



**HAL**  
open science

# Hépatocytes différenciés à partir de cellules souches pluripotentes : un modèle d'études physiopathologiques et de thérapie génique et cellulaire - Application à l'hypercholestérolémie familiale de type IIA

Jérôme Caron

► **To cite this version:**

Jérôme Caron. Hépatocytes différenciés à partir de cellules souches pluripotentes : un modèle d'études physiopathologiques et de thérapie génique et cellulaire - Application à l'hypercholestérolémie familiale de type IIA. Biologie cellulaire. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS533 . tel-01968029

**HAL Id: tel-01968029**

**<https://theses.hal.science/tel-01968029>**

Submitted on 2 Jan 2019

**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.

# Hépatocytes différenciés à partir de cellules souches pluripotentes : un modèle d'études physiopathologiques et de thérapie génique et cellulaire - Application à l'hypercholestérolémie familiale de type IIA

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à l'Université Paris-Sud (Paris XI)

École doctorale n°569 Innovation thérapeutique : Du fondamental à l'appliqué  
Spécialité de doctorat: Physiologie, Physiopathologie

Thèse présentée et soutenue à Villejuif, le 14 décembre 2017, par

**Jérôme CARON**

## Composition du Jury :

Pr. Christian POUS INSERM U1193 – Chatenay-Malabry	Président
Dr. Jean DUBUISSON INSERM U1019 – Lille	Rapporteur
Pr. Ludovic VALLIER Laboratory for Regenerative Medecine - Cambridge	Rapporteur
Pr. Eric BRUCKERT Chef de service Endocrinologie – Hôpital La Pitié-Salpêtrière	Examineur
Pr. Christelle MONVILLE INSERM/UEVE U861 – Evry	Examineur
Dr. Hélène STRICK-MARCHAND INSERM U1223 – Paris	Examineur
Dr. Anne DUBART-KUPPERSCHMITT INSERM U1193 – Villejuif	Directeur de thèse
Dr. Anne WEBER INSERM U1193 – Villejuif	Co-Directeur de thèse

It's time to begin, isn't it ?  
I get a little bit bigger but then I'll admit,  
I'm just the same as I was !  
Now don't you understand,  
I'm never changing who I am !

*Dan Reynolds – Imagine Dragons*

# Remerciements

---

Nous y sommes ! Il y a quatre ans, je ne faisais qu'imaginer ce moment et aujourd'hui, il est arrivé bien plus vite que je ne l'aurai cru. Quatre années, c'est à la fois long et court. Il y a évidemment eu des moments de doutes et des frustrations mais au final, je ne retiendrai que le positif de cette expérience où j'ai tellement grandi. Si je peux présenter ce travail aujourd'hui, ce n'est pas uniquement grâce à moi, loin de là, mais aussi grâce à l'aide de nombreuses personnes qui, de près ou de loin, m'ont aidé à avancer et à remettre les choses en perspective sans parfois même s'en rendre compte.

Tout d'abord, je souhaite remercier l'ensemble des **membres du jury** : le professeur Ludovic Vallier et le docteur Jean Dubuisson pour avoir accepté d'être les rapporteurs de mes travaux de thèse et pour leur lecture attentive de mon manuscrit ainsi que les professeurs Christelle Monville, Christian Poüs et Eric Bruckert et le docteur Hélène Strick-Marchand pour l'intérêt qu'ils portent à mon travail et leur présence au sein de mon jury.

Je remercie du fond du cœur **Anne Dubart-Kupperschmitt** et **Anne Weber**, mes co-directrices de thèse. La confiance et la grande autonomie que vous m'avez accordées dès le départ m'ont véritablement touché et rapidement permis de gagner en maturité et en rigueur scientifique. J'ai énormément appris pendant ces années à vos côtés tant sur le plan technique que sur le plan humain. Votre disponibilité, votre soutien, vos nombreux conseils, idées et avis tout comme votre envie communicative d'aller toujours plus loin et de trouver une solution pour résoudre les problèmes ont été de véritables moteurs pour arriver au bout de ce projet dont je suis très fier ! Les discussions plus personnelles échangées pendant la pause repas ou le soir nous ont permis de partager plus qu'une simple relation formelle directeur/étudiant. Je vous souhaite beaucoup de bonheur avec vos petits-enfants ! Enfin, merci également d'avoir toujours cherché à me mettre un maximum en valeur, notamment par la participation à de nombreux congrès ainsi que par la relecture et la correction attentive de ce manuscrit. Anne Weber, tu m'as dit un jour qu'il était d'usage qu'à la fin d'une thèse un étudiant ne puisse plus supporter son/ses encadrant(s). Je trouve qu'on s'en est plutôt bien sorti 😊

Je voudrais également adresser mes remerciements à **Georges Uzan** pour m'avoir accueilli au sein de l'unité U972 ainsi qu'à **Didier Samuel**, directeur de l'unité U1193 que nous avons rejoint en 2015 et dans laquelle j'ai fini mon doctorat, notamment pour m'avoir permis d'assister à un congrès aux Etats-Unis. Mes sincères remerciements également envers **François Le Naour** pour m'avoir accueilli dans son équipe lors du changement d'unité et **Jean-Charles Duclos-Vallée** pour avoir financé mes trois derniers mois de doctorat dans le cadre du DHU.

Je souhaite évidemment remercier toutes les personnes passées ou présentes sans qui le travail au laboratoire aurait été beaucoup moins agréable et chaleureux :

**Eléonor Luce**, on a commencé ensemble et on va finir ensemble. Bon, à un jour près mais c'est tout comme ! On aura tout vécu de concert pendant ces 4 ans, les galères de manips, les congrès, les afterworks à la Butte. Je suis sincèrement ravi d'avoir pu travailler avec une co-thésarde aussi joviale, cool et drôle que toi ! Les longues journées de culture au L2 n'auraient pas eu la même saveur sans nos envolées lyriques sur "Vivo per Lei" et les soucis de biologie moléculaire auraient pu être tellement plus frustrants et décourageants sans ton recul et ton humour pour les désarmer. Je te souhaite le meilleur pour ta future carrière et plus important encore, dans ta vie personnelle. Il est temps que le karma s'inverse, tu en as assez vu comme ça, tu le mérites, tu es une belle personne !

**Antonietta Messina**, l'italiana più pazza che conosca. Grazie mille per tutte le crisi di ridarella che abbiamo avuto insieme. Resta la persona naturale col carattere di fuoco che sei. So che sono uno stronzo ma è troppo tardi, non posso cambiare più e vado a continuare ad imitare tutti. Sono desolato di sempre dire no, vado a fare degli sforzi per dire talvolta sì, te lo prometto ! E come hai sempre fame, se si andava a mangiare dei sushi ?

**Emmanuel Hornez**, pardon Docteur Hornez ! Ça a été un plaisir de partager le bureau avec toi à une période où il manquait cruellement de garçons au labo ! Surtout, garde cette bonne humeur, cet humour grinçant et ce répondant. On se capte bientôt pour une session piscine suivie d'un bon gros kebab pour ruiner tous nos efforts ? ;)

**Nassima Benzoubir**, ton petit côté tête en l'air m'aura bien souvent fait rire et ta connaissance du western blot m'aura été d'un grand secours ! Ce fut un plaisir de discuter de tout et de rien avec toi mais par contre, s'il te plaît, si les 15 d'entre vous pouvaient se mettre d'accord pour arrêter de m'attraper par les épaules et me secouer à chaque bonne nouvelle, j'apprécierai grandement ☺

**Alejandra Vargas Valderrama**, notre petite (mais gentille !) Shakira ! Garde ta folie et ta bonne humeur qui seront des armes bien utiles pour la suite de ta thèse. Et si jamais tu as mal au cou, n'oublie jamais que c'est de la faute du esport et des estagiares et que seuls les fruits de la passion peuvent te soigner.

**Hind Guenou**, merci de m'avoir offert la possibilité d'enseigner à l'université d'Evry. Cette expérience a été véritablement enrichissante pour moi et m'a ouvert de nouvelles perspectives de carrière auxquelles je réfléchis sérieusement.

Plus que des gestionnaires de choc qui savent rattraper tous les petits problèmes de commandes, **Vincent Quilin** et **Christine Angelosanto** sont deux personnes à l'écoute, hyper réactives et très serviables avec lesquelles on peut discuter d'énormément de choses et cela a été un réel plaisir de travailler avec eux.

Un énorme merci à tous les anciens de l'équipe qui m'ont formidablement accueilli et que je n'oublie pas : **Clara Steichen** et **Noushin Dianat** pour leurs multiples conseils et encouragements et pour m'avoir montré qu'il y a une vie hors du labo, **Sarah Awan-Toor** dont je n'ai jamais réussi à copier l'impressionnant sang-froid et avec qui j'ai apprécié travailler sur le projet iPSC, **Sonia Safar** pour sa joie de vivre, **Sylvie Goulinet Mainot** pour son expertise en biologie moléculaire et sa patience devant mes nombreuses questions techniques, **Marc-Ghislain Antoni** pour sa bonne humeur et **Aissata Mossi** pour son sourire si communicatif.

J'adresse mes sincères remerciements à **Philippe Leclerc** pour sa gentillesse et son aide technique sur mes nombreuses questions de microscopie confocale, à **Denis Clay** pour sa capacité à résoudre tous les problèmes informatiques et son aide technique indispensable en cytométrie en flux et à **Christophe Desterke** pour sa grande culture en bioinformatique et les discussions informelles que nous avons pu avoir. Je remercie également tous les **autres membres des unités U1193 et U1197**, trop nombreux pour être tous cités, que j'ai pu croiser lors de ces années.

Un grand merci à l'ensemble de nos collaborateurs sur les travaux présentés dans ce manuscrit : **Laia Tolosa-Pardo** et **Maria-José Gómez-Lechón** pour m'avoir fait confiance pour les expériences *in vitro* du papier VAL9 et avoir ensuite continué à travailler avec nous pour enrichir les données du papier sur les hiPSC issues du patient hypercholestérolémique ; le professeur **Eric Bruckert** et le docteur **Samir Saheb** pour l'obtention des biopsies des patients hypercholestérolémiques ; **Tuan Nguyen**, **Angélique Fourier**, **Jean-Marie Heslan** et **Claire Poiron** pour leur expertise sur l'édition du génome et enfin, l'équipe d'**Arielle Rosenberg**, constituée de **Véronique Pène**, **Maxime Villaret** et **Alexis Moravic** pour leur expertise sur l'hépatite C et les nombreuses discussions intéressantes que nos résultats ont généré. Je souhaite bon courage à Maxime pour sa thèse qui débute tout juste et si jamais tu as besoin des conseils d'un "vieux", n'hésite pas !

Ma vie au laboratoire est déjà bien remplie mais elle ne serait pas complète sans un certain nombre de belles personnes que j'ai l'honneur d'appeler mes amis. Ils ont supporté mes énervements, mes découragements parfois et accepté mes absences souvent sans jamais me reprocher quoi que ce soit. Je suis vraiment chanceux de pouvoir compter sur eux tous :

**Florent**, mon Dean Winchester, mon Astérix, mon Dr. Watson, les gens ont tellement l'habitude de nous voir en duo qu'ils s'inquiètent si jamais on fait des choses séparément ! Notre CDD amical de 5 ans s'est depuis longtemps transformé en CDI que même la distance n'arrive pas à rompre. A mes yeux, tu représentes bien plus qu'un ami. Tu es le grand frère que je n'ai pas, celui avec qui je peux parler de tout, sans filtre, celui avec qui je déconne, celui qui me donne des conseils et surtout, celui qui continue à m'étonner !

**Aliaume**, je me demande encore qui m'a collé un coloc pareil ! Puis après, je réfléchis et je me dis que j'ai finalement fait le bon choix ! Je te remercie pour ta patience et ton écoute car tu as souvent été ma première soupape de décompression quand je rentrais le soir du labo

ainsi que pour ton "laisser couler" bien souvent salutaire dont je dois absolument continuer à m'inspirer pour la suite pour éviter de me laisser submerger par des choses pas si importantes que ça quand on y réfléchit !

Je remercie également le marseillais naturalisé parisien, **Julien**, pour sa capacité à organiser n'importe quel évènement avec facilité - notamment des vacances au ski à huit - et qui m'a aussi bien aidé à vaincre ma peur des avions (promis, je monterai avec toi une fois que tu auras validé ton brevet) ; **Cyprien** pour les nombreuses sorties théâtrales (en carré or s'il vous plaît !) que nous avons partagées, je te souhaite désormais un bon courage pour ta fin de thèse et **Sylvain** pour sa bonhomie naturelle et son accord quasi-instantané quand il s'agit d'aller boire un verre (sauf en cas de footgolf, là personne ne peut lutter !).

**Laurène** et **Christopher**, je vous ai déjà tout dit lors de votre récent mariage et mes sentiments envers vous restent inchangés. Je vous remercie d'être les personnes attentionnées que vous êtes et de m'avoir accueilli tant de fois en Alsace pour des week-ends toujours animés !

**Elsa**, mon petit lapin, ta spontanéité de tous les instants est une telle bouffée d'oxygène. J'adore cette candeur et cette naïveté qui te caractérisent et qui nous ont souvent valu d'énormes crises de rire. C'est toujours un plaisir de passer un moment hors du temps avec toi que ce soit autour d'un verre, d'un bon brunch ou devant une expo.

J'ai également une pensée pour **Anthony** qui m'accompagne au quotidien. J'espère que de là où tu es, tu es fier de moi. Je ne t'oublie pas, je ne t'oublierai jamais.

Un immense merci à **Marie** et **Boubou** pour leur soutien sans faille qui s'est le plus souvent traduit par des week-ends récupérateurs dans la campagne de Moret et des soirées jeux de société accompagnées de repas de roi ! Sur ce dernier point, merci également à l'autre couple de joueurs, **Justine** et **Thomas** pour les nombreuses parties disputées, toutes accompagnées de délicieux dîners. Un jour, je ne désespère pas, je trouverai ta faille Thomas et je te vaincrai ;)

Merci infiniment à tous mes amis que je vois moins souvent à cause d'emplois du temps difficilement compatibles mais avec qui le contact n'a jamais été rompu et le plaisir de se retrouver reste toujours intact : **Maxence**, l'as du wakeboard avec qui j'ai toujours plaisir à boire un petit jaune en rentrant du ski ou d'Avignon ; **Jean-Loup** pour les sorties parisiennes et la découverte de Bordeaux ; **Bastien** pour les parties les plus longues de toute l'histoire du billard et surtout pour m'avoir accueilli quelques jours à New-York ; **Clotilde** avec qui je passe beaucoup de temps au téléphone avant de trouver enfin une date pour une expo ; **Sara**, la plus belge des normandes, on s'est raté tout 2017 mais on se voit sans faute l'an prochain ; **Benoît** pour la visite du bassin d'Arcachon et de la côte landaise ; **Caillou** et **Robin** pour nos (trop rares !) conversations autour d'un verre ou d'une pizza.

Ces 4 années ont également été ponctuées de nouvelles rencontres de personnes formidables :

**Margaux**, sous couvert d'un visage angélique au premier abord se cache en réalité une redoutable ironie et causticité. Après tout, la rousseur n'est-elle pas la couleur du diable ? Avec toi, je serai tenté de le croire ;) Merci pour ta gentillesse et tes nombreuses invitations à jouer, regarder un film (MUSIQUE !!!) ou juste à chiller !

**Laetitia**, on se connaît encore peu mais déjà, j'apprécie ta drôlerie, ta douceur, ta tchatche et ton enthousiasme toujours débordant ! J'attends avec impatience la soirée promise où il n'y aura pas que de l'eau dans ton verre !

**Olivier**, pas du tout impressionné de me rentrer verbalement dans le lard sans même me connaître. Merci pour ces conversations interminables qui démarrent de manière absolument normales et finissent toujours par partir dans un délire où les autres nous regardent comme si on était fous ! Rendez-vous en short pour Halloween l'an prochain ?

**Lucas**, l'expert de la blague sous la ceinture. Véritable encyclopédie vivante de la musique métal et amateur de saveurs houblonnées, ce fut un plaisir de partager ce festoche sous 30 degrés avec toi. Espérons qu'il fasse moins chaud l'an prochain !

**Raphaël**, mon chou, je pense vraiment que ton alter-ego speedster a dérégulé la timeline. Parce que quelqu'un qui pense autant comme moi sans être moi, c'est un peu flippant ! Je maintiens quand même que notre vision de la vie est la bonne et j'espère qu'un jour, d'autres s'en rendront compte ! Tu es tout à la fois mon psy, mon coach sportif, mon wingman mais avant tout une sacrée personnalité, honnête et droite avec qui tout s'est fait hyper naturellement ! Tu feras un excellent juriste, je n'ai aucun doute là-dessus !

A tous, merci de faire partie de mon monde qui serait bien fade sans votre présence. Restez vous-même, si uniques, si différents mais si importants ! J'espère pouvoir vous rendre un jour ne serait-ce que la moitié de tout ce que vous m'avez donné car sans vous, je ne serai rien !

