour la repopulation du foie non embolisé par les cellules exprimant le transgène utilisé (GFP). Notre approche de thérapie génique ex vivo a été efficace et 16 semaines après la transplantation, les hépatocytes greffés et transduits par le lentivirus apoAII-GFP exprimaient le transgène contrôlé par le promoteur Apo-AII humain.

Dans des études antérieures nous avons démontré que l'EPP définitive par l'Histoacryl® induisait une importante hypertrophie du foie résiduel [278]. Nous avons ensuite utilisé le Curaspon® en forme de poudre pour obtenir une EPP très distale et réversible. Nous avons ainsi obtenu une hypertrophie significative du foie non-embolisé avec une importante prolifération hépatocytaire [612].

Notre protocole a été très bien toléré par les animaux. Malgré une augmentation temporaire des transaminases, nous n'avons pas noté une réaction inflammatoire, immunitaire ou une nécrose hépatocytaire liée au produit d'embolisation ou aux cellules transduites par le lentivirus.

La prolifération d'hépatocytes greffées, marquées au Hoechst ou transduites par le lentivirus apoAII-GFP, a été démontrée par la présence des clusters cellulaires deux semaines après la transplantation, suggérant que les cellules transplantées avaient participé à la régénération hépatique.

Notre étude a aussi démontré que l'utilisation de notre lentivirus est bien tolérée et sans risque chez les grands animaux. En effet, le monde scientifique a longuement été douteux en ce qui concerne l'utilisation des vecteurs lentiviraux dans des essais cliniques. Cependant, les vecteurs lentiviraux utilisés ne contiennent pas un promoteur viral ou des séquences enhancer qui pourraient activer des gènes en amont et en aval des sites d'intégration. Des vecteurs lentiviraux du même type que le nôtre ont déjà été utilisés pour transduire des cellules souches hématopoïétiques, qui ont été ensuite transplantées chez des macaques. Ces animaux surveillés jusqu'à trois ans après la transplantation hépatocytaire n'ont pas eu d'effet indésirable durant cette période [624]. Dans notre étude les bilans biologiques effectués à différents intervalles étaient normaux. En utilisant la technique de la PCR quantitative, nous avons vérifié l'absence de dissémination du vecteur lentiviral utilisé dans les autres organes de ces animaux. En plus, nous n'avons pas détecté l'ADN du vecteur dans le sang ou les urines.

Notre étude a démontré que la réalisation d'une EPP réversible avant la transplantation augmente de manière significative le pourcentage des cellules transduites greffées. Le stimulus de régénération sur le foie résiduel ainsi que sur les cellules transduites transplantées a eu comme résultat la repopulation d'environ 2% du foie 16 semaines après transplantation. Ce pourcentage est similaire à celui obtenu en utilisant le même protocole avec des cellules hépatiques transplantées marquées au Hoechst. Ce résultat indique que notre protocole de transduction lentivirale ne diminue pas le potentiel de greffe d'hépatocytes isolés.

Dans cette étude chez le singe, le taux de transduction des cellules était d'environ 30% en moyenne. En utilisant les mêmes conditions expérimentales chez l'Homme, plus que 90% d'hépatocytes humains sont

transduits par notre lentivirus. C'est pour cette raison que nous estimons une repopulation hépatique de 6 à 7% chez les patients.

Aujourd'hui, nous savons qu'un taux de correction de 5% d'une anomalie génétique du foie pourrait être suffisant pour obtenir une amélioration clinique d'une MMHH, comme l'hypercholestérolémie familiale. Dans le cas de cette maladie, une correction du déficit génétique de 2% à 5% pourrait être bénéfique. La transplantation autologue d'une quantité d'hépatocytes transduits combinée à une augmentation de leur capacité proliférative par un stimulus comme l'EPP résorbable pourrait être suffisante, surtout si le niveau d'expression du transgène est élevé. Les résultats de cette étude pourraient aussi avoir une implication dans des protocoles de transplantation d'hépatocytes allogéniques pour le traitement d'autres MMHH [285].

Notre protocole montre pour la première fois chez un gros animal que l'EPP par un produit résorbable entraîne une importante repopulation hépatique après transplantation d'hépatocytes transduits par un vecteur lentiviral. Nous avons aussi démontré la sécurité de notre approche et que l'expression du transgène à long terme peut être obtenue en utilisant des séquences régulatrices hépatiques humaines. Cette étude ouvre la voie pour l'utilisation de cette approche dans des études cliniques de phase I/II pour le traitement des MMHH par thérapie génique ex vivo. Cependant, toutes les précautions et améliorations nécessaires doivent être effectuées pour le passage de l'animal à l'Homme.

Ex vivo liver-directed gene therapy for the treatment of metabolic diseases : advances in hepatocyte transplantation and retroviral vectors

Tuan Huy NGUYEN, Sylvie MAINOT, Panagiotis LAINAS, Marie-Thérèse GROYER-PICARD, Dominique FRANCO, Ibrahim DAGHER, Anne WEBER

(Curr Gene Ther 2009; 9:136-149 [625])

PRESENTATION DE L'ARTICLE

Le foie, un organe ayant plusieurs fonctions métaboliques, est le site de différentes maladies métaboliques génétiques. La thérapie génique est une alternative prometteuse à la transplantation hépatique car cette approche pourrait combler le manque de donneurs tout en étant moins invasive. Plus des quinze ans après le premier essai clinique de thérapie génique *ex vivo* pour le traitement de l'hypercholestérolémie familiale [329, 330], il persiste un nombre important d'obstacles et étapes limitantes pour la réalisation d'une telle approche.

Plusieurs modèles animaux de transplantation d'hépatocytes (primates et autres grands animaux) sont en cours de développement pour améliorer la prise de greffe et l'intégration d'hépatocytes dans le parenchyme hépatique [60, 278, 621]. La création de vecteurs qui assurent l'expression d'un transgène à long terme a été une très importante avancée. Le développement des vecteurs lentiviraux a permis le transfert des gènes dans le génome de cellules quiescentes, comme les hépatocytes différenciés [318]. En particulier, les vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1 sont actuellement les plus fréquemment utilisés et ont amélioré significativement la sécurité et l'efficacité des approches de thérapie génique [87, 90, 296, 452, 502-504, 506, 509, 510, 621, 626].

Dans cette revue, tous les récents progrès ainsi que les étapes limitantes actuelles de la thérapie génique *ex vivo* sont détaillés. L'éventuelle application de cette approche en clinique est aussi discutée.

Ex Vivo Liver-Directed Gene Therapy for the Treatment of Metabolic Diseases: Advances in Hepatocyte Transplantation and Retroviral Vectors

Tuan Huy Nguyen¹, Sylvie Mainot², Panagiotis Lainas^{2,3}, Marie-Thérèse Groyer-Picard², Dominique Franco^{2,3}, Ibrahim Dagher^{2,3} and Anne Weber^{2,*}

¹Inserm U948, Biothérapies hépatiques, CHU Hotel-Dieu, 44093 Nantes Cedex, France; ²Inserm U972; Univ Paris-Sud, Bicêtre Hospital, Kremlin-Bicêtre, F-94270, France; ³Department of Surgery, Antoine Béclère Hospital, AP-HP, Clamart, F-92140, France

Abstract: Transplantation of hepatocytes, whether genetically modified or not, has become an alternative to orthotopic liver transplantation for the treatment of patients with metabolic disease. However, more than ten years after the first clinical trial of *ex vivo* gene therapy to treat patients with Familial Hypercholesterolemia, there are still a number of impediments to these approaches. Numerous animal models are still being developed on the one hand to improve hepatocyte integration within hepatic parenchyma and function, and on the other hand to develop vectors that drive long-term transgene expression *in situ*. These include large animal models such as non-human primates, which have recently led to significant progress in hepatocyte transplantation. Simultaneous development of lentiviral vectors from different lentivirus species has permitted the transfer of genes into mitotically-quiescent primary cells including differentiated hepatocytes. Particularly third generation vectors derived from HIV-1 lentivirus are the most widely used and have significantly improved the safety and efficiency of these vectors. Given the shortage of organs and problems related to immunosuppression on one hand, and recent progresses in hepatocyte transduction and transplantation on the other hand, *ex vivo* approach is becoming a real alternative to allogeneic hepatocyte transplantation.

We review the present progresses and limits of the *ex vivo* liver gene therapy approach in different animal models, emphasizing clinically relevant procedures.

Keywords: Liver disease, gene therapy, lentiviral vectors, animal models.

1. INTRODUCTION

Since the first gene therapy trial published in 1990 by the group of Rosenberg [1], over 1472 clinical trials have been completed, are ongoing or have been approved worldwide to date (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/database> updated September 2008). Inherited monogenic disorders, that often manifest early in childhood, represent 8.3% of the diseases targeted by gene therapy.

Because the liver has vast metabolic capacities, it is the primary site for many of these disorders, the pathogenesis of which may be restricted to the liver or may concern extra-hepatic organs. Most, if not all, of the inherited metabolic liver diseases are currently only completely cured by orthotopic liver transplantation (OLT). However, the shortage of donor organs remains dramatic and patients that will benefit OLT are still selected. Gene therapy has long been considered a promising alternative to organ transplantation both because it would alleviate the need for organ donor and propose a definitive therapeutic option without the side effects of lifelong immunosuppression. There are two approaches to hepatic gene therapy: (i) *in vivo*, where vector is injected into patient's circulation, and (ii) *ex vivo*, where cells are isolated

from the patient, genetically modified *in vitro* and then returned to the patient.

The liver has unique advantages for developing *ex vivo* gene therapy. It is organized in segments or lobes, which can be individually removed (up to a 70% liver resection in animals) for cell isolation. Hepatocytes constitute the major cell type (60% and 80% by volume), and are easily separated from the other cells by differential sedimentation. The (adult) liver is a quiescent organ, with only 0.01% cycling hepatocytes under normal physiological conditions, but hepatocytes have the extraordinary ability to proliferate after injury until the original liver mass is restored. Indeed the liver was one of the first organs transplanted with isolated cells and the first animal model was the Gunn rat, model for Crigler-Najjar syndrome type I (CN-1), which is congenitally unable to conjugate bilirubin and consequently exhibits life-long hyperbilirubinemia, due to deficiency in bilirubin glucuronosyl transferase (UGT1A1) (E.C. 2.4.1.17) [2]. More than thirty years later, this model is still used to improve hepatocyte engraftment and/or function of the transduced cells.

Inherited metabolic disorders can be classified in two categories:

-diseases in which hepatocytes are injured, due to the accumulation of a toxic product, and cannot proliferate (such as type I tyrosinemia, or Wilson's disease). In the animal models of such diseases, transplanted healthy or genetically-

*Address correspondence to this author at the INSERM U972, 80 rue du Général Leclerc, 94276, Kremlin-Bicêtre cedex, France; Tel: +331-4959-1856; Fax: +331-4959-1959; E-mail: anne.weber@inserm.fr

corrected hepatocytes have a selective growth advantage over resident diseased hepatocytes and can repopulate the liver.

-genetic defects affecting a specific hepatic function with extra-hepatic manifestations (Crigler-Najjar type 1, familial hypercholesterolemia IIa, ornithine transcarbamylase, deficiency and coagulation defects). In this category, diseased hepatocytes can proliferate as normal hepatocytes.

The most obvious disease "candidates" for *ex vivo* liver gene therapy are diseases in which: (i) precise gene control is not required because the transgene product is not toxic; (ii) the liver is histologically normal for cell isolation and cell transplantation, (iii) partial gene correction provides sufficient clinical benefit to avoid subsequent liver transplantation. Type 1 liver diseases have an abnormal histology (fibrosis, cirrhosis), precluding efficient cell isolation and/or transplantation. Thus, *ex vivo* gene therapy should be applied in infants, before the onset of the disease and before liver injuries. In some animal models, corrected hepatocytes have a selective growth advantage over diseased hepatocytes. In other diseases, such as alpha 1-antitrypsin deficiency, the mutated protein is toxic *per se* and has to be eliminated or its expression inhibited, for normal function to be restored.

To date, patients with five inherited liver diseases have been treated either by *ex vivo* (familial hypercholesterolemia by genetically-modified hepatocytes, hemophilia A by genetically-modified fibroblasts), or *in vivo* approaches (alpha-1-antitrypsin deficiency, hemophilia A and B, and ornithine transcarbamylase deficiency (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>)). Vectors derived from Moloney-Murine Leukemia Virus (MoMuLV)-retrovirus, adenovirus, adeno-associated virus (AAV), and non viral vectors were used for gene delivery. These trials resulted in transient expression of the therapeutic gene, but no obvious therapeutic benefit were observed. The observed acute toxicity of adenoviral vectors has limited their further use in the clinic [3]. AAV vectors have shown great promise in preclinical studies, but a recent clinical study indicates that in hemophilia B patients, a pre-existing immunity to AAV capsid antigens hampers long-term therapeutic FIX expression level [4]. There is thus an absolute need for the design of safe and efficient new therapeutic vectors and approaches.

2. ALLOGENEIC HEPATOCYTE TRANSPLANTATION: AN ALTERNATIVE TO GENE THERAPY?

Allogeneic hepatocytes were transplanted into approximately 20 patients with metabolic disease, resulting in a few cases in transient clinical improvement necessitating OLT several months thereafter [5]. Recently, a long-term clinical benefit was observed in two patients: one with total argininosuccinate lyase deficiency, where enzyme activity reached 3% of control after 8 months, leading to a moderate form of the disease [6]; one with glycogenose type 1b, where a normal level of glucose-6-phosphatase activity 8 months after transplantation allowed a normal diet [7]. Thus, to date, this approach is still far from fully correcting metabolic liver diseases and several reasons may explain these results:

(i) Poor engraftment of transplanted hepatocytes, which has been extensively demonstrated in rodent models (see below). Despite decades of research, the processes and the

factors underlying cell graft and *in situ* proliferation are only partially understood. A good understanding of these mechanisms is essential for the development of new and efficient treatments of human liver diseases. Preventing early loss of transplanted cells would undoubtedly improve transplantation efficiency.

(ii) Due to the inefficacy of liver cell engraftment and to the low availability of fresh hepatocytes, cryopreserved cells are also used in clinical trials; their functionality is lower than that of fresh hepatocytes [8]. Indeed, hepatocytes are highly susceptible to the freeze-thaw process. Cryopreservation is detrimental to hepatocyte structure and metabolic function, including cell attachment, which is important to the survival and graft of transplanted cells in the liver. Indeed, a clinical trial using allogeneic hepatocytes to treat CN-1 disease has revealed the benefits of using freshly isolated and uncultured hepatocytes [9]. Moreover, hepatocytes pooled from different donors are very often needed, and clinical studies suggest that transplanted hepatocytes are lost in the majority of patients despite immunosuppression. Apoptosis seems to play a role in grafted cell rejection, which seems to be involved in the time-limited clinical improvement of patients transplanted for metabolic diseases [10]. Humoral rejection is a major cause of allograft injury and macrophages have recently been implicated in mediating CD4+ T-cell-dependant injury of transplanted hepatocytes [11]. Furthermore, graft survival is limited by immunosuppression regimens. For example, rapamycin has a deleterious effect on the engraftment and proliferation of engrafted hepatocytes [12].

Noteworthy, the first successful use of hepatocyte transplantation as a bridge to subsequent auxiliary partial orthotopic liver transplantation was reported in a child antenatally diagnosed with severe, ornithine transcarbamylase deficiency [13].

The lack of donor organs and the difficulty of manipulating isolated adult hepatocytes *in vitro* have encouraged the use of stem cells, either of hepatic or extra-hepatic origin, including embryonic stem cell studies, with the aim of generating hepatocytes [14]. Recently human hepatic stem cells from adult liver were isolated and expanded *in vitro*; they expressed specific proteins after transplantation in a mouse model, raising hope for their future use in the clinics [15]. However, the number of cells that need to be expanded *in vitro* and differentiated constitutes a major limitation to these approaches. Also, the functionality of these various cell types as well as their potential tumorigenicity needs to be carefully addressed in animal models. Interesting results reported by Brulport *et al.*, suggested horizontal gene transfer into resident murine hepatocytes and/or only partial hepatic transdifferentiation when putative human precursor cells of extra-hepatic origin are transplanted into mice [16].

3. EX VIVO LIVER GENE THERAPY

Auto-transplantation of *ex vivo* genetically modified hepatocytes circumvents two hurdles of hepatocyte transplantation: hepatocytes can be used fresh rather than cryopreserved (liver lobe resection can be scheduled and hepatocytes be isolated in a high amount (5×10^9 hepatocytes from a left liver lobe) [17]; the use of autologous cells overcomes the problems of donor scarcity and immunosuppression.

Two limiting steps however need to be overcome:

-Efficacy of the gene transfer vector and long-term expression of therapeutic transgene *in situ*.

-Efficiency of hepatocyte engraftment, a step common to allogeneic transplantation.

The Vectors

a. OncoRetrovirus

The introduction of a therapeutic gene into hepatocytes should have long lasting effects. Oncoretroviral vectors (generally derived from MoMuLV retroviruses) have been widely used for over 20 years because of their ability to integrate the transgene expression cassette into the host genome. They were the first vectors to be used to transduce primary hepatocytes [18]. However these retroviral vectors can only transduce cells in division [19], where the natural breakdown of the nuclear membrane allows the vectors to enter the nucleus. Since MoMuLV retroviral vectors infect only dividing cells, induction of proliferation is needed to achieve efficient hepatocyte transduction. We achieved efficient retroviral gene delivery *in vivo* in rat liver after portal branch ligation (PBL), known to induce cell proliferation in non ligated lobes [20]. Indeed when retroviral vectors were infused at the peak of hepatocyte proliferation about 20% of these cells were transduced.

In vitro, the general protocol when using these vectors includes: isolation of hepatocytes from the full liver for rodents followed by 3-4 days culture during which hepatocytes are induced to proliferate by incubation with growth factors and transduced. The cells are then harvested from the plates by trypsination and subsequently transplanted into the animals.

There was only one clinical trial using genetically-modified hepatocytes, for the treatment of familial hypercholesterolemia, caused by mutations in the LDL receptor gene, which was performed on five homozygous patients 15 years ago [21]. Although the feasibility and safety of the protocol were demonstrated, this approach has never been repeated ever since, because of the various limitations encountered in the study: (i) transduction efficiency was low, about 20%, as hepatocytes proliferate poorly *in vitro*, (ii) large-scale primary culture of hepatocytes is difficult and the yield after harvest was only 30%, (iii) efficiency of cell engraftment was low, (iv) long-term expression of the transgene was not demonstrated; less than one cell in 1000 expressed the LDL receptor. The authors concluded on the necessity to “return to the bench” and these last years preclinical approaches have been developed to (i) design gene expression cassettes that allow long-term expression of the therapeutic transgene, (ii) design vectors that efficiently transduce isolated hepatocytes, (iii) improve cell engraftment efficiency and/or (iv) induce proliferation of the transduced hepatocytes once transplanted.

Use of Chimeric Envelopes

Retrovirus entry into cells is first determined by virus binding to a specific cell surface receptor, followed by interaction of the virus envelope glycoprotein and its specific

receptor (Fig. 1A). To improve hepatocyte transduction, we engineered envelope of murine retrovirus to display hepatocyte growth factor (HGF), a potent mitogen for hepatocytes, by fusing it to the envelope transmembrane subunit (TM) [22]. Because this engineered HGF-TM protein could not promote cell membrane fusion and therefore be used as a surrogate receptor for virus entry, modified-envelope retrovirus also displayed wild-type envelope proteins (Fig. 1B). We showed that engineered retroviral vectors: (i) bound to c-Met, the HGF receptor, (ii) induced hepatocyte proliferation and (iii) transduced primary mouse and simian hepatocytes more efficiently than an unmodified-envelope virus (Fig. 1B and C). The engineered-envelope retrovirus also exhibited higher infectivity for the c-Met expressing Madin-Darby canine kidney cell line, which does not proliferate upon HGF stimulation, showing that the chimeric HGF-TM protein also improved virus binding onto cell surface. We further extended this approach by incorporating single-chain antibodies against c-Met in viral envelope [23]. This approach of co-displaying growth factors and a wild-type fusion-competent envelope on retrovirus particles was since reported by others who demonstrated increased transduction efficiency of the targeted cells [24], including the ability to transduce resting T cells and human CD34+ cells with recombinant lentivirus displaying cytokines [25, 26].

Scale Up Using Non-Human Primates

Scale up on large animal models is critical for the design of clinical protocols to evaluate the feasibility and safety of the procedures and to provide clear evidence of the long-term activity of the transgene.

Non-human primates are the most closely related to humans. The Macaca liver including its vasculature, is more similar to the human liver than that of other non-primate mammals [27]. As in man, the left lobe constitutes approximately 1/5th of the liver and can be easily resected and perfused.

By optimizing primary culture and transduction protocol, we showed that up to 80% of simian hepatocytes were transduced using a MoMuLV-retroviral vectors [28]. Of note, the same protocol with sequential addition of HGF yielded up to 50% of human hepatocytes transduced [29]. To assess the engraftment efficiency in a preclinical model and the effect of 20% hepatectomy we designed an *ex vivo* protocol [30]. Hepatocytes isolated from the left lobe, were cultured for 4 days, transduced by β -galactosidase-expressing retroviruses on day 2 and 3 in the presence of HGF, and harvested and transplanted on day 4. Infusion of 400 million transduced hepatocytes, equivalent to 4% of the liver mass, resulted in engraftment of less than 2% of the liver mass, at best [28] (Fig. 2). Thus, as in rodent models, more than 50% of transplanted hepatocytes were lost during the process [28, 30]. Consequently, 20% hepatectomy is not sufficient by itself to induce liver regeneration nor increase the efficiency of transplanted cell engraftment.

b. Lentivirus

The limitations of MoMuLV retroviral vector have been partially overcome by the development of lentiviral vectors, which can transduce both dividing and non-dividing cells [31]. Lentiviral vectors are derived from different lentivirus

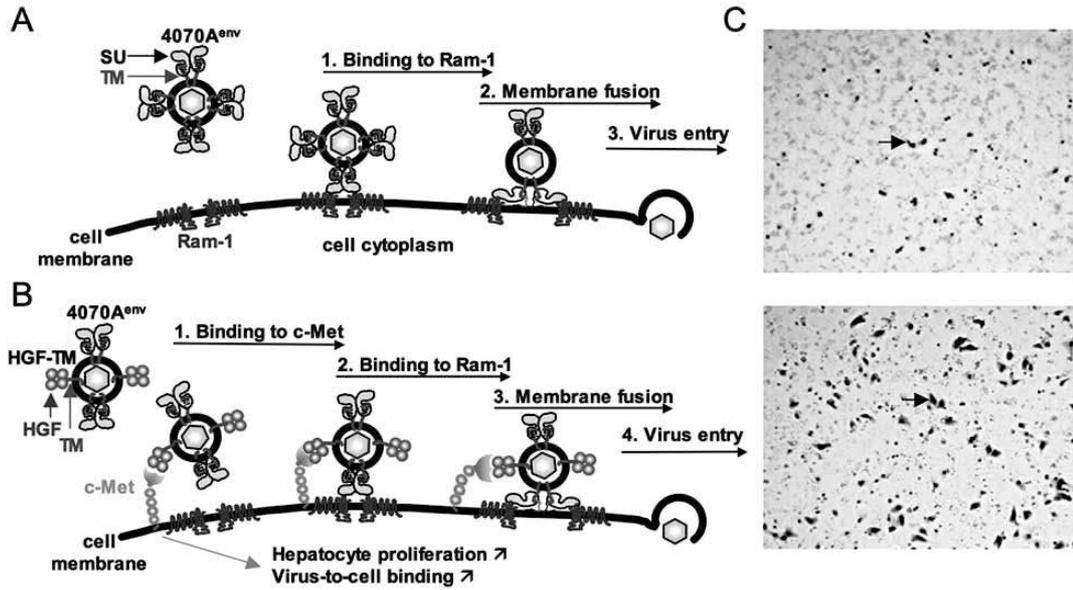


Fig. (1). Schematic representation of amphotropic MoMuLV retrovirus entry. (A) Amphotropic retroviral envelope proteins (4070A^{env}) are arranged as trimers of the surface domain (SU) anchored to the viral membrane by the transmembrane domain (TM). The 4070A^{env} SU permits specific virus attachment to cell surface by binding to its receptor, Ram-1. This binding induces a conformational change in SU, which exposes the hydrophobic domain in the TM, which then catalyses fusion between viral and cellular membranes, leading to delivery of the virus core into the cytoplasm. (B) Schematic representation of HGF-TM chimeric envelope-MoMuLV retrovirus entry. Hepatocyte growth factor (HGF) is fused to the 4070A^{env} TM and co-incorporated with 4070A^{env} proteins in retrovirus envelope. The virally displayed HGF binds to its high affinity c-Met receptor, which is expressed by hepatocytes. This binding induces hepatocyte proliferation and increased virus attachment to target cells. Subsequently, the 4070A^{env} SU bind to Ram-1 permitting virus entry. (C) Co-operation of HGF-TM and 4070A^{env} protein for improving transduction of simian hepatocytes. Hepatocytes were transduced with nuclear β-galactosidase encoding-retroviral vector displaying 4070A^{env} protein alone (upper panel) or co-displaying 4070A^{env} and HGF-TM proteins (lower panel). Arrows indicate transduced hepatocytes.

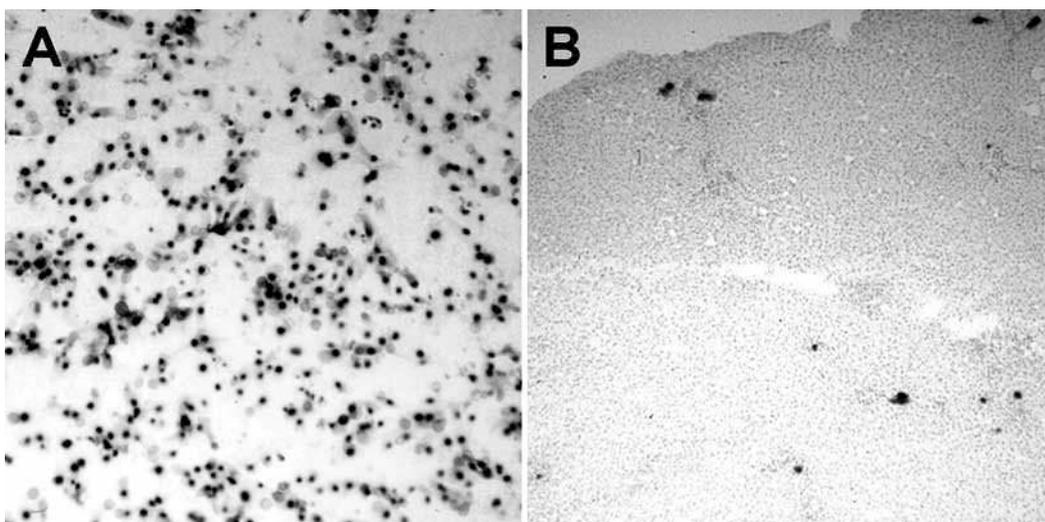


Fig. (2). Retroviral transduction and transplantation of simian hepatocytes (A) Histochemical analysis of β-galactosidase in transduced hepatocytes. The cells were cultured in the presence of HGF and transduced by nuclear β-galactosidase-expressing MoMuLV-retroviral vector on day 2 and 3 after plating and β-galactosidase activity was detected on day 4, showing up to 90% transduced hepatocytes. (B) Transgene expression in monkey liver after intraportal transplantation of transduced hepatocytes. Representative field of a right lobe biopsied 4 days after infusion of 400 million hepatocytes.

species, including caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV), equine infectious anemia virus (EIAV), feline immunodeficiency virus (FIV), human immunodeficiency virus (HIV) and simian infectious virus (SIV). Amongst these, the best characterized and most widely used are derived from HIV-1. The vectors can be pseudotyped with different envelopes [32], but the glycoprotein G, derived from Vesicular Stomatitis virus (VSV G), is the most widely used because it is resistant to virus concentration, and does not need receptor at the cell surface to enter target cells thus conferring a broad tropism to these vectors. Novel pseudotypes are also being investigated that confer selective preference for specific cell types to lentiviral vectors, e.g. hepatocytes (Hepatitis C virus envelope) [33], B lymphocytes (measle virus envelope) [34] or G0 quiescent T lymphocytes (measle virus envelope) [35].