Pour terminer, mes derniers remerciements vont à **ma famille**. Vous n'avez pas toujours tout compris à ce que je faisais ici mais vous vous êtes toujours intéressés à savoir comment j'allais et si tout se passait bien dans ma vie parisienne. Les retours en Picardie ont toujours été de véritables bols d'air frais et de déconnection totale. Merci ne sera jamais un mot suffisamment fort pour exprimer l'immense gratitude que j'éprouve pour **mes parents** pour tout ce qu'ils m'ont apporté depuis toutes ces années. Vous êtes mon socle, vous êtes qui je suis et d'où je viens et je tente au quotidien d'appliquer toutes les belles valeurs que vous m'avez inculquées. Vous m'avez toujours fait confiance, vous ne m'avez jamais lâché, vous avez toujours accepté et soutenu mes choix, vous vous souciez toujours et encore de moi. Vous êtes deux personnes exceptionnelles. **Maman, Papa**, je vous aime.

# *Table des matières*

---

<b>Table des matières</b> .....	<b>8</b>
<b>Table des illustrations</b> .....	<b>12</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>14</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>17</b>
<b>CHAPITRE 1 : Le foie</b>	
I. Anatomie et composition cellulaire du foie .....	<b>17</b>
A. Structure et fonctions de l'organe adulte .....	17
B. Populations cellulaires.....	18
1. Les hépatocytes .....	18
2. Les cholangiocytes.....	19
3. Les cellules de Küpffer .....	19
4. Les cellules de Ito .....	19
5. Les cellules endothéliales.....	19
6. Les "pit cells" .....	20
II. Développement embryonnaire du foie.....	<b>20</b>
A. Induction du tube digestif antérieur .....	20
B. Spécification hépatique .....	21
C. Formation et croissance du bourgeon hépatique .....	22
D. De l'hépatoblaste à l'hépatocyte et au cholangiocyte .....	23
E. Zonation fonctionnelle des hépatocytes .....	25
III. Le virus de l'hépatite C.....	<b>27</b>
A. Génome du VHC .....	27
B. Cycle viral du VHC .....	28
C. Traitements disponibles.....	29
IV. Thérapie cellulaire.....	<b>30</b>
A. La transplantation .....	30
1. La transplantation orthotopique et la transplantation d'hépatocytes.....	30
2. Les cellules stromales mésenchymateuses .....	32
3. Les cellules progénitrices du foie .....	34
4. Les cellules épithéliales amniotiques .....	35

B.	Problématiques liées à la transplantation de cellules .....	36
C.	La suppléance extracorporelle du foie.....	38
1.	La suppléance artificielle non biologique.....	38
2.	Le foie bioartificiel .....	39
D.	L'ingénierie tissulaire .....	40
<b>CHAPITRE 2 : Les cellules souches pluripotentes : Intérêts pour l'hépatologie</b>		
I.	Les cellules souches embryonnaires .....	<b>44</b>
A.	Origine.....	44
B.	Propriétés et caractérisation .....	45
1.	L'auto-renouvellement .....	45
2.	La pluripotence .....	45
C.	Evolution des techniques de culture vers la clinique .....	47
II.	Les cellules souches pluripotentes induites .....	<b>47</b>
A.	Historique.....	47
B.	Caractérisation.....	48
C.	Les différentes techniques de reprogrammation .....	49
1.	Méthodes intégratives .....	49
2.	Méthodes non intégratives .....	50
D.	Améliorer l'efficacité de reprogrammation .....	53
E.	Comparaison entre les hESC et les hiPSC .....	54
III.	Intérêt et applications des cellules souches pluripotentes .....	<b>55</b>
A.	Un modèle pour l'étude du développement.....	56
B.	Modélisation de maladies.....	57
C.	Modélisation de l'infection par le VHC.....	59
D.	Criblage pharmaco- et toxicologique .....	60
E.	Thérapie cellulaire et médecine personnalisée.....	62
IV.	Différenciation des CSP en hépatocytes .....	<b>64</b>
A.	Des CSP à l'endoderme définitif .....	65
B.	Spécification en endoderme hépatique puis en hépatoblastes.....	66
C.	Différenciation hépatocytaire.....	66
D.	Améliorer la culture en monocouche pour obtenir des hépatocytes plus matures .....	67
<b>CHAPITRE 3 : L'hypercholestérolémie familiale</b>		
I.	Généralités .....	<b>71</b>
A.	Historique.....	71

B. Présentation clinique .....	72
II. Métabolisme du cholestérol.....	<b>74</b>
A. Cycle entéro-hépatique du cholestérol .....	75
B. Synthèse de novo du cholestérol .....	77
C. Homéostasie du cholestérol.....	78
III. Le récepteur aux lipoprotéines de faible densité.....	<b>79</b>
A. Gène et structure du RLDL .....	79
B. Cycle du RLDL .....	80
C. Implication du RLDL dans l'hypercholestérolémie familiale .....	83
1. Mutations de classe 1 ou allèle nul.....	83
2. Mutations de classe 2 ou transport-déficient .....	84
3. Mutations de classe 3 ou liaison-déficient.....	84
4. Mutations de classe 4 ou internalisation-déficient .....	84
5. Mutations de classe 5 ou recyclage-déficient .....	84
D. Implication du RLDL dans les infections virales.....	85
1. Le virus de la dengue .....	85
2. Le virus de la stomatite vésiculeuse .....	86
3. Le virus de l'hépatite C .....	87
IV. Autres gènes induisant une hypercholestérolémie familiale.....	<b>88</b>
A. ApoB .....	88
B. PCSK9.....	89
C. LDLRAP1 .....	90
V. Modèles animaux de la maladie .....	<b>90</b>
VI. Traitements disponibles .....	<b>92</b>
A. Patients hétérozygotes .....	92
1. Thérapies classiques .....	92
2. Thérapies émergentes .....	94
B. Patients homozygotes.....	95
1. Thérapies classiques .....	95
2. Thérapies émergentes .....	96
 <b>CHAPITRE 4 : L'édition du génome</b>	
I. Intérêt des systèmes d'édition du génome.....	<b>99</b>
A. Pour la compréhension des relations entre génotype et phénotype.....	99
B. Pour le traitement des maladies héréditaires .....	101

II. Les différents systèmes d'édition du génome existants .....	<b>102</b>
A. Les méganucléases .....	102
B. Les nucléases à doigt de zinc .....	104
C. Les nucléases effectrices de type activateur de transcription.....	105
D. Les courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées .....	106
III. Avantages et inconvénients des différents systèmes.....	<b>110</b>
A. Facilité de design.....	110
B. Mode de délivrance .....	111
C. Spécificité.....	111
IV. Applications à l'hépatologie et aux CSP .....	<b>113</b>
A. Les méganucléases .....	113
B. Les ZFNs .....	113
C. Les TALENs .....	115
D. Les CRISPR .....	117
<b>Objectifs</b> .....	<b>122</b>
<b>Résultats</b> .....	<b>123</b>
Article 1 : Transplantation of hESC-derived hepatocytes protects mice from liver injury....	<b>123</b>
Article 2 : CRISPR/Cas9-mediated correction and productive HCV infection in Familial Hypercholesterolemia-iPSC-derived hepatocytes.....	<b>149</b>
<b>Discussion</b> .....	<b>206</b>
Les hiPSC rendent-elles les hESC obsolètes ?.....	<b>206</b>
Obtenir des hépatocytes pour traiter l'hypercholestérolémie familiale .....	<b>210</b>
L'édition du génome : Sommes-nous aux portes du transhumanisme ?.....	<b>214</b>
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	<b>219</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>221</b>

# Table des illustrations

---

Figure 1. Architecture du foie et du lobule hépatique.....	18
Figure 2. Les différentes populations cellulaires hépatiques .....	20
Figure 3. Morphogénèse du bourgeon hépatique .....	22
Figure 4. Régulation de la croissance du bourgeon hépatique et de la différenciation hépatocytaire .....	23
Figure 5. Formation de la plaque ductale .....	25
Figure 6. Zonation métabolique des hépatocytes .....	26
Figure 7. Organisation du génome viral du VHC .....	27
Figure 8. Cycle du virus de l'hépatite C .....	28
Figure 9. Atteintes hépatiques et transplantation orthotopique.....	31
Figure 10. Les différents facteurs trophiques sécrétés par les cellules stromales mésenchymateuses en cas de lésion hépatique .....	33
Figure 11. Localisation et caractéristique phénotypique des cellules souches du foie .....	34
Figure 12. Les différents types de bioréacteurs.....	39
Figure 13. Exemple d'un "scaffold" éponge.....	40
Figure 14. Décellularisation d'un foie de rat .....	41
Figure 15. Morphologie d'une colonie d'hESC .....	44
Figure 16. Les différents types cellulaires obtenus à partir d'une cellule pluripotente .....	46
Figure 17. Les différents facteurs à tester pour caractériser une lignée hiPSC.....	48
Figure 18. Applications des cellules souches pluripotentes .....	55
Figure 19. Pipeline pour du criblage de médicaments à haut débit appliqué à la déficience en A1AT.....	62
Figure 20. Principaux marqueurs à vérifier lors de la différenciation des cellules souches pluripotentes en hépatocytes .....	65
Figure 21. Les principaux protocoles de différenciation de CSP en hépatocytes .....	67
Figure 22. Gluconéogenèse et cycle de l'urée dans les hépatocytes.....	68
Figure 23. Manifestations cliniques de l'hypercholestérolémie familiale chez un patient homozygote .....	72
Figure 24. Pourcentage de patients diagnostiqués HF dans différents pays par rapport au nombre théorique de patients touchés basée sur la prévalence de 1/500 .....	73
Figure 25. Les différentes lipoprotéines et leur composition.....	74
Figure 26. Cycle entéro-hépatique du cholestérol.....	76
Figure 27. Synthèse <i>de novo</i> du cholestérol .....	77
Figure 28. Homéostasie du cholestérol .....	79
Figure 29. Structure du RLDL .....	80
Figure 30. Cycle de vie du RLDL .....	81
Figure 31. PCSK9 régule le nombre de RLDL à la membrane cellulaire.....	83
Figure 32. Les différentes classes de mutation affectant le RLDL .....	85
Figure 33. Différentes hypothèses sur le rôle du RLDL dans l'entrée du VHC .....	88
Figure 34. Structure du gène PCSK9 et principales mutations .....	89

Figure 35. Régulation des gènes du métabolisme du cholestérol par les micro-ARN.....	98
Figure 36. Les différentes possibilités permises par l'édition du génome.....	100
Figure 37. Mode d'action naturel des méganucléases .....	103
Figure 38. Mode d'action des méganucléases LAGLIDADG dans le cadre de l'édition du génome .....	104
Figure 39. Structure des protéines à doigt de zinc et des ZFNs .....	105
Figure 40. Structure des TALE et des TALENs .....	106
Figure 41. Immunité adaptative bactérienne : le système CRISPR .....	107
Figure 42. Le système CRISPR/Cas9 pour l'édition du génome.....	108
Figure 43. Restauration d'un phénotype normal dans des iPSC modèles de la déficience en $\alpha$ -1 anti trypsine par les ZFNs .....	114
Figure 44. Etablissement de modèles <i>in vitro</i> via les TALENs pour les déficiences en ApoB-100 et en sortiline .....	116
Figure 45. Inhibition de la production virale de VHC par le système CRISPR/Cas issu de <i>Francisella novicida</i> .....	118
Figure 46. Principe de la reprogrammation des voies de signalisation métabolique appliqué à la tyrosinémie de type 1 .....	120
Figure 47. Principe de la translecture de codons STOP .....	201
Figure 48. Restauration de la fonctionnalité du RLDL par le PTC124.....	202
Figure 49. Détection des coupures hors-cible .....	204
Figure 50. Les promoteurs des gènes RLDL, PCSK9 et ApoA2 contiennent chacun une séquence régulatrice sensible à SREBP2 (SRE) .....	204
Figure 51. Effet de la combinaison statines/anticorps monoclonaux anti-PCSK9 sur le récepteur des LDL .....	205
Figure 52. Origine de la variabilité génétique observée dans les hiPSC.....	209
Figure 53. Diagrammes de Waddington illustrant la différenciation, la reprogrammation et la transdifférenciation.....	211
Tableau 1. Méthodes de reprogrammation des cellules somatiques en hiPSC .....	52
Tableau 2. Réduction du taux de LDL-c et des incidents cardiovasculaires après traitement par anticorps monoclonaux anti-PCSK9 .....	95
Tableau 3. Comparaison des différents systèmes d'édition du génome .....	109

# *Liste des abréviations*

---

A1AT : Alpha 1-antitrypsine  
AA : Activine A  
AAD : Agents antiviraux directs  
AAV : Adeno-associated virus (virus associé aux adénovirus)  
AAVS1 : Site préférentiel d'insertion des virus associés aux adénovirus  
ABCA1 : ATP-binding cassette transporter A1  
ABCG : ATP-binding cassette sub-family G  
Acétyl-coA : Acétyl-coenzyme A  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
AFP : Alpha-foetoprotéine  
APC : Adenomatous Polyposis Coli  
Apo : Apolipoprotéine  
ARN : Acide ribonucléique  
ARNm : ARN messenger  
ARNmm : ARN messenger modifié  
ASGR : Récepteur de l'asialoglycoprotéine  
ATP : Adénosine Tri-phosphate  
BMP : Bone Morphogenetic Protein  
C/EBP $\alpha$  : CCAT-enhancer binding protein  
Cas : CRISPR-associated protein  
CCl<sub>4</sub> : Tétrachlorure de carbone (chloroforme)  
CEA : Cellules épithéliales amniotiques  
CETP : Cholesteryl ester transfer protein  
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
CNV : Variation du nombre de copies  
CoA : Coenzyme A  
crRNA : ARN CRISPR  
CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées)  
CSM : Cellules Souches Mésenchymateuses  
CSP : Cellules souches pluripotentes  
CYP : Cytochrome P450  
DENV : Virus de la dengue  
DMLA : Dégénérescence maculaire liée à l'âge  
DPI : Diagnostic pré-implantatoire  
EGF : Epithelial Growth Factor  
ELAD : Extracorporeal Liver Assist Device  
EPCAM : Epithelial Cell Adhesion Marker  
FA : fatty acids (acides gras)  
FAH : Fumarylacétoacétate Hydrolase

FGF : Fibroblast Growth Factor  
FOX : Forkhead Box Protein  
G6P : glucose-6-phosphatase  
GMP : Good Manufacturing Practices (Bonnes pratiques de fabrication)  
GS : Glutamine synthase  
GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3  
HCVcc : Hepatitis C Virus cell culture  
HCVpc : Hepatitis C Virus primary culture  
HDL : High-Density Lipoproteins (lipoprotéines de haute densité)  
HDR : Homologous Directed-Repair (réparation par recombinaison homologue)  
hESC : human Embryonic Stem Cells (Cellules souches embryonnaires humaines)  
HF : Hypercholestérolémie familiale  
hiPSC : human induced Pluripotent Stem Cells (Cellules souches pluripotents induites humaines)  
HMG-CoA : hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A  
HMGCR : hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase  
HNF : Hepatocyte Nuclear Factor  
HPD : Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase  
HPRT : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase  
HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cells  
IDL : Intermediate-Density Lipoproteins (lipoprotéines de densité intermédiaire)  
IL : Interleukine  
INSIG1 : Insuline-induced gene 1 protein  
LDL : Low-Density Lipoproteins (lipoprotéines de basse densité)  
LDL-c : LDL circulants  
LDLRAP1 : LDL Receptor Adapter Protein 1  
LPV : Lipoviroparticule  
LRP : Low density lipoprotein-related protein  
LSEC : Liver Sinusoidal Endothelial Cells (cellules endothéliales sinusoidales du foie)  
LXR $\alpha$  : Liver X Receptor  $\alpha$   
MARS : Molecular Adsorbent Recirculating System  
MEF : Mouse embryonic fibroblasts (fibroblastes embryonnaires murins)  
miRNA : micro-ARN  
MMP : Métalloprotéases matricielles  
MNs : Méganucléases  
MTP : Protéine de transfert microsomal des triglycérides  
NHEJ : Non-Homologous End-Joining  
NPC1L1 : Niemann–Pick C1-like 1  
NS : Protéine non structurales  
OCT : Octamer-binding Transcription Factor  
OSM : Oncostatine M  
PAM : Protospacer Adjacent Motif (motif protospacer adjacent)  
PB : Transposon piggyBac  
PCSK9 : Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase  
RLDL : Récepteur des LDL  
rgRNA : RNA-targeting guide RNA (ARN guide ciblant un ARN)  
RPE : Retinal pigment epithelium (épithélium pigmentaire rétinien)  
RT-PCR : Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction  
sLDLR : LDL soluble  
SeV : Virus Sendaï  
sgRNA : ARN guide  
SNC : Système nerveux central  
SOX : SRY-box  
SCAP : SREBP Cleavage-Activating Protein  
siRNA : Petit ARN interférent  
SRB1 : Scavenger Receptor B1  
SRE : Sterol Regulatory Element  
SREBP2 : Sterol Regulatory Element Binding Protein 2  
SRY : Sex determining region Y  
SSEA : Stage-Specific Embryonic Antigen  
TALENs : Transcription Activator-like effector nucleases (nucléases effectrices de type activateur de transcription)  
tracrRNA : ARN trans-activateur  
TG : Triglycérides  
TGF : Transforming Growth Factor  
TNF $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$   
UDP : Uridine diphosphate  
UGT : UDP-glucuronosyltransferase  
uPA : Urokinase plasminogen activator  
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor  
VHB : Virus de l'Hépatite B  
VHC : Virus de l'Hépatite C  
VLDL : Very Low-Density Lipoproteins (lipoprotéines de très basse densité)  
VSV : Virus de la Stomatite Vésiculeuse  
WHHL : Lapin Watanabe Heritable Hyperlipidemic  
ZFNs : Zinc Finger nucleases (nucléases à doigt de zinc)

# *Introduction*

---

## **CHAPITRE 1 : Le foie**

### **I. Anatomie et composition cellulaire du foie**

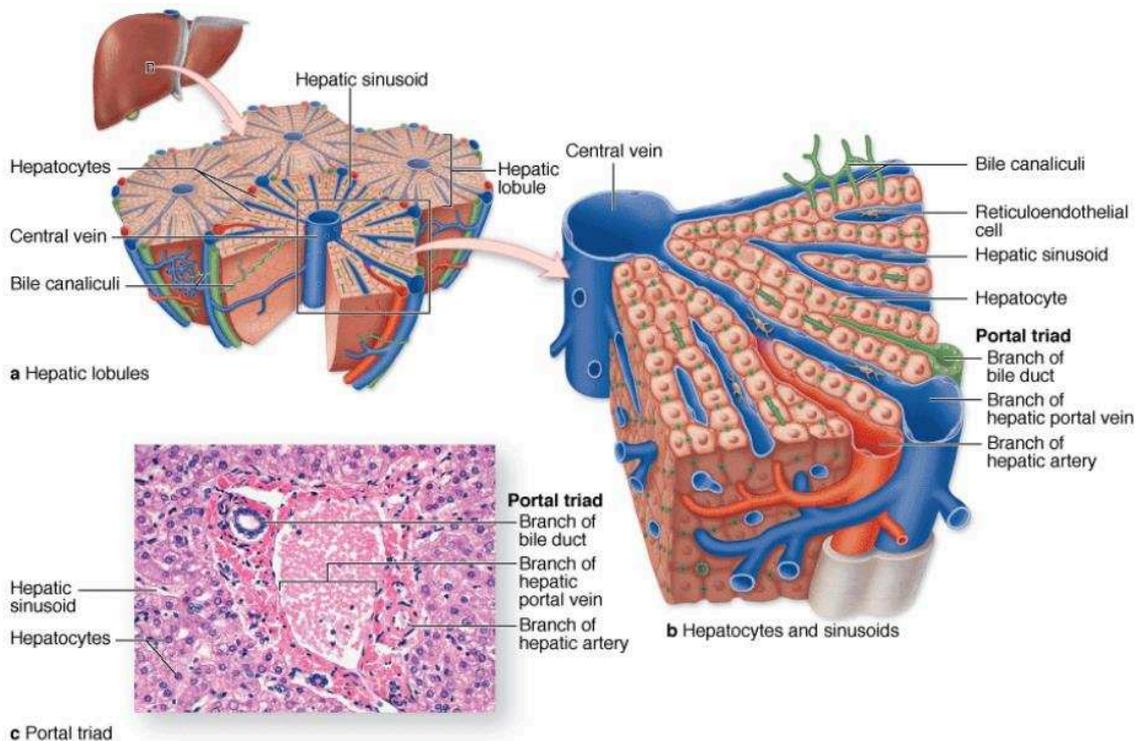
#### **A. Structure et fonctions de l'organe adulte**

Le foie est l'organe interne le plus volumineux du corps humain, pesant environ 1500 grammes chez l'adulte (soit 2,5% du poids corporel). Il est entouré d'une enveloppe conjonctive, appelée capsule de Glisson, dont les invaginations permettent de délimiter deux lobes principaux, le lobe droit et le lobe gauche ainsi que deux lobes annexes, le lobe caudé et le lobe carré. C'est un organe extrêmement vascularisé, ce qui lui confère cette couleur rouge foncé, et qui possède une double vascularisation afférente et une efférente. La vascularisation afférente est composée de deux vaisseaux majeurs : l'artère hépatique propre qui apporte l'oxygène et la veine porte qui constitue la vascularisation fonctionnelle de l'organe puisqu'elle draine le sang en provenance du tube digestif et apporte diverses substances (nutriments mais également toxines, médicaments ou xénobiotiques) qui seront transformées pendant leur passage dans le foie. Une fois filtré, le sang retourne alors au cœur par l'intermédiaire des veines hépatiques qui se jettent dans la veine cave inférieure (vascularisation efférente). Le foie est également traversé par de nombreux canaux biliaires qui collectent la bile sécrétée et la mène dans le canal hépatique pour la drainer hors de l'organe.

La position anatomique privilégiée du foie par rapport à la circulation sanguine et son organisation histologique très structurée lui permettent d'accomplir ses fonctions métaboliques spécifiques de synthèse, catabolisme et de stockage de nombreux composés et nutriments. Il assure ainsi le métabolisme de nombreuses protéines (synthèse de protéines plasmatiques, d'albumine et de facteurs de coagulation, dégradation de l'ammoniac provenant des acides aminés en urée), des glucides (glucose et glycogène, maintien de la glycémie) et des lipides (cholestérol). Il est également la réserve d'une multitude de substances comme la vitamine A, le fer ou le cuivre. Enfin, étant doté d'un système enzymatique très riche, il est l'organe de détoxification de toutes les substances toxiques (xénobiotiques ou métabolites endogènes nocifs) qui arrivent notamment par la circulation du tube digestif en les empêchant de passer dans la circulation générale. Pour cela, différents types de réactions sont mises en œuvre comme l'oxydation, l'hydrolyse ou encore la conjugaison.

L'unité fonctionnelle du foie est appelée lobule hépatique. De forme polyédrique, ce dernier s'organise autour de la veine centrolobulaire et est entouré d'espaces portes (ou triades portales) comprenant une branche de la veine porte, une branche de l'artère hépatique et un canal biliaire (**Figure 1**). Le parenchyme de ces lobules est majoritairement composé

d'hépatocytes organisés en travées monocellulaires séparées par les capillaires sanguins ou sinusoides. Les canalicules biliaires drainent la bile vers le canal biliaire en sens inverse de la circulation sanguine. La jonction entre le canal biliaire et les travées hépatocytaires se fait via le canal de Hering.



**Figure 1.** Architecture du foie et du lobule hépatique<sup>1</sup>

(A) Le foie est organisé en lobules hépatiques autour de la veine centrolobulaire.

(B) Chaque lobule, entouré de la triade portale, est constitué de travées d'hépatocytes et de sinusoides.

(C) Représentation histologique d'un lobule hépatique

## B. Populations cellulaires

Le foie adulte est composé de deux catégories cellulaires distinctes : les hépatocytes ou cellules parenchymateuses et les cellules non parenchymateuses subdivisées elles-mêmes en 5 types cellulaires différents interagissant entre eux pour le bon fonctionnement de l'organe (**Figure 2**).

### 1. Les hépatocytes

Cellules épithéliales polygonales représentant 60% du nombre total des cellules du foie et 80% de la masse hépatique, les hépatocytes sont des cellules d'environ 30µm de diamètre, mono- ou binucléées, le degré de ploïdie évoluant avec l'âge. Ils sont impliqués dans un grand nombre de fonctions hépatiques comme le métabolisme, la synthèse ou encore le stockage<sup>2</sup> et sont polarisées selon trois pôles assurant des fonctions particulières :

\_ Le pôle sinusoidal est situé au niveau de la face basolatérale de l'hépatocyte et est en contact avec la matrice extracellulaire de l'espace de Disse (espace situé entre les hépatocytes et les vaisseaux sanguins) et les cellules endothéliales des sinusoides. Les villosités de la

membrane plasmique à ce pôle augmentent la surface d'échange avec le sang assurant ainsi la sécrétion et l'absorption d'hormones et d'autres métabolites ainsi que la captation des xénobiotiques.

\_ Le pôle biliaire ou apical permet quant à lui la sécrétion des acides biliaires dans les canalicules biliaires. Ces derniers dans lesquels est déversée la bile ne possèdent pas de membrane propre mais consistent en un sillon ménagé entre les membranes plasmiques de deux hépatocytes adjacents au sein d'une même travée. Ils constituent le point de départ du système de collecte et d'évacuation de la bile.

\_ Le pôle latéral assure la cohésion entre les hépatocytes voisins par le biais de jonctions intermédiaires et serrées et les échanges inter-hépatocytaires par la présence de jonctions de type gap.

## 2. Les cholangiocytes

Cellules épithéliales qui tapissent les canaux biliaires extra- et intrahépatiques ainsi que la vésicule biliaire, les cholangiocytes représentent 3 à 5% de la masse hépatique. Par l'expression de diverses protéines (transporteurs, canaux ioniques ou échangeurs), ils contrôlent notamment la composition, le pH ainsi que le transport de la bile à l'extérieur du foie<sup>3</sup>. Contrairement à d'autres cellules épithéliales, les cholangiocytes sont morphologiquement et fonctionnellement hétérogènes. On distingue les petits cholangiocytes aux capacités prolifératives et les grands impliqués dans la sécrétion de la bile<sup>4</sup>.

## 3. Les cellules de Kupffer

Localisées dans les lumières des sinusoides, les cellules de Kupffer représentent 20% des cellules non parenchymateuses et assurent le rôle de macrophages hépatiques. Elles sont les premières cellules en contact avec le sang provenant du tube digestif et donc avec des organismes potentiellement toxiques comme les virus ou les bactéries<sup>5</sup>. Elles interviennent également dans la sécrétion de diverses cytokines inflammatoires comme le Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) ou l'interleukine 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ).

## 4. Les cellules de Ito

Egalement appelées cellules stellaires hépatiques, les cellules de Ito sont situées dans l'espace de Disse. De morphologie étoilée, elles sont principalement responsables de la synthèse de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire comme certains types de collagène ou la fibronectine. Elles ont également un rôle important dans le stockage des graisses et de la vitamine A via leurs gouttelettes lipidiques cytoplasmiques<sup>6</sup>.

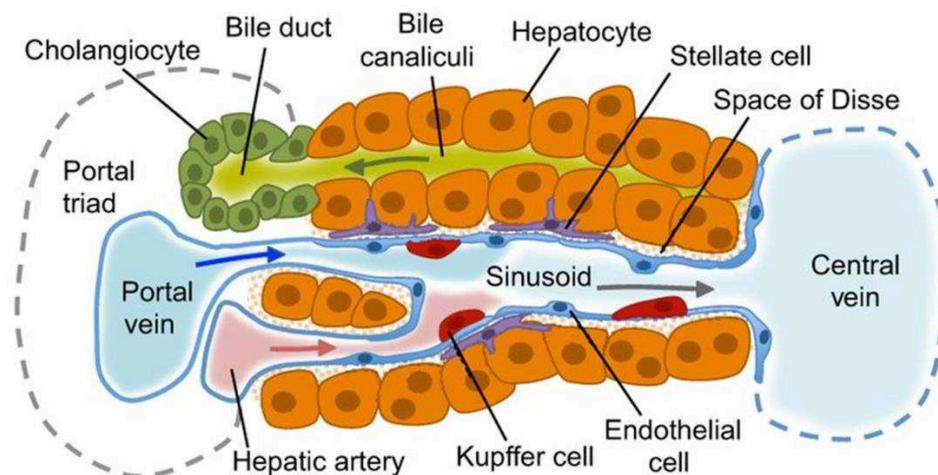
## 5. Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sinusoidales du foie ou LSEC bordent les capillaires sinusoidaux. De forme plate, leur cytoplasme est fenêtré et elles ne possèdent pas de

membrane basale. Ces deux particularités facilitent les échanges de métabolites entre le sang et les hépatocytes sous-jacents.

## 6. Les "pit cells"

Lymphocytes de type natural-killer, les pit cells sont présentes en faible quantité dans le foie au niveau des sinusoides et de l'espace de Disse. Par leur fort pouvoir cytotoxique, elles agissent en synergie avec les cellules de Küppfer afin d'éliminer les cellules tumorales ou nécrosées ou infectées par des virus<sup>7</sup>.



**Figure 2.** Les différentes populations cellulaires hépatiques<sup>8</sup>

## II. Développement embryonnaire du foie

Des trois feuillets embryonnaires issus de la gastrulation, le foie dérive majoritairement de l'endoderme à l'origine de toutes les cellules épithéliales des systèmes respiratoire et digestif donc des hépatocytes et des cholangiocytes. Les autres types cellulaires (cellules endothéliales, de Küppfer et de Ito) dérivent du mésoderme. Les études chez la souris, le poisson zèbre et l'embryon de poulet ont permis de déterminer la série progressive d'interactions réciproques entre endoderme et mésoderme aboutissant à la formation du foie<sup>9</sup>. Pour la suite ne seront traités que les mécanismes aboutissant à la formation des hépatocytes et des cholangiocytes.

### A. Induction du tube digestif antérieur

Les mouvements morphogénétiques ayant lieu pendant la gastrulation entraînent la formation d'un tube digestif primitif d'origine endodermique entouré de mésoderme. Ce dernier sécrète différents facteurs qui spécifient le tube digestif en trois régions le long de l'axe antéro-postérieur : la région postérieure ("hindgut") caractérisée par l'expression de la protéine caudal-type homeobox (Cdx), la région thoracique ("midgut") où s'exprime la protéine pancreatic and duodenal homeobox 1 (Pdx1) et la région antérieure ("foregut") où la protéine hematopoietically-expressed homeobox protein (Hhex) peut être détectée<sup>10</sup>. Des

travaux de traçages cellulaires chez la souris ont permis de montrer que les précurseurs communs au foie, à la vésicule biliaire, au pancréas et au poumon étaient situés dans la région latérale de l'endoderme ventral antérieur<sup>11</sup>.

D'autres études, notamment chez le Xénope, ont mis en évidence les protéines de la famille Wnt et la protéine Fibroblast Growth Factor 4 (FGF4) comme principaux régulateurs de l'identité régionale du tube digestif. La sécrétion de ces facteurs par le mésoderme postérieur promeut l'induction en tube digestif postérieur alors que l'endoderme antérieur sécrète des inhibiteurs de ces signaux entraînant une différenciation en tube digestif antérieur<sup>12,13</sup>.

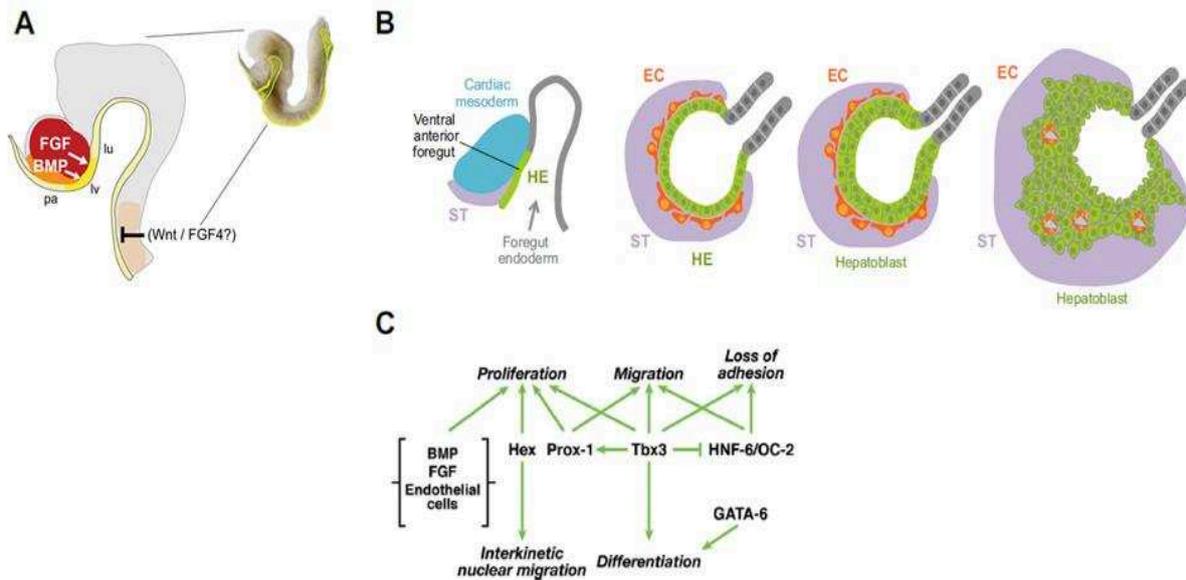
## **B. Spécification hépatique**

Une fois l'endoderme définitif établi (au début de la 3<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'Homme et à E8.5 chez la souris), une partie des cellules le constituant va recevoir les signaux nécessaires à sa spécification hépatique. Ces signaux proviennent de l'ébauche cardiaque dont l'endoderme antérieur est proche et du septum transversum (constituant du futur diaphragme) qui les sépare (**Figure 3A**).

Le mésoderme cardiaque sécrète des facteurs de la famille des FGF, notamment FGF1 et FGF2, nécessaires à l'induction du destin hépatique d'une partie de l'endoderme antérieur. L'ajout exogène de ces facteurs sur des explants murins d'endoderme antérieur a permis l'induction hépatique<sup>14</sup>, suggérant leur implication dans la suite du développement. La concentration de ces facteurs est également une donnée clé car si elle est trop élevée, l'induction sera de type pulmonaire alors que si elle est trop faible, l'endoderme antérieur se différenciera en pancréas<sup>15</sup>. Par sa localisation entre l'ébauche cardiaque et une partie de l'endoderme antérieur, le septum transversum semble donc permettre à ce dernier de recevoir une concentration intermédiaire des facteurs FGF1 et FGF2.