Due to VSV-G and viral protease cytotoxicity, stable packaging cell lines can only be used if the expression of these proteins is tightly regulated by means of a transcription inducible system that is activated at the time of production such as the tetracycline or ecidsome systems [36-40]. However to date, limitations of these systems, in particular the poor long-term stability of the packaging cells due to leaky expression of VSV-G and delays in the production of the lentivectors after removal of the inhibitor from the culture, have prevented the use of stably transfected packaging cells in clinical settings. Lentiviral vectors of clinical grade of have been prepared using transient transfection which is cumbersome and difficult to scale up. A new, promising packaging cell, based on cumate and Tet inducible systems, has recently been described, which is being tested in several laboratories [41].

The capacity of lentiviral vectors to infect non-cycling cells has been attributed to mechanisms allowing active import of viral DNA into the nucleus. Following fusion of the viral and cell membranes, either at cell membrane or in endosomes, depending on the envelope pseudotype, retroviral cores form large nucleoprotein complexes which undergo reverse transcription. The resulting complex of cDNA and viral proteins is referred to as the preintegration complex (PIC). The PIC is transported to the nucleus by exploiting the cellular nuclear import machinery: several virion proteins in the HIV-1 PIC, which includes the matrix protein, accessory protein Vpr (when present in the recombinant lentivirus) and integrase are karyophilic, interacting with members of the importin family [42]. It has recently been shown that transportin-SR2 is also a karyophilic interaction partner for integrase [43]. In addition to these trans-acting determinants, the central polypurine tract and central termination sequence (cPPT-CTS), a second site of initiation of plus strand DNA synthesis during reverse-transcription present in all lentivirus, also referred as FLAP, acts in cis to stimulate nuclear import by formation of a triple-stranded DNA [44, 45].

The ability of lentiviral vectors to integrate the transgene into the host cell genome provides a further advantage in that the gene transferred can be maintained in proliferating hepatocytes. For *in vivo* gene transfer, pre-existing immunity to HIV-1 particles is limited in the general population, by contrast to AAV and adenovirus. However, VSV-G-pseudotyped lentiviral vectors are inactivated in human se-

rum, which may limit liver transduction efficiency following systemic vector injection [46]; this does not apply to *ex vivo* gene transfer, and is a potential advantage as residual virus particles, if present, at the surface of the transplanted cells hepatocytes will be rapidly inactivated.

Below we will focus on VSV-G-pseudotyped lentiviral vectors derived from HIV-1

c. Vector Design

Beyond transduction efficiency, transgene expression and vector biosafety are also crucial and is important to achieve adequate levels of transgene expression from a low vector copy number per cell.

SIN Vector

The risk of enhancer-mediated mutagenesis has been reduced by the development of self-inactivating (SIN) vectors in which the U3 region of the 3' LTR (long terminal repeat) containing the viral enhancer sequence is deleted, leading to inactivation of both LTRs upon integration of the provirus into the transduced cell genome [47]. In these vectors transcription of the transgene is via an internal promoter. However, enhancer elements associated with internal regulatory elements still have a potential for mutagenesis. Safer vector should contain enhancer-less regulatory elements which allow stable transcription of the therapeutic gene in the targeted tissue.

Vector optimization should also avoid gene silencing or variegation due to the sites of integration. This can be achieved using chromatin insulator sequences such as the one containing the DNase I hypersensitive site 4 (cHS4) core from the chicken β -globin locus control region (LCR) in the U3 LTR region [48, 49]. Another element "A2UCO" (UCOE "ubiquitously acting chromatin opening element") from the human *HNRPA2B1-CBX3* locus, which consists of a methylation-free CpG island, has recently been described to provide high stable transgene expression in hematopoietic stem cells [50]. This type of sequences has not been evaluated in hepatocytes as yet.

WPRE

The woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (wPRE) is widely used, inserted into the 3' untranslated region of coding sequences in oncoretroviral and lentiviral vectors [51]. This sequence stimulates the nuclear export of messenger RNAs to the cytoplasm and substantially increases gene expression in different cell types [52, 53]. Addition of WPRE to a liver-specific vector carrying the mTTR promoter, (murine transthyretin promoter fused to a synthetic liver-specific enhancer [54]) enhanced transgene expression by 2-4 fold in human primary hepatocytes (Fig. 3A). This lentiviral expression cassette was successfully used to treat two animal models of metabolic disease in the long-term [55, 56].

Stimulation of transgene expression was also described with the Hepatitis B virus PRE sequence [57]. Furthermore, we recently showed that a vector containing the mutated PRE (mPRE), in which the 5' sequences and the internal ATG of the truncated X protein present in the sequence were

mutated, produces levels of transgene expression comparable to that of a vector containing WPRE [58], suggesting that clinical vectors can include the mPRE in place of wPRE.

Transduction of Hepatocytes

a. Human Hepatocytes

Cultured human primary hepatocytes are efficiently transduced with lentiviral vectors [59]. We demonstrated that, when transduced in suspension, immediately after isolation, hepatocytes were also highly susceptible to lentiviral vectors. At low multiplicity of infection (moi of 1), up to 70% of human hepatocytes were transduced (Fig. 3B). Increasing the moi to 10 allowed transduction of 90% of hepatocytes. In addition, we reported that addition of vitamin E, a strong anti-oxidant, greatly improved cell transduction in some cases, when liver biopsies were of poor quality (prolonged time of liver ischemia between liver resection and hepatocyte isolation, ...). Efficient transduction efficiency was not dependent on the presence of HIV-1 accessory proteins (vif, vpr, vpu, nef) but the presence of cPPT-CTS sequence in the vector greatly stimulated hepatocyte transduction [59].

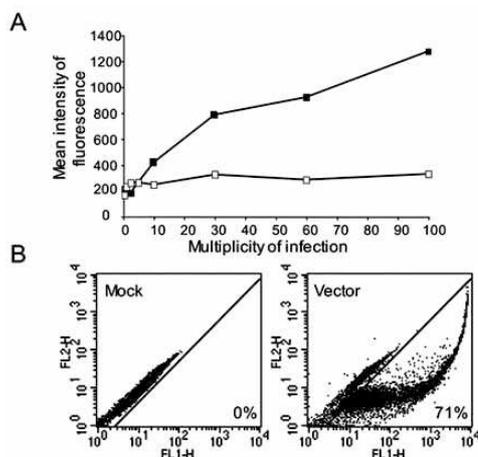


Fig. (3). High susceptibility of human primary hepatocytes to lentiviral transduction. Human hepatocytes were transduced in suspension, in the presence of 50 μ M vitamin E, by a 2-hour exposure to a lentiviral vector encoding GFP under the control of the liver-specific mTTR promoter. This promoter is composed of the murine transthyretin promoter fused to a synthetic liver-specific sequence that was generated by random ligation of synthetic oligonucleotides containing binding sites for hepatic transcription factors (DPB, C/EBP, HNF1, HNF3, HNF4, and HNF6) [54]. Hepatocytes were then washed, and cultured in absence of serum and growth factors for 5 days before FACS analysis. **(A)** Level expression of vectors containing or not WPRE sequence. Hepatocytes were transduced with increasing amounts of the GFP-encoding mTTR vectors containing (closed squares) or not (open squares) WPRE sequence. The mean intensity of GFP fluorescence was determined by FACS after culture of the transduced hepatocytes, as described above. **(B)** Representative FACS analyses of hepatocytes transduced with GFP-encoding mTTR vectors at a multiplicity of infection of 1. FL2-H and FL1-H represent nonspecific fluorescence and specific GFP fluorescence, respectively.

In conclusion, the limitations of *ex vivo* gene therapy regarding transduction efficiency and minimum cell manipulation are avoided when using HIV-1 derived lentiviral vectors. Lentiviral vectors from other lentivirus species may also be used for transduction of human hepatocytes. However, it has been shown that human TRIM5 α , a restriction factor that inactivates incoming retroviral capsids (see below) decreased infectivity of SIV-, FIV-, EIAV- derived vectors, which may limit their applicability in humans [60, 61].

b. Non-Human Primate Hepatocytes

Non-human primate species including the rhesus macaque [62, 63] and the baboon are usually poorly transduced by HIV-1-derived lentiviral vector [64, 65]. This is likely due to post-entry host restriction factors, such as TRIM5 α , the major factor restricting HIV-1 infection in rhesus cells [66]. In the cytoplasm, TRIM5 α binds to viral capsid leading to premature uncoating [67]. This TRIM5 α -mediated restriction is cyclophilin A dependent [68]. Cyclophilin A is a highly conserved peptidyl prolyl isomerase that also binds to HIV-1 capsid with high affinity. Disruption of cyclophilin A/capsid interaction by cyclosporin A increased lentiviral infectivity in restricted non human primate cells, showing that cyclophilin A renders HIV-1 more susceptible to TRIM5 α restriction. However, cyclophilin A/capsid interaction increases HIV-1 infectivity in humans [69, 70].

We also observed lower hepatocyte transduction of two monkey species, *Macaca cynomolgus* and *Macaca fascicularis*, when compared to human primary hepatocytes. A high vector dose (moi of 30) is required to obtain a transduction efficiency of 30% and 60% for cynomolgus and fascicularis hepatocytes, respectively [58, 71]. A similar observation was reported with rhesus CD34+ cells [65]. This is likely due to non infectious capsids saturating host restriction factors [69, 72]. Host restriction factors in simian cells can also be abrogated with HIV-1-derived lentiviral vector particles incorporating modified capsid proteins [73, 74]. Interestingly, pseudotyping with GALV (Gibbon Ape Leukemia Virus) envelope protein improved transduction of rhesus fibroblasts as compared to VSV-G pseudotypes. This might be due to the difference in the route of viral entry, i.e. fusion at cell membrane vs. via the endosomes for GALV and VSV-G-pseudotype, respectively [75]. These strategies to bypass host restriction factors have not yet been evaluated in simian hepatocytes. Recently, it was reported that the pig-tailed macaque might constitute a privileged simian model because its CD34+ cells were efficiently transduced by this vector [65].

c. Non Primate Hepatocytes

Murine and rat hepatocytes have different susceptibility to lentiviral transduction. This resistance is partly overcome by increasing the moi and by addition of vitamin E at the time of infection [59]. A plateau of transduction efficiency is reached at 30% and 50% for murine and rat hepatocytes respectively. We also observed that hepatocytes isolated from adult rabbit are poorly transduced by lentiviral vectors, as also reported in a rabbit corneal epithelial cell line [76]. By contrast, pig hepatocytes are highly transduced by HIV-1 lentiviral vectors [77].

We and others reported that a high transduction efficiency is achieved in hepatocytes after *in vivo* gene delivery of lentiviral vectors into neonates or young animals [56, 78]. We also found that hepatocytes isolated from 9 day-old mice were transduced at 75% and 90% at a moi of 10 and 30, respectively (not illustrated). The higher susceptibility of young hepatocytes to VSV-G pseudotyped HIV-1 derived lentiviral vectors may be related to cell activation/cycling status, as suggested by others [79]. Noteworthy, efficient transduction of human CD34+ cells with lentiviral vectors requires cell activation by cytokines (stem cell factor, thrombopoietin, Flt-3L) that stimulate cell expansion [80]. It was also reported that proteasome activity restricted transduction of hematopoietic stem cells, the activity of which was down-regulated by cytokine treatment [81, 82]. It would be interesting to evaluate whether transduction of adult hepatocytes is increased in the presence of proteasome inhibitors.

Canine D17 cells were reported to lack restriction factors [61], suggesting that a dog model of liver disease such as the hemophilia B dog might be appropriate to assess the therapeutic effectiveness of HIV-1 derived lentiviral vectors.

In conclusion, *ex vivo* lentiviral transduction of hepatocytes of non-human origin should be performed preferentially in young animals, or with a high vector dose.

Potential Problems of Lentivirus Integration in Hepatocytes

Insertional mutagenesis represents a major concern for gene therapy applications. Such a safety concern has dramatically been highlighted after serious events that occurred in 4 out of 10 treated patients with X-linked severe combined immunodeficiency (SCID-X1). These patients developed leukemia two-three years after transplantation of hematopoietic stem cells transduced *in vitro* with murine oncoretroviral vectors containing a transcriptionally active LTR [83].

Animal studies in tumor-prone mice showed that tumorigenesis was not stimulated after lentiviral vector transduction [84, 85]. The SIN design of lentiviral vectors, and its distinct integration profile are probably important factors in the lower risk of insertional oncogenesis of lentiviral vectors, as compared to the MoMuLV vectors used in the SCID-X1 clinical trial. Indeed, HIV-1 derived lentiviral vectors preferentially integrate within actively transcribed genes, while MoMuLV vectors prefer to integrate near the start of transcription units [86]. Recent studies showed that MoMuLV vectors with SIN vector design had reduced insertional genotoxicity as compared to control vector with retroviral enhancer [87, 88]. However, SIN vector design does not abolish enhancer interactions, in particular when the internal promoter has a strong enhancer. Inclusion of insulator elements in the vector could reduce insertional oncogenesis [88]. In addition, because of their shorter lifespan preclinical animal studies may underscore genotoxicity of lentiviral vectors; also some observed adverse events might be due to negative synergy with underlying disease. It is important to reduce the risk of genotoxicity by using a low moi to achieve 1-2 vector copies per cell. Vector biosafety might be improved if conditional ablation of transduced hepatocytes were possible. The HSV-TK/GCV (herpes simplex thymidine kinase/ ganci-

clovir) suicide strategy has proven to be safe in a clinical trial of cancer gene therapy [89] or modulation of graft-versus host-disease [90]. However, acquired ganciclovir resistance might allow such transduced cells to escape the suicide gene treatment [91].

Of note, in an adult liver hepatocytes are mitotically quiescent cells and very few of them are cycling; lentiviral vectors might be therefore less prone to integrate into proto-oncogenes. In addition, there is no *in vivo* clonal expansion of transduced hepatocytes. In response to a loss or damage of liver tissue, the liver mass is restored by proliferation of residual hepatocytes. Almost all hepatocytes participate in this regenerative process, which lasts 7-10 days after a 70% partial hepatectomy in rodents, and residual cells divide only once or twice [92]. In hematopoietic tissue, cell renewal is dependent on few progenitor or stem cells permitting a clonal expansion of transduced hematopoietic stem cells [93, 94]. Furthermore, the entry of the hepatocyte into the cell cycle is tightly regulated. Hepatocytes have to enter a state of replicative competence, corresponding to the G0/G1 transition and referred as priming, where they can respond to extrahepatic and intrahepatic growth factors [92]. In the absence of priming, hepatocytes could be forced to proliferate but this needs continuous administration of high levels of cytokine or growth factor, and, liver size being tightly regulated, the liver mass returned to normal thereafter [95-98]. After neonatal delivery of MoMuLV vector, or after reconstitution of almost all the liver with as few as 1000 MoMuLV-transduced hepatocytes in the model of Fah-/- mice, no transduced cells derived-tumor were reported [99, 100]. It may, therefore, be possible that the liver is less prone to insertional oncogenesis.

A study reported the development of hepatocellular carcinoma following *in utero* or neonatal delivery of EIAV-derived lentiviral vectors [101]. The potential role of the wPRE sequence present in the EIAV-derived vectors was excluded, because tumor development was not observed after HIV-1 derived lentiviral vectors carrying wPRE sequence. At present, the observed liver oncogenesis of EIAV vectors is unexplained.

Hepatocyte Infusion

In cases of metabolic liver disease in which the liver architecture is intact, the presence of a physiological matrix and the availability of a portal blood supply make the liver the optimal site for hepatocyte transplantation. The intra-portal route has been used in animal models (and humans). Once engrafted, syngeneic hepatocytes survived indefinitely. They interact with neighbouring hepatocytes allowing interactions, regulatory signaling and persistence of specialized hepatocellular function.

Ectopic sites for hepatocyte engraftment have been investigated, in particular the peritoneal cavity. However, these sites do not efficiently support cell viability for long periods because the transplanted cells have no direct and instant access to oxygen and nutrients. However, the survival of hepatocytes transplanted into the peritoneal cavity can be prolonged by encapsulation in alginate or attachment to collagen-coated beads [102].

Of all non-hepatic organs, the spleen has proven to be the best site for hepatocyte grafts [103]; hepatocytes infused into the portal vein or infused into the spleen undergo blood flow-mediated translocation to the hepatic sinusoids. However, a large proportion (approximately 25%) remains in the spleen, which can serve as a site for long-term survival and function of grafted hepatocytes [104]. Interestingly, Ohashi *et al.* showed long-term survival of hepatocytes transplanted under the kidney capsule which survived in sufficient number to achieve 5-10% normal level of factor VIII in hemophilia A mice [105, 106].

It is worth noting that hepatocytes are metabolically specialised cells and liver genes are differentially expressed along a portocentral axis, allowing for metabolic zonation. Mechanisms directing position-specific liver gene regulation are incompletely understood, although the Wnt/beta-catenin pathway and APC seem to be involved [107]. A recent study confirmed the high degree of plasticity of gene expression in hepatocytes subjected to a change in microenvironment and the predominant role of the liver microenvironment in directing position-specific gene expression [108].

Hepatocyte Transplantation in Rodents

Many studies have shown that hepatocytes (approximately 20–40 µm diameter) transplanted in rodents via the spleen or the portal vasculature enter through portal vein branches and are trapped in proximal hepatic sinusoids which are 6–9 µm in diameter; consequently the hepatocytes are distributed predominantly in periportal regions of the hepatic lobules. Numerous hepatocytes (up to 70% of transplanted cells) remain trapped in the portal spaces and most of them are destroyed by the phagocytic responses of Kupffer cells, which are activated shortly after deposition of hepatocytes in liver sinusoids [109]. The remaining cells translocate from sinusoids into the liver plates through a process involving disruption of the sinusoidal endothelium, and release of vascular endothelial growth factor by both host and transplanted cells. Subsequently, translocated cells integrate into the liver parenchyma where gap junctions and bile canaliculi form between transplanted and host hepatocytes without any significant proliferation in adult animals [110-112]. Only hepatocytes with a selective advantage for survival/proliferation can massively repopulate a recipient liver, thus, many repopulation strategies have been developed using approaches involving the induction of acute or chronic liver injury [113]. Liver conditioning by irradiation or prolonged cell cycle block also promotes preferential proliferation of transplanted hepatocytes [114, 115]. However, all these procedures, including hepatectomy and injection of toxins to induce liver damage, cannot be used in patients: such liver conditioning carries unacceptable clinical risks.

In Vivo Transgene Expression After Transplantation of Transduced Hepatocytes

We developed an original approach, in which isolated hepatocytes are transduced in Suspension with a Lentiviral vector and Immediately Transplanted (SLIT). SLIT allows rapid transduction of almost all human hepatocytes, which can be then transplanted within hours after cell isolation

without a culture step. It preserves engraftment, functional and proliferative potential of transduced hepatocytes [59, 77, 116]. Using the SLIT approach, we recently demonstrated that hepatocytes isolated from a patient suffering from Crigler-Najjar type 1 allowed gene correction of almost all hepatocytes and restoration of UGT1A1 protein expression [117]. Human hepatocytes can be cryopreserved after transduction and after thawing keep their ability to engraft in the liver of immunodeficient mice [77, 117].

The most powerful murine models able to harbour functional liver cell xenografts are mice homozygous for targeted mutations in the interleukin-2-receptor (IL-2R) gamma-chain locus (Rag2 γ mac $^{-/-}$ mice); these mutations cause severe impairments in T- and B-cell development and function and also completely prevent NK-cell development [118].

We explored the long-term expression of a transgene (Green Fluorescence Protein or GFP) driven by liver-specific regulatory sequences, derived from the human Apolipoprotein A-II gene. Simian primary hepatocytes were subjected to SLIT and transplanted into immunodeficient mice. Expression of GFP was sustained at 12 weeks post-transplantation [71]. Similarly, long-term expression (up to 26 weeks post-transplantation) was demonstrated with mTTR promoter after transduction of human hepatocytes isolated from CN-1 patients and transplantation in NOD/SCID mice [117].

The Gunn rat model constitutes an attractive and very convenient model, however corrected hepatocytes have no selective advantage over diseased hepatocytes. We demonstrated the therapeutic proof-of-principle of SLIT for treating inherited metabolic liver diseases in the Gunn rat, an animal model of CN-1. In Gunn rats receiving UGT1A1-lentivirally-corrected hepatocytes, bilirubinemia decreased by about 30% [119]. The level of correction remained stable for up to 240 days. However, transplanted hepatocytes accounted at most for 0.5–1% of the recipient liver [110]. Our study highlighted the crucial need to improve hepatocyte engraftment efficiency and/or induce the proliferation of grafted hepatocytes in the recipient liver. Interestingly, it was recently reported that hepatocytes overexpressing FOXM1B repopulated regenerating liver more rapidly than control hepatocytes [120].

The Non-Human Primate as a Preclinical Large Animal Model to Improve Hepatocyte Engraftment

Not only are new rodent models of cell transplantation required but large animal models (rabbits, pigs, dogs or non-human primates) are needed. Research with large animal models is essential to define procedures that can be applied clinically. As mentioned above, our first experiments with Macaca showed that, as in rodents, transplanted hepatocytes were lost and did not proliferate, despite a 20% hepatectomy. We also showed that an SV40 Large T-immortalized simian foetal liver progenitor cell line did not proliferate *in situ*, after transplantation of the cells into Rag2 γ mac $^{-/-}$ mouse livers [121]. Thus, hepatocytes which display a high ability to proliferate *in vitro*, do not grow in a quiescent environment. We used the CRE recombinase *in vitro* to excise the transgene; hepatocytes from which the transgene had been excised stopped dividing and became apoptotic [122].

a. Permanent Partial Portal Occlusion

In rats, the occlusion of portal branches of the two anterior liver lobes (70% of total liver mass), results in a regeneration response in the remaining non-occluded lobes leading to their hypertrophy [123, 124]. This approach was performed in Watanabe hyperlipidemic rabbits to improve therapeutic efficacy of hepatocyte transplantation. Five months after transplantation of allogeneic hepatocytes into PBL-stimulated Watanabe rabbits, the decrease in cholesterol was more pronounced and sustained than in non-ligated animals [125]. This experiment demonstrated that a liver regeneration stimulus enhanced the population of grafted hepatocytes and their functional effect in a large animal model of liver metabolic disease.

Portal vein occlusion is also a widely practiced technique in humans. In humans, portal ligation or embolization is performed before major hepatectomy and the embolized liver is generally removed. To explore its effect on hepatocyte engraftment, 50% of the portal territory was occluded either by ligation or by embolization with biological glue prior to cell transplantation in non-human primates (*Macaca mulatta*). The left lateral lobe, which accounts for about 20% of the liver mass was resected for hepatocyte isolation. Isolated hepatocytes were immediately labeled with the Hoechst fluorescent dye and transplanted via the portal vein. Liver regeneration was induced after partial portal embolization and transplanted hepatocyte engraftment/proliferation was enhanced after embolization leading to replacement of approximately 10% of the liver mass [58].

b. Transient Partial Embolization

Liver Regeneration

In patients the embolized liver is not removed and the long-term effects of permanent portal occlusion with a non-absorbable material are not known. Therefore, it would be safer to use absorbable embolizing materials prior to hepatocyte transplantation since the embolized liver is not to be resected.

We tested the effect of reversible portal vein embolization using an absorbable material (Curaspon powder) rather than gelfoam strips (known to obstruct larger portal branches and therefore probably resulting in early reperfusion of embolized liver). Obstruction of the portal branches with Curaspon powder resulted in hypertrophy of the non-embolized segments and an increase in the non-embolized liver volume: from approximately 40% before embolization to $55.9 \pm 1\%$ after embolization. Complete portal reperfusion was observed approximately 15 days after embolization and was sufficient to induce significant hepatocyte proliferation, which peaked three days after surgery [123].

Transplantation of Transduced Hepatocytes

The left lobe was resected to isolate hepatocytes and the left and right anterior portal branches of animals were embolized with absorbable material (Fig. 4A, B and C). Isolated hepatocytes from the left lobe were labeled with Hoechst dye or transduced in suspension with lentiviral vector expressing GFP under the control of the human Apolipoprotein A-II regulatory sequences and transplanted via the inferior mesen-

teric vein [58]. Liver repopulation after transplantation with Hoescht-labeled hepatocytes was $7.4 \pm 1.2\%$. It was $2.1\% \pm 0.2\%$ with transduced hepatocytes (Fig. 4D). Given that the mean transduction efficiency of the GFP-expressing cells was similar to that obtained with Hoechst-labeled cells, transgene expression persisted at 16 weeks post-transplantation.

CONCLUSIONS

Significant progress has been made in the design of safer lentiviral vectors, which allow efficient human hepatocyte transduction, and long-term transgene expression *in situ* in preclinical models. We have also developed preclinical approaches of hepatocyte transplantation in non-human primates under defined conditions which allow significant proliferation of transplanted hepatocytes. The procedure is easily transposable to the clinic.

Current investigations are being carried out to generate (i) stable packaging cells for lentiviral vector production devoid of replication-competent lentivirus: such cell lines would certainly improve the safety, large-scale manufacture and the costs of clinical-grade lentivector production [41]; (ii) new vectors, such as the integrative deficient lentiviral vector (IDLV) [126]. In the absence of a functional integrase protein, lentiviruses are unable to integrate into the genome of transduced cells and remain in the nucleus as 1-LTR or 2-LTR episomes. These viral episomes are transcriptionally active, although at lower levels than their integrated counterparts [127, 128]. IDLV vectors are produced using the same protocol as integrative vectors, but a packaging plasmid coding for a defective-integrase is used in place of the regular packaging plasmid coding for a functional integrase [126, 129]. Lentiviral episomes are not maintained in dividing cells, because of vector loss during cell replication rather than vector degradation [130, 131]. They allow however long-term transgene expression after injection in non-dividing organs, such as retina, muscle, brain and liver [126, 129, 132, 133]. Interestingly, targeted integration was achieved using IDLV vectors providing both the expression of designed zinc-finger nucleases that induce a specific double-strand break in cell genome and the template DNA for gene correction [134].

Non viral integrative vectors, based on transposon systems such as "sleeping beauty", are also being investigated. The sleeping beauty system consists of two components: a plasmid containing the transposon, which carries the expression transgene cassette flanked by two terminal inverted repeats containing binding sites for the transposase, and a sleeping beauty transposase that can move the transposon from the carrier plasmid to cell genome [135]. The transposase source can be an expression cassette included in the transposon plasmid. Recent efforts have been made to construct "sleeping beauty" transposases that can target specific integration sites [136, 137]. The sleeping beauty system has been shown to cure murine hemophilia and tyrosinemia mice in the long-term after *in vivo* gene delivery [138-141] and was recently evaluated for *ex vivo* gene transfer [142].

As far as cells are concerned, recently discovered technologies for reprogramming of postnatal and even adult fibroblasts into pluripotent stem cells (=Induced Pluripotent

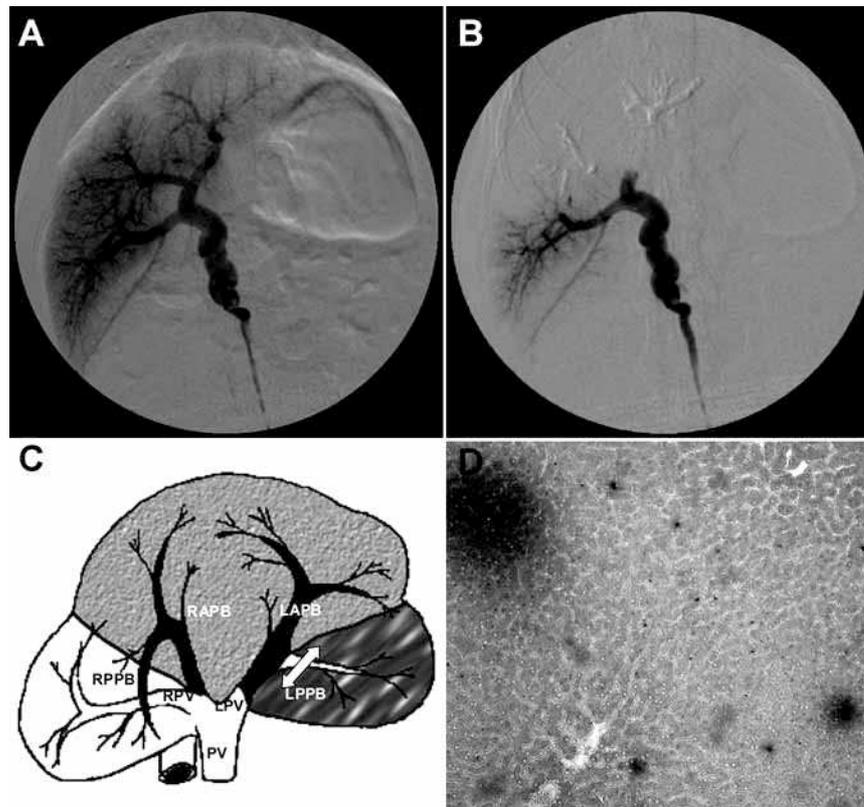


Fig. (4). Long-term engraftment of transplanted hepatocytes and transgene expression after transient embolization of Macaca liver. **(A)** Portograms before and **(B)** after embolization of the left and right anterior portal branch. **(C)** Schematic representation of Macaca liver surgery protocol. The left posterior portal branch (LPPB) is removed for hepatocyte isolation. The left anterior portal branch (LAPB) and the right anterior portal branch (RAPB) are then embolized by infusion of Gelfoam powder (light gray) **(D)**. Immunohistochemical staining of a representative liver section of transplanted transduced simian hepatocytes in non-embolized segments, 8 weeks after transplantation. Hepatocytes were transduced in suspension for 2h with a lentiviral vector encoding GFP under the control of the liver-specific human Apolipoprotein A-II promoter, at a multiplicity of infection of 30, washed and immediately transplanted via the mesenteric vein. Transduced hepatocytes were detected on liver sections by immunostaining with antibodies directed against GFP.

PV : portal vein, LPV : left portal vein, RPV : right portal vein, RPPB : right posterior portal branch.

Stem Cells, iPS) may pave the way towards the generation of patient-specific autologous cells [143]. This approach relies on the introduction by means of retrovirus or lentiviruses of three genes expressing transcription factors (Oct4, Sox2, Klf4) +/- c-myc, the overexpression of which induces the reprogramming of fibroblasts into pluripotent ES-like stem cells. Results obtained by different groups to date suggest that human iPS cells, once established, are transcriptionally and epigenetically similar to ES cells and maintain the potential to differentiate into derivatives of all germ layers. Actual developments aim at deriving safe human iPS cells with regulated gene expression and/or devoid of integrated provirus [144]. The further important step will be to identify ways of assessing which iPS cell lines are sufficiently safe to use for therapeutic applications. The ability to generate patient-specific pluripotent cells should lead to the development of new ex vivo gene therapy approaches, including toward liver diseases [145]. This would allow multiple autologous cell infusion.

Clinical trials of *ex vivo* liver gene therapy can be expected in the near future. To avoid problems with the potential immunogenicity of the transgene, proof-of-concept studies will have to focus on metabolic disease patients who still express low levels of the defective protein.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to AFM (Association Française contre les Myopathies) for financial support. Our research was also supported by AFG (Association Française des Glycogénoses), ANR-Maladies Rares, Fondation pour la Recherche Médicale, Fondation Avenir, GIS-Maladies Rares, Inserm and University Paris XI.

ABBREVIATIONS

AAV = Adeno-associated virus
CAEV = Caprine arthritis-encephalitis virus

CN-1	= Crigler-Najjar syndrome type I
cPPT-CTS	= Central termination sequence
EIAV	= Equine infectious anemia virus
FIV	= Feline immunodeficiency virus
GALV	= Gibbon Ape Leukemia Virus
GFP	= Green Fluorescence Protein
HGF	= Hepatocyte growth factor
HGF-TM	= Fusion protein between HGF and 4070A ^{env} TM
HIV	= Human immunodeficiency virus
IDLV	= Integrative deficient lentiviral vector
iPS	= Induced Pluripotent Stem Cells
LTR	= Long terminal repeat
MOI	= Multiplicity of infection
MoMuLV	= Moloney-Murine Leukemia Virus
mTTR	= Murine transthyretin promoter fused to a synthetic liver-specific enhancer
OLT	= Orthotopic liver transplantation
PBL	= Portal branch ligation
PIC	= Preintegration complex
SCID-X1	= X-linked severe combined immunodeficiency.
SIN	= Self-inactivating
SIV	= Simian infectious virus
SLIT	= Suspension with a Lentiviral vector and Immediately Transplanted
SU	= Surface unit
TM	= Transmembrane subunit
UGT1A1	= Bilirubin glucuronosyl transferase
VSV G	= Vesicular Stomatitis virus G glycoprotein
WPRE	= Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element

REFERENCES

- [1] Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, *et al.* Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med* 1990; 323: 570-78.
- [2] Groth CG, Arborgh B, Bjorken C, Sundberg B, Lundgren G. Correction of hyperbilirubinemia in the glucuronyltransferase-deficient rat by intraportal hepatocyte transplantation. *Transplant Proc* 1977; 9: 313-16.
- [3] Raper SE, Chirmule N, Lee FS, *et al.* Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* 2003; 80: 148-58.
- [4] Manno CS, Arruda VR, Pierce GF, *et al.* Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* 2006; 12: 342-7.
- [5] Fisher RA, Strom SC. Human hepatocyte transplantation: worldwide results. *Transplantation* 2006; 82: 441-9.
- [6] Stephenne X, Najimi M, Sibille C, Nassogne MC, Smets F, Sokal EM. Sustained engraftment and tissue enzyme activity after liver cell transplantation for argininosuccinate lyase deficiency. *Gastroenterology* 2006; 130: 1317-23.
- [7] Lee KW, Lee JH, Shin SW, *et al.* Hepatocyte transplantation for glycogen storage disease type Ib. *Cell Transplant* 2007; 16: 629-37.
- [8] Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A. Hepatocyte transplantation in the treatment of liver diseases - future seems bright after all. *Pediatr Transplant* 2008; 12: 4-5.
- [9] Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, *et al.* Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* 1998; 338: 1422-6.
- [10] Allen KJ, Mifsud NA, Williamson R, Bertolino P, Hardikar W. Cell-mediated rejection results in allograft loss after liver cell transplantation. *Liver Transpl* 2008; 14: 688-94.
- [11] Horne PH, Zimmerer JM, Fisher MG, *et al.* Critical role of effector macrophages in mediating CD4-dependent alloimmune injury of transplanted liver parenchymal cells. *J Immunol* 2008; 181: 1224-31.
- [12] Smets F, Najimi M, Sokal EM. Cell transplantation in the treatment of liver diseases. *Pediatr Transplant* 2008; 12: 6-13.
- [13] Puppi J, Tan N, Mitry RR, *et al.* Hepatocyte transplantation followed by auxiliary liver transplantation--a novel treatment for ornithine transcarbamylase deficiency. *Am J Transplant* 2008; 8: 452-7.
- [14] Alison MR, Choong C, Lim S. Application of liver stem cells for cell therapy. *Semin Cell Dev Biol* 2007; 18: 819-26.
- [15] Schmelzer E, Zhang L, Bruce A, *et al.* Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med* 2007; 204: 1973-87.
- [16] Brulport M, Schormann W, Bauer A, *et al.* Fate of extrahepatic human stem and precursor cells after transplantation into mouse livers. *Hepatology* 2007; 46: 861-70.
- [17] Grossman M, Rader DJ, Muller DWM, *et al.* A pilot study of *ex vivo* gene therapy for homozygous familial hypercholesterolemia. *Nat Med* 1995; 1: 1148-54.
- [18] Ledley FD, Darlington GJ, Hahn T, Woo SL. Retroviral gene transfer into primary hepatocytes: implications for genetic therapy of liver-specific functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 5335-9.
- [19] Roe T, Reynolds TC, Yu G, Brown PO. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J* 1993; 12: 2099-108.
- [20] Lorand I, Vons C, Nguyen TH, *et al.* Portal branch ligation induces efficient retrovirus-mediated gene delivery in rat liver. *J Gene Med* 2004; 6: 507-13.
- [21] Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, *et al.* Successful *ex vivo* gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolemia. *Nat Genet* 1994; 6: 335-41.
- [22] Nguyen TH, Pages JC, Farge D, Briand P, Weber A. Amphotropic retroviral vectors displaying hepatocyte growth factor-envelope fusion proteins improve transduction efficiency of primary hepatocytes. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 2469-79.
- [23] Solly SK, Nguyen TH, Weber A, Horellou P. Targeting of c-Met and urokinase expressing human glioma cell lines by retrovirus vector displaying single-chain variable fragment antibody. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 987-92.
- [24] Cosset FL, Russell SJ. Targeting retrovirus entry. *Gene Ther* 1996; 3: 946-56.
- [25] Verhoeven E, Dardalhon V, Ducrey-Rundquist O, Trono D, Taylor N, Cosset FL. IL-7 surface-engineered lentiviral vectors promote survival and efficient gene transfer in resting primary T lymphocytes. *Blood* 2003; 101: 2167-74.
- [26] Verhoeven E, Wiznerowicz M, Olivier D, *et al.* Novel lentiviral vectors displaying "early-acting cytokines" selectively promote survival and transduction of NOD/SCID repopulating human hematopoietic stem cells. *Blood* 2005; 106: 3386-95.
- [27] Vons C, Beaudoin S, Helmy N, Dagher I, Weber A, Franco D. First description of the surgical anatomy of the cynomolgus monkey liver. *Am J Primatol* 2009; Feb 4. [Epub ahead of print].
- [28] Andreoletti M, Loux N, Vons C, *et al.* Engraftment of autologous retrovirally transduced hepatocytes after intraportal transplantation into nonhuman primates: implication for *ex vivo* gene therapy. *Hum Gene Ther* 2001; 12: 169-79.
- [29] Nguyen TH, Loux N, Dagher I, *et al.* Improved gene transfer selectivity to hepatocarcinoma cells by retrovirus vector displaying single-chain variable fragment antibody against c-Met. *Cancer Gene Ther* 2003; 10: 840-9.

- [30] Vons C, Loux N, Simon L, *et al.* Transplantation of hepatocytes in nonhuman primates: a preclinical model for the treatment of hepatic metabolic diseases. *Transplantation* 2001; 72: 811-8.
- [31] Naldini L, Blomer U, Gallay P, *et al.* *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996; 272: 263-7.
- [32] Frecha C, Szecsi J, Cosset FL, Verhoeyen E. Strategies for targeting lentiviral vectors. *Curr Gene Ther* 2008; 8: 449-60.
- [33] Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* 2003; 197: 633-42.
- [34] Funke S, Maisner A, Muhlebach MD, *et al.* Targeted cell entry of lentiviral vectors. *Mol Ther* 2008; 16: 1427-36.
- [35] Frecha C, Costa C, Negre D, *et al.* Stable transduction of quiescent T-cells without induction of cycle progression by a novel lentiviral vector pseudotyped with measles virus glycoproteins. *Blood* 2008; 112: 4843-52.
- [36] Farson D, Witt R, McGuinness R, *et al.* A new-generation stable inducible packaging cell line for lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 2001; 12: 981-97.
- [37] Klages N, Zufferey R, Trono D. A stable system for the high-titer production of multiply attenuated lentiviral vectors. *Mol Ther* 2000; 2: 170-6.
- [38] Ni Y, Sun S, Oparaocha I, *et al.* Generation of a packaging cell line for prolonged large-scale production of high-titer HIV-1-based lentiviral vector. *J Gene Med* 2005; 7: 818-34.
- [39] Pacchia AL, Adelson ME, Kaul M, Ron Y, Dougherty JP. An inducible packaging cell system for safe, efficient lentiviral vector production in the absence of HIV-1 accessory proteins. *Virology* 2001; 282: 77-86.
- [40] Xu K, Ma H, McCown TJ, Verma IM, Kafri T. Generation of a stable cell line producing high-titer self-inactivating lentiviral vectors. *Mol Ther* 2001; 3: 97-104.
- [41] Broussau S, Jabbour N, Lachapelle G, *et al.* Inducible packaging cells for large-scale production of lentiviral vectors in serum-free suspension culture. *Mol Ther* 2008; 16: 500-7.
- [42] Suzuki Y, Craigie R. The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses. *Nat Rev* 2007; 5: 187-96.
- [43] Christ F, Thys W, De Rijck J, *et al.* Transportin-SR2 imports HIV into the nucleus. *Curr Biol* 2008; 18: 1192-202.
- [44] Follenzi A, Ailles L, Bakovic S, Geuna M, Naldini L. Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat Genet* 2000; 25: 217-22.
- [45] Zennou V, Petit C, Guetard D, Nerhbass U, Montagnier L, Charneau P. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* 2000; 10: 173-85.
- [46] Strang BL, Ikeda Y, Cosset FL, Collins MK, Takeuchi Y. Characterization of HIV-1 vectors with gammaretrovirus envelope glycoproteins produced from stable packaging cells. *Gene Ther* 2004; 11: 591-8.
- [47] Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, *et al.* Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient *in vivo* gene delivery. *J Virol* 1998; 72: 9873-80.
- [48] Imren S, Fabry ME, Westerman KA, *et al.* High-level beta-globin expression and preferred intragenic integration after lentiviral transduction of human cord blood stem cells. *J Clin Invest* 2004; 114: 953-62.
- [49] Recillas-Targa F, Pikaart MJ, Burgess-Beusse B, *et al.* Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken beta-globin insulator are separable activities. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 6883-8.
- [50] Zhang F, Thornhill SI, Howe SJ, *et al.* Lentiviral vectors containing an enhancer-less ubiquitously acting chromatin opening element (UCOE) provide highly reproducible and stable transgene expression in hematopoietic cells. *Blood* 2007; 110: 1448-57.
- [51] Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 1999; 73: 2886-92.
- [52] Donello JE, Loeb JE, Hope TJ. Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J Virol* 1998; 72: 5085-92.
- [53] Mastroiannopoulos NP, Feldman ML, Uney JB, Mahadevan MS, Phylactou LA. Woodchuck post-transcriptional element induces nuclear export of myotonic dystrophy 3' untranslated region transcripts. *EMBO Rep* 2005; 6: 458-63.
- [54] Costa RH, Grayson DR. Site-directed mutagenesis of hepatocyte nuclear factor (HNF) binding sites in the mouse transthyretin (TTR) promoter reveal synergistic interactions with its enhancer region. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 4139-45.
- [55] Brown BD, Cantore A, Annoni A, *et al.* A microRNA-regulated lentiviral vector mediates stable correction of hemophilia B mice. *Blood* 2007; 110: 4144-4152.
- [56] Nguyen TH, Bellodi-Privato M, Aubert D, *et al.* Therapeutic lentivirus-mediated neonatal *in vivo* gene therapy in hyperbilirubinemic Gunn rats. *Mol Ther* 2005; 12: 852-9.
- [57] Seppen J, Rijnberg M, Cooreman MP, Oude Elferink RP. Lentiviral vectors for efficient transduction of isolated primary quiescent hepatocytes. *J Hepatol* 2002; 36: 459-65.
- [58] Dagher I, Nguyen T, Groyer-Picard M, *et al.* Efficient hepatocyte engraftment and long-term transgene expression after reversible portal embolization in non-human primates. *Hepatology* 2009; 49: 950-9.
- [59] Nguyen TH, Oberholzer J, Birraux J, Majno P, Morel P, Trono D. Highly efficient lentiviral vector-mediated transduction of nondividing, fully reimplantable primary hepatocytes. *Mol Ther* 2002; 6: 199-209.
- [60] Hanawa H, Hematti P, Keyvanfar K, *et al.* Efficient gene transfer into rhesus repopulating hematopoietic stem cells using a simian immunodeficiency virus-based lentiviral vector system. *Blood* 2004; 103: 4062-9.
- [61] Saenz DT, Teo W, Olsen JC, Poeschla EM. Restriction of feline immunodeficiency virus by Ref1, Lv1, and primate TRIM5alpha proteins. *J Virol* 2005; 79: 15175-88.
- [62] An DS, Kung SK, Bonifacino A, *et al.* Lentivirus vector-mediated hematopoietic stem cell gene transfer of common gamma-chain cytokine receptor in rhesus macaques. *J Virol* 2001; 75: 3547-55.
- [63] An DS, Wersto RP, Agricola BA, *et al.* Marking and gene expression by a lentivirus vector in transplanted human and nonhuman primate CD34(+) cells. *J Virol* 2000; 74: 1286-95.
- [64] Horn PA, Topp MS, Morris JC, Riddell SR, Kiem HP. Highly efficient gene transfer into baboon marrow repopulating cells using GALV-pseudotype oncoretroviral vectors produced by human packaging cells. *Blood* 2002; 100: 3960-7.
- [65] Trobridge GD, Beard BC, Gooch C, *et al.* Efficient transduction of pigtailed macaque hematopoietic repopulating cells with HIV-based lentiviral vectors. *Blood* 2008; 111: 5537-43.
- [66] Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, Sodroski J. The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 2004; 427: 848-53.
- [67] Stremlau M, Perron M, Lee M, *et al.* Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 5514-9.
- [68] Lin TY, Emerman M. Determinants of cyclophilin A-dependent TRIM5 alpha restriction against HIV-1. *Virology* 2008; 379: 335-41.
- [69] Munk C, Brandt SM, Lucero G, Landau NR. A dominant block to HIV-1 replication at reverse transcription in simian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 13843-8.
- [70] Towers GJ, Hatzioannou T, Cowan S, Goff SP, Luban J, Bieniasz PD. Cyclophilin A modulates the sensitivity of HIV-1 to host restriction factors. *Nat Med* 2003; 9: 1138-43.
- [71] Parouchev A, Nguyen TH, Dagher I, *et al.* Efficient *ex vivo* gene transfer into non-human primate hepatocytes using HIV-1 derived lentiviral vectors. *J Hepatol* 2006; 45: 99-107.
- [72] Cowan S, Hatzioannou T, Cunningham T, Muesing MA, Gottlinger HG, Bieniasz PD. Cellular inhibitors with Fv1-like activity restrict human and simian immunodeficiency virus tropism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 11914-9.
- [73] Kootstra NA, Munk C, Tonnu N, Landau NR, Verma IM. Abrogation of postentry restriction of HIV-1-based lentiviral vector transduction in simian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 1298-303.
- [74] Rits MA, van Dort KA, Munk C, Meijer AB, Kootstra NA. Efficient transduction of simian cells by HIV-1-based lentiviral vectors that contain mutations in the capsid protein. *Mol Ther* 2007; 15: 930-7.
- [75] Kahl CA, Cannon PM, Oldenburg J, Tarantal AF, Kohn DB. Tissue-specific restriction of cyclophilin A-independent HIV-1- and SIV-derived lentiviral vectors. *Gene Ther* 2008; 15: 1079-89.
- [76] Besnier C, Takeuchi Y, Towers G. Restriction of lentivirus in monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 11920-5.

- [77] Nguyen TH, Khakhoulina T, Simmons A, Morel P, Trono D. A simple and highly effective method for the stable transduction of uncultured porcine hepatocytes using lentiviral vector. *Cell Transplant* 2005; 14: 489-96.
- [78] Park F, Ohashi K, Kay MA. The effect of age on hepatic gene transfer with self-inactivating lentiviral vectors *in vivo*. *Mol Ther* 2003; 8: 314-23.
- [79] Park F, Ohashi K, Chiu W, Naldini L, Kay M. Efficient lentiviral transduction of liver requires cell cycling *in vivo*. *Nat Genet* 2000; 24: 49-52.
- [80] Chang AH, Stephan MT, Sadelain M. Stem cell-derived erythroid cells mediate long-term systemic protein delivery. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 1017-21.
- [81] Santoni de Sio FR, Gritti A, Cascio P, *et al.* Lentiviral vector gene transfer is limited by the proteasome at postentry steps in various types of stem cells. *Stem Cells* 2008; 26: 2142-52.
- [82] Santoni de Sio FR, Cascio P, Zingale A, Gasparini M, Naldini L. Proteasome activity restricts lentiviral gene transfer into hematopoietic stem cells and is down-regulated by cytokines that enhance transduction. *Blood* 2006; 107: 4257-65.
- [83] Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, *et al.* Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* 2008; 118: 3132-42.
- [84] Bauer G, Dao MA, Case SS, *et al.* *In vivo* biosafety model to assess the risk of adverse events from retroviral and lentiviral vectors. *Mol Ther* 2008; 16: 1308-15.
- [85] Montini E, Cesana D, Schmidt M, *et al.* Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 687-96.
- [86] Wu X, Li Y, Crise B, Burgess SM. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* 2003; 300: 1749-51.
- [87] Modlich U, Bohne J, Schmidt M, *et al.* Cell-culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity. *Blood* 2006; 108: 2545-53.
- [88] Zychlinski D, Schambach A, Modlich U, *et al.* Physiological promoters reduce the genotoxic risk of integrating gene vectors. *Mol Ther* 2008; 16: 718-25.
- [89] Nasu Y, Saika T, Ebara S, *et al.* Suicide gene therapy with adenoviral delivery of HSV-tK gene for patients with local recurrence of prostate cancer after hormonal therapy. *Mol Ther* 2007; 15: 834-40.
- [90] Traversari C, Marktel S, Magnani Z, *et al.* The potential immunogenicity of the TK suicide gene does not prevent full clinical benefit associated with the use of TK-transduced donor lymphocytes in HSCT for hematologic malignancies. *Blood* 2007; 109: 4708-15.
- [91] Frank O, Rudolph C, Heberlein C, *et al.* Tumor cells escape suicide gene therapy by genetic and epigenetic instability. *Blood* 2004; 104: 3543-49.
- [92] Michalopoulos G, DeFrances M. Liver regeneration. *Science* 1997; 276: 60-6.
- [93] Baum C, Kustikova O, Modlich U, Li Z, Fehse B. Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors. *Hum Gene Ther* 2006; 17: 253-63.
- [94] Nienhuis AW, Dunbar CE, Sorrentino BP. Genotoxicity of retroviral integration in hematopoietic cells. *Mol Ther* 2006; 13: 1031-49.
- [95] Forbes SJ, Themis M, Alison MR, Sarosi I, Coutelle C, Hodgson HJ. Synergistic growth factors enhance rat liver proliferation and enable retroviral gene transfer via a peripheral vein. *Gastroenterology* 2000; 118: 591-8.
- [96] Patijn GA, Lieber A, Schowalter DB, Schwall R, Kay MA. Hepatocyte growth factor induces hepatocyte proliferation *in vivo* and allows for efficient retroviral-mediated gene transfer in mice. *Hepatology* 1998; 28: 707-16.
- [97] Pichard V, Aubert D, Ferry N. Efficient retroviral gene transfer to the liver *in vivo* using nonpolypeptidic mitogens. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286: 929-35.
- [98] Zimmers TA, McKillop IH, Pierce RH, Yoo JY, Koniaris LG. Massive liver growth in mice induced by systemic interleukin 6 administration. *Hepatology* 2003; 38: 326-34.
- [99] Bellodi-Privato M, Aubert D, Pichard V, Myara A, Trivin F, Ferry N. Successful gene therapy of the Gunn rat by *in vivo* neonatal hepatic gene transfer using murine oncoretroviral vectors. *Hepatology* 2005; 42: 431-8.
- [100] Overturf K, Al-Dhalimy M, Tanguay R, *et al.* Hepatocytes corrected by gene therapy are selected *in vivo* in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. *Nat Genet* 1996; 12: 266-73.
- [101] Themis M, Waddington SN, Schmidt M, *et al.* Oncogenesis following delivery of a nonprimate lentiviral gene therapy vector to fetal and neonatal mice. *Mol Ther* 2005; 12: 763-71.
- [102] Uyama S, Kaufmann PM, Kneser U, *et al.* Hepatocyte transplantation using biodegradable matrices in ascorbic acid-deficient rats: comparison with heterotopically transplanted liver grafts. *Transplantation* 2001; 71: 1226-31.
- [103] Nagata H, Ito M, Shiota C, Edge A, McCowan TC, Fox IJ. Route of hepatocyte delivery affects hepatocyte engraftment in the spleen. *Transplantation* 2003; 76: 732-4.
- [104] Kobayashi N, Ito M, Nakamura J, *et al.* Hepatocyte transplantation in rats with decompensated cirrhosis. *Hepatology* 2000; 31: 851-7.
- [105] Ohashi K, Kay MA, Yokoyama T, *et al.* Stability and repeat regeneration potential of the engineered liver tissues under the kidney capsule in mice. *Cell Transplant* 2005; 14: 621-7.
- [106] Ohashi K, Waugh JM, Dake MD, *et al.* Liver tissue engineering at extrahepatic sites in mice as a potential new therapy for genetic liver diseases. *Hepatology* 2005; 41: 132-40.
- [107] Benhamouche S, Decaens T, Godard C, *et al.* Apc tumor suppressor gene is the "zonation-keeper" of mouse liver. *Dev Cell* 2006; 10: 759-70.
- [108] Koenig S, Aurich H, Schneider C, *et al.* Zonal expression of hepatocytic marker enzymes during liver repopulation. *Histochem Cell Biol* 2007; 128: 105-14.
- [109] Joseph B, Malhi H, Bhargava KK, Palestro CJ, McCuskey RS, Gupta S. Kupffer cells participate in early clearance of syngeneic hepatocytes transplanted in the rat liver. *Gastroenterology* 2002; 123: 1677-85.
- [110] Gupta S, Rajvanshi P, Sokhi R, *et al.* Entry and integration of transplanted hepatocytes in rat liver plates occur by disruption of hepatic sinusoidal endothelium. *Hepatology* 1999; 29: 509-19.
- [111] Joseph B, Kumaran V, Berishvili E, Bhargava KK, Palestro CJ, Gupta S. Monocrotaline promotes transplanted cell engraftment and advances liver repopulation in rats via liver conditioning. *Hepatology* 2006; 44: 1411-20.
- [112] Slehria S, Rajvanshi P, Ito Y, *et al.* Hepatic sinusoidal vasodilators improve transplanted cell engraftment and ameliorate microcirculatory perturbations in the liver. *Hepatology* 2002; 35: 1320-8.
- [113] Grompe M, Laconi E, Shafritz DA. Principles of therapeutic liver repopulation. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 7-14.
- [114] Koenig S, Krause P, Schmidt TK, *et al.* Irradiation as preparative regimen for hepatocyte transplantation causes prolonged cell cycle block. *Int J Rad Biol* 2008; 84: 285-98.
- [115] Malhi H, Joseph B, Schilsky ML, Gupta S. Development of cell therapy strategies to overcome copper toxicity in the LEC rat model of Wilson disease. *Regen Med* 2008; 3: 165-73.
- [116] Giannini C, Morosan S, Tralhao JG, *et al.* A highly efficient, stable, and rapid approach for *ex vivo* human liver gene therapy via a FLAP lentiviral vector. *Hepatology* 2003; 38: 114-22.
- [117] Birraux J, Menzel O, Wildhaber B, Jond C, Chardot C, Nguyen TH. A step toward liver gene therapy: efficient correction of the genetic defect of hepatocytes isolated from a patient with Crigler-Najjar syndrome type 1 with lentiviral vectors. *Transplantation* 2009; In press.
- [118] DiSanto JP, Muller W, Guy-Grand D, Fischer A, Rajewsky K. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 377-81.
- [119] Nguyen TH, Birraux J, Wildhaber B, *et al.* *Ex vivo* lentivirus transduction and immediate transplantation of uncultured hepatocytes for treating hyperbilirubinemic Gunn rat. *Transplantation* 2006; 82: 794-803.
- [120] Brezillon N, Lambert-Blot M, Morosan S, *et al.* Transplanted hepatocytes over-expressing FoxM1B efficiently repopulate chronically injured mouse liver independent of donor age. *Mol Ther* 2007; 15: 1710-5.
- [121] Delgado JP, Parouchev A, Allain JE, *et al.* Long-term controlled immortalization of a primate hepatic progenitor cell line after Simian virus 40 T-Antigen gene transfer. *Oncogene* 2005; 24: 541-51.
- [122] Allain JE, Dagher I, Mahieu-Caputo D, *et al.* Immortalization of a primate bipotent epithelial liver stem cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 3639-44.