Le septum transversum sécrète pour sa part des protéines de la famille des Bone Morphogenetic Protein (BMP) et plus particulièrement BMP2 et BMP4. En synergie avec le FGF2, ces facteurs permettent le développement du futur foie, leur inhibition empêchant tout développement hépatique<sup>16</sup>.

L'endoderme antérieur exprime les facteurs de transcription Forkhead Box Protein (FOX) A1 et FOXA2 ainsi que GATA4. Ces protéines se fixent alors sur des régions activatrices du gène de l'albumine pour décompacter la chromatine et ainsi permettre la fixation dans cette région d'autres facteurs de transcription comme CCAT-enhancer binding protein (C/EBP $\alpha$ ) entraînant ainsi la synthèse de l'albumine<sup>17,18</sup>.



**Figure 3.** Morphogénèse du bourgeon hépatique

(A) L'endoderme ventral antérieur reçoit des signaux FGF et BMP du mésenchyme environnant<sup>19</sup> qui entraîne (B) la prolifération et la délamination des hépatoblastes créant ainsi le bourgeon hépatique<sup>8</sup> (C) sous étroite régulation d'un réseau transcriptionnel interconnecté<sup>20</sup>.

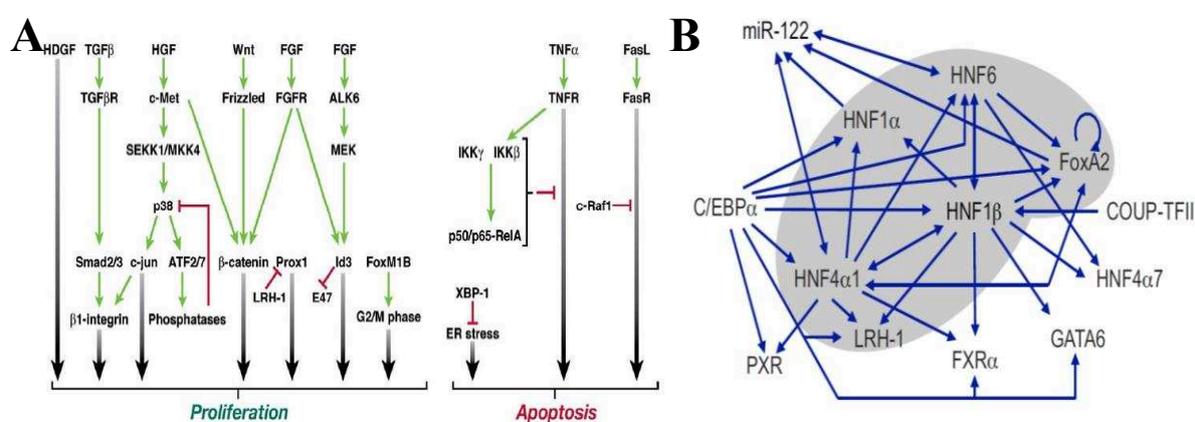
### C. Formation et croissance du bourgeon hépatique

Très peu de temps après la spécification hépatique (au 22<sup>ème</sup> jour de gestation chez l'Homme et à E8,75 chez la souris), les cellules de l'endoderme expriment des gènes hépatiques comme Hepatocyte Nuclear Factor (HNF) 4 $\alpha$  et l'albumine. Sous l'influence d'Hex, ces cellules changent alors de morphologie pour passer d'un épithélium monocouche aux cellules cuboïdes à un épithélium pluristratifié aux cellules plus allongées appelées désormais hépatoblastes. Ces derniers forment une structure appelée diverticule hépatique et sont bordés par une membrane basale constituée notamment de collagène IV, de laminine, de fibronectine et de protéoglycans (**Figure 3B**)<sup>21</sup>.

L'expression de deux protéines de la famille des métalloprotéases matricielles (MMP), MMP2 par le septum transversum et MMP14 à la membrane des hépatoblastes, permet la migration des hépatoblastes au travers de cette membrane basale et l'invasion du septum transversum entraînant la formation du bourgeon hépatique<sup>22</sup>. Celle-ci s'accompagne d'une transition épithélio-mésenchymateuse caractérisée par une perte de la morphologie épithéliale et de l'expression de la protéine E-cadhérine. Cette transition est régulée par un réseau de gènes qui permettent notamment de garder l'état différencié des hépatoblastes (*GATA6*) ainsi que d'assurer leur motilité (*T-box transcription factor TBX3*, *Hepatocyte Nuclear Factor 6 (HNF6)*) (**Figure 3C**)<sup>20</sup>.

Les hépatoblastes continuent à proliférer sous l'influence de nombreux facteurs (**Figure 4A**). Le septum transversum et les cellules endothéliales du foie fœtal sécrètent l'Hepatocyte Growth Factor (HGF) dont le récepteur, c-Met, se trouve à la surface des hépatoblastes. La liaison ligand/récepteur induit une cascade de signalisation médiée par

SEK1/MKK4 qui entraîne cette prolifération. Par l'intermédiaire de la voie de signalisation SMAD2/SMAD3, le facteur Transforming Growth Factor (TGF)  $\beta$ , en synergie avec HGF, active la bêta-intégrine 1, nécessaire à la prolifération cellulaire<sup>20</sup>. Les différents facteurs de croissance des familles FGF et BMP, déjà présents dans les stades de différenciation précédents, continuent à jouer un rôle dans le développement et la prolifération hépatique. De même, la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, qui agissait comme répresseur de l'entité hépatique, favorise à ce stade la croissance hépatique par l'intermédiaire de Wnt9a<sup>12</sup>. L'acide rétinoïque induit quant à lui la production de facteurs trophiques dans les cellules du mésoderme comme le Wilms' tumor suppressor gene 1 (WT1) qui agit sur la prolifération<sup>23</sup>. Enfin, le TNF $\alpha$  induit une cascade de signalisation qui active la protéine NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B) permettant de protéger les hépatoblastes en croissance de l'apoptose induite par TNF $\alpha$ <sup>24</sup>.



**Figure 4.** Régulation de la croissance du bourgeon hépatique et de la différenciation hépatocytaire

(A) Voies de signalisation impliquée dans la prolifération des hépatoblastes<sup>20</sup>.

(B) Boucles de régulations croisées permettant la différenciation des hépatoblastes en hépatocytes<sup>25</sup>.

#### D. De l'hépatoblaste à l'hépatocyte et au cholangiocyte

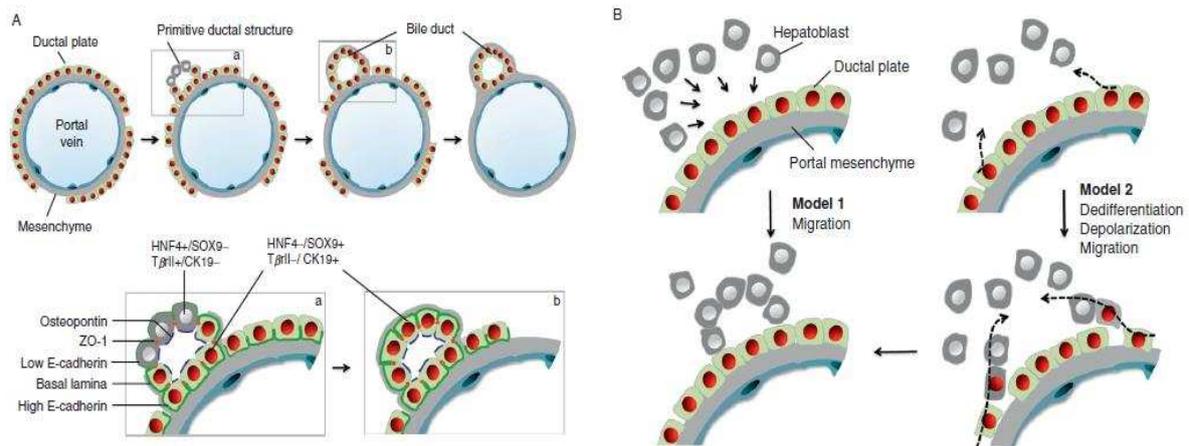
Les hépatoblastes sont des cellules bipotentes capables de se différencier soit en hépatocytes soit en cholangiocytes sous l'influence de facteurs différents. Le HGF joue un rôle prépondérant dans le devenir de l'hépatoblaste en hépatocyte par la stimulation de l'expression de C/EBP $\alpha$ . Une fois l'engagement vers la voie hépatocytaire effectué, la différenciation en cellules matures est régulée par un réseau interconnecté (boucles d'auto-régulation et de régulations croisées) composé de six facteurs de transcription principaux : HNF4 $\alpha$ , HNF1 $\alpha$ , HNF1 $\beta$ , HNF6, FOXA2 et le Liver Receptor Homolog 1 (LRH1) dont le knock-out d'un seul d'entre eux entraîne une diminution des marqueurs et de la fonctionnalité hépatocytaires<sup>26</sup> (**Figure 4B**). HNF4 $\alpha$  est également essentiel au maintien de l'état différencié de l'hépatocyte adulte par son rôle de co-activateur de HNF1 $\alpha$ , lui-même impliqué dans l'expression de protéines hépatocytaires spécifiques (comme l'albumine, l' $\alpha$ -1 anti trypsine (A1AT) et l'aldolase B)<sup>27</sup>.

L'environnement extra-cellulaire joue également un rôle très important pour la maturation hépatocytaire. Le foie fœtal est le site majeur de l'hématopoïèse et les cellules

hématopoïétiques sécrètent de manière abondante une cytokine de la famille de l'IL-6, l'oncostatine M (OSM). Cette dernière se lie au récepteur GP130 présent à la surface des hépatoblastes et active la voie de signalisation JAK/STAT3 qui va induire l'expression de gènes métaboliques majeurs comme celui de la glucose-6-phosphatase (G6P) codant pour une enzyme essentielle à la néoglucogenèse<sup>28</sup>.

Outre l'activation et l'acquisition de gènes liés à un phénotype hépatocytaire mature, la répression de certains marqueurs fœtaux est également nécessaire à la différenciation en cellules pleinement matures. Parmi eux, l'Hepatoma-Derived Growth Factor (HDGF), produit par les hépatoblastes fœtaux afin de stimuler leur prolifération, est totalement indétectable dans les hépatocytes adultes<sup>29</sup>. De la même façon, le gène codant pour l' $\alpha$ -fetoprotéine (AFP) est réprimé dès la naissance, lorsque les hépatocytes post-nataux se différencient. Deux répresseurs transcriptionnels de cette protéine exprimés de manière plus abondante dans le foie adulte que dans le foie fœtal ont été identifiés : le Zinc finger and homeoboxes Factor 2 (ZFX2)<sup>30</sup> et le Zinc finger factor ZBTB20<sup>31</sup>. Certaines protéines, comme HNF4 $\alpha$  ou le cytochrome P450 CYP3A, possèdent plusieurs isoformes. La différenciation hépatocytaire induit l'expression préférentielle des isoformes adultes (HNF4 $\alpha$ 1 et CYP3A4) par rapport aux isoformes fœtales (HNF4 $\alpha$ 7 et CYP3A7).

Parallèlement à la différenciation hépatocytaire, certains hépatoblastes vont se différencier en cellules biliaires, les cholangiocytes. Une monocouche de cellules hépatoblastiques localisées autour de la veine porte va former la plaque ductale, constituée de précurseurs des cholangiocytes exprimant des marqueurs biliaires spécifiques comme SRY (sex determining region Y)-box 9 (SOX9)<sup>32</sup>. Autour de la 12<sup>ème</sup> semaine de gestation, des structures luminales préfigurant les futurs canaux biliaires, nommées structures ductales primitives, sont décelables. La morphogenèse de ces structures est unique car elle se caractérise par une asymétrie transitoire (**Figure 5A**). En effet, du côté portal, la lumière du tube est bordée des cellules précurseurs des cholangiocytes (exprimant les marqueurs biliaires SOX9 ou l'ostéopontine) alors que du côté parenchymateux, elle est bordée par des cellules hépatoblastiques (exprimant des marqueurs comme HNF4  $\alpha$ ) qui vont progressivement se différencier en cholangiocytes<sup>33</sup>. L'origine de cette asymétrie n'est pas encore pleinement établie, deux hypothèses se confrontant pour l'expliquer. La première prône une migration des hépatoblastes venant ensuite s'apposer sur la plaque ductale<sup>32</sup> et la deuxième (basée sur l'analyse *in vitro* de la formation des plaques ductales dans une lignée immortalisée d'hépatoblastes) penche pour une pliure des cellules de la plaque ductale afin de former les structures ductales primitives<sup>34</sup> (**Figure 5B**). Cette dernière est conceptuellement plus complexe car elle implique que les cellules migrent hors de la plaque ductale, se dépolarisent et se différencient pour revenir à un phénotype d'hépatoblastes. Une fois la plaque ductale formée, la sécrétion de la bile débute vers la 16<sup>ème</sup> semaine de gestation et les étapes de maturation des canaux biliaires continuent jusqu'après la naissance.



**Figure 5.** Formation de la plaque ductale<sup>33</sup>

(A) Les précurseurs biliaires forment une structure tubulaire autour de la veine porte, appelée plaque ductale, et caractérisée par une asymétrie transitoire.

(B) Les deux modèles proposés pour la génération de la plaque ductale : la migration des hépatoblastes (panel de gauche) et la dédifférenciation, dépolarisation et migration des cellules de la plaque ductale (panel de droite)

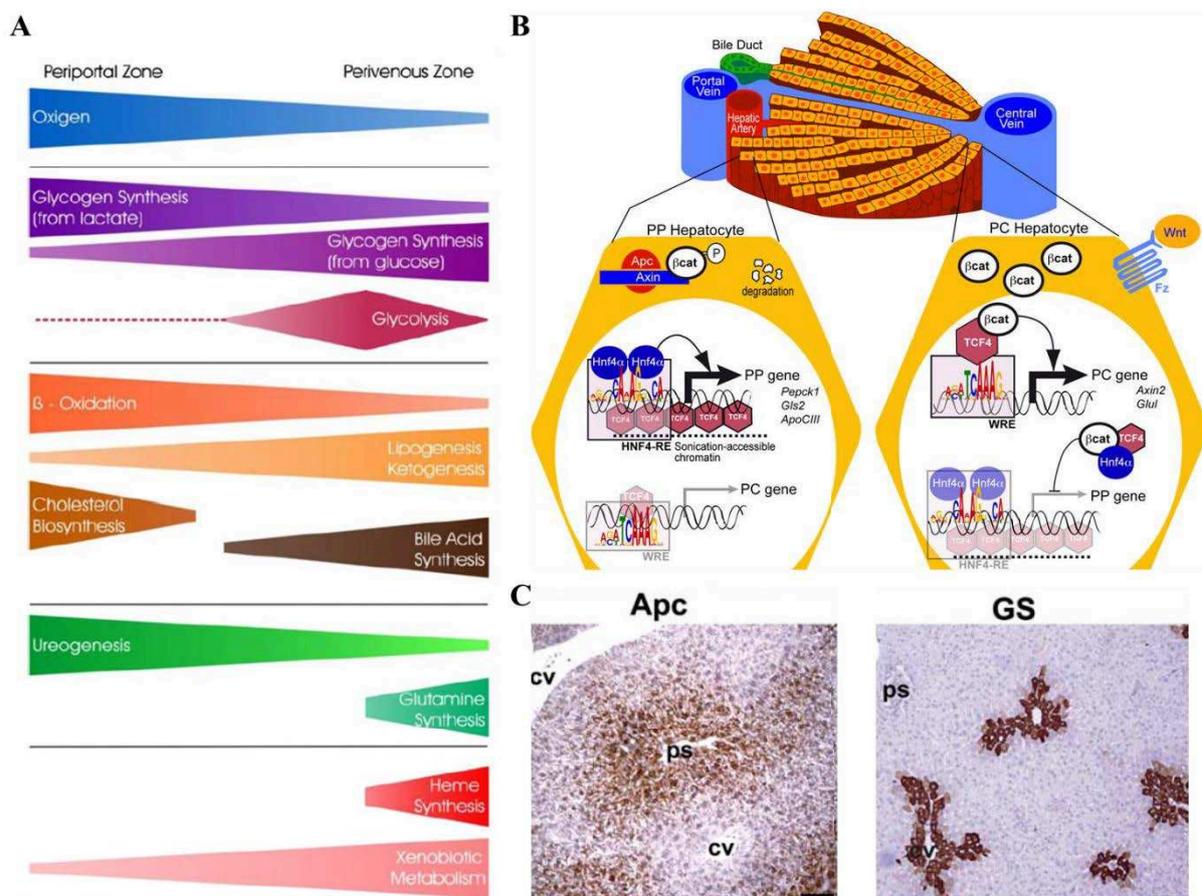
La détermination du destin biliaire est régie par différents facteurs de transcription. Au cours du développement, les hépatoblastes sont exposés à un gradient de  $TGF\beta$  en provenance du mésenchyme de la veine porte. Plus les cellules sont proches de celle-ci, plus elles reçoivent de  $TGF\beta$ <sup>35</sup>. En se liant à son récepteur,  $TGF\beta$  type II receptor ( $T\beta RII$ ), ce dernier induit donc la différenciation des hépatoblastes en cholangiocytes. Cette régulation est toutefois finement contrôlée par le ratio  $C/EBP\alpha$  (inhibiteur du récepteur et activateur de la différenciation hépatocytaire) sur  $C/EBP\beta$  (activateur du récepteur et de la différenciation biliaire) car la différenciation cholangiocytaire n'a lieu que pour les cellules entourant la veine porte<sup>36</sup>. La voie de signalisation Jagged/Notch semble également jouer un rôle important pour la destinée biliaire des hépatoblastes. *In vivo*, Jagged1 est sécrété par le mésenchyme portal et induit l'expression de Notch2 dans les hépatoblastes entourant la veine porte. La surexpression de Notch intracellulaire induit alors une stimulation des gènes biliaires et une répression des gènes hépatocytaires<sup>37</sup>. Ainsi, cette voie semble contrôler la ségrégation biliaire des hépatoblastes. Néanmoins, l'expression maintenue de Jagged1 et Notch2 dans les cholangiocytes différenciés appuie l'hypothèse selon laquelle cette voie de signalisation est également nécessaire à la différenciation et au maintien de l'identité biliaire. Le rôle des voies de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine, BMP et FGF dans ce processus reste assez difficile à expliciter et est toujours actuellement source de résultats contradictoires<sup>25</sup>.