- [123] Furrer K, Tian Y, Pfammatter T, *et al.* Selective portal vein embolization and ligation trigger different regenerative responses in the rat liver. *Hepatology* 2008; 47:1615-23.
- [124] Ise N, Sato T, Yasui O, *et al.* Enhanced proliferation of hepatic progenitor cells in rats after portal branch occlusion. *Liver Transpl* 2004; 10: 748-54.
- [125] Eguchi S, Rozga J, Lebow LT, *et al.* Treatment of hypercholesterolemia in the Watanabe rabbit using allogeneic hepatocellular transplantation under a regeneration stimulus. *Transplantation* 1996; 62: 588-93.
- [126] Yanez-Munoz RJ, Balaggan KS, MacNeil A, *et al.* Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors. *Nat Med* 2006; 12: 348-53.
- [127] Cara A, Cereseto A, Lori F, Reitz MS, Jr. HIV-1 protein expression from synthetic circles of DNA mimicking the extrachromosomal forms of viral DNA. *J Biol Chem* 1996; 271: 5393-7.
- [128] Engelman A, Englund G, Orenstein JM, Martin MA, Craigie R. Multiple effects of mutations in human immunodeficiency virus type 1 integrase on viral replication. *J Virol* 1995; 69: 2729-36.
- [129] Philippe S, Sarkis C, Barkats M, *et al.* Lentiviral vectors with a defective integrase allow efficient and sustained transgene expression *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 17684-9.
- [130] Butler SL, Johnson EP, Bushman FD. Human immunodeficiency virus cDNA metabolism: notable stability of two-long terminal repeat circles. *J Virol* 2002; 76: 3739-47.
- [131] Pierson TC, Kieffer TL, Ruff CT, Buck C, Gange SJ, Siliciano RF. Intrinsic stability of episomal circles formed during human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol* 2002; 76: 4138-44.
- [132] Apolonia L, Waddington SN, Fernandes C, *et al.* Stable gene transfer to muscle using non-integrating lentiviral vectors. *Mol Ther* 2007; 15: 1947-54.
- [133] Bayer M, Kantor B, Cockrell A, *et al.* A large U3 deletion causes increased *in vivo* expression from a nonintegrating lentiviral vector. *Mol Ther* 2008; 16: 1968-76.
- [134] Lombardo A, Genovese P, Beausejour CM, *et al.* Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat Biotechnol* 2007; 25: 1298-306.
- [135] Ivics Z, Izsvak Z. Transposons for gene therapy! *Curr Gene Ther* 2006; 6: 593-607.
- [136] Ivics Z, Katzer A, Stuwe EE, Fiedler D, Knespel S, Izsvak Z. Targeted sleeping beauty transposition in human cells. *Mol Ther* 2007; 15: 1137-44.
- [137] Yant SR, Huang Y, Akache B, Kay MA. Site-directed transposon integration in human cells. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: e50.
- [138] Liu L, Mah C, Fletcher BS. Sustained FVIII expression and phenotypic correction of hemophilia A in neonatal mice using an endothelial-targeted sleeping beauty transposon. *Mol Ther* 2006; 13: 1006-15.
- [139] Montini E, Held PK, Noll M, *et al.* *In vivo* correction of murine tyrosinemia type I by DNA-mediated transposition. *Mol Ther* 2002; 6: 759-69.
- [140] Ohlfest JR, Frandsen JL, Fritz S, *et al.* Phenotypic correction and long-term expression of factor VIII in hemophilic mice by immunotolerization and nonviral gene transfer using the sleeping beauty transposon system. *Blood* 2005; 105: 2691-8.
- [141] Yant SR, Meuse L, Chiu W, Ivics Z, Izsvak Z, Kay MA. Somatic integration and long-term transgene expression in normal and haemophilic mice using a DNA transposon system. *Nat Genet* 2000; 25: 35-41.
- [142] Wang X, Mani P, Sarkar DP, Roy-Chowdhury N, Roy-Chowdhury J. *Ex vivo* gene transfer into hepatocytes. *Meth Mol Biol* 2009; 481: 1-23.
- [143] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861-72.
- [144] Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 2008; 322: 949-53.
- [145] Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell stem cell* 2007; 1: 39-49.

DISCUSSION DE L'ARTICLE

Les progrès réalisés depuis quelques années dans le domaine de la thérapie génique *ex vivo* sont impressionnants. Dans un premier temps, l'émergence des vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1 qui ont la capacité de transduire des cellules quiescentes, comme les hépatocytes humains, et d'assurer l'expression d'un transgène à long terme a été une très importante avancée. L'amélioration de la sécurité et de l'efficacité de transduction de ces vecteurs permet aujourd'hui leur utilisation dans des approches de thérapie génique *ex vivo* avec des résultats très encourageants. Ensuite, la création des modèles animaux de transplantation d'hépatocytes pour améliorer la prise de greffe et l'intégration d'hépatocytes dans le parenchyme hépatique a aussi joué un rôle très important pour le développement de cette approche. Dans ce but, des approches d'induction de régénération hépatique et d'augmentation de la prise de greffe, comme l'EPP définitive ou réversible, ont été testées avec succès. En combinant toutes ces avancées, notre équipe a développé un modèle d'autotransplantation d'hépatocytes génétiquement modifiés *ex vivo* chez le macaque, qui a permis une importante régénération hépatique et prolifération des cellules transplantés ainsi qu'une expression du transgène à long terme. Ce modèle est transposable en clinique, en effectuant bien sûr toutes les améliorations nécessaires et en prenant toutes les précautions demandées pour un passage chez l'Homme.

La thérapie génique *ex vivo* est une approche attractive et prometteuse pour le traitement des MMHH. L'autotransplantation d'hépatocytes génétiquement modifiés pourrait devenir une véritable concurrente à la

transplantation d'hépatocytes allogéniques pour le traitement de ces maladies. Des essais cliniques de thérapie génique ex vivo dans ce but sont attendus et seront réalisés dans un futur proche. Cependant, pour valider cette approche et éviter les problèmes liés à l'immunogénicité du transgène, les premières études devraient être effectuées chez des patients qui expriment à un niveau faible la protéine manquante.

**TROISIEME PARTIE :
DISCUSSION GENERALE
ET PERSPECTIVES**

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Nous avons démontré pour la première fois dans la littérature l'efficacité d'une EPP réversible ou transitoire à induire une importante prolifération hépatocytaire et régénération hépatique chez le macaque [612]. A la différence de l'EPP par un produit non résorbable, il ne s'agit pas d'une approche potentiellement délétère à long terme. Pour provoquer une obstruction veineuse plus complète nous avons opté pour le Curaspon® en forme de poudre, une gélatine biodégradable couramment utilisée chez l'Homme pour induire une occlusion vasculaire temporaire dans un but hémostatique. Cela nous a permis d'obtenir une obstruction complète, s'étendant des branches portales principales jusqu'aux branches distales de petit calibre. Nous avons montré que cette approche est faisable et sans danger chez le macaque : elle a été bien tolérée par tous les animaux, avec un niveau des transaminases qui est revenu à la normale trois jours après l'intervention et des biopsies hépatiques normales à J15. Nous avons ensuite montré que cette EPP transitoire provoque une occlusion portale entièrement réversible qui dure environ deux semaines, période durant laquelle se fait la régénération hépatique. En effet, la prolifération hépatocytaire après EPP définitive débute rapidement et la régénération des segments non embolisés se produit essentiellement pendant les 15 premiers jours. Dans un modèle d'EPP chez le porc, la réplication hépatocytaire chute à moins de 2% à J12 [611]. Dans notre modèle de primate après EPP définitive, la régénération hépatique débute encore plus précocement (maximum de prolifération hépatocytaire de 23.5% à J3, chute à 11.2% à J7) [278]. L'EPP au Curaspon® semble donc provoquer une occlusion portale d'une durée idéale pour stimuler une régénération hépatique suffisante. Enfin, nous avons montré que la régénération des segments hépatiques non-embolisés est significative avec une augmentation du volume du foie non-embolisé de l'ordre de 40% un mois après EPP réversible.

Nos données suggèrent qu'une occlusion portale partielle initiale, même si elle n'est pas définitive, est suffisante pour déclencher les mécanismes responsables d'une régénération hépatique dans le foie non-embolisé. L'utilisation du Curaspon® en poudre peut être considérée comme la forme la plus évoluée d'embolisation : très distale, résorbable et qui dure suffisamment pour induire l'hypertrophie hépatique. La recanalisation précoce du territoire embolisé après environ deux semaines n'exclut pas l'augmentation du volume hépatique. En effet, cette période de deux semaines est compatible avec la cinétique de la régénération hépatique chez l'homme suite à une EPP définitive : période précoce de régénération intense d'une durée de 3 semaines, suivie par une période de stable et faible augmentation du volume résiduel hépatique [608]. A la fin de cette période initiale d'occlusion portale, le foie non-embolisé semble avoir effectué plus de 75% de son hypertrophie.

Si on couple à ces données le fait que l'EPP réversible est un geste peu invasif, notre approche pourrait devenir très prometteuse en clinique. Cette technique pourrait être indiquée dans des situations cliniques nécessitant une régénération hépatique de courte durée, comme dans le traitement de cancers du foie en plusieurs étapes. Il a été aussi suggéré que notre approche pourrait avoir un rôle dans la transplantation hépatique par donneur vivant, pour augmenter le volume du lobe gauche du donneur [612, 627]. Cependant, nous considérons que des études supplémentaires doivent être effectuées pour pouvoir appliquer notre approche dans le domaine de la transplantation hépatique orthotopique chez l'Homme. Enfin, l'EPP réversible pourrait avoir une indication dans des cas qui ne nécessitent pas une résection hépatique, comme la transplantation d'hépatocytes pour le traitement de maladies métaboliques du foie, en créant un « espace physiologique » pour la prolifération d'hépatocytes transplantés par l'atrophie des segments embolisés, sans provoquer des lésions définitives au foie embolisé.

Les résultats très encourageants de l'utilisation de l'EPP réversible au Curaspon® nous ont permis d'évaluer cette approche dans notre protocole préclinique de thérapie génique pour le traitement de l'hypercholestérolémie familiale. Ce protocole consistait

à une autotransplantation d'hépatocytes génétiquement modifiés ex vivo par un vecteur lentiviral chez le primate.

Nous avons démontré que l'EPP réversible induit une régénération hépatique du foie non-embolisé et améliore notablement les résultats de la transplantation d'hépatocytes isolés génétiquement modifiés exprimant la GFP [621]. En plus, 16 semaines après la transplantation, les hépatocytes greffées et transduites par notre lentivirus apoAII-GFP, exprimaient le transgène contrôlé par le promoteur apo-AII humain. Notre étude a aussi montré que l'utilisation de notre vecteur lentiviral chez les grands animaux a été bien tolérée et sans risque. La réalisation d'une EPP réversible avant la transplantation a augmenté de manière significative le pourcentage des cellules transduites greffées. Le stimulus de régénération sur le foie résiduel ainsi que sur les cellules transplantées a eu comme résultat la repopulation de 2% du foie. Si on tient compte que notre taux de transduction de cellules était d'environ 30% seulement, en sachant que plus que 90% d'hépatocytes humains sont transduits par ce même lentivirus et en utilisant les mêmes conditions, nous estimons qu'une repopulation hépatique de 6 à 7% pourrait être atteinte chez les patients. Ce résultat est suffisant, car il est connu qu'une prise de greffe hépatocytaire de 5% après transplantation d'hépatocytes normaux ou génétiquement modifiés pourrait être suffisante pour obtenir une amélioration clinique d'une MMHH, comme l'hypercholestérolémie familiale [96, 625]. Enfin, les résultats de cette étude pourraient aussi avoir une implication dans des protocoles de transplantation d'hépatocytes allogéniques pour le traitement des MMHH [285].

Notre protocole d'autotransplantation d'hépatocytes génétiquement modifiés ex vivo chez le macaque a montré pour la première fois chez un gros animal que l'EPP avec un produit résorbable entraîne avec des conditions de sécurité optimales une repopulation hépatique importante d'hépatocytes transduits par un vecteur lentiviral, et ceci même à distance de la transplantation hépatocytaire. Nous avons aussi démontré que l'expression du transgène à long terme peut être obtenue en utilisant des séquences régulatrices hépatiques humaines. Les résultats encourageants de ces travaux nous ont

ouvert la voie pour envisager la réalisation d'une étude clinique de phase I/II pour l'hypercholestérolémie familiale.

Avant l'étape clinique, nous prévoyons des expérimentations précliniques sur le lapin Watanabe, le modèle animal de l'hypercholestérolémie familiale. Le protocole expérimental sera le même, avec quelques modifications dues aux différences anatomiques et physiologiques existantes entre le macaque et le lapin. Nos expérimentations sur le lapin Watanabe sont en cours et nos premiers résultats seront bientôt publiés (Goulinet-Mainot S, Tranchart H, Groyer-Picard MT, **Lainas P**, Diop PS, Holopherne D, Gonin P, Benihoud K, Ba N, Gauthier O, Franco D, Guettier C, Pariente D, Weber A, Dagher I, Nguyen TH. Improved hepatocyte engraftment after portal vein occlusion in LDL-receptor deficient WHHL rabbits and lentiviral-mediated phenotypic correction in vitro. Cell Transplantation 2012, accepté).

L'effet métabolique de notre approche devra être démontré chez le lapin Watanabe avant de pouvoir envisager un passage chez l'Homme. En cas de succès, les perspectives immédiates seront de réaliser un essai clinique. Il s'agit d'un essai clinique de phase I/II évaluant la faisabilité et la tolérance de la transplantation d'hépatocytes autologues transduits par un lentivirus recombinant exprimant le récepteur R-LDL chez des patients ayant une hypercholestérolémie familiale. En cas de succès de ce protocole clinique pour l'hypercholestérolémie familiale nos perspectives à plus long terme seront d'étendre cette approche à d'autres maladies métaboliques hépatiques monogéniques dont le gène est cloné et caractérisé mais également d'évaluer l'EPP réversible dans le cadre de l'allotransplantation d'hépatocytes normaux provenant de donneurs cadavériques. Enfin, nous sommes actuellement entrain d'évaluer l'efficacité de notre approche d'EPP réversible à induire une régénération hépatique significative chez des patients atteints d'un cancer du foie.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Goldstein J, Hobbs H, Brown M. In: *Familial Hypercholesterolemia*. New York. McGraw-Hill; 2001.
2. Brown MS, Goldstein JL. Expression of the familial hypercholesterolemia gene in heterozygotes: mechanism for a dominant disorder in man. *Science* 1974; 185: 61-63.
3. Brown MS, Goldstein JL. Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science* 1976; 191: 150-154.
4. Brown MS, Goldstein JL. Familial hypercholesterolemia: A genetic defect in the low-density lipoprotein receptor. *N Engl J Med* 1976; 294: 1386-1390.
5. Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL, Eeckels R, Vandenbergh K, van den Berghe H, et al. Prenatal diagnosis of homozygous familial hypercholesterolaemia. Expression of a genetic receptor disease in utero. *Lancet* 1978; 1: 526-529.
6. Tolleshaug H, Hobgood KK, Brown MS, Goldstein JL. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: multiple mutations disrupt transport and processing of a membrane receptor. *Cell* 1983; 32: 941-951.
7. Motulsky AG. The 1985 Nobel Prize in physiology or medicine. *Science* 1986; 231: 126-129.
8. Raju TN. The Nobel chronicles. 1985: Joseph Leonard Goldstein (b 1940), Michael Stuart Brown (b 1941). *Lancet* 2000; 355: 416.
9. Bruckert E, Chapman J. [Low density lipoprotein receptor and hypercholesterolemia]. *Rev Prat* 1994; 44: 1287-1293.
10. Turpin G, Bruckert E. [Familial hypercholesterolemia]. *Ann Med Interne (Paris)* 1999; 150: 605-614.
11. Oosterveer DM, Versmissen J, Yazdanpanah M, Hamza TH, Sijbrands EJ. Differences in characteristics and risk of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia patients with and without tendon xanthomas: a systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis* 2009; 207: 311-317.
12. Marks D, Thorogood M, Neil HA, Humphries SE. A review on the diagnosis, natural history, and treatment of familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 2003; 168: 1-14.
13. Raal FJ, Santos RD. Homozygous familial hypercholesterolemia: Current perspectives on diagnosis and treatment. *Atherosclerosis* 2012; 223: 262-268.
14. Payne MY. Too young to be having a heart attack. *Lancet* 2001; 358 Suppl: S64.
15. Macchiaiolo M, Gagliardi MG, Toscano A, Guccione P, Bartuli A. Homozygous familial hypercholesterolaemia. *Lancet* 2012; 379: 1330.
16. Gill PJ, Harnden A, Karpe F. Familial hypercholesterolaemia. *Bmj* 2012; 344: e3228.
17. Breslow JL. Genetic basis of lipoprotein disorders. *J Clin Invest* 1989; 84: 373-380.
18. Thompson GR, Naoumova RP, Watts GF. Role of cholesterol in regulating apolipoprotein B secretion by the liver. *J Lipid Res* 1996; 37: 439-447.
19. Sibley C, McGann S, Stone NJ. Long-term survival of childhood coronary artery disease in a patient severely affected with familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 2004; 94: 699-700.
20. Raper A, Kolansky DM, Cuchel M. Treatment of familial hypercholesterolemia: is there a need beyond statin therapy? *Curr Atheroscler Rep* 2012; 14: 11-16.
21. Perry CM. Colesevelam: in pediatric patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Paediatr Drugs* 2010; 12: 133-140.
22. Capuzzi DM, Guyton JR, Morgan JM, Goldberg AC, Kreisberg RA, Brusco OA, et al. Efficacy and safety of an extended-release niacin (Niaspan): a long-term study. *Am J Cardiol* 1998; 82: 74U-81U.
23. Descamps OS, Tenoutasse S, Stephenne X, Gies I, Beauloye V, Lebrethon MC, et al. Management of familial hypercholesterolemia in children and young adults: consensus paper developed by a panel of lipidologists, cardiologists, paediatricians, nutritionists, gastroenterologists, general practitioners and a patient organization. *Atherosclerosis* 2011; 218: 272-280.

24. Stein EA, Illingworth DR, Kwiterovich PO, Jr., Liacouras CA, Siimes MA, Jacobson MS, et al. Efficacy and safety of lovastatin in adolescent males with heterozygous familial hypercholesterolemia: a randomized controlled trial. *Jama* 1999; 281: 137-144.
25. Avis HJ, Vissers MN, Stein EA, Wijburg FA, Trip MD, Kastelein JJ, et al. A systematic review and meta-analysis of statin therapy in children with familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 1803-1810.
26. Sjouke B, Kusters DM, Kastelein JJ, Hovingh GK. Familial hypercholesterolemia: present and future management. *Curr Cardiol Rep* 2011; 13: 527-536.
27. Vuorio A, Kuoppala J, Kovanen PT, Humphries SE, Strandberg T, Tonstad S, et al. Statins for children with familial hypercholesterolemia. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; CD006401.
28. Armitage J. The safety of statins in clinical practice. *Lancet* 2007; 370: 1781-1790.
29. Weng TC, Yang YH, Lin SJ, Tai SH. A systematic review and meta-analysis on the therapeutic equivalence of statins. *J Clin Pharm Ther* 2010; 35: 139-151.
30. Miura S, Saku K. Ezetimibe, a selective inhibitor of the transport of cholesterol. *Intern Med* 2008; 47: 1165-1170.
31. Pandor A, Ara RM, Tumur I, Wilkinson AJ, Paisley S, Duenas A, et al. Ezetimibe monotherapy for cholesterol lowering in 2,722 people: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Intern Med* 2009; 265: 568-580.
32. Descamps OS, De Sutter J, Guillaume M, Missault L. Where does the interplay between cholesterol absorption and synthesis in the context of statin and/or ezetimibe treatment stand today? *Atherosclerosis* 2011; 217: 308-321.
33. Mikhailidis DP, Lawson RW, McCormick AL, Sibbring GC, Tershakovec AM, Davies GM, et al. Comparative efficacy of the addition of ezetimibe to statin vs statin titration in patients with hypercholesterolaemia: systematic review and meta-analysis. *Curr Med Res Opin* 2011; 27: 1191-1210.
34. Shanes JG. A review of the rationale for additional therapeutic interventions to attain lower LDL-C when statin therapy is not enough. *Curr Atheroscler Rep* 2012; 14: 33-40.
35. Baigent C, Landray MJ, Reith C, Emberson J, Wheeler DC, Tomson C, et al. The effects of lowering LDL cholesterol with simvastatin plus ezetimibe in patients with chronic kidney disease (Study of Heart and Renal Protection): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2011; 377: 2181-2192.
36. Taylor AJ, Villines TC, Stanek EJ, Devine PJ, Griffen L, Miller M, et al. Extended-release niacin or ezetimibe and carotid intima-media thickness. *N Engl J Med* 2009; 361: 2113-2122.
37. Bell DA, Hooper AJ, Burnett JR. Mipomersen, an antisense apolipoprotein B synthesis inhibitor. *Expert Opin Investig Drugs* 2011; 20: 265-272.
38. Ricotta DN, Frishman W. Mipomersen: a safe and effective antisense therapy adjunct to statins in patients with hypercholesterolemia. *Cardiol Rev* 2012; 20: 90-95.
39. Richter WO, Donner MG, Schwandt P. Short- and long-term effects on serum lipoproteins by three different techniques of apheresis. *Artif Organs* 1996; 20: 311-317.
40. Assogba U, Dairou F, Turpin G, Bruckert E. [LDL-apheresis therapy, methods and indications]. *Presse Med* 1999; 28: 985-991.
41. Hollman G, Ek AC, Olsson AG, Bertero C. Meaning of quality of life among patients with familial hypercholesterolemia. *J Cardiovasc Nurs* 2004; 19: 243-250.
42. Van Craeyveld E, Jacobs F, Gordts SC, De Geest B. Gene therapy for familial hypercholesterolemia. *Curr Pharm Des* 2011; 17: 2575-2591.
43. Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* 1993; 92: 883-893.
44. Kozarsky KF, Jooss K, Donahee M, Strauss JF, 3rd, Wilson JM. Effective treatment of familial hypercholesterolaemia in the mouse model using adenovirus-mediated transfer of the VLDL receptor gene. *Nat Genet* 1996; 13: 54-62.

45. Kobayashi K, Oka K, Forte T, Ishida B, Teng B, Ishimura-Oka K, et al. Reversal of hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice by adenovirus-mediated gene transfer of the very low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 1996; 271: 6852-6860.
46. Stein CS, Martins I, Davidson BL. Long-term reversal of hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor (LDLR)-deficient mice by adenovirus-mediated LDLR gene transfer combined with CD154 blockade. *J Gene Med* 2000; 2: 41-51.
47. Leberer C, Gao G, Louboutin JP, Millar J, Rader D, Wilson JM. Gene therapy with novel adeno-associated virus vectors substantially diminishes atherosclerosis in a murine model of familial hypercholesterolemia. *J Gene Med* 2004; 6: 663-672.
48. Belalcazar LM, Merched A, Carr B, Oka K, Chen KH, Pastore L, et al. Long-term stable expression of human apolipoprotein A-I mediated by helper-dependent adenovirus gene transfer inhibits atherosclerosis progression and remodels atherosclerotic plaques in a mouse model of familial hypercholesterolemia. *Circulation* 2003; 107: 2726-2732.
49. Kassim SH, Li H, Vandenberghe LH, Hinderer C, Bell P, Marchadier D, et al. Gene therapy in a humanized mouse model of familial hypercholesterolemia leads to marked regression of atherosclerosis. *PLoS One* 5: e13424.
50. Jacobs F, Van Craeyveld E, Feng Y, Snoeys J, De Geest B. Adenoviral low density lipoprotein receptor attenuates progression of atherosclerosis and decreases tissue cholesterol levels in a murine model of familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2008; 201: 289-297.
51. Kondo T, Watanabe Y. [A heritable hyperlipemic rabbit (author's transl)]. *Jikken Dobutsu* 1975; 24: 89-94.
52. Havel RJ, Yamada N, Shames DM. Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. Animal model for familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis* 1989; 9: I33-38.
53. Chowdhury JR, Grossman M, Gupta S, Chowdhury NR, Baker JR, Jr., Wilson JM. Long-term improvement of hypercholesterolemia after ex vivo gene therapy in LDLR-deficient rabbits. *Science* 1991; 254: 1802-1805.
54. Wilson JM, Grossman M, Raper SE, Baker JR, Jr., Newton RS, Thoene JG. Ex vivo gene therapy of familial hypercholesterolemia. *Hum Gene Ther* 1992; 3: 179-222.
55. Kozarsky KF, McKinley DR, Austin LL, Raper SE, Stratford-Perricaudet LD, Wilson JM. In vivo correction of low density lipoprotein receptor deficiency in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit with recombinant adenoviruses. *J Biol Chem* 1994; 269: 13695-13702.
56. Li J, Fang B, Eisensmith RC, Li XH, Nasonkin I, Lin-Lee YC, et al. In vivo gene therapy for hyperlipidemia: phenotypic correction in Watanabe rabbits by hepatic delivery of the rabbit LDL receptor gene. *J Clin Invest* 1995; 95: 768-773.
57. Tietge UJ, Cichon G, Buttner C, Genschel J, Heeren J, Gielow P, et al. A sensitive noninvasive method for monitoring successful liver-directed gene transfer of the low-density lipoprotein receptor in Watanabe hyperlipidemic rabbits in vivo. *Gene Ther* 2004; 11: 574-580.
58. Kankkonen HM, Vahakangas E, Marr RA, Pakkanen T, Laurema A, Leppanen P, et al. Long-term lowering of plasma cholesterol levels in LDL-receptor-deficient WHHL rabbits by gene therapy. *Mol Ther* 2004; 9: 548-556.
59. Wiederkehr JC, Kondos GT, Pollak R. Hepatocyte transplantation for the low-density lipoprotein receptor-deficient state. A study in the Watanabe rabbit. *Transplantation* 1990; 50: 466-471.
60. Eguchi S, Rozga J, Lebow LT, Chen SC, Wang CC, Rosenthal R, et al. Treatment of hypercholesterolemia in the Watanabe rabbit using allogeneic hepatocellular transplantation under a regeneration stimulus. *Transplantation* 1996; 62: 588-593.
61. Attaran M, Schneider A, Grote C, Zwiens C, Flemming P, Gratz KF, et al. Regional and transient ischemia/reperfusion injury in the liver improves therapeutic efficacy of allogeneic intraportal hepatocyte transplantation in low-density lipoprotein receptor deficient Watanabe rabbits. *J Hepatol* 2004; 41: 837-844.
62. Nguyen TH, Ferry N. Gene therapy for liver enzyme deficiencies: what have we learned from models for Crigler-Najjar and tyrosinemia? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2007; 1: 155-171.
63. Childs B, Sidbury JB, C.J. M. Glucuronic acid conjugation by patients with familial non-hemolytic jaundice and their relatives. *Pediatrics* 1959; 23: 903.