### E. Zonation fonctionnelle des hépatocytes

Les hépatocytes situés le long de l'axe porto-central sont hétérogènes : ils n'expriment pas les mêmes panels de gènes, ne remplissent pas tous les mêmes fonctions métaboliques, n'ont pas la même sensibilité aux drogues et n'ont pas la même réponse en terme de prolifération. Ce phénomène qui se met en place dans les semaines post-natales (le foie faisant partie des organes dont le développement n'est pas terminé à la naissance) s'appelle la zonation métabolique. Au sein d'un lobule hépatique, deux zones principales peuvent être distinguées : la zone périportale autour de la veine porte et la zone péricentrale autour de la

veine centrolobulaire. Ainsi, les hépatocytes proches de la veine porte sont principalement impliqués dans la néoglucogenèse, l'uréogénèse et la synthèse du cholestérol (**Figure 6A**). Plus sensibles à l'HGF, ce sont les premiers à proliférer lors des phénomènes de régénération hépatique. Les hépatocytes proches de la veine centrolobulaire possèdent des fonctions glycolytiques et de synthèse (glutamine, lipides, acides biliaires) et sont spécialisés également dans le métabolisme des xénobiotiques (**Figure 6A**). Ils sont les derniers à proliférer après un stimulus régénératif.

La voie Wnt/ $\beta$ -caténine a été mise en évidence comme régulateur majeur de cette zonation<sup>38</sup>(**Figure 6B**). L'expression du répresseur Adenomatous Polyposis Coli (APC) de la  $\beta$ -caténine est retrouvée dans les hépatocytes périportaux quand celle de la protéine est détectée dans les hépatocytes péricentraux (**Figure 6C**). La  $\beta$ -caténine non réprimée est alors transloquée dans le noyau où elle se lie aux facteurs de transcription Lymphoid Enhancer Binding Factor 1 (LEF1) et Transcription Factor 4 (TCF4) qui activent leurs gènes cibles comme celui de la glutamine synthase (GS) (**Figure 6C**). La protéine alors synthétisée élimine l'ammoniac toxique du sang avant qu'il ne rejoigne la circulation.



**Figure 6.** Zonation métabolique des hépatocytes

(A) Les hépatocytes ont des fonctions différentes selon leur localisation au sein du lobule hépatique<sup>39</sup>

(B) L'interaction entre TCF4 et la  $\beta$ -caténine est nécessaire pour activer les gènes cibles comme celui de la glutamine synthase. Celle-ci n'est possible que dans la zone périportale où APC n'est pas exprimé (adapté de<sup>40</sup>).

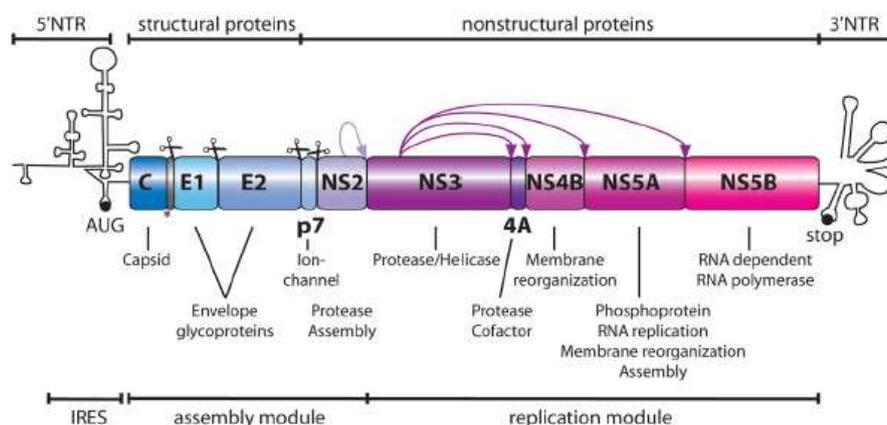
(C) Immunohistochimie montrant la localisation d'APC autour de la veine porte (ps = portal space) et de la glutamine synthase (GS) autour de la veine centrolobulaire (cv = central vein)<sup>38</sup>

Outre les substances toxiques, les hépatocytes matures sont également la cible de nombreux virus parmi lesquels le virus de l'hépatite C.

### III. Le virus de l'hépatite C

Le virus de l'hépatite C (VHC), découvert en 1989, est un virus enveloppé à ARN simple brin positif de la famille des *Flaviviridae* et possède une variété génomique assez importante. Il existe en effet six géotypes principaux et de nombreux sous-types qui n'influent pas dans l'évolution de la maladie mais jouent notamment sur la réponse au traitement. L'infection par le VHC touche environ 3% de la population mondiale soit 170 millions de personnes, avec des disparités fortes selon les régions du globe (jusqu'à 22% de personnes infectées en Egypte par exemple<sup>41</sup>) ce qui en fait un problème de santé majeur et international. Sa transmission s'effectue principalement par contact avec un objet souillé par du sang contaminé (seringues mal nettoyées chez les utilisateurs de drogue, pratiques rituelles comme la circoncision ou les tatouages avec des outils infectés, etc.) et dans une moindre mesure, après un rapport sexuel à risque. L'infection est dans un premier temps asymptomatique mais les infections chroniques finissent par provoquer des fibroses et des cirrhoses pouvant déboucher sur des carcinomes hépatocellulaires chez les patients<sup>42</sup>.

#### A. Génome du VHC



**Figure 7.** Organisation du génome viral du VHC<sup>43</sup>

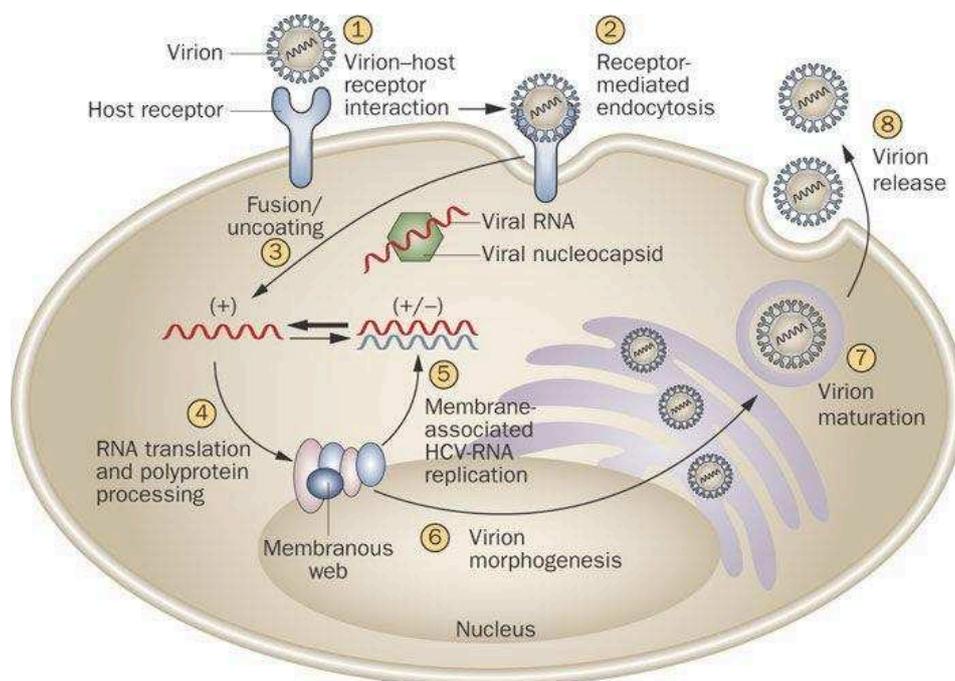
Les ciseaux et les flèches indiquent respectivement les sites de clivage médiés par les protéases cellulaires et virales.

La traduction de l'ARN viral, d'une longueur de 9600 nucléotides, entraîne la synthèse d'une polyprotéine clivée co- et post-traductionnellement à la fois par les protéases virales et celles de la cellule hôte en 10 protéines finales<sup>44</sup> (**Figure 7**). Ces dernières peuvent être classées en 2 catégories avec d'un côté les protéines structurales (la protéine de capsid, les deux glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 et la protéine p7) et de l'autre les protéines non structurales, qui assurent les fonctions enzymatiques nécessaires au cycle viral (Non-Structural proteins (NS) 2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B). La protéine de capsid forme, avec l'ARN viral, l'intérieur du virus, enveloppé par les deux glycoprotéines E1 et E2,

impliquées dans le processus d'entrée du VHC. NS2 et p7 sont requises pour l'assemblage complet du virus ; NS3, activée par NS4A, est impliquée dans la réplication du génome viral via sa fonction hélicase ; NS4B induit le remodelage membranaire du réticulum endoplasmique de la cellule infectée formant le "membranous web" ; NS5A est nécessaire à la réplication et à l'assemblage du virus et, enfin, NS5B est la polymérase virale ARN-dépendante<sup>43</sup>.

## B. Cycle viral du VHC

Les hépatocytes sont les cellules préférentiellement infectées par le VHC bien que ce dernier soit également capable d'infecter d'autres cellules comme les cellules hématopoïétiques<sup>45</sup>. *In vivo*, les particules de HCV circulantes présentent une grande variabilité de densité, allant de 1,03 à 1,2 g/cm<sup>3</sup><sup>46</sup> qui s'explique par le fait que les particules virales sont associées à de nombreux composants des lipoprotéines (comme l'apolipoprotéine E (ApoE), l'ApoB, l'ApoC1, l'ApoC2 et l'ApoC3) ce qui leur vaut le nom de lipoviriparticules (LPV)<sup>47</sup>. Le cycle viral peut être décomposé en 3 grandes étapes : l'entrée du virus, sa réplication et finalement, sa morphogénèse (assemblage, maturation et relargage) (**Figure 8**).



**Figure 8.** Cycle du virus de l'hépatite C<sup>48</sup>

Le VHC se lie à différents récepteurs membranaires (1) qui vont entraîner son endocytose (2). Les membranes de la vésicule d'endocytose et du VHC vont fusionner libérant ainsi le virus dans la cellule (3). Là, il va être traduit une première fois et les protéines virales vont remodeler le réticulum endoplasmique (4) pour promouvoir sa réplication (5). Le virus va ensuite s'assembler dans la cellule (6) avant d'être mûri via les gouttelettes lipidiques (7) puis sécrété (8).

Le mécanisme par lequel les LPV se lient puis entrent dans les cellules n'est pas encore totalement élucidé. Plusieurs protéines membranaires sont semble-t-il impliquées dans ce processus permettant l'ancrage du VHC sur la cellule avant une phase de roulement sur la membrane puis finalement son endocytose. Il a été montré que le VHC se liait aux

glycosaminoglycanes présents sur les héparanes sulfate, notamment le syndécan 1<sup>49</sup> et le syndécan 4<sup>50</sup>. Cette interaction semble médiée par l'ApoE présente sur les LPV plutôt que par une des glycoprotéines d'enveloppe du virus<sup>51</sup>. Le VHC interagit ensuite avec la protéine membranaire Scavenger receptor class B member 1 (SRB1) à la fois via sa lipoprotéine associée et sa glycoprotéine d'enveloppe E2<sup>52</sup> avant une nouvelle interaction avec la tétraspanine CD81<sup>53</sup>. Cette dernière est l'une des protéines les plus importantes pour l'entrée du VHC dans les cellules. Elle forme un complexe avec la claudine 1 qui permet le déclenchement de l'internalisation du virus dans des vésicules à manteau de clathrine<sup>54</sup>. D'autres protéines, comme l'occludine<sup>55</sup> et Niemann–Pick C1-like 1 (NPC1L1)<sup>56</sup> semblent également jouer un rôle dans l'entrée du virus mais celui-ci reste encore à clarifier. De la même façon, le rôle exact du récepteur des lipoprotéines de basse densité (RLDL) dans le cycle viral du VHC est à l'heure actuelle toujours débattu (voir chapitre 3).

Après fusion des membranes de la vésicule d'endocytose et du VHC, la nucléocapside (qui contient l'ARN viral) est libérée dans le cytoplasme de la cellule. Le génome viral est alors traduit dans le réticulum endoplasmique rugueux et la polyprotéine formée est alors modifiée comme décrit dans le paragraphe précédent. Sous l'action de NS4B se forme le "membranous web" constitué de vésicules à double couche de membrane contenant les protéines non structurales et l'ARN du VHC, ainsi que des membranes du réticulum endoplasmique et des gouttelettes lipidiques<sup>57</sup>. C'est dans ce réseau qu'a lieu la réplication du génome viral médiée par NS5B qui produit un ARN intermédiaire à brin négatif, nécessaire pour produire de nouveaux ARN à brin positif. Ces derniers peuvent être à nouveau traduits pour former de nouvelles protéines virales ou servir de base à un nouveau cycle de réplication ou encore être intégrés dans les particules infectieuses nouvellement assemblées.

Les processus d'assemblage et de relargage des particules virales ne sont pas encore pleinement élucidés. Néanmoins, ils semblent étroitement liés au métabolisme lipidique de la cellule<sup>58</sup>. En effet, l'infection par le VHC induit un changement drastique de la distribution intracellulaire des gouttelettes lipidiques passant d'une distribution uniforme dans le cytoplasme dans une cellule classique à une forte accumulation périnucléaire dans les cellules infectées<sup>59</sup>. L'association génome/protéines virales avec les gouttelettes lipidiques semble donc cruciale pour la formation de nouveaux virions, le blocage de cette interaction entraînant une absence de production virale<sup>60</sup>. Les nouveaux virions formés ont en effet une forte teneur en lipides, contiennent de multiples copies d'apolipoprotéines, notamment l'ApoE et sont excrétés par les voies de sécrétion constitutive.

### **C. Traitements disponibles**

A l'heure actuelle, contrairement aux hépatites A et B, il n'existe aucun vaccin disponible sur le marché pour prévenir le développement d'une hépatite C même si de nombreux laboratoires s'attellent depuis plusieurs années à en développer un<sup>61</sup>. Cependant, il existe des traitements médicamenteux appelés agents antiviraux directs (AAD), interférant avec le cycle viral notamment au moment de la réplication, qui permettent de guérir, d'après l'Organisation Mondiale pour la Santé, 95% des personnes prises en charge (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>).

A l'origine, le traitement de référence était l'interféron  $\alpha$  pégylé, protéine impliquée dans la réponse immunitaire, potentialisé par la ribavirine qui interfère avec un large spectre de virus par un mécanisme encore inconnu, pendant 3 à 6 mois<sup>62</sup>. Néanmoins, ce traitement n'est désormais plus recommandé par les autorités sanitaires car il est trop peu efficace par rapport aux effets secondaires qu'il induit (troubles du sommeil, anémie, neutropénie, nausées). Il existe désormais sur le marché, depuis le début des années 2010, différents AAD qui inhibent spécifiquement les protéases virales NS3 et NS4A (télaprévir, bocéprévir), la protéine d'assemblage NS5A (daclatasvir, ledipasvir) ou encore la polymérase NS5B (sofosbuvir). Le traitement actuellement recommandé comprend majoritairement, en fonction du génotype, soit le sofosbuvir, soit le daclatasvir soit une combinaison sofosbuvir/ledipasvir<sup>63</sup>. Ces derniers sont bien mieux tolérés par les patients que le traitement originel et amènent des durées de guérison plus courtes (de l'ordre de 12 semaines).

Même si les traitements curatifs sont de plus en plus efficaces, leur accès reste limité car les patients infectés ne connaissent pas nécessairement leur situation et les prix appliqués ne permettent pas à tous de se soigner. Au-delà d'étendre cet accès au plus grand nombre, pour réduire le nombre de néo-infections, il est également très important de mettre l'accent sur la prévention et d'expliquer aux populations qu'il ne faut pas réutiliser pour quelqu'un un matériel qui a été souillé par le sang d'un autre.

## IV. Thérapie cellulaire

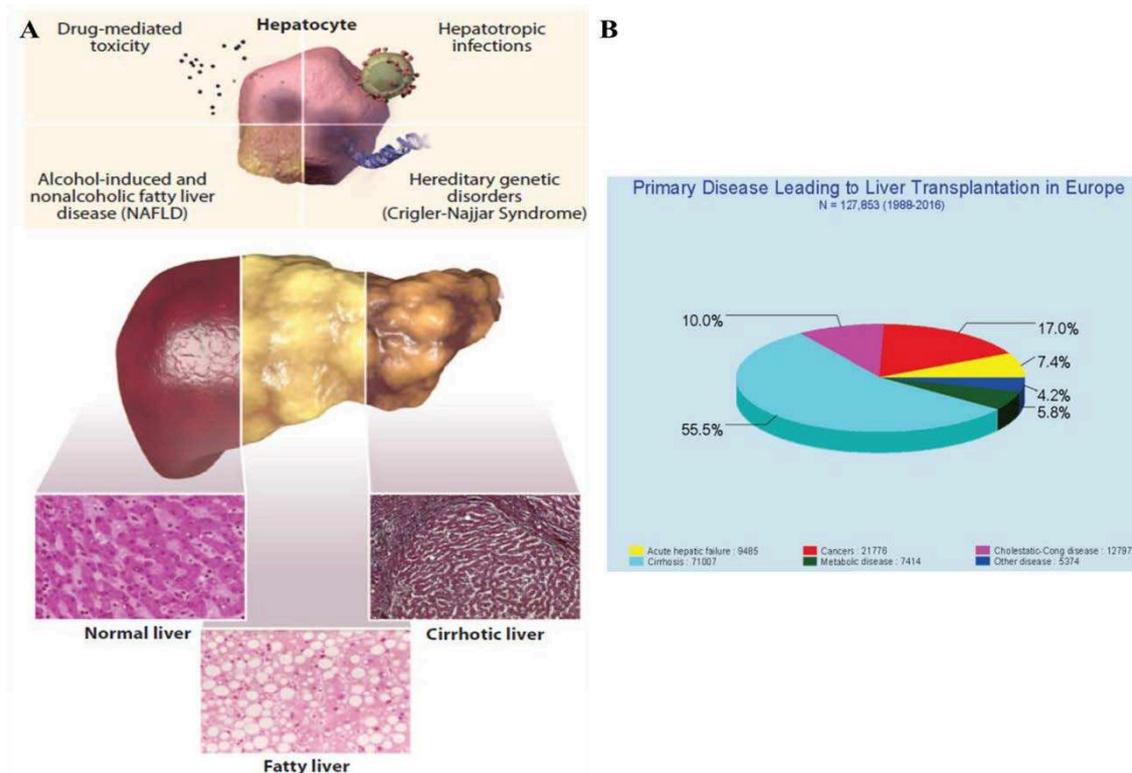
### A. La transplantation

#### 1. La transplantation orthotopique et la transplantation d'hépatocytes

A l'instar des autres organes du corps humain, le foie est touché par un nombre varié de maladies comme les cancers (carcinome hépatocellulaire ou cholangiocarcinome), les atteintes virales (hépatites A, B ou C) et les maladies métaboliques héréditaires (hémophilies, maladie de Wilson, etc.). Etant la première barrière de détoxification de l'organisme, le foie peut également être atteint par une trop grande ou trop fréquente quantité d'alcool ou de médicaments entraînant respectivement une cirrhose ou une hépatite médicamenteuse (**Figure 9A**).

Bien qu'il existe des traitements pour retarder l'évolution de ces maladies ou en soigner certains aspects, elles peuvent évoluer de manière dramatique pour les patients et mener à des insuffisances hépatiques aiguës. Dans ce cas, l'unique traitement curatif disponible est la transplantation orthotopique de foie (**Figure 9B**). Cette technique chirurgicale consiste en la transplantation d'un foie entier d'un donneur décédé en lieu et place anatomique du foie du receveur. La première intervention de ce type a été réalisée en 1963 par l'équipe du Dr Thomas Starzl à l'université du Colorado et s'est soldée par un échec. C'est quatre ans plus tard, grâce notamment aux progrès de l'immunosuppression et des techniques de préservation du greffon, que cette même équipe connaîtra ses premiers succès<sup>64</sup>. Si à l'heure actuelle, le

taux de survie à long terme est relativement élevé (88% à 1 an, 75% à 5 ans et 58% à 15 ans), la principale problématique relative à cette technique reste néanmoins la pénurie de donneurs. En 2014 par exemple, d'après les chiffres relevés par la fédération française des associations pour le don d'organes et de tissus humains (France ADOT), sur les 2347 patients candidats à une greffe hépatique, seuls 1280 ont pu en bénéficier (ratio de 1,83 receveur pour 1 foie) quand 215 sont décédés faute de greffons disponibles. A l'heure actuelle, il est donc nécessaire de trouver des alternatives afin de pallier ce manque de donneurs.



**Figure 9.** Atteintes hépatiques et transplantation orthotopique

(A) Les différentes atteintes qui induisent des dommages aux hépatocytes et déstructurent l'architecture hépatique<sup>65</sup>

(B) Taux de transplantation orthotopique en fonction des différentes maladies hépatiques de 1988 à 2016 d'après le registre européen de la transplantation hépatique (ELTR - <http://www.eltr.org/>)

Aussi, depuis plusieurs années, la transplantation d'hépatocytes est-elle envisagée comme une alternative à la transplantation orthotopique pour des maladies engageant le pronostic vital. Cela concerne essentiellement des maladies métaboliques génétiques ; toutefois, il convient également de considérer les hépatites fulminantes et certaines hépatites chroniques n'ayant pas de fibrose trop prononcée ce qui empêcherait la prise de greffe. En effet, la méthode de transplantation la plus usitée consiste à injecter les hépatocytes dans le flux sanguin au niveau de la veine porte. Ceux-ci vont alors se transloquer des sinusoides hépatiques aux régions périportales des lobules hépatiques pour s'intégrer dans le parenchyme. Dans le cas d'une insuffisance hépatique chronique comme la cirrhose où l'architecture du foie est complètement anormale et fibrotique, cette approche devient difficile à mettre en œuvre. Par rapport à la transplantation orthotopique, la transplantation d'hépatocytes est plus simple à réaliser, permet de réduire les complications post-opératoires

ainsi que le coût financier, peut être répétée et est réversible. Outre l'allogreffe, l'autogreffe d'hépatocytes génétiquement corrigés *in vitro* est également réalisable, ce qui permettrait en plus des précédents avantages, de supprimer les traitements immunosuppresseurs normalement nécessaires pendant l'intervention chirurgicale.

Les techniques d'isolement des hépatocytes sont employées depuis la fin des années 1960 et ont évolué jusqu'à des procédures standards et suivant les bonnes pratiques de fabrication ou Good Manufacturing Processes (GMP)<sup>66</sup>. Cette approche a donné des résultats encourageants dans le traitement des maladies métaboliques monogéniques héréditaires. Il est en effet estimé qu'une production de 5 à 15% de la protéine déficiente suffit à corriger le défaut phénotypique. Plusieurs études montrent ainsi des corrections phénotypiques partielles après greffes d'hépatocytes primaires, comme par exemple pour la déficience en argininosuccinate lyase (correction complète)<sup>67</sup>, le syndrome de Crigler-Najjar (correction partielle)<sup>68,69</sup>, la déficience en facteur VII (réduction de 80% du besoin de facteur VII recombinant)<sup>70</sup> ou encore l'hypercholestérolémie familiale. Dans ce dernier cas, l'équipe de James Wilson a utilisé des vecteurs dérivés de rétrovirus murins codant pour la protéine déficiente (RLDL) pour transduire les hépatocytes isolés à partir du lobe gauche d'une patiente avant de les ré-infuser ensuite dans son foie. Il en a résulté une réduction transitoire du taux de cholestérol sanguin de la patiente, démontrant la faisabilité de l'approche mais également les différentes limites (efficacité de transduction des hépatocytes *in vitro* avec ce type de vecteurs, depuis remplacés par les vecteurs lentiviraux, extinction à long terme des séquences régulatrices choisies pour le transgène et efficacité de la prise de greffe). Cette approche n'a pas été répétée depuis.

L'isolement d'hépatocytes entre toutefois en compétition avec la transplantation du foie. De ce fait, la source principale d'hépatocytes pour la transplantation cellulaire provient de foies rejetés pour la transplantation orthotopique (pas de receveurs compatibles, dommages physiques sur le greffon, problème de stérilité pendant le processus, foie très gras voire stéatosique ou encore provenant d'un patient trop âgé). Ces cellules sont donc peu disponibles et de qualité variable d'un lot à l'autre. En outre, elles ne peuvent être amplifiées *in vitro* et elles résistent mal à la cryoconservation (perte de l'intégrité membranaire entraînant une diminution de la viabilité pouvant atteindre 50% et/ou des fonctions métaboliques (dédifférenciation)). Ces deux dernières caractéristiques réduisent leur potentiel thérapeutique dans la mesure où il est nécessaire d'injecter plus de dix millions de cellules par kilogramme de poids du corps soit au minimum un milliard pour un adulte. Depuis un certain nombre d'années, des sources alternatives de cellules d'origine à la fois extrahépatique et intrahépatique sont donc à l'étude.

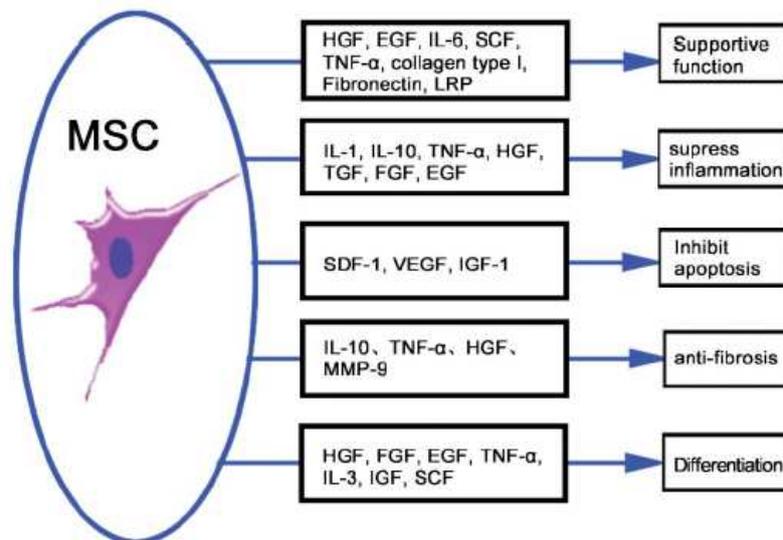
## 2. Les cellules stromales mésenchymateuses

Les cellules stromales mésenchymateuses (CSM), anciennement appelées cellules souches mésenchymateuses, sont des cellules souches adultes multipotentes non hématopoïétiques. Elles proviennent d'une variété de tissus comme la moelle osseuse, les tissus adipeux, la gelée de Wharton du cordon ombilical ou encore certains compartiments du

placenta<sup>71</sup>. D'origine mésodermique, ces cellules extrêmement plastiques et prolifératives ont un potentiel de différenciation *in vitro* en 3 grands lignages, adipogénique, chondrogénique et ostéogénique.

Néanmoins, avec les facteurs de croissances adéquats, il est également possible de différencier ces CSM en hépatocytes. De nombreux protocoles, dont le premier date de 2002, basés sur les facteurs cités dans la première partie de ce chapitre (FGF, HGF, OSM) sont désormais publiés à ce sujet<sup>72,73</sup>. *In vitro*, les hépatocytes différenciés à partir de CSM assurent des fonctions hépatiques telles que la synthèse d'albumine et d'urée, le stockage du glycogène ou l'internalisation des low-density lipoproteins (LDL)<sup>74</sup>, même si cette dernière n'est pas hépato-spécifique. Transplantées dans le foie de souris atteintes de défaillances hépatiques, ces hépatocytes différenciés à partir de CSM contribuent à une augmentation de la fonction et de la régénération hépatique<sup>75</sup>. Cependant, il n'est toujours pas certain que les CSM différenciées, une fois transplantées, améliorent les fonctions hépatiques en s'intégrant dans le parenchyme et en se différenciant réellement en hépatocytes fonctionnels. Il n'est en effet pas exclu que leur effet s'exerce par fusion cellulaire avec les hépatocytes endogènes, ce qui peut induire une instabilité génomique et une perte de chromosomes<sup>76</sup>.

Il semble toutefois désormais admis que les bénéfices de la transplantation de CSM en cas d'insuffisance hépatique sont dus non à l'expression de fonctions hépatiques par les cellules transplantées mais plutôt aux propriétés immunomodulatrices des CSM<sup>77</sup>. Ces cellules sécrètent en effet des facteurs inhibant l'apoptose des hépatocytes, la réponse inflammatoire ou encore la fibrose hépatique ainsi que d'autres, comme le HGF, qui stimulent les fonctions et la régénération des hépatocytes (**Figure 10**)<sup>78</sup>.

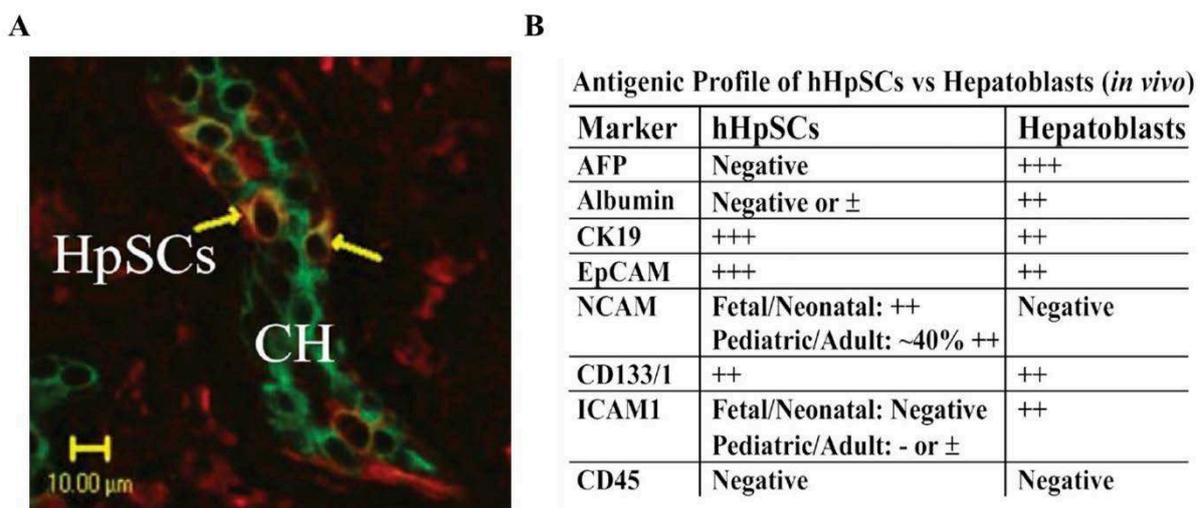


**Figure 10.** Les différents facteurs trophiques sécrétés par les CSM en cas de lésion hépatique<sup>78</sup>

EGF, Epidermal Growth Factor; FGF, Fibroblast Growth Factor; HGF, Hepatocyte Growth Factor; IGF-1, Insulin-like Growth Factor-1; IL, Interleukin; IL-1RA, Interleukin-1 Receptor Antagonist; MMP, Matrix Metalloproteinase; MSC, Mesenchymal Stem Cell; LRP, Liver-Regulating Protein; TGF- $\beta$ , Transforming Growth Factor- $\beta$ ; SCF, Stem Cell Factor; SDF-1, Stromal cell-derived Factor-1; TNF- $\alpha$ , Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ; VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor.

### 3. Les cellules progénitrices du foie

Le foie adulte est normalement quiescent avec un taux de mitoses très faible (inférieur à 0.1%) qui maintient son homéostasie. Après une hépatectomie des 2/3, la régénération hépatique s'effectue par le biais des cellules matures. Toutefois, en cas d'atteinte hépatique par des agents chimiques, comme l'alcool ou les virus, qui endommagent les hépatocytes de façon aiguë ou chronique, des cellules progénitrices des hépatoblastes sont activées. Ces dernières, appelées cellules souches du foie, permettent la génération de nouveaux hépatocytes et cholangiocytes afin de restaurer l'homéostasie hépatique<sup>79</sup>. Elles constituent environ 0.5 à 2% du parenchyme du foie et varient en taille de 7 à 10 microns de diamètre avec un rapport nucléocytoplasmique élevé. L'isolement de ces cellules, localisées dans les plaques ductales dans les foies fœtaux et dans les canaux de Hering dans les foies adultes<sup>80</sup> (**Figure 11**), a depuis été réalisé par l'équipe de Lola Reid<sup>81</sup> à l'aide du marqueur Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM). Transplantées dans des foies de souris immunodéficientes, ces cellules (fraîchement isolées et amplifiées en culture) greffent et donnent naissance au tissu hépatique, montrant ainsi leur capacité à maturer *in vivo*<sup>81</sup>.