64. Jansen PL. Diagnosis and management of Crigler-Najjar syndrome. *Eur J Pediatr* 1999; 158 Suppl 2: S89-94.
65. Arias IM, Gartner LM, Cohen M, Ezzer JB, Levi AJ. Chronic nonhemolytic unconjugated hyperbilirubinemia with glucuronyl transferase deficiency. Clinical, biochemical, pharmacologic and genetic evidence for heterogeneity. *Am J Med* 1969; 47: 395-409.
66. Van der Veere CN, Sinaasappel M, McDonagh AF, Rosenthal P, Labrune P, Odievre M, et al. Current therapy for Crigler-Najjar syndrome type I: report of a world registry. *Hepatology* 1996; 24: 311-315.
67. Bosma PJ, Seppen J, Goldhoorn B, Bakker C, Oude Elferink RP, Chowdhury JR, et al. Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man. *J Biol Chem* 1994; 269: 17960-17964.
68. Bosma PJ, Chowdhury JR, Huang TJ, Lahiri P, Elferink RP, Van Es HH, et al. Mechanisms of inherited deficiencies of multiple UDP-glucuronosyltransferase isoforms in two patients with Crigler-Najjar syndrome, type I. *Faseb J* 1992; 6: 2859-2863.
69. Ritter JK, Yeatman MT, Ferreira P, Owens IS. Identification of a genetic alteration in the code for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in the UGT1 gene complex of a Crigler-Najjar type I patient. *J Clin Invest* 1992; 90: 150-155.
70. Ritter JK, Yeatman MT, Kaiser C, Gridelli B, Owens IS. A phenylalanine codon deletion at the UGT1 gene complex locus of a Crigler-Najjar type I patient generates a pH-sensitive bilirubin UDP-glucuronosyltransferase. *J Biol Chem* 1993; 268: 23573-23579.
71. Labrune P, Myara A, Hadchouel M, Ronchi F, Bernard O, Trivin F, et al. Genetic heterogeneity of Crigler-Najjar syndrome type I: a study of 14 cases. *Hum Genet* 1994; 94: 693-697.
72. Ciotti M, Obaray R, Martin MG, Owens IS. Genetic defects at the UGT1 locus associated with Crigler-Najjar type I disease, including a prenatal diagnosis. *Am J Med Genet* 1997; 68: 173-178.
73. Petit F, Gajdos V, Capel L, Parisot F, Myara A, Francoual J, et al. Crigler-Najjar type II syndrome may result from several types and combinations of mutations in the UGT1A1 gene. *Clin Genet* 2006; 69: 525-527.
74. Fevery J, Blanckaert N, Heirwegh KP, Preaux AM, Berthelot P. Unconjugated bilirubin and an increased proportion of bilirubin monoconjugates in the bile of patients with Gilbert's syndrome and Crigler-Najjar disease. *J Clin Invest* 1977; 60: 970-979.
75. Gunn CH. Hereditary acholuric jaundice in a new mutant strain of rats. *J Hered* 1938; 29: 137.
76. Ferry N. [Gene therapy of the liver: from the laboratory to the patient's bedside]. *Acta Gastroenterol Belg* 1994; 57: 213-218.
77. Li Q, Murphree SS, Willer SS, Bolli R, French BA. Gene therapy with bilirubin-UDP-glucuronosyltransferase in the Gunn rat model of Crigler-Najjar syndrome type I. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 497-505.
78. Thummala NR, Ghosh SS, Lee SW, Reddy B, Davidson A, Horwitz MS, et al. A non-immunogenic adenoviral vector, coexpressing CTLA4Ig and bilirubin-uridine-diphosphoglucuronateglucuronosyltransferase permits long-term, repeatable transgene expression in the Gunn rat model of Crigler-Najjar syndrome. *Gene Ther* 2002; 9: 981-990.
79. Miles KK, Kessler FK, Webb LJ, Smith PC, Ritter JK. Adenovirus-mediated gene therapy to restore expression and functionality of multiple UDP-glucuronosyltransferase 1A enzymes in Gunn rat liver. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318: 1240-1247.
80. Flageul M, Aubert D, Pichard V, Nguyen TH, Nowrouzi A, Schmidt M, et al. Transient expression of genes delivered to newborn rat liver using recombinant adeno-associated virus 2/8 vectors. *J Gene Med* 2009; 11: 689-696.
81. Dimmock D, Brunetti-Pierri N, Palmer DJ, Beaudet AL, Ng P. Correction of hyperbilirubinemia in Gunn rats using clinically relevant low doses of helper-dependent adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 2011; 22: 483-488.
82. Branchereau S, Ferry N, Myara A, Sato H, Kowai O, Trivin F, et al. [Correction of bilirubin glucuronyl transferase in Gunn rats by gene transfer in the liver using retroviral vectors]. *Chirurgie* 1993; 119: 642-648.

83. Fox IJ, Chowdhury NR, Gupta S, Kondapalli R, Schilsky ML, Stockert RJ, et al. Conditional immortalization of Gunn rat hepatocytes: an ex vivo model for evaluating methods for bilirubin-UDP-glucuronosyltransferase gene transfer. *Hepatology* 1995; 21: 837-846.
84. Tada K, Chowdhury NR, Neufeld D, Bosma PJ, Heard M, Prasad VR, et al. Long-term reduction of serum bilirubin levels in Gunn rats by retroviral gene transfer in vivo. *Liver Transpl Surg* 1998; 4: 78-88.
85. Tada K, Roy-Chowdhury N, Prasad V, Kim BH, Manchikalapudi P, Fox IJ, et al. Long-term amelioration of bilirubin glucuronidation defect in Gunn rats by transplanting genetically modified immortalized autologous hepatocytes. *Cell Transplant* 1998; 7: 607-616.
86. Bellodi-Privato M, Aubert D, Pichard V, Myara A, Trivin F, Ferry N. Successful gene therapy of the Gunn rat by in vivo neonatal hepatic gene transfer using murine oncoretroviral vectors. *Hepatology* 2005; 42: 431-438.
87. Seppen J, van der Rijt R, Looije N, van Til NP, Lamers WH, Oude Elferink RP. Long-term correction of bilirubin UDPglucuronyltransferase deficiency in rats by in utero lentiviral gene transfer. *Mol Ther* 2003; 8: 593-599.
88. Nguyen TH, Bellodi-Privato M, Aubert D, Pichard V, Myara A, Trono D, et al. Therapeutic lentivirus-mediated neonatal in vivo gene therapy in hyperbilirubinemic Gunn rats. *Mol Ther* 2005; 12: 852-859.
89. van der Wegen P, Louwen R, Imam AM, Buijs-Offerman RM, Sinaasappel M, Grosveld F, et al. Successful treatment of UGT1A1 deficiency in a rat model of Crigler-Najjar disease by intravenous administration of a liver-specific lentiviral vector. *Mol Ther* 2006; 13: 374-381.
90. Nguyen TH, Birraux J, Wildhaber B, Myara A, Trivin F, Le Coultre C, et al. Ex vivo lentivirus transduction and immediate transplantation of uncultured hepatocytes for treating hyperbilirubinemic Gunn rat. *Transplantation* 2006; 82: 794-803.
91. Schmitt F, Remy S, Dariel A, Flageul M, Pichard V, Boni S, et al. Lentiviral vectors that express UGT1A1 in liver and contain miR-142 target sequences normalize hyperbilirubinemia in Gunn rats. *Gastroenterology* 2010; 139: 999-1007, 1007 e1001-1002.
92. Wilke M, Bijma A, Timmers-Reker AJ, Scholte BJ, Sinaasappel M. Complementation of the genetic defect in Gunn rat hepatocytes in vitro by highly efficient gene transfer with cationic liposomes. *Gene Ther* 1997; 4: 1305-1312.
93. Kren BT, Parashar B, Bandyopadhyay P, Chowdhury NR, Chowdhury JR, Steer CJ. Correction of the UDP-glucuronosyltransferase gene defect in the Gunn rat model of crigler-najjar syndrome type I with a chimeric oligonucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 10349-10354.
94. Cubero FJ, Arza E, Maganto P, Barrutia G, Mula N, Ortiz A, et al. Expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase (bUGT) throughout fetal development: intrasplenic transplantation into Gunn rats to correct enzymatic deficiency. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 2762-2767.
95. Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD. Hepatocyte transplantation for liver-based metabolic disorders. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29: 431-435.
96. Weber A, Groyer-Picard MT, Franco D, Dagher I. Hepatocyte transplantation in animal models. *Liver Transpl* 2009; 15: 7-14.
97. Ito M, Nagata H, Miyakawa S, Fox IJ. Review of hepatocyte transplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2009; 16: 97-100.
98. Schmitt F, Flageul M, Dariel A, Pichard V, Pontes CA, Boni S, et al. Transient increase in intrahepatic pressure mediates successful treatment of the Gunn rat with reduced doses of lentiviral vector. *Hum Gene Ther* 2011; 21: 1349-1356.
99. Jackson MJ, Beaudet AL, O'Brien WE. Mammalian urea cycle enzymes. *Annu Rev Genet* 1986; 20: 431-464.
100. Campbell AG, Rosenberg LE, Snodgrass PJ, Nuzum CT. Ornithine transcarbamylase deficiency: a cause of lethal neonatal hyperammonemia in males. *N Engl J Med* 1973; 288: 1-6.
101. Scott CR, Teng CC, Goodman SI, Greensher A, Mace JW. X-linked transmission of ornithine-transcarbamylase deficiency. *Lancet* 1972; 2: 1148.

102. Felipo V, Hermenegildo C, Montoliu C, Llansola M, Minana MD. Neurotoxicity of ammonia and glutamate: molecular mechanisms and prevention. *Neurotoxicology* 1998; 19: 675-681.
103. Maillot F, Crenn P. [Urea cycle disorders in adult patients]. *Rev Neurol (Paris)* 2007; 163: 897-903.
104. Riordan SM, Williams R. Treatment of hepatic encephalopathy. *N Engl J Med* 1997; 337: 473-479.
105. Fox J, Hack AM, Fenton WA, Golbus MS, Winter S, Kalousek F, et al. Prenatal diagnosis of ornithine transcarbamylase deficiency with use of DNA polymorphisms. *N Engl J Med* 1986; 315: 1205-1208.
106. Hasegawa T, Tzakis AG, Todo S, Reyes J, Nour B, Finegold DN, et al. Orthotopic liver transplantation for ornithine transcarbamylase deficiency with hyperammonemic encephalopathy. *J Pediatr Surg* 1995; 30: 863-865.
107. Ribes-Koninckx C, Pareja Ibars E, Agrasot MA, Bonora-Centelles A, Polo Miquel B, Vila Carbo JJ, et al. Clinical outcome of hepatocyte transplantation in four pediatric patients with inherited metabolic diseases. *Cell Transplant* 2012, in press.
108. Puppi J, Tan N, Mitry RR, Hughes RD, Lehec S, Mieli-Vergani G, et al. Hepatocyte transplantation followed by auxiliary liver transplantation--a novel treatment for ornithine transcarbamylase deficiency. *Am J Transplant* 2008; 8: 452-457.
109. Grompe M, Jones SN, Loulseged H, Caskey CT. Retroviral-mediated gene transfer of human ornithine transcarbamylase into primary hepatocytes of spf and spf-ash mice. *Hum Gene Ther* 1992; 3: 35-44.
110. Podevin G, Ferry N, Calise D, Revillion Y. In vivo retroviral-mediated transfer of a marker-gene in ornithine transcarbamylase-deficient Spf(ash) mice. *J Pediatr Surg* 1996; 31: 1516-1519.
111. Kiwaki K, Kanegae Y, Saito I, Komaki S, Nakamura K, Miyazaki JI, et al. Correction of ornithine transcarbamylase deficiency in adult spf(ash) mice and in OTC-deficient human hepatocytes with recombinant adenoviruses bearing the CAG promoter. *Hum Gene Ther* 1996; 7: 821-830.
112. Raper SE, Wilson JM, Yudkoff M, Robinson MB, Ye X, Batshaw ML. Developing adenoviral-mediated in vivo gene therapy for ornithine transcarbamylase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 1998; 21 Suppl 1: 119-137.
113. Brunetti-Pierri N, Clarke C, Mane V, Palmer DJ, Lanpher B, Sun Q, et al. Phenotypic correction of ornithine transcarbamylase deficiency using low dose helper-dependent adenoviral vectors. *J Gene Med* 2008; 10: 890-896.
114. Stratford-Perricaudet LD, Levrero M, Chasse JF, Perricaudet M, Briand P. Evaluation of the transfer and expression in mice of an enzyme-encoding gene using a human adenovirus vector. *Hum Gene Ther* 1990; 1: 241-256.
115. Moscioni D, Morizono H, McCarter RJ, Stern A, Cabrera-Luque J, Hoang A, et al. Long-term correction of ammonia metabolism and prolonged survival in ornithine transcarbamylase-deficient mice following liver-directed treatment with adeno-associated viral vectors. *Mol Ther* 2006; 14: 25-33.
116. Cunningham SC, Kok CY, Dane AP, Carpenter K, Kizana E, Kuchel PW, et al. Induction and prevention of severe hyperammonemia in the spfash mouse model of ornithine transcarbamylase deficiency using shRNA and rAAV-mediated gene delivery. *Mol Ther* 2009; 19: 854-859.
117. Wang L, Wang H, Morizono H, Bell P, Jones D, Lin J, et al. Sustained correction of OTC deficiency in spf(ash) mice using optimized self-complementary AAV2/8 vectors. *Gene Ther* 2012; 19: 404-410.
118. Wang L, Morizono H, Lin J, Bell P, Jones D, McMenamin D, et al. Preclinical evaluation of a clinical candidate AAV8 vector for ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency reveals functional enzyme from each persisting vector genome. *Mol Genet Metab* 2012; 105: 203-211.
119. Michel JL, Rabier D, Rambaud C, Kamoun P, Brousse N, Vassault A, et al. [Intrasplenic transplantation of hepatocytes in spf-ash mice with congenital ornithine transcarbamylase deficiency]. *Chirurgie* 1993; 119: 666-671.
120. Stolberg SG. The biotech death of Jesse Gelsinger. *N Y Times Mag* 1999; 136-140, 149-150.
121. Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* 2003; 80: 148-158.
122. Talamo RC, Blennerhassett JB, Austen KF. Familial emphysema and alpha-1-antitrypsin deficiency. *N Engl J Med* 1966; 275: 1301-1304.

123. Fairbanks KD, Tavill AS. Liver disease in alpha 1-antitrypsin deficiency: a review. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 2136-2141.
124. Stoller JK, Aboussouan LS. Alpha1-antitrypsin deficiency. *Lancet* 2005; 365: 2225-2236.
125. Carlson JA, Rogers BB, Sifers RN, Hawkins HK, Finegold MJ, Woo SL. Multiple tissues express alpha 1-antitrypsin in transgenic mice and man. *J Clin Invest* 1988; 82: 26-36.
126. Demkow U, van Overveld FJ. Role of elastases in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: implications for treatment. *Eur J Med Res* 2010; 15 Suppl 2: 27-35.
127. Darlington GJ, Astrin KH, Muirhead SP, Desnick RJ, Smith M. Assignment of human alpha 1-antitrypsin to chromosome 14 by somatic cell hybrid analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79: 870-873.
128. DeMeo DL, Silverman EK. Alpha1-antitrypsin deficiency. 2: genetic aspects of alpha(1)-antitrypsin deficiency: phenotypes and genetic modifiers of emphysema risk. *Thorax* 2004; 59: 259-264.
129. Stoller JK, Aboussouan LS. A review of alpha1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185: 246-259.
130. Black LF, Kueppers F. alpha1-Antitrypsin deficiency in nonsmokers. *Am Rev Respir Dis* 1978; 117: 421-428.
131. de Serres FJ. Worldwide racial and ethnic distribution of alpha1-antitrypsin deficiency: summary of an analysis of published genetic epidemiologic surveys. *Chest* 2002; 122: 1818-1829.
132. Ganrot PO, Laurell CB, Eriksson S. Obstructive lung disease and trypsin inhibitors in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Scand J Clin Lab Invest* 1967; 19: 205-208.
133. Sharp HL, Bridges RA, Krivit W, Freier EF. Cirrhosis associated with alpha-1-antitrypsin deficiency: a previously unrecognized inherited disorder. *J Lab Clin Med* 1969; 73: 934-939.
134. Jeppsson JO. Amino acid substitution Glu leads to Lys alpha1-antitrypsin PiZ. *FEBS Lett* 1976; 65: 195-197.
135. Petersen KB, Kolvraa S, Bolund L, Petersen GB, Koch J, Gregersen N. Detection of alpha 1-antitrypsin genotypes by analysis of amplified DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 352.
136. Teckman JH, Perlmutter DH. Retention of mutant alpha(1)-antitrypsin Z in endoplasmic reticulum is associated with an autophagic response. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G961-974.
137. Sveger T. Liver disease in alpha1-antitrypsin deficiency detected by screening of 200,000 infants. *N Engl J Med* 1976; 294: 1316-1321.
138. Kochar R, Fallon MB. Pulmonary diseases and the liver. *Clin Liver Dis* 2011; 15: 21-37.
139. Sveger T. The natural history of liver disease in alpha 1-antitrypsin deficient children. *Acta Paediatr Scand* 1988; 77: 847-851.
140. Esquivel CO, Iwatsuki S, Gordon RD, Marsh WW, Jr., Koneru B, Makowka L, et al. Indications for pediatric liver transplantation. *J Pediatr* 1987; 111: 1039-1045.
141. Prachalias AA, Kalife M, Francavilla R, Muiesan P, Dhawan A, Baker A, et al. Liver transplantation for alpha-1-antitrypsin deficiency in children. *Transpl Int* 2000; 13: 207-210.
142. Francavilla R, Castellaneta SP, Hadzic N, Chambers SM, Portmann B, Tung J, et al. Prognosis of alpha-1-antitrypsin deficiency-related liver disease in the era of paediatric liver transplantation. *J Hepatol* 2000; 32: 986-992.
143. Hood JM, Koep LJ, Peters RL, Schroter GP, Weil R, 3rd, Redeker AG, et al. Liver transplantation for advanced liver disease with alpha-1-antitrypsin deficiency. *N Engl J Med* 1980; 302: 272-275.
144. Zhang KY, Tung BY, Kowdley KV. Liver transplantation for metabolic liver diseases. *Clin Liver Dis* 2007; 11: 265-281.
145. Perlmutter DH. Pathogenesis of chronic liver injury and hepatocellular carcinoma in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Pediatr Res* 2006; 60: 233-238.
146. Theodoropoulos G, Fertakis A, Archimandritis A, Kapordelis C, Angelopoulos B. Alpha 1-antitrypsin phenotypes in cirrhosis and hepatoma. *Acta Hepatogastroenterol (Stuttg)* 1976; 23: 114-117.
147. Zhou H, Ortiz-Pallardo ME, Ko Y, Fischer HP. Is heterozygous alpha-1-antitrypsin deficiency type PIZ a risk factor for primary liver carcinoma? *Cancer* 2000; 88: 2668-2676.

148. Rudnick DA, Perlmutter DH. Alpha-1-antitrypsin deficiency: a new paradigm for hepatocellular carcinoma in genetic liver disease. *Hepatology* 2005; 42: 514-521.
149. Eriksson S, Carlson J, Velez R. Risk of cirrhosis and primary liver cancer in alpha 1-antitrypsin deficiency. *N Engl J Med* 1986; 314: 736-739.
150. Dragani TA. Risk of HCC: genetic heterogeneity and complex genetics. *J Hepatol* 2010; 52: 252-257.
151. Carlson JA, Rogers BB, Sifers RN, Finegold MJ, Clift SM, DeMayo FJ, et al. Accumulation of PiZ alpha 1-antitrypsin causes liver damage in transgenic mice. *J Clin Invest* 1989; 83: 1183-1190.
152. Geller SA, Nichols WS, Dyaico MJ, Felts KA, Sorge JA. Histopathology of alpha 1-antitrypsin liver disease in a transgenic mouse model. *Hepatology* 1990; 12: 40-47.
153. Ponder KP, Gupta S, Leland F, Darlington G, Finegold M, DeMayo J, et al. Mouse hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intrasplenic transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 1217-1221.
154. Bumgardner GL, Heininger M, Li J, Xia D, Parker-Thornburg J, Ferguson RM, et al. A functional model of hepatocyte transplantation for in vivo immunologic studies. *Transplantation* 1998; 65: 53-61.
155. Saylor RL, 3rd, Wall DA. Expression of human alpha 1 antitrypsin in murine hematopoietic cells in vivo after retrovirus-mediated gene transfer. *Mol Genet Metab* 1998; 63: 198-204.
156. Song S, Witek RP, Lu Y, Choi YK, Zheng D, Jorgensen M, et al. Ex vivo transduced liver progenitor cells as a platform for gene therapy in mice. *Hepatology* 2004; 40: 918-924.
157. Li H, Lu Y, Witek RP, Chang LJ, Campbell-Thompson M, Jorgensen M, et al. Ex vivo transduction and transplantation of bone marrow cells for liver gene delivery of alpha1-antitrypsin. *Mol Ther* 2010; 18: 1553-1558.
158. Trocello JM, Chappuis P, Chaîne P, Remy P, Debray D, Duclos-Vallee JC, et al. [Wilson disease]. *Presse Med* 2009; 38: 1089-1098.
159. Wilson SAK. Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. *Brain* 1912; 34: 295-509.
160. Frommer DJ. Defective biliary excretion of copper in Wilson's disease. *Gut* 1974; 15: 125-129.
161. Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat Genet* 1993; 5: 327-337.
162. Loudianos G, Dessi V, Lovicu M, Angius A, Figus A, Lilliu F, et al. Molecular characterization of wilson disease in the Sardinian population--evidence of a founder effect. *Hum Mutat* 1999; 14: 294-303.
163. Yamaguchi Y, Heiny ME, Gitlin JD. Isolation and characterization of a human liver cDNA as a candidate gene for Wilson disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 197: 271-277.
164. Lutsenko S, Barnes NL, Bartee MY, Dmitriev OY. Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiol Rev* 2007; 87: 1011-1046.
165. Sato M, Gitlin JD. Mechanisms of copper incorporation during the biosynthesis of human ceruloplasmin. *J Biol Chem* 1991; 266: 5128-5134.
166. Gitlin JD, Schroeder JJ, Lee-Ambrose LM, Cousins RJ. Mechanisms of caeruloplasmin biosynthesis in normal and copper-deficient rats. *Biochem J* 1992; 282 (Pt 3): 835-839.
167. Das SK, Ray K. Wilson's disease: an update. *Nat Clin Pract Neurol* 2006; 2: 482-493.
168. Ala A, Walker AP, Ashkan K, Dooley JS, Schilsky ML. Wilson's disease. *Lancet* 2007; 369: 397-408.
169. Woimant F, Chaîne P, Favrole P, Mikol J, Chappuis P. [Wilson disease]. *Rev Neurol (Paris)* 2006; 162: 773-781.
170. Shanmugiah A, Sinha S, Taly AB, Prashanth LK, Tomar M, Arunodaya GR, et al. Psychiatric manifestations in Wilson's disease: a cross-sectional analysis. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2008; 20: 81-85.
171. Roberts EA, Schilsky ML. Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update. *Hepatology* 2008; 47: 2089-2111.
172. Steindl P, Ferenci P, Dienes HP, Grimm G, Pabinger I, Madl C, et al. Wilson's disease in patients presenting with liver disease: a diagnostic challenge. *Gastroenterology* 1997; 113: 212-218.

173. Ingster-Moati I, Bui Quoc E, Pless M, Djomby R, Orssaud C, Guichard JP, et al. Ocular motility and Wilson's disease: a study on 34 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78: 1199-1201.
174. Suvarna JC. Kayser-Fleischer ring. *J Postgrad Med* 2008; 54: 238-240.
175. Czlonkowska A, Rodo M, Gromadzka G. Late onset Wilson's disease: therapeutic implications. *Mov Disord* 2008; 23: 896-898.
176. Cuthbert JA. Wilson's disease. Update of a systemic disorder with protean manifestations. *Gastroenterol Clin North Am* 1998; 27: 655-681.
177. Walshe JM. Treatment of Wilson's disease with trientine (triethylene tetramine) dihydrochloride. *Lancet* 1982; 1: 643-647.
178. Schilsky ML, Scheinberg IH, Sternlieb I. Liver transplantation for Wilson's disease: indications and outcome. *Hepatology* 1994; 19: 583-587.
179. Pabon V, Dumortier J, Gincul R, Baulieux J, Ducerf C, Trepo C, et al. Long-term results of liver transplantation for Wilson's disease. *Gastroenterol Clin Biol* 2008; 32: 378-381.
180. Medici V, Mirante VG, Fassati LR, Pompili M, Forti D, Del Gaudio M, et al. Liver transplantation for Wilson's disease: The burden of neurological and psychiatric disorders. *Liver Transpl* 2005; 11: 1056-1063.
181. Guan R, Oon CJ, Wong PK, Foong WC, Wee A. Primary hepatocellular carcinoma associated with Wilson's disease in a young woman. *Postgrad Med J* 1985; 61: 357-359.
182. Polio J, Enriquez RE, Chow A, Wood WM, Atterbury CE. Hepatocellular carcinoma in Wilson's disease. Case report and review of the literature. *J Clin Gastroenterol* 1989; 11: 220-224.
183. Wilkinson ML, Portmann B, Williams R. Wilson's disease and hepatocellular carcinoma: possible protective role of copper. *Gut* 1983; 24: 767-771.
184. Kamamoto Y, Makiura S, Sugihara S, Hiasa Y, Arai M. The inhibitory effect of copper on DL-ethionine carcinogenesis in rats. *Cancer Res* 1973; 33: 1129-1135.
185. Theophilos MB, Cox DW, Mercer JF. The toxic milk mouse is a murine model of Wilson disease. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1619-1624.
186. Buiakova OI, Xu J, Lutsenko S, Zeitlin S, Das K, Das S, et al. Null mutation of the murine ATP7B (Wilson disease) gene results in intracellular copper accumulation and late-onset hepatic nodular transformation. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1665-1671.
187. Li Y, Togashi Y, Sato S, Emoto T, Kang JH, Takeichi N, et al. Spontaneous hepatic copper accumulation in Long-Evans Cinnamon rats with hereditary hepatitis. A model of Wilson's disease. *J Clin Invest* 1991; 87: 1858-1861.
188. Yoshida Y, Tokusashi Y, Lee GH, Ogawa K. Intrahepatic transplantation of normal hepatocytes prevents Wilson's disease in Long-Evans cinnamon rats. *Gastroenterology* 1996; 111: 1654-1660.
189. Irani AN, Malhi H, Slehria S, Gorla GR, Volenberg I, Schilsky ML, et al. Correction of liver disease following transplantation of normal rat hepatocytes into Long-Evans Cinnamon rats modeling Wilson's disease. *Mol Ther* 2001; 3: 302-309.
190. Malhi H, Irani AN, Volenberg I, Schilsky ML, Gupta S. Early cell transplantation in LEC rats modeling Wilson's disease eliminates hepatic copper with reversal of liver disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 438-447.
191. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology* 2010; 139: 393-408.
192. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 1996; 13: 399-408.
193. de Sousa M, Reimao R, Lacerda R, Hugo P, Kaufmann SH, Porto G. Iron overload in beta 2-microglobulin-deficient mice. *Immunol Lett* 1994; 39: 105-111.
194. Santos M, Schilham MW, Rademakers LH, Marx JJ, de Sousa M, Clevers H. Defective iron homeostasis in beta 2-microglobulin knockout mice recapitulates hereditary hemochromatosis in man. *J Exp Med* 1996; 184: 1975-1985.