**Figure 11.** Localisation et caractéristique phénotypique des cellules souches du foie<sup>81</sup>

(A) Les cellules souches du foie (HpSCs – Hepatic Stem Cells) sont localisées dans les canaux de Hering (CH) et expriment toutes EPCAM (en vert). Certaines sont également positives pour l'albumine (en rouge)

(B) Les différents marqueurs exprimés par les HpSCs et les hépatoblastes. A l'inverse de ces derniers, les HpSCs n'expriment pas l'AFP et peu l'albumine mais expriment la Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM)

Depuis cette première étude, les techniques d'injection hépatique de ces cellules ont été améliorées. Plutôt que de les injecter directement dans le foie, ce qui résulte en une dispersion ectopique des cellules et parfois en leur agrégation dans le système vasculaire pouvant entraîner une embolie, la même équipe les a empaquetées dans un biomatériau favorisant la prise de greffe ainsi que la survie et la croissance des cellules une fois transplantées. Ce biomatériau est constitué de protéines retrouvées dans le microenvironnement naturel de ces cellules souches (laminine, collagène et hyaluronanes) et améliore grandement l'humanisation de foies de souris immunodéficientes (de 5% par injection directe à 30% avec cette technique)<sup>82</sup>. Les premiers essais cliniques ont dès lors été engagés chez l'Homme. Deux

patients atteints d'une cirrhose avancée ont reçu une greffe de cellules souches hépatiques fraîchement isolées de foies fœtaux issus d'interruption volontaire de grossesse, sans nécessité de traitements immunosuppresseurs. Ils n'ont, pendant les douze mois post-greffe, développé aucun effet secondaire suggérant la sécurité de cette procédure. Le suivi montre une amélioration des paramètres cliniques et biochimiques (synthèse d'albumine, diminution de la bilirubine) pour une durée d'au moins six mois. Les auteurs préconisent alors une nouvelle transplantation à ce stade pour maintenir l'amélioration phénotypique<sup>83</sup>. En combinant les approches d'encapsulation permettant une meilleure prise de greffe avec ces cellules pour de prochains essais cliniques, il semble envisageable d'étendre cette durée avant de recommencer le traitement.

#### 4. Les cellules épithéliales amniotiques

Les cellules épithéliales amniotiques (CEA) sont issues de l'amnios, annexe extra-embryonnaire dérivée de l'épiblaste dont le rôle est la protection de l'embryon en contenant le liquide amniotique autour de celui-ci. L'amnios apparaît très précocement dans le développement (8 jours après fécondation) avant même la spécification du destin cellulaire lors de la gastrulation. Ainsi, les cellules le composant restent pluripotentes tout au long de la gestation. Pour obtenir *in vitro* des CEA, il faut isoler la membrane amniotique du placenta (généralement issu d'une naissance par césarienne), la laver plusieurs fois pour éliminer toute trace de cellules sanguines et la digérer à la trypsine pour isoler les cellules d'intérêt<sup>84</sup>.

Les CEA expriment le panel classique de marqueurs de cellules souches (Octamer-binding Transcription Factor 4 (OCT4), Nanog, Stage-Specific Embryonic Antigen 3 (SSEA-3) ou encore le marqueur de surface TRA-1-81) mais de manière intéressante, elles n'expriment pas la télomérase, enzyme qui permet l'auto-renouvellement par la conservation de la longueur des télomères des chromosomes<sup>85</sup>. Cette dernière propriété confère une non-tumorigénicité aux CEA lorsqu'elles sont transplantées dans des souris immunodéficientes à l'inverse des autres types de cellules souches exprimant la télomérase mais empêche leur prolifération extensive *in vitro*. Comme pour les CSM, il existe dans la littérature de nombreux protocoles disponibles pour différencier les CEA en hépatocytes<sup>86</sup>.

La transplantation de CEA non différenciées en hépatocytes dans des souris immunodéficientes a montré une fonctionnalité hépatique de ces cellules après intégration dans le parenchyme hépatique laissant suggérer une différenciation en hépatocytes fonctionnels ou une fusion cellulaire<sup>86</sup>. Récemment, la transplantation directe de CEA dans le foie de souris modèles du syndrome de Hurler (désordre lysosomal causé par une mutation sur le gène codant pour l' $\alpha$ -L-iduronidase entraînant un défaut dans l'assimilation de l'acide mucopolysaccharique) a permis la restauration de l'activité enzymatique impliquant une amélioration du phénotype de ces animaux<sup>87</sup>. Ainsi, par leur relative facilité d'accès (160 000 césariennes en France en 2015) et d'isolement, leur capacité d'expansion *in vitro* (on obtient environ 100 millions de cellules par placenta, ce qui donne jusqu'à 60 milliards de cellules après 6 passages<sup>85</sup>) et leur résistance à la cryoconservation, les CEA pourraient représenter une alternative crédible à la transplantation orthotopique hépatique.

## B. Problématiques liées à la transplantation de cellules

L'efficacité de la transplantation cellulaire repose avant tout sur la qualité des cellules à transplanter. Dans le cas d'hépatocytes primaires, il est donc nécessaire de vérifier au-delà de leur simple viabilité et de s'assurer de leur fonctionnalité en étudiant la synthèse d'urée et l'activité des cytochromes P450 par spectrométrie de masse par exemple. Si les hépatocytes primaires à greffer sont congelés, ils sont soumis à un stress cellulaire qui induit une destruction des mitochondries, la diminution de la synthèse de l'ATP et par conséquent, une fonctionnalité cellulaire moindre<sup>88</sup>. Pour assurer la transplantation des meilleures cellules qui soient, il existe désormais des procédures précises pour cryoconserver les hépatocytes primaires les plus viables après isolement (viabilité supérieure à 80%) et vérifier leurs fonctions métaboliques<sup>89</sup>. Il est également possible d'évaluer certaines fonctions, comme la synthèse d'urée ou l'activité d'enzymes particulières, dans le but de transplanter les hépatocytes les plus adaptés pour un patient avec une maladie métabolique précise, comme un désordre du cycle de l'urée par exemple<sup>90</sup>.

Pour transplanter de manière efficace des cellules dans un foie, il ne suffit pas de les y injecter. En effet, de nombreuses études sur les modèles animaux montrent que les hépatocytes traversent la barrière sinusoidale pour se connecter aux hépatocytes résidents en ré-exprimant des protéines de jonctions et qu'ils survivent sur le long terme et sont capables de répondre aux stimuli de croissance. Néanmoins, plus de 70% des cellules injectées restent bloquées dans les sinusoides et les espaces portes et sont alors éliminées par le système immunitaire (notamment les cellules de Kupffer). Ainsi, pour augmenter cette prise de greffe (spontanément de l'ordre de 0.5%), il est de ce fait nécessaire de créer un environnement adéquat à la greffe, c'est-à-dire de produire un stimulus de régénération, en lésant ou détruisant une partie des cellules résidentes du foie receveur car l'homéostasie du foie est finement régulée dans un foie ayant une masse normale d'hépatocytes fonctionnels. Ces atteintes hépatiques vont ainsi induire des signaux de régénération hépatique permettant une augmentation de la prise de greffe dans l'organe hôte basé sur le principe de "l'avantage sélectif" : si les cellules transplantées ont une meilleure fonctionnalité (ou une mutation corrigée) par rapport aux cellules résidentes dans un foie lésé alors elles s'intégreront plus facilement et proliféreront plus rapidement dans le parenchyme hépatique lors de la régénération hépatique. De nombreux modèles ont donc été mis au point pour favoriser la prise de greffe.

Il existe des modèles animaux de destruction physique et/ou chimique basés sur l'induction d'une toxicité hépatique aiguë par le tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>)<sup>91</sup>, l'acétaminophène (paracétamol)<sup>92</sup> ou l'exposition aux rayons X<sup>93</sup>. Même si toutes ces études montrent une augmentation du nombre de cellules greffées, ce type d'atteinte n'est en aucun cas transposable à l'Homme. Il existe également des modèles animaux de génotoxicité du foie receveur qui correspondent à certaines maladies métaboliques héréditaires du foie humain. Les plus utilisés sont le modèle murin de la tyrosinémie de type 1 (déficiency de l'enzyme Fumarylacétoacétate Hydrolase ou FAH)<sup>94</sup> et le modèle transgénique basé sur l'introduction du gène de l'enzyme urokinase plasminogen activator (uPA) sous contrôle du promoteur de

l'albumine qui entraîne une destruction des hépatocytes du fait de la toxicité du transgène<sup>95</sup>. Dans ces deux modèles, la transplantation d'hépatocytes sains induit un repeuplement hépatique et une restauration des fonctions déficientes (sécrétion de phospholipides<sup>96</sup> ou activité de la FAH<sup>97</sup>). Néanmoins, là encore, l'applicabilité à l'Homme reste impossible. Deux modèles murins de repeuplement reproduisent la cholestase intrahépatique familiale (souris *mdr2-/-*) et la déficience en A1AT, respectivement caractérisées par une absence de phospholipides dans la bile et la polymérisation anormale d'une enzyme, qui entraînent toutes deux une toxicité hépatocyttaire<sup>98,99</sup>. Ces derniers modèles montrent un repeuplement spontané des hépatocytes normaux transplantés par rapport aux hépatocytes résidents, même sans lésion hépatique supplémentaire, suggérant qu'un tel avantage pourrait s'appliquer aux patients atteints.

Outre les modèles précédents, il existe également des modèles purement chirurgicaux basés sur l'induction d'une régénération hépatique par l'obturation ou l'ablation de certains lobes hépatiques. L'hépatectomie (ablation d'une partie du foie) des 2/3 est le modèle préclinique le plus ancien et est encore considéré comme référence aujourd'hui pour l'étude de la régénération hépatique par hypertrophie compensatoire : après hépatectomie, les lobes hépatiques restants s'hypertrophient pour permettre au foie de reprendre sa taille initiale<sup>100</sup>. La prolifération des hépatocytes débute dans les zones périportales puis s'étend par la suite aux zones péricentrales, chaque hépatocyte effectuant en moyenne une à deux divisions<sup>101</sup>. Ce procédé très invasif est évidemment une nouvelle fois non transposable en clinique.

Deux autres procédés, la ligature portale et l'embolisation portale, sont quant à eux déjà utilisés en clinique pour l'induction d'une régénération hépatique du futur foie restant avant intervention chirurgicale majeure (comme une hépatectomie partielle pour retrait de tumeurs par exemple) et s'avèrent donc intéressants dans le cadre de la transplantation cellulaire. Il a été montré chez le petit animal qu'une ligature portale, technique consistant à serrer un lien autour d'une branche de la veine porte, induisait une prolifération hépatocyttaire dès 24h après intervention dans le foie non touché par la ligature<sup>102</sup>. Sur un modèle de primate non humain, des ligatures portales partielles suivies d'une transplantation autologue de 400 millions d'hépatocytes génétiquement modifiés a permis une prise de greffe de l'ordre de 2%<sup>103</sup>. Ce chiffre reste trop faible pour espérer une amélioration significative de la qualité de vie d'un patient qui recevrait une transplantation cellulaire post-ligature. Il peut en partie être expliqué par une reprise de la vascularisation à distance du site de ligature, démontrée chez le porc<sup>104</sup> et déjà rapportée en clinique chez l'Homme<sup>105</sup>.

L'embolisation portale, qui consiste à obstruer la veine porte par injection de différents produits (comme par exemple l'alcool polyvinyle<sup>106</sup> ou le n-butylcyanoacrylate<sup>107</sup>), est largement utilisée en chirurgie pour induire une hypertrophie du lobe restant avant une hépatectomie majeure et est moins invasive que la ligature. Dans un modèle de primate non humain, il a été montré qu'une embolisation d'environ 50% du foie à l'aide d'une colle biologique entraînait un repeuplement de 10% du lobe non embolisé après transplantation d'hépatocytes autologues<sup>108</sup>, rendant ce processus très intéressant dans une transposition clinique pour l'Homme. Il est également possible d'utiliser une poudre résorbable pour

l'embolisation, ce qui rend la technique encore moins invasive, et permet une reperméabilisation complète de la veine porte deux semaines après embolisation. Le suivi sur trois mois de primates ayant subi cette technique montre que 6% du foie receveur est constitué par les hépatocytes transplantés<sup>109</sup>. Ce procédé semble donc être tout à fait prometteur pour permettre d'induire les signaux nécessaires à une prise de greffe lors d'une transplantation cellulaire dans le but de restaurer une fonctionnalité hépatique correcte.

Néanmoins, au-delà des points évoqués ci-dessus et de l'accessibilité des différents types cellulaires présentés dans le précédent paragraphe, l'un des principaux problèmes de la transplantation cellulaire reste le traitement des maladies où l'architecture du foie est désorganisée, les cellules ayant besoin de s'intégrer dans le parenchyme pour pouvoir être pleinement fonctionnelles. Il est alors nécessaire d'avoir recours à d'autres technologies pour stabiliser le patient en attente d'une greffe hépatique totale.

### **C. La suppléance extracorporelle du foie**

Dans le cas d'une insuffisance hépatique aiguë, il existe deux types de suppléances extracorporelles qui, en assurant les fonctions hépatiques déficientes, permettent soit au foie natif de régénérer soit de gagner du temps jusqu'à ce qu'un foie compatible soit trouvé pour une greffe : la suppléance artificielle non biologique et le foie bioartificiel.

#### **1. La suppléance artificielle non biologique**

Les systèmes de suppléance artificielle non biologique sont des systèmes de détoxification basés sur un concept similaire à la dialyse rénale. L'idée est qu'une insuffisance hépatique aiguë traitée assez longtemps par filtration et adsorption des toxines accumulées (donc non traitées par le foie malade) permette au foie natif de régénérer et ainsi de fonctionner à nouveau normalement<sup>110</sup>. Les substances toxiques hydro- et lipophiles, les acides biliaires, la bilirubine ou encore certaines cytokines, toutes ces molécules qui inhibent la régénération hépatique et peuvent causer des dommages à d'autres organes, notamment le cerveau, sont épurées par filtration, dialyse à l'albumine et par fractionnement du plasma.

Deux machines sont à l'heure actuelle les plus utilisées dans les essais cliniques : MARS (pour Molecular Adsorbent Recirculating System) basé sur la dialyse contre un dialysat enrichi à l'albumine<sup>111</sup> et Prometheus (pour Fractionated Plasma Separation, Adsorption and Dialysis device) qui sépare le plasma du sang avant adsorption sur colonne des molécules toxiques contenues dans le plasma<sup>112</sup>. Des études cliniques ont montré que ces deux dispositifs diminuaient les taux de toxines liées à l'albumine et d'acides biliaires dans le sérum et amélioreraient de ce fait la fonction hépatique<sup>113,114</sup>. Néanmoins, il n'y a pour le moment aucun résultat démontrant une augmentation de la durée de vie des patients utilisant ces machines<sup>115,116</sup>.

## 2. Le foie bioartificiel

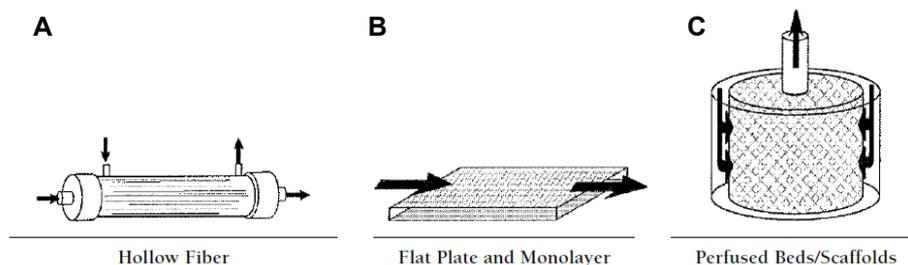
Le foie bioartificiel consiste en un bioréacteur tridimensionnel dans lequel se trouvent des hépatocytes viables, séparés du flux sanguin par une membrane. Ainsi, en plus des fonctions de détoxification réalisées par les précédents systèmes, le foie bioartificiel possède également des fonctions métaboliques comme l'uréogénèse, la synthèse protéique et la glycogénogénèse.

Il existe actuellement différents types de bioréacteurs, chacun avec ses avantages et ses inconvénients (**Figure 12**) :

\_ Le bioréacteur à fibre creuse où les cellules sont situées soit à l'intérieur soit à l'extérieur des lumières des fibres (le flux sanguin s'écoulant du côté où ne sont pas les cellules). Il offre une grande surface d'échange entre le sang et les cellules tout en diminuant les contraintes de cisaillement. La taille des pores de la membrane (cut-off de 100 à 150 kDa) empêche également la présentation des composants immunitaires (anticorps ou protéines du complément) aux hépatocytes ce qui les protège de réactions immunitaires inopportunes. Néanmoins, la distribution cellulaire n'est pas uniforme au sein de ce dispositif.

\_ Le bioréacteur plan où les cellules sontensemencées sur de larges surfaces plates, le flux sanguin passant alors par-dessus. Il est très peu utilisé car il est difficile de faire un "scale-up" de ce système et de plus, le ratio surface cellulaire/volume sanguin est très faible.

\_ Le bioréacteur à lit perfusé inspiré de l'architecture hépatique où le flux sanguin diffuse de manière radiale du centre vers la périphérie. Cependant, dans ce système, la perfusion n'est pas uniforme et les hépatocytes sont exposés à de fortes contraintes de cisaillement.