195. Parkkila S, Waheed A, Britton RS, Bacon BR, Zhou XY, Tomatsu S, et al. Association of the transferrin receptor in human placenta with HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 13198-13202.
196. Bennett MJ, Lebron JA, Bjorkman PJ. Crystal structure of the hereditary haemochromatosis protein HFE complexed with transferrin receptor. *Nature* 2000; 403: 46-53.
197. Lebron JA, Bennett MJ, Vaughn DE, Chirino AJ, Snow PM, Mintier GA, et al. Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell* 1998; 93: 111-123.
198. Niederau C, Fischer R, Sonnenberg A, Stremmel W, Trampisch HJ, Strohmeyer G. Survival and causes of death in cirrhotic and in noncirrhotic patients with primary hemochromatosis. *N Engl J Med* 1985; 313: 1256-1262.
199. Niederau C, Fischer R, Purschel A, Stremmel W, Haussinger D, Strohmeyer G. Long-term survival in patients with hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology* 1996; 110: 1107-1119.
200. Barry M, Scheuer PJ, Sherlock S, Ross CF, Williams R. Hereditary spherocytosis with secondary haemochromatosis. *Lancet* 1968; 2: 481-485.
201. Kew MD. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hereditary hemochromatosis: occurrence in noncirrhotic patients. *Hepatology* 1990; 11: 1086-1087.
202. Bonkovsky HL, Banner BF, Lambrecht RW, Rubin RB. Iron in liver diseases other than hemochromatosis. *Semin Liver Dis* 1996; 16: 65-82.
203. Sotiropoulos GC, Molmenti EP, Lang H, Beckebaum S, Kaiser GM, Brokalaki EI, et al. Surgery for hepatocellular carcinoma arising in hereditary hemochromatosis. *Eur Surg Res* 2006; 38: 371-376.
204. Zhou XY, Tomatsu S, Fleming RE, Parkkila S, Waheed A, Jiang J, et al. HFE gene knockout produces mouse model of hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 2492-2497.
205. Fleming RE, Feng Q, Britton RS. Knockout mouse models of iron homeostasis. *Annu Rev Nutr* 2011; 31: 117-137.
206. Nadakkavukaran IM, Gan EK, Olynyk JK. Screening for hereditary haemochromatosis. *Pathology* 2012; 44: 148-152.
207. van Bokhoven MA, van Deursen CT, Swinkels DW. Diagnosis and management of hereditary haemochromatosis. *BMJ* 2011; 342: c7251.
208. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, et al. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 8780-8785.
209. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 2001; 276: 7811-7819.
210. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, et al. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 4596-4601.
211. Pietrangelo A. Hepcidin in human iron disorders: therapeutic implications. *J Hepatol* 2011; 54: 173-181.
212. Ashorn M, Pitkanen S, Salo MK, Heikinheimo M. Current strategies for the treatment of hereditary tyrosinemia type I. *Paediatr Drugs* 2006; 8: 47-54.
213. Esquivel CO, Mieles L, Marino IR, Todo S, Makowka L, Ambrosino G, et al. Liver transplantation for hereditary tyrosinemia in the presence of hepatocellular carcinoma. *Transplant Proc* 1989; 21: 2445-2446.
214. van Spronsen FJ, Berger R, Smit GP, de Klerk JB, Duran M, Bijleveld CM, et al. Tyrosinaemia type I: orthotopic liver transplantation as the only definitive answer to a metabolic as well as an oncological problem. *J Inher Metab Dis* 1989; 12 Suppl 2: 339-342.
215. Lindstedt S, Holme E, Lock EA, Hjalmarson O, Strandvik B. Treatment of hereditary tyrosinaemia type I by inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Lancet* 1992; 340: 813-817.
216. Masurel-Paulet A, Poggi-Bach J, Rolland MO, Bernard O, Guffon N, Dobbelaere D, et al. NTBC treatment in tyrosinaemia type I: long-term outcome in French patients. *J Inher Metab Dis* 2008; 31: 81-87.

217. Schlune A, Thimm E, Herebian D, Spiekerkoetter U. Single dose NTBC-treatment of hereditary tyrosinemia type I. *J Inher Metab Dis* 2012; 35:831-6.
218. Grompe M, Lindstedt S, al-Dhalimy M, Kennaway NG, Papaconstantinou J, Torres-Ramos CA, et al. Pharmacological correction of neonatal lethal hepatic dysfunction in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. *Nat Genet* 1995; 10: 453-460.
219. Arnon R, Annunziato R, Miloh T, Wasserstein M, Sogawa H, Wilson M, et al. Liver transplantation for hereditary tyrosinemia type I: analysis of the UNOS database. *Pediatr Transplant* 2011; 15: 400-405.
220. Gluecksohn-Waelsch S. Genetic control of morphogenetic and biochemical differentiation: lethal albino deletions in the mouse. *Cell* 1979; 16: 225-237.
221. Grompe M, al-Dhalimy M, Finegold M, Ou CN, Burlingame T, Kennaway NG, et al. Loss of fumarylacetoacetate hydrolase is responsible for the neonatal hepatic dysfunction phenotype of lethal albino mice. *Genes Dev* 1993; 7: 2298-2307.
222. Nakamura K, Tanaka Y, Mitsubuchi H, Endo F. Animal models of tyrosinemia. *J Nutr* 2007; 137: 1556S-1560S; discussion 1573S-1575S.
223. Tanguay RM, Jorquera R, Poudrier J, St-Louis M. Tyrosine and its catabolites: from disease to cancer. *Acta Biochim Pol* 1996; 43: 209-216.
224. Klebig ML, Russell LB, Rinchik EM. Murine fumarylacetoacetate hydrolase (Fah) gene is disrupted by a neonatally lethal albino deletion that defines the hepatocyte-specific developmental regulation 1 (hsdr-1) locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 1363-1367.
225. Overturf K, Al-Dhalimy M, Manning K, Ou CN, Finegold M, Grompe M. Ex vivo hepatic gene therapy of a mouse model of Hereditary Tyrosinemia Type I. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 295-304.
226. Overturf K, al-Dhalimy M, Ou CN, Finegold M, Tanguay R, Lieber A, et al. Adenovirus-mediated gene therapy in a mouse model of hereditary tyrosinemia type I. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 513-521.
227. Overturf K, Al-Dhalimy M, Tanguay R, Brantly M, Ou CN, Finegold M, et al. Hepatocytes corrected by gene therapy are selected in vivo in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. *Nat Genet* 1996; 12: 266-273.
228. Paulk NK, Wursthorn K, Wang Z, Finegold MJ, Kay MA, Grompe M. Adeno-associated virus gene repair corrects a mouse model of hereditary tyrosinemia in vivo. *Hepatology* 2012; 51: 1200-1208.
229. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 1229-1234.
230. Starzl TE, Marchioro TL, Huntley RT, Rifkind D, Rowlands DT, Jr., Dickinson TC, et al. Experimental and Clinical Homotransplantation of the Liver. *Ann N Y Acad Sci* 1964; 120: 739-765.
231. Greffe hépatique. Agence de la Biomédecine 2012; <http://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2010/donnees/organes/05-foie/synthese.htm>.
232. Munoz LE, Nanez H, Rositas F, Perez E, Razo S, Cordero P, et al. Long-term complications and survival of patients after orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 2010; 42: 2381-2382.
233. Duvoux C. De novo tumours after liver transplantation in adults. What is the actual risk? *J Hepatol* 2001; 34: 161-164.
234. Herrero JI. Screening of de novo tumors after liver transplantation. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27: 1011-1016.
235. Burra P, Freeman R. Trends in liver transplantation 2011. *J Hepatol* 2012; 56 Suppl 1: S101-111.
236. Gilbert JR, Pascual M, Schoenfeld DA, Rubin RH, Delmonico FL, Cosimi AB. Evolving trends in liver transplantation: an outcome and charge analysis. *Transplantation* 1999; 67: 246-253.
237. Pierson RN, 3rd, Dorling A, Ayares D, Rees MA, Seebach JD, Fishman JA, et al. Current status of xenotransplantation and prospects for clinical application. *Xenotransplantation* 2009; 16: 263-280.
238. Starzl TE, Fung J, Tzakis A, Todo S, Demetris AJ, Marino IR, et al. Baboon-to-human liver transplantation. *Lancet* 1993; 341: 65-71.

239. Fung J, Rao A, Starzl T. Clinical trials and projected future of liver xenotransplantation. *World J Surg* 1997; 21: 956-961.
240. Makowka L, Wu GD, Hoffman A, Podesta L, Sher L, Tuso PJ, et al. Immunohistopathologic lesions associated with the rejection of a pig-to-human liver xenograft. *Transplant Proc* 1994; 26: 1074-1075.
241. Chapman LE, Folks TM, Salomon DR, Patterson AP, Eggerman TE, Noguchi PD. Xenotransplantation and xenogeneic infections. *N Engl J Med* 1995; 333: 1498-1501.
242. Bach FH, Fishman JA, Daniels N, Proimos J, Anderson B, Carpenter CB, et al. Uncertainty in xenotransplantation: individual benefit versus collective risk. *Nat Med* 1998; 4: 141-144.
243. Denner J. Infectious risk in xenotransplantation--what post-transplant screening for the human recipient? *Xenotransplantation* 2011; 18: 151-157.
244. Ekser B, Ezzelarab M, Hara H, van der Windt DJ, Wijkstrom M, Bottino R, et al. Clinical xenotransplantation: the next medical revolution? *Lancet* 2012; 379: 672-683.
245. Houser SL, Kuwaki K, Knosalla C, Dor FJ, Gollackner B, Cheng J, et al. Thrombotic microangiopathy and graft arteriopathy in pig hearts following transplantation into baboons. *Xenotransplantation* 2004; 11: 416-425.
246. Kuwaki K, Tseng YL, Dor FJ, Shimizu A, Houser SL, Sanderson TM, et al. Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat Med* 2005; 11: 29-31.
247. Buhler L, Basker M, Alwayn IP, Goepfert C, Kitamura H, Kawai T, et al. Coagulation and thrombotic disorders associated with pig organ and hematopoietic cell transplantation in nonhuman primates. *Transplantation* 2000; 70: 1323-1331.
248. Lin CC, Ezzelarab M, Shapiro R, Ekser B, Long C, Hara H, et al. Recipient tissue factor expression is associated with consumptive coagulopathy in pig-to-primate kidney xenotransplantation. *Am J Transplant* 2010; 10: 1556-1568.
249. Hering BJ, Wijkstrom M, Graham ML, Hardstedt M, Aasheim TC, Jie T, et al. Prolonged diabetes reversal after intraportal xenotransplantation of wild-type porcine islets in immunosuppressed nonhuman primates. *Nat Med* 2006; 12: 301-303.
250. Bonavita AG, Quaresma K, Cotta-de-Almeida V, Pinto MA, Saraiva RM, Alves LA. Hepatocyte xenotransplantation for treating liver disease. *Xenotransplantation* 2010; 17: 181-187.
251. Onions DE, Witt CJ. Xenotransplantation: an overview of microbiological risks and potentials for risk management. *Rev Sci Tech* 2000; 19: 289-301.
252. Nyberg SL. Bridging the gap: Advances in artificial liver support. *Liver Transpl* 2012, in press.
253. Hughes RD, Williams R. Use of bioartificial and artificial liver support devices. *Semin Liver Dis* 1996; 16: 435-444.
254. Stockmann HB, Hiemstra CA, Marquet RL, JN IJ. Extracorporeal perfusion for the treatment of acute liver failure. *Ann Surg* 2000; 231: 460-470.
255. Stange J, Mitzner SR, Risler T, Erley CM, Lauchart W, Goehl H, et al. Molecular adsorbent recycling system (MARS): clinical results of a new membrane-based blood purification system for bioartificial liver support. *Artif Organs* 1999; 23: 319-330.
256. Hassanein TI, Tofteng F, Brown RS, Jr., McGuire B, Lynch P, Mehta R, et al. Randomized controlled study of extracorporeal albumin dialysis for hepatic encephalopathy in advanced cirrhosis. *Hepatology* 2007; 46: 1853-1862.
257. Sen S, Davies NA, Mookerjee RP, Cheshire LM, Hodges SJ, Williams R, et al. Pathophysiological effects of albumin dialysis in acute-on-chronic liver failure: a randomized controlled study. *Liver Transpl* 2004; 10: 1109-1119.
258. Arroyo V, Fernandez J, Mas A, Escorsell A. Molecular adsorbents recirculating system (MARS) and the failing liver: a negative editorial for a positive trial? *Hepatology* 2008; 47: 2143-2144.
259. Krisper P, Haditsch B, Stauber R, Jung A, Stadlbauer V, Trauner M, et al. In vivo quantification of liver dialysis: comparison of albumin dialysis and fractionated plasma separation. *J Hepatol* 2005; 43: 451-457.
260. Rifai K, Tetta C, Ronco C. Prometheus: from legend to the real liver support therapy. *Int J Artif Organs* 2007; 30: 858-863.

261. Krisper P, Stadlbauer V, Stauber RE. Clearing of toxic substances: are there differences between the available liver support devices? *Liver Int* 2011; 31 Suppl 3: 5-8.
262. Faenza S, Baraldi O, Bernardi M, Bolondi L, Coli L, Cucchetti A, et al. Mars and Prometheus: our clinical experience in acute chronic liver failure. *Transplant Proc* 2008; 40: 1169-1171.
263. Kribben A, Gerken G, Haag S, Herget-Rosenthal S, Treichel U, Betz C, et al. Effects of fractionated plasma separation and adsorption on survival in patients with acute-on-chronic liver failure. *Gastroenterology* 2012; 142: 782-789.
264. Chari RS, Collins BH, Magee JC, DiMaio JM, Kirk AD, Harland RC, et al. Brief report: treatment of hepatic failure with ex vivo pig-liver perfusion followed by liver transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331: 234-237.
265. Ellis AJ, Hughes RD, Wendon JA, Dunne J, Langley PG, Kelly JH, et al. Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. *Hepatology* 1996; 24: 1446-1451.
266. Sussman NL, Chong MG, Koussayer T, He DE, Shang TA, Whisnand HH, et al. Reversal of fulminant hepatic failure using an extracorporeal liver assist device. *Hepatology* 1992; 16: 60-65.
267. Gerlach JC, Brombacher J, Kloppel K, Schnoy N, Neuhaus P. Comparison of four methods for mass hepatocyte isolation from pig and human livers. *Transplantation* 1994; 57: 1318-1322.
268. Rozga J, Williams F, Ro MS, Neuzil DF, Giorgio TD, Backfisch G, et al. Development of a bioartificial liver: properties and function of a hollow-fiber module inoculated with liver cells. *Hepatology* 1993; 17: 258-265.
269. Fremond B, Joly A, Desille M, Desjardins JF, Campion JP, Clement B. Cell-based therapy of acute liver failure: the extracorporeal bioartificial liver. *Cell Biol Toxicol* 1996; 12: 325-329.
270. Joly A, Desjardins JF, Fremond B, Desille M, Campion JP, Malledant Y, et al. Survival, proliferation, and functions of porcine hepatocytes encapsulated in coated alginate beads: a step toward a reliable bioartificial liver. *Transplantation* 1997; 63: 795-803.
271. Desille M, Fremond B, Mahler S, Malledant Y, Seguin P, Bouix A, et al. Improvement of the neurological status of pigs with acute liver failure by hepatocytes immobilized in alginate gel beads inoculated in an extracorporeal bioartificial liver. *Transplant Proc* 2001; 33: 1932-1934.
272. Desille M, Mahler S, Seguin P, Malledant Y, Fremond B, Sebille V, et al. Reduced encephalopathy in pigs with ischemia-induced acute hepatic failure treated with a bioartificial liver containing alginate-entrapped hepatocytes. *Crit Care Med* 2002; 30: 658-663.
273. Samuel D, Ichai P, Feray C, Saliba F, Azoulay D, Arulnaden JL, et al. Neurological improvement during bioartificial liver sessions in patients with acute liver failure awaiting transplantation. *Transplantation* 2002; 73: 257-264.
274. Demetriou AA, Brown RS, Jr., Busuttil RW, Fair J, McGuire BM, Rosenthal P, et al. Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure. *Ann Surg* 2004; 239: 660-667.
275. Stutchfield BM, Simpson K, Wigmore SJ. Systematic review and meta-analysis of survival following extracorporeal liver support. *Br J Surg* 2011; 98: 623-631.
276. Nibourg GA, Chamuleau RA, van Gulik TM, Hoekstra R. Proliferative human cell sources applied as biocomponent in bioartificial livers: a review. *Expert Opin Biol Ther* 2012; 12: 905-921.
277. Carpentier B, Gautier A, Legallais C. Artificial and bioartificial liver devices: present and future. *Gut* 2009; 58: 1690-1702.
278. Dagher I, Boudechiche L, Branger J, Coulomb-Lhermine A, Parouchev A, Sentilhes L, et al. Efficient hepatocyte engraftment in a nonhuman primate model after partial portal vein embolization. *Transplantation* 2006; 82: 1067-1073.
279. Fox IJ, Roy-Chowdhury J. Hepatocyte transplantation. *J Hepatol* 2004; 40: 878-886.
280. Sauer V, Siaj R, Stoppeler S, Bahde R, Spiegel HU, Kohler G, et al. Repeated transplantation of hepatocytes prevents fulminant hepatitis in a rat model of Wilson's disease. *Liver Transpl* 2012; 18: 248-259.
281. Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A. Current status of hepatocyte transplantation. *Transplantation* 2012; 93: 342-347.
282. Terry C, Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD. Cryopreservation of isolated human hepatocytes for transplantation: State of the art. *Cryobiology* 2006; 53: 149-159.

283. Vosough M, Moslem M, Pournasr B, Baharvand H. Cell-based therapeutics for liver disorders. *Br Med Bull* 2011; 100: 157-172.
284. Nussler A, Konig S, Ott M, Sokal E, Christ B, Thasler W, et al. Present status and perspectives of cell-based therapies for liver diseases. *J Hepatol* 2006; 45: 144-159.
285. Puppi J, Strom SC, Hughes RD, Bansal S, Castell JV, Dagher I, et al. Improving the techniques for human hepatocyte transplantation: report from a consensus meeting in London. *Cell Transplant* 2012; 21: 1-10.
286. Gupta S, Gorla GR, Irani AN. Hepatocyte transplantation: emerging insights into mechanisms of liver repopulation and their relevance to potential therapies. *J Hepatol* 1999; 30: 162-170.
287. Strom SC, Chowdhury JR, Fox IJ. Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 39-48.
288. Allen KJ, Soriano HE. Liver cell transplantation: the road to clinical application. *J Lab Clin Med* 2001; 138: 298-312.
289. Gupta S, Chowdhury JR. Therapeutic potential of hepatocyte transplantation. *Semin Cell Dev Biol* 2002; 13: 439-446.
290. Fisher RA, Strom SC. Human hepatocyte transplantation: worldwide results. *Transplantation* 2006; 82: 441-449.
291. Pietrosi G, Vizzini GB, Gruttadauria S, Gridelli B. Clinical applications of hepatocyte transplantation. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2074-2077.
292. Dhawan A, Strom SC, Sokal E, Fox IJ. Human hepatocyte transplantation. *Methods Mol Biol* 2010; 640: 525-534.
293. Dhawan A, Puppi J, Hughes RD, Mitry RR. Human hepatocyte transplantation: current experience and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 288-298.
294. Jorns C, Ellis EC, Nowak G, Fischler B, Nemeth A, Strom SC, et al. Hepatocyte transplantation for inherited metabolic diseases of the liver. *J Intern Med* 2012; 272: 201-23.
295. Yu Y, Fisher JE, Lillegard JB, Rodysill B, Amiot B, Nyberg SL. Cell therapies for liver diseases. *Liver Transpl* 2012; 18: 9-21.
296. Nguyen TH, Ferry N. Liver gene therapy: advances and hurdles. *Gene Ther* 2004; 11 Suppl 1: S76-84.
297. Kass-Eisler A, Falck-Pedersen E, Elfenbein DH, Alvira M, Buttrick PM, Leinwand LA. The impact of developmental stage, route of administration and the immune system on adenovirus-mediated gene transfer. *Gene Ther* 1994; 1: 395-402.
298. Yao XL, Nakagawa S, Gao JQ. Current targeting strategies for adenovirus vectors in cancer gene therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2012; 11: 810-825.
299. Schiedner G, Hertel S, Johnston M, Dries V, van Rooijen N, Kochanek S. Selective depletion or blockade of Kupffer cells leads to enhanced and prolonged hepatic transgene expression using high-capacity adenoviral vectors. *Mol Ther* 2003; 7: 35-43.
300. Samulski RJ, Zhu X, Xiao X, Brook JD, Housman DE, Epstein N, et al. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *Embo J* 1991; 10: 3941-3950.
301. Giraud C, Winocour E, Berns KI. Site-specific integration by adeno-associated virus is directed by a cellular DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 10039-10043.
302. Grieger JC, Samulski RJ. Adeno-associated virus vectorology, manufacturing, and clinical applications. *Methods Enzymol* 2012; 507: 229-254.
303. Ortolano S, Spuch C, Navarro C. Present and future of adeno associated virus based gene therapy approaches. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov* 2012; 6: 47-66.
304. Carter BJ. Adeno-associated virus vectors in clinical trials. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 541-550.
305. Frank KM, Hogarth DK, Miller JL, Mandal S, Mease PJ, Samulski RJ, et al. Investigation of the cause of death in a gene-therapy trial. *N Engl J Med* 2009; 361: 161-169.
306. Hughes V. Therapy on trial. *Nat Med* 2007; 13: 1008-1009.
307. Acland GM, Aguirre GD, Ray J, Zhang Q, Aleman TS, Cideciyan AV, et al. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet* 2001; 28: 92-95.

308. Bennicelli J, Wright JF, Komaromy A, Jacobs JB, Hauck B, Zelenia O, et al. Reversal of blindness in animal models of leber congenital amaurosis using optimized AAV2-mediated gene transfer. *Mol Ther* 2008; 16: 458-465.
309. Jacobson SG, Cideciyan AV, Ratnakaram R, Heon E, Schwartz SB, Roman AJ, et al. Gene therapy for leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years. *Arch Ophthalmol* 2012; 130: 9-24.
310. Colella P, Auricchio A. Gene Therapy of Inherited Retinopathies: a Long and Successful Road from Viral Vectors to Patients. *Hum Gene Ther* 2012, 23: 796-807.
311. Snyder RO, Miao CH, Patijn GA, Spratt SK, Danos O, Nagy D, et al. Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors. *Nat Genet* 1997; 16: 270-276.
312. Mulligan RC. The basic science of gene therapy. *Science* 1993; 260: 926-932.
313. Anderson WF. Human gene therapy. *Nature* 1998; 392: 25-30.
314. Danos O, Mulligan RC. Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 6460-6464.
315. Roe T, Reynolds TC, Yu G, Brown PO. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *Embo J* 1993; 12: 2099-2108.
316. Narayan O, Clements JE. Biology and pathogenesis of lentiviruses. *J Gen Virol* 1989; 70 (Pt 7): 1617-1639.
317. Tang H, Kuhen KL, Wong-Staal F. Lentivirus replication and regulation. *Annu Rev Genet* 1999; 33: 133-170.
318. Naldini L, Blomer U, Gally P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996; 272: 263-267.
319. Kafri T, van Praag H, Ouyang L, Gage FH, Verma IM. A packaging cell line for lentivirus vectors. *J Virol* 1999; 73: 576-584.
320. VandenDriessche T, Thorrez L, Naldini L, Follenzi A, Moons L, Berneman Z, et al. Lentiviral vectors containing the human immunodeficiency virus type-1 central polypurine tract can efficiently transduce nondividing hepatocytes and antigen-presenting cells in vivo. *Blood* 2002; 100: 813-822.
321. Follenzi A, Sabatino G, Lombardo A, Boccaccio C, Naldini L. Efficient gene delivery and targeted expression to hepatocytes in vivo by improved lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 2002; 13: 243-260.
322. Mito M, Kusano M, Kawaura Y. Hepatocyte transplantation in man. *Transplant Proc* 1992; 24: 3052-3053.
323. Strom SC, Fisher RA, Rubinstein WS, Barranger JA, Towbin RB, Charron M, et al. Transplantation of human hepatocytes. *Transplant Proc* 1997; 29: 2103-2106.
324. Nagata H, Ito M, Shirota C, Edge A, McCowan TC, Fox IJ. Route of hepatocyte delivery affects hepatocyte engraftment in the spleen. *Transplantation* 2003; 76: 732-734.
325. Bilir BM, Guinette D, Karrer F, Kumpe DA, Krysl J, Stephens J, et al. Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl* 2000; 6: 32-40.
326. Habibullah CM, Syed IH, Qamar A, Taher-Uz Z. Human fetal hepatocyte transplantation in patients with fulminant hepatic failure. *Transplantation* 1994; 58: 951-952.
327. Fisher RA, Bu D, Thompson M, Tisnado J, Prasad U, Sterling R, et al. Defining hepatocellular chimerism in a liver failure patient bridged with hepatocyte infusion. *Transplantation* 2000; 69: 303-307.
328. Schneider A, Attaran M, Meier PN, Strassburg C, Manns MP, Ott M, et al. Hepatocyte transplantation in an acute liver failure due to mushroom poisoning. *Transplantation* 2006; 82: 1115-1116.
329. Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, Stein EA, Engelhardt JF, Muller D, et al. Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat Genet* 1994; 6: 335-341.
330. Grossman M, Rader DJ, Muller DW, Kolansky DM, Kozarsky K, Clark BJ, 3rd, et al. A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia. *Nat Med* 1995; 1: 1148-1154.
331. Horslen SP, Fox IJ. Hepatocyte transplantation. *Transplantation* 2004; 77: 1481-1486.

332. Horslen SP, McCowan TC, Goertzen TC, Warkentin PI, Cai HB, Strom SC, et al. Isolated hepatocyte transplantation in an infant with a severe urea cycle disorder. *Pediatrics* 2003; 111: 1262-1267.
333. Fox II, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, et al. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* 1998; 338: 1422-1426.
334. Muraca M, Gerunda G, Neri D, Vilei MT, Granato A, Feltracco P, et al. Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a. *Lancet* 2002; 359: 317-318.
335. Sokal EM, Smets F, Bourgois A, Van Maldergem L, Buts JP, Reding R, et al. Hepatocyte transplantation in a 4-year-old girl with peroxisomal biogenesis disease: technique, safety, and metabolic follow-up. *Transplantation* 2003; 76: 735-738.
336. Mitry RR, Dhawan A, Hughes RD, Bansal S, Lehec S, Terry C, et al. One liver, three recipients: segment IV from split-liver procedures as a source of hepatocytes for cell transplantation. *Transplantation* 2004; 77: 1614-1616.
337. Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD, Lehec S, Terry C, Bansal S, et al. Hepatocyte transplantation for inherited factor VII deficiency. *Transplantation* 2004; 78: 1812-1814.
338. Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A. Hepatocyte transplantation for metabolic liver disease: UK experience. *J R Soc Med* 2005; 98: 341-345.
339. Ambrosino G, Varotto S, Strom SC, Guariso G, Franchin E, Miotto D, et al. Isolated hepatocyte transplantation for Crigler-Najjar syndrome type I. *Cell Transplant* 2005; 14: 151-157.
340. Lee KW, Lee JH, Shin SW, Kim SJ, Joh JW, Lee DH, et al. Hepatocyte transplantation for glycogen storage disease type Ib. *Cell Transplant* 2007; 16: 629-637.
341. Strom SC, Fisher RA, Thompson MT, Sanyal AJ, Cole PE, Ham JM, et al. Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation* 1997; 63: 559-569.
342. Braun KM, Degen JL, Sandgren EP. Hepatocyte transplantation in a model of toxin-induced liver disease: variable therapeutic effect during replacement of damaged parenchyma by donor cells. *Nat Med* 2000; 6: 320-326.
343. Verma IM, Weitzman MD. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem* 2005; 74: 711-738.
344. Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, eds. *Retroviruses*. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1997;
345. Friedmann T. Progress toward human gene therapy. *Science* 1989; 244: 1275-1281.
346. ICTVdB M. 00.061. Retroviridae. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 3. In: Buchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB>; 2006.
347. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77: 7415-7419.
348. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220: 868-871.
349. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 1984; 224: 500-503.
350. Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, et al. Human immunodeficiency viruses. *Science* 1986; 232: 697.
351. Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 1986; 233: 343-346.
352. Gluckman JC, Klatzmann D, Montagnier L. Lymphadenopathy-associated-virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *Annu Rev Immunol* 1986; 4: 97-117.
353. Gallo RC, Montagnier L. The discovery of HIV as the cause of AIDS. *N Engl J Med* 2003; 349: 2283-2285.
354. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 1984; 224: 497-500.
355. Wain-Hobson S, Sonigo P, Danos O, Cole S, Alizon M. Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* 1985; 40: 9-17.

356. Barin F, M'Boup S, Denis F, Kanki P, Allan JS, Lee TH, et al. Serological evidence for virus related to simian T-lymphotropic retrovirus III in residents of west Africa. *Lancet* 1985; 2: 1387-1389.
357. Clavel F, Guyader M, Guetard D, Salle M, Montagnier L, Alizon M. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* 1986; 324: 691-695.
358. Guyader M, Emerman M, Sonigo P, Clavel F, Montagnier L, Alizon M. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* 1987; 326: 662-669.
359. Emerman M, Guyader M, Montagnier L, Baltimore D, Muesing MA. The specificity of the human immunodeficiency virus type 2 transactivator is different from that of human immunodeficiency virus type 1. *Embo J* 1987; 6: 3755-3760.
360. Kappes JC, Morrow CD, Lee SW, Jameson BA, Kent SB, Hood LE, et al. Identification of a novel retroviral gene unique to human immunodeficiency virus type 2 and simian immunodeficiency virus SIVMAC. *J Virol* 1988; 62: 3501-3505.
361. Hizi A, Tal R, Shaharabany M, Loya S. Catalytic properties of the reverse transcriptases of human immunodeficiency viruses type 1 and type 2. *J Biol Chem* 1991; 266: 6230-6239.
362. Naldini L. Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. *Curr Opin Biotechnol* 1998; 9: 457-463.
363. Buchschacher GL, Jr., Wong-Staal F. Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood* 2000; 95: 2499-2504.
364. Akkina RK, Walton RM, Chen ML, Li QX, Planelles V, Chen IS. High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J Virol* 1996; 70: 2581-2585.
365. Poeschla E, Corbeau P, Wong-Staal F. Development of HIV vectors for anti-HIV gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 11395-11399.
366. Reiser J, Harmison G, Kluepfel-Stahl S, Brady RO, Karlsson S, Schubert M. Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 15266-15271.
367. Arya SK, Zamani M, Kundra P. Human immunodeficiency virus type 2 lentivirus vectors for gene transfer: expression and potential for helper virus-free packaging. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 1371-1380.
368. Poeschla E, Gilbert J, Li X, Huang S, Ho A, Wong-Staal F. Identification of a human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) encapsidation determinant and transduction of nondividing human cells by HIV-2-based lentivirus vectors. *J Virol* 1998; 72: 6527-6536.
369. Mselli-Lakhal L, Favier C, Da Silva Teixeira MF, Chettab K, Legras C, Ronfort C, et al. Defective RNA packaging is responsible for low transduction efficiency of CAEV-based vectors. *Arch Virol* 1998; 143: 681-695.
370. Curran MA, Kaiser SM, Achacoso PL, Nolan GP. Efficient transduction of nondividing cells by optimized feline immunodeficiency virus vectors. *Mol Ther* 2000; 1: 31-38.
371. Mitrophanous K, Yoon S, Rohll J, Patil D, Wilkes F, Kim V, et al. Stable gene transfer to the nervous system using a non-primate lentiviral vector. *Gene Ther* 1999; 6: 1808-1818.
372. Mselli-Lakhal L, Favier C, Leung K, Guiguen F, Grezel D, Miossec P, et al. Lack of functional receptors is the only barrier that prevents caprine arthritis-encephalitis virus from infecting human cells. *J Virol* 2000; 74: 8343-8348.
373. Olsen JC. Gene transfer vectors derived from equine infectious anemia virus. *Gene Ther* 1998; 5: 1481-1487.
374. Condiotti R, Curran MA, Nolan GP, Giladi H, Ketzinel-Gilad M, Gross E, et al. Prolonged liver-specific transgene expression by a non-primate lentiviral vector. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320: 998-1006.
375. Mangeot PE, Negre D, Dubois B, Winter AJ, Leissner P, Mehtali M, et al. Development of minimal lentivirus vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) and their use for gene transfer into human dendritic cells. *J Virol* 2000; 74: 8307-8315.
376. Berkowitz RD, Ilves H, Plavec I, Veres G. Gene transfer systems derived from Visna virus: analysis of virus production and infectivity. *Virology* 2001; 279: 116-129.

377. Schnell T, Foley P, Wirth M, Munch J, Uberla K. Development of a self-inactivating, minimal lentivirus vector based on simian immunodeficiency virus. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 439-447.
378. Ramezani A, Hawley RG. Overview of the HIV-1 Lentiviral Vector System. *Curr Protoc Mol Biol* 2002; Chapter 16.
379. Fuller M, Anson DS. Can the use of HIV-1 derived gene transfer vectors for clinical application be justified? *Curr Gene Ther* 2004; 4: 65-77.
380. Bank A, Dorazio R, Leboulch P. A phase I/II clinical trial of beta-globin gene therapy for beta-thalassemia. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1054: 308-316.
381. Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, Wang G, Hehir K, Fusil F, et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. *Nature* 2010; 467: 318-322.
382. Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomae CC, Veres G, Schmidt M, Kutschera I, et al. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* 2009; 326: 818-823.
383. ICTVdB M. 00.061.1.06. Lentivirus. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 3. In: Buchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB>; 2006.
384. Lewis PF, Emerman M. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J Virol* 1994; 68: 510-516.
385. Weinberg JB, Matthews TJ, Cullen BR, Malim MH. Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes. *J Exp Med* 1991; 174: 1477-1482.
386. Lewis P, Hensel M, Emerman M. Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *Embo J* 1992; 11: 3053-3058.
387. Trono D. Lentiviral vectors: turning a deadly foe into a therapeutic agent. *Gene Ther* 2000; 7: 20-23.
388. Vigna E, Naldini L. Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J Gene Med* 2000; 2: 308-316.
389. Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 11382-11388.
390. Blomer U, Naldini L, Kafri T, Trono D, Verma IM, Gage FH. Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J Virol* 1997; 71: 6641-6649.
391. Kafri T, Blomer U, Peterson DA, Gage FH, Verma IM. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet* 1997; 17: 314-317.
392. Miyoshi H, Takahashi M, Gage FH, Verma IM. Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 10319-10323.
393. Case SS, Price MA, Jordan CT, Yu XJ, Wang L, Bauer G, et al. Stable transduction of quiescent CD34(+)CD38(-) human hematopoietic cells by HIV-1-based lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 2988-2993.
394. Uchida N, Sutton RE, Frieria AM, He D, Reitsma MJ, Chang WC, et al. HIV, but not murine leukemia virus, vectors mediate high efficiency gene transfer into freshly isolated G0/G1 human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 11939-11944.
395. Sirven A, Pflumio F, Zennou V, Titeux M, Vainchenker W, Coulombel L, et al. The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells. *Blood* 2000; 96: 4103-4110.
396. Gallichan WS, Kafri T, Krahl T, Verma IM, Sarvetnick N. Lentivirus-mediated transduction of islet grafts with interleukin 4 results in sustained gene expression and protection from insulinitis. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 2717-2726.
397. Johnson LG, Olsen JC, Naldini L, Boucher RC. Pseudotyped human lentiviral vector-mediated gene transfer to airway epithelia in vivo. *Gene Ther* 2000; 7: 568-574.
398. Gropp M, Itsykson P, Singer O, Ben-Hur T, Reinhartz E, Galun E, et al. Stable genetic modification of human embryonic stem cells by lentiviral vectors. *Mol Ther* 2003; 7: 281-287.

399. Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, Verma IM. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 2140-2145.
400. Ma Y, Ramezani A, Lewis R, Hawley RG, Thomson JA. High-level sustained transgene expression in human embryonic stem cells using lentiviral vectors. *Stem Cells* 2003; 21: 111-117.
401. Sonigo P, Alizon M, Staskus K, Klatzmann D, Cole S, Danos O, et al. Nucleotide sequence of the visna lentivirus: relationship to the AIDS virus. *Cell* 1985; 42: 369-382.
402. Chakrabarti L, Guyader M, Alizon M, Daniel MD, Desrosiers RC, Tiollais P, et al. Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retroviruses. *Nature* 1987; 328: 543-547.
403. Charneau P, Clavel F. A single-stranded gap in human immunodeficiency virus unintegrated linear DNA defined by a central copy of the polypurine tract. *J Virol* 1991; 65: 2415-2421.
404. Charneau P, Alizon M, Clavel F. A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *J Virol* 1992; 66: 2814-2820.
405. Peliska JA, Benkovic SJ. Mechanism of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 1992; 258: 1112-1118.
406. Powell MD, Levin JG. Sequence and structural determinants required for priming of plus-strand DNA synthesis by the human immunodeficiency virus type 1 polypurine tract. *J Virol* 1996; 70: 5288-5296.
407. Klarman GJ, Yu H, Chen X, Dougherty JP, Preston BD. Discontinuous plus-strand DNA synthesis in human immunodeficiency virus type 1-infected cells and in a partially reconstituted cell-free system. *J Virol* 1997; 71: 9259-9269.
408. Palaniappan C, Kim JK, Wisniewski M, Fay PJ, Bambara RA. Control of initiation of viral plus strand DNA synthesis by HIV reverse transcriptase. *J Biol Chem* 1998; 273: 3808-3816.
409. Charneau P, Mirambeau G, Roux P, Paulous S, Buc H, Clavel F. HIV-1 reverse transcription. A termination step at the center of the genome. *J Mol Biol* 1994; 241: 651-662.
410. Hameau L, Jeusset J, Lafosse S, Coulaud D, Delain E, Unge T, et al. Human immunodeficiency virus type 1 central DNA flap: dynamic terminal product of plus-strand displacement dna synthesis catalyzed by reverse transcriptase assisted by nucleocapsid protein. *J Virol* 2001; 75: 3301-3313.
411. Lavigne M, Roux P, Buc H, Schaeffer F. DNA curvature controls termination of plus strand DNA synthesis at the centre of HIV-1 genome. *J Mol Biol* 1997; 266: 507-524.
412. Stetor SR, Rausch JW, Guo MJ, Burnham JP, Boone LR, Waring MJ, et al. Characterization of (+) strand initiation and termination sequences located at the center of the equine infectious anemia virus genome. *Biochemistry* 1999; 38: 3656-3667.
413. Marsden MD, Zack JA. Human immunodeficiency virus bearing a disrupted central DNA flap is pathogenic in vivo. *J Virol* 2007; 81: 6146-6150.
414. Zennou V, Petit C, Guetard D, Nerhass U, Montagnier L, Charneau P. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* 2000; 101: 173-185.
415. Bukrinsky MI, Haggerty S, Dempsey MP, Sharova N, Adzhubel A, Spitz L, et al. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* 1993; 365: 666-669.
416. Bukrinsky MI, Sharova N, Dempsey MP, Stanwick TL, Bukrinskaya AG, Haggerty S, et al. Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 6580-6584.
417. Gulizia J, Dempsey MP, Sharova N, Bukrinsky MI, Spitz L, Goldfarb D, et al. Reduced nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes in the presence of a prototypic nuclear targeting signal. *J Virol* 1994; 68: 2021-2025.
418. Heinzinger NK, Bukrinsky MI, Haggerty SA, Ragland AM, Kewalramani V, Lee MA, et al. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 7311-7315.

419. von Schwedler U, Kornbluth RS, Trono D. The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 6992-6996.
420. Katz RA, Greger JG, Boimel P, Skalka AM. Human immunodeficiency virus type 1 DNA nuclear import and integration are mitosis independent in cycling cells. *J Virol* 2003; 77: 13412-13417.
421. Miyoshi H, Blomer U, Takahashi M, Gage FH, Verma IM. Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol* 1998; 72: 8150-8157.
422. Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, et al. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 1998; 72: 9873-9880.
423. Federico M. Lentiviruses as gene delivery vectors. *Curr Opin Biotechnol* 1999; 10: 448-453.
424. Bukovsky AA, Song JP, Naldini L. Interaction of human immunodeficiency virus-derived vectors with wild-type virus in transduced cells. *J Virol* 1999; 73: 7087-7092.
425. Kafri T, van Praag H, Gage FH, Verma IM. Lentiviral vectors: regulated gene expression. *Mol Ther* 2000; 1: 516-521.
426. Xu K, Ma H, McCown TJ, Verma IM, Kafri T. Generation of a stable cell line producing high-titer self-inactivating lentiviral vectors. *Mol Ther* 2001; 3: 97-104.
427. Luo MJ, Reed R. Splicing is required for rapid and efficient mRNA export in metazoans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 14937-14942.
428. Matsumoto K, Wassarman KM, Wolffe AP. Nuclear history of a pre-mRNA determines the translational activity of cytoplasmic mRNA. *Embo J* 1998; 17: 2107-2121.
429. Chang DD, Sharp PA. Regulation by HIV Rev depends upon recognition of splice sites. *Cell* 1989; 59: 789-795.
430. Huang Y, Carmichael GG. A suboptimal 5' splice site is a cis-acting determinant of nuclear export of polyomavirus late mRNAs. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 6046-6054.
431. Legrain P, Rosbash M. Some cis- and trans-acting mutants for splicing target pre-mRNA to the cytoplasm. *Cell* 1989; 57: 573-583.
432. Bray M, Prasad S, Dubay JW, Hunter E, Jeang KT, Rekosh D, et al. A small element from the Mason-Pfizer monkey virus genome makes human immunodeficiency virus type 1 expression and replication Rev-independent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 1256-1260.
433. Braun IC, Rohrbach E, Schmitt C, Izaurralde E. TAP binds to the constitutive transport element (CTE) through a novel RNA-binding motif that is sufficient to promote CTE-dependent RNA export from the nucleus. *Embo J* 1999; 18: 1953-1965.
434. Ernst RK, Bray M, Rekosh D, Hammarskjold ML. A structured retroviral RNA element that mediates nucleocytoplasmic export of intron-containing RNA. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 135-144.
435. Gruter P, Taberner C, von Kobbe C, Schmitt C, Saavedra C, Bachi A, et al. TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. *Mol Cell* 1998; 1: 649-659.
436. Kang Y, Cullen BR. The human Tap protein is a nuclear mRNA export factor that contains novel RNA-binding and nucleocytoplasmic transport sequences. *Genes Dev* 1999; 13: 1126-1139.
437. Huang Y, Wimler KM, Carmichael GG. Intronless mRNA transport elements may affect multiple steps of pre-mRNA processing. *Embo J* 1999; 18: 1642-1652.
438. Donello JE, Loeb JE, Hope TJ. Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J Virol* 1998; 72: 5085-5092.
439. Schambach A, Wodrich H, Hildinger M, Bohne J, Krausslich HG, Baum C. Context dependence of different modules for posttranscriptional enhancement of gene expression from retroviral vectors. *Mol Ther* 2000; 2: 435-445.
440. Wu GY, Wu CH. Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem* 1987; 262: 4429-4432.
441. Protzer U, Nassal M, Chiang PW, Kirschfink M, Schaller H. Interferon gene transfer by a hepatitis B virus vector efficiently suppresses wild-type virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 10818-10823.

442. Ponder KP, Dunbar RP, Wilson DR, Darlington GJ, Woo SL. Evaluation of relative promoter strength in primary hepatocytes using optimized lipofection. *Hum Gene Ther* 1991; 2: 41-52.
443. Kay MA, Baley P, Rothenberg S, Leland F, Fleming L, Ponder KP, et al. Expression of human alpha 1-antitrypsin in dogs after autologous transplantation of retroviral transduced hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 89-93.
444. Armentano D, Thompson AR, Darlington G, Woo SL. Expression of human factor IX in rabbit hepatocytes by retrovirus-mediated gene transfer: potential for gene therapy of hemophilia B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 6141-6145.
445. Kramer MG, Barajas M, Razquin N, Berraondo P, Rodrigo M, Wu C, et al. In vitro and in vivo comparative study of chimeric liver-specific promoters. *Mol Ther* 2003; 7: 375-385.
446. Zhang G, Song YK, Liu D. Long-term expression of human alpha1-antitrypsin gene in mouse liver achieved by intravenous administration of plasmid DNA using a hydrodynamics-based procedure. *Gene Ther* 2000; 7: 1344-1349.
447. Wilson JM, Chowdhury NR, Grossman M, Wajsman R, Epstein A, Mulligan RC, et al. Temporary amelioration of hyperlipidemia in low density lipoprotein receptor-deficient rabbits transplanted with genetically modified hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 8437-8441.
448. Kay MA, Li Q, Liu TJ, Leland F, Toman C, Finegold M, et al. Hepatic gene therapy: persistent expression of human alpha 1-antitrypsin in mice after direct gene delivery in vivo. *Hum Gene Ther* 1992; 3: 641-647.
449. Ciliberto G, Dente L, Cortese R. Cell-specific expression of a transfected human alpha 1-antitrypsin gene. *Cell* 1985; 41: 531-540.
450. De Simone V, Ciliberto G, Hardon E, Paonessa G, Palla F, Lundberg L, et al. Cis- and trans-acting elements responsible for the cell-specific expression of the human alpha 1-antitrypsin gene. *Embo J* 1987; 6: 2759-2766.
451. Hardon EM, Frain M, Paonessa G, Cortese R. Two distinct factors interact with the promoter regions of several liver-specific genes. *Embo J* 1988; 7: 1711-1719.
452. Parouchev A, Nguyen TH, Dagher I, Mainot S, Groyer-Picard MT, Branger J, et al. Efficient ex vivo gene transfer into non-human primate hepatocytes using HIV-1 derived lentiviral vectors. *J Hepatol* 2006; 45: 99-107.
453. Al-Dosari M, Zhang G, Knapp JE, Liu D. Evaluation of viral and mammalian promoters for driving transgene expression in mouse liver. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 339: 673-678.
454. French gene therapy group reports on the adverse event in a clinical trial of gene therapy for X-linked severe combined immune deficiency (X-SCID). Position statement from the European Society of Gene Therapy. *J Gene Med* 2003; 5: 82-84.
455. Marshall E. Clinical research. Gene therapy a suspect in leukemia-like disease. *Science* 2002; 298: 34-35.
456. Marshall E. Gene therapy. Second child in French trial is found to have leukemia. *Science* 2003; 299: 320.
457. Couzin J, Kaiser J. Gene therapy. As Gelsinger case ends, gene therapy suffers another blow. *Science* 2005; 307: 1028.
458. Boehm T, Foroni L, Kaneko Y, Perutz MF, Rabbitts TH. The rhombotin family of cysteine-rich LIM-domain oncogenes: distinct members are involved in T-cell translocations to human chromosomes 11p15 and 11p13. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 4367-4371.
459. Yamada Y, Warren AJ, Dobson C, Forster A, Pannell R, Rabbitts TH. The T cell leukemia LIM protein Lmo2 is necessary for adult mouse hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 3890-3895.
460. Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E, et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2003; 348: 255-256.
461. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003; 302: 415-419.
462. Check E. Safety panel backs principle of gene-therapy trials. *Nature* 2002; 420: 595.
463. Check E. Second cancer case halts gene-therapy trials. *Nature* 2003; 421: 305.
464. Cavazzana-Calvo M, Thrasher A, Mavilio F. The future of gene therapy. *Nature* 2004; 427: 779-781.
465. Check E. Regulators split on gene therapy as patient shows signs of cancer. *Nature* 2002; 419: 545-546.

466. Aiuti A, Slavin S, Aker M, Ficara F, Deola S, Mortellaro A, et al. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* 2002; 296: 2410-2413.
467. Naldini L. Inserting optimism into gene therapy. *Nat Med* 2006; 12: 386-388.
468. Check E. Cancer fears cast doubts on future of gene therapy. *Nature* 2003; 421: 678.
469. Check E. Gene therapists hopeful as trials resume with childhood disease. *Nature* 2004; 429: 587.
470. Laufs S, Gentner B, Nagy KZ, Jauch A, Benner A, Naundorf S, et al. Retroviral vector integration occurs in preferred genomic targets of human bone marrow-repopulating cells. *Blood* 2003; 101: 2191-2198.
471. Mitchell RS, Beitzel BF, Schroder AR, Shinn P, Chen H, Berry CC, et al. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biol* 2004; 2: E234.
472. Schroder AR, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 2002; 110: 521-529.
473. Wu X, Li Y, Crise B, Burgess SM. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* 2003; 300: 1749-1751.
474. De Palma M, Montini E, Santoni de Sio FR, Benedicenti F, Gentile A, Medico E, et al. Promoter trapping reveals significant differences in integration site selection between MLV and HIV vectors in primary hematopoietic cells. *Blood* 2005; 105: 2307-2315.
475. Woods NB, Muessig A, Schmidt M, Flygare J, Olsson K, Salmon P, et al. Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: risk of insertional mutagenesis. *Blood* 2003; 101: 1284-1289.
476. Ciuffi A, Mitchell RS, Hoffmann C, Leipzig J, Shinn P, Ecker JR, et al. Integration site selection by HIV-based vectors in dividing and growth-arrested IMR-90 lung fibroblasts. *Mol Ther* 2006; 13: 366-373.
477. Kiem HP, Sellers S, Thomasson B, Morris JC, Tisdale JF, Horn PA, et al. Long-term clinical and molecular follow-up of large animals receiving retrovirally transduced stem and progenitor cells: no progression to clonal hematopoiesis or leukemia. *Mol Ther* 2004; 9: 389-395.
478. Hematti P, Hong BK, Ferguson C, Adler R, Hanawa H, Sellers S, et al. Distinct genomic integration of MLV and SIV vectors in primate hematopoietic stem and progenitor cells. *PLoS Biol* 2004; 2: e423.
479. Recchia A, Bonini C, Magnani Z, Urbinati F, Sartori D, Muraro S, et al. Retroviral vector integration deregulates gene expression but has no consequence on the biology and function of transplanted T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 1457-1462.
480. Li Z, Dullmann J, Schiedlmeier B, Schmidt M, von Kalle C, Meyer J, et al. Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* 2002; 296: 497.
481. Eissenberg JC, Elgin SC. Boundary functions in the control of gene expression. *Trends Genet* 1991; 7: 335-340.
482. Kellum R, Schedl P. A position-effect assay for boundaries of higher order chromosomal domains. *Cell* 1991; 64: 941-950.
483. Chung JH, Whiteley M, Felsenfeld G. A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell* 1993; 74: 505-514.
484. Pikaart MJ, Recillas-Targa F, Felsenfeld G. Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. *Genes Dev* 1998; 12: 2852-2862.
485. Emery DW, Yannaki E, Tubb J, Stamatoypoulos G. A chromatin insulator protects retrovirus vectors from chromosomal position effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 9150-9155.
486. Lotti F, Menguzzato E, Rossi C, Naldini L, Ailles L, Mavilio F, et al. Transcriptional targeting of lentiviral vectors by long terminal repeat enhancer replacement. *J Virol* 2002; 76: 3996-4007.
487. Pawliuk R, Westerman KA, Fabry ME, Payen E, Tighe R, Bouhassira EE, et al. Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy. *Science* 2001; 294: 2368-2371.

488. May C, Rivella S, Callegari J, Heller G, Gaensler KM, Luzzatto L, et al. Therapeutic haemoglobin synthesis in beta-thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human beta-globin. *Nature* 2000; 406: 82-86.
489. Seppen J, Rijnberg M, Cooreman MP, Oude Elferink RP. Lentiviral vectors for efficient transduction of isolated primary quiescent hepatocytes. *J Hepatol* 2002; 36: 459-465.
490. Giannini C, Morosan S, Tralhao JG, Guidotti JE, Battaglia S, Mollier K, et al. A highly efficient, stable, and rapid approach for ex vivo human liver gene therapy via a FLAP lentiviral vector. *Hepatology* 2003; 38: 114-122.
491. Oertel M, Rosencrantz R, Chen YQ, Thota PN, Sandhu JS, Dabeva MD, et al. Repopulation of rat liver by fetal hepatoblasts and adult hepatocytes transduced ex vivo with lentiviral vectors. *Hepatology* 2003; 37: 994-1005.
492. Ohashi K, Park F, Schwall R, Kay M. Efficient gene transduction to cultured hepatocytes by HIV-1 derived lentiviral vector. *Transplant Proc* 2002; 34: 1431-1433.
493. Nguyen TH, Khakhoulina T, Simmons A, Morel P, Trono D. A simple and highly effective method for the stable transduction of uncultured porcine hepatocytes using lentiviral vector. *Cell Transplant* 2005; 14: 489-496.
494. Maruyama M, Kobayashi N, Okitsu T, Totsugawa T, Watanabe T, Matsumura T, et al. Successful lentivirus-based delivery of NLS-LACZ gene into porcine hepatocytes. *Transplant Proc* 2003; 35: 435-436.
495. Nguyen TH, Oberholzer J, Birraux J, Majno P, Morel P, Trono D. Highly efficient lentiviral vector-mediated transduction of nondividing, fully reimplantable primary hepatocytes. *Mol Ther* 2002; 6: 199-209.
496. Zahler MH, Irani A, Malhi H, Reutens AT, Albanese C, Bouzahzah B, et al. The application of a lentiviral vector for gene transfer in fetal human hepatocytes. *J Gene Med* 2000; 2: 186-193.
497. Park F, Ohashi K, Chiu W, Naldini L, Kay MA. Efficient lentiviral transduction of liver requires cell cycling in vivo. *Nat Genet* 2000; 24: 49-52.
498. van Til NP, Markusic DM, van der Rijt R, Kunne C, Hiralall JK, Vreeling H, et al. Kupffer cells and not liver sinusoidal endothelial cells prevent lentiviral transduction of hepatocytes. *Mol Ther* 2005; 11: 26-34.
499. Follenzi A, Battaglia M, Lombardo A, Annoni A, Roncarolo MG, Naldini L. Targeting lentiviral vector expression to hepatocytes limits transgene-specific immune response and establishes long-term expression of human antihemophilic factor IX in mice. *Blood* 2004; 103: 3700-3709.
500. De Geest BR, Van Linthout SA, Collen D. Humoral immune response in mice against a circulating antigen induced by adenoviral transfer is strictly dependent on expression in antigen-presenting cells. *Blood* 2003; 101: 2551-2556.
501. Mingozzi F, Liu YL, Dobrzynski E, Kaufhold A, Liu JH, Wang Y, et al. Induction of immune tolerance to coagulation factor IX antigen by in vivo hepatic gene transfer. *J Clin Invest* 2003; 111: 1347-1356.
502. Puthenveetil G, Scholes J, Carbonell D, Qureshi N, Xia P, Zeng L, et al. Successful correction of the human beta-thalassemia major phenotype using a lentiviral vector. *Blood* 2004; 104: 3445-3453.
503. Yoshimitsu M, Sato T, Tao K, Walia JS, Rasaiah VI, Sleep GT, et al. Bioluminescent imaging of a marking transgene and correction of Fabry mice by neonatal injection of recombinant lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 16909-16914.
504. Kobayashi H, Carbonaro D, Pepper K, Petersen D, Ge S, Jackson H, et al. Neonatal gene therapy of MPS I mice by intravenous injection of a lentiviral vector. *Mol Ther* 2005; 11: 776-789.
505. Seppen J, van Til NP, van der Rijt R, Hiralall JK, Kunne C, Elferink RP. Immune response to lentiviral bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene transfer in fetal and neonatal rats. *Gene Ther* 2006; 13: 672-677.
506. Trollet C, Athanasopoulos T, Popplewell L, Malerba A, Dickson G. Gene therapy for muscular dystrophy: current progress and future prospects. *Expert Opin Biol Ther* 2009; 9: 849-866.
507. Lu X, Humeau L, Slepishkin V, Binder G, Yu Q, Slepishkina T, et al. Safe two-plasmid production for the first clinical lentivirus vector that achieves >99% transduction in primary cells using a one-step protocol. *J Gene Med* 2004; 6: 963-973.
508. Manilla P, Rebello T, Afafe C, Lu X, Slepishkin V, Humeau LM, et al. Regulatory considerations for novel gene therapy products: a review of the process leading to the first clinical lentiviral vector. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 17-25.

509. MacGregor RR. Clinical protocol. A phase 1 open-label clinical trial of the safety and tolerability of single escalating doses of autologous CD4 T cells transduced with VRX496 in HIV-positive subjects. *Hum Gene Ther* 2001; 12: 2028-2029.
510. Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomae CC, Bougneres P, Schmidt M, Kalle CV, et al. Lentiviral hematopoietic cell gene therapy for X-linked adrenoleukodystrophy. *Methods Enzymol* 2012; 507: 187-198.
511. Best DH, Coleman WB. Liver regeneration by small hepatocyte-like progenitor cells after necrotic injury by carbon tetrachloride in retrorsine-exposed rats. *Exp Mol Pathol* 2012; 89: 92-98.
512. Guo D, Fu T, Nelson JA, Superina RA, Soriano HE. Liver repopulation after cell transplantation in mice treated with retrorsine and carbon tetrachloride. *Transplantation* 2002; 73: 1818-1824.
513. Vons C, Loux N, Simon L, Mahieu-Caputo D, Dagher I, Andreoletti M, et al. Transplantation of hepatocytes in nonhuman primates: a preclinical model for the treatment of hepatic metabolic diseases. *Transplantation* 2001; 72: 811-818.
514. Gagandeep S, Rajvanshi P, Sokhi RP, Slehria S, Palestro CJ, Bhargava KK, et al. Transplanted hepatocytes engraft, survive, and proliferate in the liver of rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *J Pathol* 2000; 191: 78-85.
515. Gupta S, Rajvanshi P, Aragona E, Lee CD, Yerneni PR, Burk RD. Transplanted hepatocytes proliferate differently after CCl4 treatment and hepatocyte growth factor infusion. *Am J Physiol* 1999; 276: G629-638.
516. Yazigi NA, Carrick TL, Bucuvalas JC, Schmidt CS, Balistreri WF, Bezerra JA. Expansion of transplanted hepatocytes during liver regeneration. *Transplantation* 1997; 64: 816-820.
517. Kobayashi N, Ito M, Nakamura J, Cai J, Gao C, Hammel JM, et al. Hepatocyte transplantation in rats with decompensated cirrhosis. *Hepatology* 2000; 31: 851-857.
518. Guha C, Sharma A, Gupta S, Alfieri A, Gorla GR, Gagandeep S, et al. Amelioration of radiation-induced liver damage in partially hepatectomized rats by hepatocyte transplantation. *Cancer Res* 1999; 59: 5871-5874.
519. Malhi H, Gorla GR, Irani AN, Annamaneni P, Gupta S. Cell transplantation after oxidative hepatic preconditioning with radiation and ischemia-reperfusion leads to extensive liver repopulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 13114-13119.
520. Zhou XF, Wang Q, Chu JX, Liu AL. Effects of retrorsine on mouse hepatocyte proliferation after liver injury. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1439-1442.
521. Laconi E, Oren R, Mukhopadhyay DK, Hurston E, Laconi S, Pani P, et al. Long-term, near-total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine. *Am J Pathol* 1998; 153: 319-329.
522. Oren R, Dabeva MD, Karnezis AN, Petkov PM, Rosencrantz R, Sandhu JP, et al. Role of thyroid hormone in stimulating liver repopulation in the rat by transplanted hepatocytes. *Hepatology* 1999; 30: 903-913.
523. Ichinohe N, Kon J, Sasaki K, Nakamura Y, Ooe H, Tanimizu N, et al. Growth ability and repopulation efficiency of transplanted hepatic stem cells, progenitor cells, and mature hepatocytes in retrorsine-treated rat livers. *Cell Transplant* 2012; 21: 11-22.
524. Grompe M. Principles of therapeutic liver repopulation. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29: 421-425.
525. De Vree JM, Ottenhoff R, Bosma PJ, Smith AJ, Aten J, Oude Elferink RP. Correction of liver disease by hepatocyte transplantation in a mouse model of progressive familial intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* 2000; 119: 1720-1730.
526. Sandgren EP, Palmiter RD, Heckel JL, Daugherty CC, Brinster RL, Degen JL. Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. *Cell* 1991; 66: 245-256.
527. Rhim JA, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, Brinster RL. Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science* 1994; 263: 1149-1152.
528. Rhim JA, Sandgren EP, Palmiter RD, Brinster RL. Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 4942-4946.
529. Karnezis AN, Dorokhov M, Grompe M, Zhu L. Loss of p27(Kip1) enhances the transplantation efficiency of hepatocytes transferred into diseased livers. *J Clin Invest* 2001; 108: 383-390.
530. Mignon A, Guidotti JE, Mitchell C, Fabre M, Wernet A, De La Coste A, et al. Selective repopulation of normal mouse liver by Fas/CD95-resistant hepatocytes. *Nat Med* 1998; 4: 1185-1188.

531. Power C, Rasko JE. Whither prometheus' liver? Greek myth and the science of regeneration. *Ann Intern Med* 2008; 149: 421-426.
532. Rosenthal N. Prometheus's vulture and the stem-cell promise. *N Engl J Med* 2003; 349: 267-274.
533. Court FG, Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Maddern GJ. The mystery of liver regeneration. *Br J Surg* 2002; 89: 1089-1095.
534. Nagy P, Teramoto T, Factor VM, Sanchez A, Schnur J, Paku S, et al. Reconstitution of liver mass via cellular hypertrophy in the rat. *Hepatology* 2001; 33: 339-345.
535. Francavilla A, Ove P, Polimeno L, Coetzee M, Makowka L, Barone M, et al. Regulation of liver size and regeneration: importance in liver transplantation. *Transplant Proc* 1988; 20: 494-497.
536. Mead JE, Braun L, Martin DA, Fausto N. Induction of replicative competence ("priming") in normal liver. *Cancer Res* 1990; 50: 7023-7030.
537. Fausto N, Laird AD, Webber EM. Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *Faseb J* 1995; 9: 1527-1536.
538. Diehl AM, Rai R. Review: regulation of liver regeneration by pro-inflammatory cytokines. *J Gastroenterol Hepatol* 1996; 11: 466-470.
539. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997; 276: 60-66.
540. Fujiiyoshi M, Ozaki M. Molecular mechanisms of liver regeneration and protection for treatment of liver dysfunction and diseases. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2011; 18: 13-22.
541. Michalopoulos GK. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol* 2010; 176: 2-13.
542. Blindenbacher A, Wang X, Langer I, Savino R, Terracciano L, Heim MH. Interleukin 6 is important for survival after partial hepatectomy in mice. *Hepatology* 2003; 38: 674-682.
543. Iwai M, Cui TX, Kitamura H, Saito M, Shimazu T. Increased secretion of tumour necrosis factor and interleukin 6 from isolated, perfused liver of rats after partial hepatectomy. *Cytokine* 2001; 13: 60-64.
544. Webber EM, Bruix J, Pierce RH, Fausto N. Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat. *Hepatology* 1998; 28: 1226-1234.
545. Yamada Y, Fausto N. Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride injury in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor. *Am J Pathol* 1998; 152: 1577-1589.
546. Yamada Y, Webber EM, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. Analysis of liver regeneration in mice lacking type 1 or type 2 tumor necrosis factor receptor: requirement for type 1 but not type 2 receptor. *Hepatology* 1998; 28: 959-970.
547. Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, et al. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 1996; 274: 1379-1383.
548. Mangnall D, Bird NC, Majeed AW. The molecular physiology of liver regeneration following partial hepatectomy. *Liver Int* 2003; 23: 124-138.
549. Reinehr R, Haussinger D. CD95 death receptor and epidermal growth factor receptor (EGFR) in liver cell apoptosis and regeneration. *Arch Biochem Biophys* 2012; 518: 2-7.
550. Guren TK, Thoresen GH, Dajani OF, Taraldsrud E, Moberg ER, Christoffersen T. Epidermal growth factor behaves as a partial agonist in hepatocytes: effects on DNA synthesis in primary culture and competition with transforming growth factor alpha. *Growth Factors* 1996; 13: 171-179.
551. Thoresen GH, Guren TK, Sandnes D, Peak M, Agius L, Christoffersen T. Response to transforming growth factor alpha (TGFalpha) and epidermal growth factor (EGF) in hepatocytes: lower EGF receptor affinity of TGFalpha is associated with more sustained activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase and greater efficacy in stimulation of DNA synthesis. *J Cell Physiol* 1998; 175: 10-18.
552. Maher JJ. Cell-specific expression of hepatocyte growth factor in liver. Upregulation in sinusoidal endothelial cells after carbon tetrachloride. *J Clin Invest* 1993; 91: 2244-2252.

553. Naldini L, Vigna E, Bardelli A, Follenzi A, Galimi F, Comoglio PM. Biological activation of pro-HGF (hepatocyte growth factor) by urokinase is controlled by a stoichiometric reaction. *J Biol Chem* 1995; 270: 603-611.
554. Sakamoto T, Liu Z, Murase N, Ezure T, Yokomuro S, Poli V, et al. Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology* 1999; 29: 403-411.
555. Russell WE, Coffey RJ, Jr., Ouellette AJ, Moses HL. Type beta transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 5126-5130.
556. Yasuda H, Mine T, Shibata H, Eto Y, Hasegawa Y, Takeuchi T, et al. Activin A: an autocrine inhibitor of initiation of DNA synthesis in rat hepatocytes. *J Clin Invest* 1993; 92: 1491-1496.
557. Houck KA, Michalopoulos GK. Altered responses of regenerating hepatocytes to norepinephrine and transforming growth factor type beta. *J Cell Physiol* 1989; 141: 503-509.
558. Boulton R, Woodman A, Calnan D, Selden C, Tam F, Hodgson H. Nonparenchymal cells from regenerating rat liver generate interleukin-1alpha and -1beta: a mechanism of negative regulation of hepatocyte proliferation. *Hepatology* 1997; 26: 49-58.
559. Bosch A, McCray PB, Jr., Chang SM, Ulich TR, Simonet WS, Jolly DJ, et al. Proliferation induced by keratinocyte growth factor enhances in vivo retroviral-mediated gene transfer to mouse hepatocytes. *J Clin Invest* 1996; 98: 2683-2687.
560. Patijn GA, Lieber A, Schowalter DB, Schwall R, Kay MA. Hepatocyte growth factor induces hepatocyte proliferation in vivo and allows for efficient retroviral-mediated gene transfer in mice. *Hepatology* 1998; 28: 707-716.
561. Kosai KI, Finegold MJ, Thi-Huynh BT, Tewson M, Ou CN, Bowles N, et al. Retrovirus-mediated in vivo gene transfer in the replicating liver using recombinant hepatocyte growth factor without liver injury or partial hepatectomy. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 1293-1301.
562. Delgado JP, Vanneaux V, Branger J, Touboul T, Sentilhes L, Mainot S, et al. The role of HGF on invasive properties and repopulation potential of human fetal hepatic progenitor cells. *Exp Cell Res* 2009; 315: 3396-3405.
563. Ueno S, Aikou T, Tanabe G, Kobayashi Y, Hamanoue M, Mitsue S, et al. Exogenous hepatocyte growth factor markedly stimulates liver regeneration following portal branch ligation in dogs. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996; 38: 233-237.
564. Kobayashi Y, Hamanoue M, Ueno S, Aikou T, Tanabe G, Mitsue S, et al. Induction of hepatocyte growth by intraportal infusion of HGF into beagle dogs. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 220: 7-12.
565. Grisham JW. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H3. *Cancer Res* 1962; 22: 842-849.
566. Lieber A, Peeters MJ, Gown A, Perkins J, Kay MA. A modified urokinase plasminogen activator induces liver regeneration without bleeding. *Hum Gene Ther* 1995; 6: 1029-1037.
567. Yoshimura S, Kamada N. Effect of cyclosporin A on liver regeneration following partial hepatectomy in the mouse. *Transplant Proc* 1989; 21: 911-912.
568. Fabrikant JI. The kinetics of cellular proliferation in regenerating liver. *J Cell Biol* 1968; 36: 551-565.
569. Francavilla A, Porter KA, Benichou J, Jones AF, Starzl TE. Liver regeneration in dogs: morphologic and chemical changes. *J Surg Res* 1978; 25: 409-419.
570. Branchereau S, Calise D, Ferry N. Factors influencing retroviral-mediated gene transfer into hepatocytes in vivo. *Hum Gene Ther* 1994; 5: 803-808.
571. Izembart A, Aguado E, Gauthier O, Aubert D, Moullier P, Ferry N. 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* 1999; 10: 2917-2925.
572. Kahn D, Hickman R, Terblanche J. A porcine model for the study of liver regeneration. *J Invest Surg* 1988; 1: 139-142.
573. Lambotte L, Saliez A, Triest S, Tagliaferri EM, Barker AP, Baranski AG. Control of rate and extent of the proliferative response after partial hepatectomy. *Am J Physiol* 1997; 273: G905-912.

574. Sun L, Chow PK, Fook-Chong SM, Chew M, Aw SE, Soo KC. Liver regeneration after partial hepatectomy is non-uniform: flow cytometric bromodeoxyuridine incorporation and cell cycle studies in a porcine model. *Res Exp Med (Berl)* 1999; 198: 229-236.
575. Farges O, Denys A. [Portal vein embolization prior to hepatectomy. Techniques, indications and results]. *Ann Chir* 2001; 126: 836-844.
576. Farges O, Belghiti J, Kianmanesh R, Regimbeau JM, Santoro R, Vilgrain V, et al. Portal vein embolization before right hepatectomy: prospective clinical trial. *Ann Surg* 2003; 237: 208-217.
577. Lim C, Farges O. Portal vein occlusion before major hepatectomy in patients with colorectal liver metastases: rationale, indications, technical aspects, complications and outcome. *J Visc Surg* 2012; 149: e86-96.
578. Azoulay D, Raccuia JS, Castaing D, Bismuth H. Right portal vein embolization in preparation for major hepatic resection. *J Am Coll Surg* 1995; 181: 266-269.
579. Nagino M, Nimura Y, Kamiya J, Kondo S, Uesaka K, Kin Y, et al. Right or left trisegment portal vein embolization before hepatic trisegmentectomy for hilar bile duct carcinoma. *Surgery* 1995; 117: 677-681.
580. de Baere T, Roche A, Elias D, Lasser P, Lagrange C, Bousson V. Preoperative portal vein embolization for extension of hepatectomy indications. *Hepatology* 1996; 24: 1386-1391.
581. Azoulay D, Castaing D, Krissat J, Smail A, Hargreaves GM, Lemoine A, et al. Percutaneous portal vein embolization increases the feasibility and safety of major liver resection for hepatocellular carcinoma in injured liver. *Ann Surg* 2000; 232: 665-672.
582. Tanaka H, Hirohashi K, Kubo S, Shuto T, Higaki I, Kinoshita H. Preoperative portal vein embolization improves prognosis after right hepatectomy for hepatocellular carcinoma in patients with impaired hepatic function. *Br J Surg* 2000; 87: 879-882.
583. Broering DC, Hillert C, Krupski G, Fischer L, Mueller L, Achilles EG, et al. Portal vein embolization vs. portal vein ligation for induction of hypertrophy of the future liver remnant. *J Gastrointest Surg* 2002; 6: 905-913.
584. Hemming AW, Reed AI, Howard RJ, Fujita S, Hochwald SN, Caridi JG, et al. Preoperative portal vein embolization for extended hepatectomy. *Ann Surg* 2003; 237: 686-691.
585. Jaeck D, Oussoultzoglou E, Rosso E, Greget M, Weber JC, Bachellier P. A two-stage hepatectomy procedure combined with portal vein embolization to achieve curative resection for initially unresectable multiple and bilobar colorectal liver metastases. *Ann Surg* 2004; 240: 1037-1049.
586. Madoff DC, Abdalla EK, Vauthey JN. Portal vein embolization in preparation for major hepatic resection: evolution of a new standard of care. *J Vasc Interv Radiol* 2005; 16: 779-790.
587. Ogata S, Belghiti J, Farges O, Varma D, Sibert A, Vilgrain V. Sequential arterial and portal vein embolizations before right hepatectomy in patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 2006; 93: 1091-1098.
588. Oussoultzoglou E, Bachellier P, Rosso E, Scurtu R, Lucescu I, Greget M, et al. Right portal vein embolization before right hepatectomy for unilobar colorectal liver metastases reduces the intrahepatic recurrence rate. *Ann Surg* 2006; 244: 71-79.
589. Capussotti L, Muratore A, Baracchi F, Lelong B, Ferrero A, Regge D, et al. Portal vein ligation as an efficient method of increasing the future liver remnant volume in the surgical treatment of colorectal metastases. *Arch Surg* 2008; 143: 978-982.
590. Aussilhou B, Lesurtel M, Sauvanet A, Farges O, Dokmak S, Goasguen N, et al. Right portal vein ligation is as efficient as portal vein embolization to induce hypertrophy of the left liver remnant. *J Gastrointest Surg* 2008; 12: 297-303.
591. Mueller L, Hillert C, Moller L, Krupski-Berdien G, Rogiers X, Broering DC. Major hepatectomy for colorectal metastases: is preoperative portal occlusion an oncological risk factor? *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 1908-1917.
592. Zorzi D, Chun YS, Madoff DC, Abdalla EK, Vauthey JN. Chemotherapy with bevacizumab does not affect liver regeneration after portal vein embolization in the treatment of colorectal liver metastases. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 2765-2772.

593. Pamecha V, Davidson B. Portal vein embolization prior to extensive resection for colorectal liver metastases. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 3214.
594. Wicherts DA, de Haas RJ, Andreani P, Sotirov D, Salloum C, Castaing D, et al. Impact of portal vein embolization on long-term survival of patients with primarily unresectable colorectal liver metastases. *Br J Surg* 2010; 97: 240-250.
595. Stureson C, Keussen I, Tranberg KG. Prolonged chemotherapy impairs liver regeneration after portal vein occlusion - an audit of 26 patients. *Eur J Surg Oncol* 2010; 36: 358-364.
596. Denys AL, Abehsera M, Sauvanet A, Sibert A, Belghiti J, Menu Y. Failure of right portal vein ligation to induce left lobe hypertrophy due to intrahepatic portoportal collaterals: successful treatment with portal vein embolization. *AJR Am J Roentgenol* 1999; 173: 633-635.
597. Kocken JM, Borel Rinkes IH, Bijma AM, de Roos WK, Bouwman E, Terpstra OT, et al. Correction of an inborn error of metabolism by intraportal hepatocyte transplantation in a dog model. *Transplantation* 1996; 62: 358-364.
598. Guha C, Parashar B, Deb NJ, Garg M, Gorla GR, Singh A, et al. Normal hepatocytes correct serum bilirubin after repopulation of Gunn rat liver subjected to irradiation/partial resection. *Hepatology* 2002; 36: 354-362.
599. Ilan Y, Roy-Chowdhury N, Prakash R, Jona V, Attavar P, Guha C, et al. 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* 1997; 64: 8-13.
600. Lorand I, Vons C, Nguyen T, Di Rico V, Coulomb A, Franco D, et al. Portal branch ligation induces efficient retrovirus-mediated gene delivery in rat liver. *J Gene Med* 2004; 6: 507-513.
601. Krupski G, Broring DC, Wittkugel O, Muller L, Nicolas V, Rogiers X, et al. [Formation of portal venous collaterals after ligation of the portal vein for induction of liver regeneration]. *Rofo* 2002; 174: 1281-1284.
602. Azoulay D, Castaing D, Smail A, Adam R, Cailliez V, Laurent A, et al. Resection of nonresectable liver metastases from colorectal cancer after percutaneous portal vein embolization. *Ann Surg* 2000; 231: 480-486.
603. Imamura H, Shimada R, Kubota M, Matsuyama Y, Nakayama A, Miyagawa S, et al. Preoperative portal vein embolization: an audit of 84 patients. *Hepatology* 1999; 29: 1099-1105.
604. Kawasaki S, Makuuchi M, Miyagawa S, Kakazu T. Radical operation after portal embolization for tumor of hilar bile duct. *J Am Coll Surg* 1994; 178: 480-486.
605. Madoff DC, Hicks ME, Abdalla EK, Morris JS, Vauthey JN. Portal vein embolization with polyvinyl alcohol particles and coils in preparation for major liver resection for hepatobiliary malignancy: safety and effectiveness--study in 26 patients. *Radiology* 2003; 227: 251-260.
606. Nagino M, Nimura Y, Kamiya J, Kondo S, Uesaka K, Kin Y, et al. Changes in hepatic lobe volume in biliary tract cancer patients after right portal vein embolization. *Hepatology* 1995; 21: 434-439.
607. Wakabayashi H, Okada S, Maeba T, Maeta H. Effect of preoperative portal vein embolization on major hepatectomy for advanced-stage hepatocellular carcinomas in injured livers: a preliminary report. *Surg Today* 1997; 27: 403-410.
608. Ribero D, Abdalla EK, Madoff DC, Donadon M, Loyer EM, Vauthey JN. Portal vein embolization before major hepatectomy and its effects on regeneration, resectability and outcome. *Br J Surg* 2007; 94: 1386-1394.
609. van den Esschert JW, van Lienden KP, de Graaf W, Maas MA, Roelofs JJ, Heger M, et al. Portal vein embolization induces more liver regeneration than portal vein ligation in a standardized rabbit model. *Surgery* 2011; 149: 378-385.
610. Wilms C, Mueller L, Lenk C, Wittkugel O, Helmke K, Krupski-Berdien G, et al. Comparative study of portal vein embolization versus portal vein ligation for induction of hypertrophy of the future liver remnant using a mini-pig model. *Ann Surg* 2008; 247: 825-834.
611. Duncan JR, Hicks ME, Cai SR, Brunt EM, Ponder KP. Embolization of portal vein branches induces hepatocyte replication in swine: a potential step in hepatic gene therapy. *Radiology* 1999; 210: 467-477.
612. Lainas P, Boudechiche L, Osorio A, Coulomb A, Weber A, Pariente D, et al. Liver regeneration and recanalization time course following reversible portal vein embolization. *J Hepatol* 2008; 49: 354-362.

613. Yokoyama Y, Nagino M, Nimura Y. Mechanisms of hepatic regeneration following portal vein embolization and partial hepatectomy: a review. *World J Surg* 2007; 31: 367-374.
614. Elias D, Debaere T, Roche A, Bonvallot S, Lasser P. Preoperative selective portal vein embolizations are an effective means of extending the indications of major hepatectomy in the normal and injured liver. *Hepatogastroenterology* 1998; 45: 170-177.
615. Jaeck D, Bachellier P, Nakano H, Oussoultzoglou E, Weber JC, Wolf P, et al. One or two-stage hepatectomy combined with portal vein embolization for initially nonresectable colorectal liver metastases. *Am J Surg* 2003; 185: 221-229.
616. Huang JY, Yang WZ, Li JJ, Jiang N, Zheng QB. Portal vein embolization induces compensatory hypertrophy of remnant liver. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 408-414.
617. Kaneko T, Nakao A, Takagi H. Clinical studies of new material for portal vein embolization: comparison of embolic effect with different agents. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 472-477.
618. Harada H, Imamura H, Miyagawa S, Kawasaki S. Fate of the human liver after hemihepatic portal vein embolization: cell kinetic and morphometric study. *Hepatology* 1997; 26: 1162-1170.
619. Kahn D, Stadler J, Terblanche J, van Hoorn-Hickman R. Thymidine kinase: an inexpensive index of liver regeneration in a large animal model. *Gastroenterology* 1980; 79: 907-911.
620. Elias D, Santoro R, Ouellet JF, Osmak L, de Baere T, Roche A. Simultaneous percutaneous right portal vein embolization and left liver tumor radiofrequency ablation prior to a major right hepatic resection for bilateral colorectal metastases. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 1788-1791.
621. Dagher I, Nguyen TH, Groyer-Picard MT, Lainas P, Mainot S, Guettier C, et al. Efficient hepatocyte engraftment and long-term transgene expression after reversible portal embolization in nonhuman primates. *Hepatology* 2009; 49: 950-959.
622. Yee JK, Zaia JA. Prospects for gene therapy using HIV-based vectors. *Somat Cell Mol Genet* 2001; 26: 159-174.
623. Gupta S, Rajvanshi P, Sokhi R, Slehria S, Yam A, Kerr A, et al. Entry and integration of transplanted hepatocytes in rat liver plates occur by disruption of hepatic sinusoidal endothelium. *Hepatology* 1999; 29: 509-519.
624. Trobridge GD, Beard BC, Gooch C, Wohlfahrt M, Olsen P, Fletcher J, et al. Efficient transduction of pigtailed macaque hematopoietic repopulating cells with HIV-based lentiviral vectors. *Blood* 2008; 111: 5537-5543.
625. Nguyen TH, Mainot S, Lainas P, Groyer-Picard MT, Franco D, Dagher I, et al. Ex vivo liver-directed gene therapy for the treatment of metabolic diseases: advances in hepatocyte transplantation and retroviral vectors. *Curr Gene Ther* 2009; 9: 136-149.
626. Birraux J, Menzel O, Wildhaber B, Jond C, Nguyen TH, Chardot C. A step toward liver gene therapy: efficient correction of the genetic defect of hepatocytes isolated from a patient with Crigler-Najjar syndrome type 1 with lentiviral vectors. *Transplantation* 2009; 87: 1006-1012.
627. Lesurtel M, Belghiti J. Temporary portal vein embolization as a starter of liver regeneration. *J Hepatol* 2008; 49: 313-315.

«La recherche procède par des moments distincts et durables, intuition, aveuglement, exaltation et fièvre. Elle aboutit un jour à cette joie, et connaît cette joie celui qui a vécu des moments singuliers.»

Albert Einstein, Comment je vois le monde (1934)