**Figure 12.** Les différents types de bioréacteurs<sup>117</sup>

(A) Le bioréacteur à fibre creuse. Le flux sanguin, représenté par les flèches, passe soit à l'extérieur soit dans la lumière de la fibre. (B) Le bioréacteur plan. (C) Le bioréacteur à lit perfusé

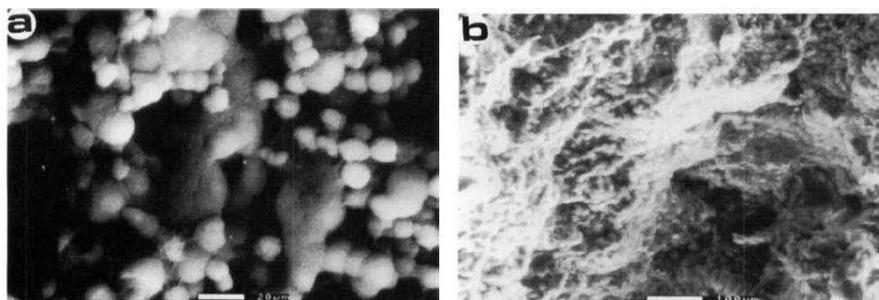
Sur le marché, plusieurs systèmes sont disponibles et les deux plus connus, qui sont à fibre creuse, se nomment HepatAssist et ELAD (pour Extracorporeal Liver Assist Device). La différence majeure entre ces 2 dispositifs réside dans le type cellulaire employé, le premier utilisant des hépatocytes d'origine porcine quand le second utilise une lignée immortalisée d'hépatocarcinome (HepG2/C3A)<sup>118,119</sup>. Ces cellules posent quelques problèmes car il est possible dans le premier cas de transmettre des protéines ou virus porcins à l'Homme et dans le second, les activités métaboliques des cellules cancéreuses sont moindres que celles d'hépatocytes primaires. Les essais cliniques menés pour le moment avec ces deux appareillages ne montrent d'ailleurs pas de différences significatives quant à l'augmentation de la survie des patients, ce qui sous-tend l'idée que ces systèmes doivent encore être améliorés.

L'amélioration de la suppléance artificielle par la suppléance bioartificielle représente une avancée importante car en combinant deux fonctions majeures du foie, la détoxification et la synthèse métabolique, il semble à terme possible de disposer d'un appareil permettant d'augmenter la durée de vie des patients en attente d'un greffe voire de permettre au foie natif de disposer de suffisamment de temps pour régénérer et reprendre son rôle. Pour cela, il semble néanmoins nécessaire de disposer d'une source abondante d'hépatocytes aux fonctionnalités similaires ou tout du moins très proches des hépatocytes primaires.

#### D. L'ingénierie tissulaire

L'ingénierie tissulaire est un domaine interdisciplinaire mêlant les méthodes et les principes des sciences de l'ingénieur à ceux des sciences de la vie dans le but de développer des substituts biologiques capables de restaurer, maintenir voire améliorer la fonctionnalité des tissus<sup>120</sup>. Le socle de cette approche repose sur le diptyque scaffold/cellule.

Le "scaffold" (échafaudage en anglais) est un élément à l'architecture tridimensionnelle sophistiquée, indispensable pour mimer la matrice extracellulaire mais qui doit respecter quelques règles. Il doit évidemment être synthétisé dans un matériau biocompatible, non toxique et immunitairement neutre pour pouvoir être accepté par le système immunitaire du patient qui va le recevoir. Il doit également guider la restructuration du tissu qu'il remplace en permettant la croissance et la régénération des tissus hôtes ainsi que la prolifération des cellules qui ont adhéré sur le "scaffold" tout en maintenant une distance suffisante entre celles-ci pour assurer une bonne diffusion des gaz et des nutriments de même qu'une possible vascularisation<sup>121</sup>. La maîtrise de la porosité est donc une donnée clé pour obtenir un "scaffold" d'intérêt.

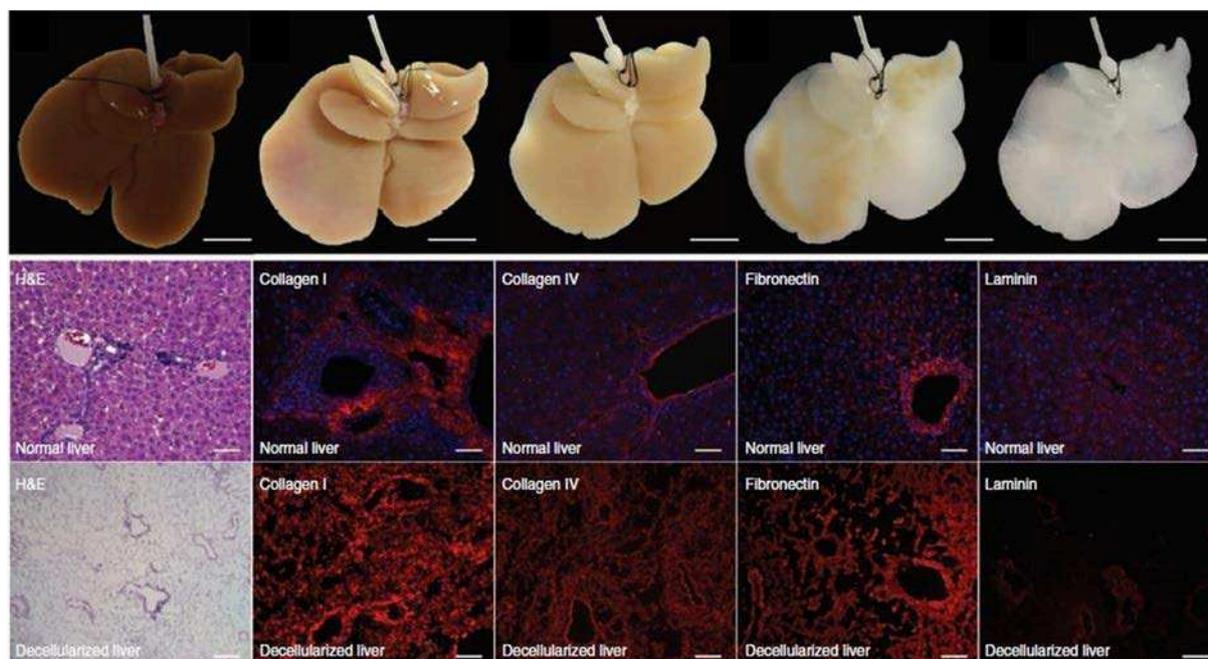


**Figure 13.** Exemple d'un "scaffold" éponge<sup>122</sup>

Photographies au microscope électronique à balayage (A) d'une éponge de polymère d'acide polylactique non traitée et (B) d'une autre éponge enssemencée avec une suspension d'hépatocytes de rats

Dans les premières études consacrées à l'ingénierie tissulaire du foie (années 1990), les "scaffolds" étaient fabriqués comme des éponges de polymères synthétiques (acide polylactique ou alcool polyvinylique) dans lesquelles venaient se nicher les hépatocytes<sup>123,124</sup> (**Figure 13**). Malheureusement, la survie des hépatocytes après implantation du système dans des rats était extrêmement faible. L'absence initiale de réseau vasculaire dans ces bioconstructions et la relative lenteur de leur vascularisation ont en effet empêché le maintien des

cellules adhérentes sur le support<sup>124</sup>. L'autre principale limitation de ce système est le manque de signaux hépatiques assurant la prolifération et la différenciation des cellules sous-entendant la nécessité d'une meilleure caractérisation de la microarchitecture du dispositif.



**Figure 14.** Décellularisation d'un foie de rat<sup>125</sup>

Le panel du haut présente des images d'un foie de rat en cours de décellularisation par perfusion de Sodium DodécylSulfate (SDS) à 0h, 18h, 48h, 52h et 72h. Les deux autres panels présentent la comparaison entre un foie normal (milieu) et un foie décellularisé (bas). Dans ce dernier, la structure est maintenue (présence de collagène et de fibronectine) mais les cellules ont été éliminées (absence de marquage à l'hématoxyline/éosine ou au DAPI)

La meilleure architecture possible et disponible pour établir un scaffold de qualité étant celle du foie natif, certaines équipes ont alors développé des techniques pour éliminer la totalité des cellules de l'organe tout en maintenant sa structure et son système vasculaire. Ces techniques de décellularisation reposent principalement sur la perfusion de détergents ou d'enzymes (**Figure 14**)<sup>126</sup>. Ces foies décellularisés peuvent alors être recellularisés avec des cellules d'intérêt (qui peuvent être de différents types comme par exemple hépatocytes et cholangiocytes) et maintenus en bioréacteurs pour permettre l'expansion, la différenciation et la fonctionnalité de ces cellules avant implantation chez un receveur. La preuve de concept de cette méthode a été apportée par Uygun et collaborateurs qui ont décellularisé des foies de rats avant de les repeupler avec des hépatocytes allogéniques et de réimplanter ce système dans un modèle de transplantation de foie chez le rat<sup>125</sup>. Les hépatocytes ainsi transplantés étaient fonctionnels assurant la sécrétion d'albumine, la synthèse d'urée et l'expression des cytochromes à des niveaux comparables à un foie normal *in vitro*. Un an plus tard, Baptista et collaborateurs ont décellularisé des foies de furet et de porc avant de les recellulariser avec des cellules endothéliales humaines, les HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) et des progéniteurs hépatiques fœtaux humains capables de se différencier en hépatocytes et en cholangiocytes<sup>126</sup>.

Même si les foies de porcs sont proches en taille du foie humain et plus facilement disponibles, les risques de transmission de certaines protéines ou virus conjugués à une ultrastructure significativement différente du foie humain n'en font probablement pas le meilleur support possible pour l'ingénierie tissulaire. En conséquence, les premières décellularisations de foie humain ont eu lieu en 2015<sup>127</sup>. Les foies utilisés dans cette étude ont été récusés pour la transplantation orthotopique du fait d'un temps trop long entre le prélèvement et la greffe ou du fait de la présence de tumeurs extra-hépatiques. Or, l'intégrité de la matrice extracellulaire est maintenue plus longtemps que celle des cellules résidentes, c'est pourquoi ces foies, qui ne présentaient aucun degré de fibrose ou de stéatose, peuvent être utilisés comme "scaffold" dans cette approche. Ils ont pu être recellularisés en 21 jours avec différents types cellulaires (lignée de cellules étoilées ou lignées d'hépatocarcinome) qui ont conservé leur viabilité ainsi que leurs propriétés de motilité, prolifération et de remodelage de la matrice extra-cellulaire. La xénotransplantation de petits cubes découpés dans cet ensemble foie décellularisé/cellules dans des souris immunocompétentes n'a montré aucun signe d'inflammation ou de rejet, suggérant une bonne biocompatibilité de ce dispositif. Pour poursuivre cette étude, il serait intéressant de recellulariser ces foies décellularisés humains avec des hépatocytes primaires.

Avec l'essor des imprimantes tridimensionnelles (3D), il semble désormais possible de recréer de toutes pièces la structure complexe du foie humain. Cette technique, dite de bioprinting, consiste en un positionnement précis, automatisé et couche par couche de matériel biologique, de composés biochimiques et de cellules vivantes. Comme pour une impression classique, ce système nécessite une imprimante (imprimante 3D), des encres (biomatériaux et différents types de cellules), un support d'impression ainsi qu'un modèle d'architecture du foie. Pour obtenir ce dernier, il est nécessaire d'avoir recours à des techniques d'imagerie fines et précises comme l'imagerie par résonance magnétique suivies de traitements mathématiques assistés par ordinateur pour reconstituer l'organisation 3D et modéliser précisément l'architecture hépatique.

La preuve de concept de l'applicabilité de cette technologie de bioimpression a été notamment apportée il y a une dizaine d'années par la construction d'un assemblage gélatine/hépatocytes de plus de 30 couches dans lequel les cellules restaient viables et fonctionnelles pendant plus de 2 mois<sup>128</sup>. Dans une autre étude datant de l'année dernière, la bioimpression a été utilisée pour encapsuler des cellules HepG2 dans un hydrogel de méthacryloyle pour des tests de criblage de drogues. Les auteurs ont pu démontrer que les structures restaient viables 30 jours et surtout fonctionnelles en mesurant la sécrétion de protéines hépatocytaires et la présence de marqueurs de polarités dans les assemblages<sup>129</sup>. De plus, la réponse toxique induite après avoir traité les cellules à l'acétaminophène était similaire à celle obtenue sur d'autres modèles *in vitro* et lors d'études sur des modèles animaux. Ce genre de modèles basés sur la bioimpression à des fins d'étude de l'expression de profils géniques et/ou protéiques après criblage médicamenteux est désormais commercialisé, notamment par la société Organovo. Il n'existe pas, pour le moment, de foies imprimés à usage clinique.

En effet, quelle que soit la technique utilisée pour réparer ou remplacer un foie malade se pose le problème du type et de l'origine des cellules à utiliser et de la complexité de l'architecture du foie. Même si les hépatocytes primaires semblent être les cellules les plus logiques et les plus intéressantes à utiliser car les plus proches de ce que l'on peut trouver *in vivo*, les difficultés à les maintenir différenciées en culture et à les cryoconserver empêchent pour le moment d'envisager une utilisation à grande échelle. Les lignées hépatiques immortalisées comme Huh-7 ou HepG2, disponibles en plus grand nombre et facilement amplifiables, ne reproduisent pas correctement l'ensemble du métabolisme des hépatocytes. Enfin, les cellules xénogéniques comme les hépatocytes porcins posent des problèmes en termes de transmission de protéines ou virus à l'Homme. Il est donc nécessaire de disposer d'une source de cellules facilement amplifiable et capable de reproduire les fonctionnalités hépatiques au plus proche de l'*in vivo*. En ce sens, les cellules souches pluripotentes peuvent représenter un atout majeur pour l'hépatologie.

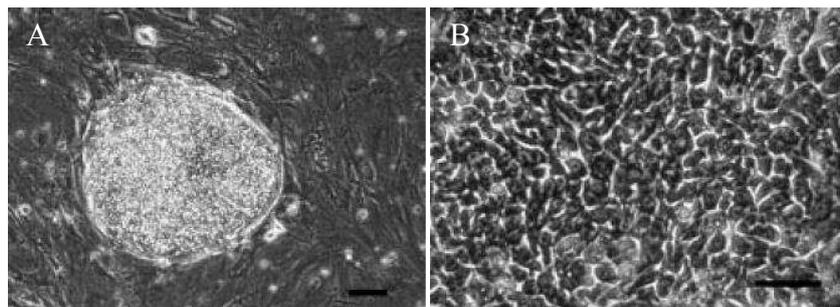
## CHAPITRE 2 : Les cellules souches pluripotentes : Intérêts pour l'hépatologie

Par leurs propriétés singulières d'autorenouvellement et de pluripotence, les cellules souches pluripotentes humaines ont rapidement suscité un grand intérêt ainsi qu'un espoir pour les nouvelles perspectives thérapeutiques qu'elles suggèrent. Il en existe deux types : les cellules souches embryonnaires humaines ou hESC et les cellules souches pluripotentes induites ou hiPSC.

### I. Les cellules souches embryonnaires

#### A. Origine

Dix-sept ans après avoir isolé les premières cellules embryonnaires murines, l'équipe de James Thomson reproduit la technique chez l'Homme et établit la première lignée de cellules souches embryonnaires humaines<sup>130</sup>. Ces cellules sont issues de la masse cellulaire interne du blastocyste d'un embryon surnuméraire à cinq jours de développement (avant l'apparition de cellules de la crête neurale), obtenu dans le cadre d'une fécondation *in vitro* après consentement éclairé des parents. Isolées du trophoblaste par microchirurgie, elles ont ensuite été ensemencées dans un milieu riche en sérum de veau fœtal sur une couche de fibroblastes embryonnaires murins (ou MEF) irradiés afin d'éviter leur prolifération. Ces MEF vont servir de couche nourricière et ainsi apporter aux cellules tous les nutriments nécessaires à leur croissance. Après environ deux semaines de culture, les colonies apparues, ont pu être amplifiées dans les mêmes conditions puis congelées afin de préserver cette lignée nouvellement créée (**Figure 15**).



**Figure 15.** Morphologie d'une colonie d'hESC<sup>130</sup>  
(A) Colonie d'hESC sur une couche nourricière de MEF (échelle : 100 µM)  
(B) Cellules au sein de la colonie (échelle : 50 µM)

A l'époque de leur isolement, les cellules souches embryonnaires humaines ou hESC représentent une formidable source de cellules pour la compréhension des mécanismes précoces du développement d'un organisme (sur lesquels nous reviendrons plus loin) ainsi que dans le cadre de la médecine régénérative.

## B. Propriétés et caractérisation

Les hESC sont caractérisées par des ribosomes abondants, un haut ratio nucléocytoplasmique ainsi que de larges nucléoles et expriment tout un panel spécifique de marqueurs de surface SSEA-4, SSEA-3, TRA-1-60 et TRA-1-81 ainsi que les facteurs de transcription OCT3/4, SOX2 et NANOG<sup>131</sup>.

### 1. L'auto-renouvellement

*In vivo* ou cultivée *in vitro*, une cellule somatique humaine ne peut effectuer qu'un nombre prédéfini de divisions cellulaires (limite de Hayflick), dépendant de son type et de son âge physiologique, avant d'entrer en sénescence, un état où elle n'est plus capable de se diviser<sup>132</sup>. De nombreux facteurs contribuent à ce processus comme par exemple des changements épigénétiques, la perte de la capacité de réparation de l'acide désoxyribonucléique (ADN), le stress oxydatif ou le raccourcissement des télomères. Ce mécanisme ne semble pas s'appliquer aux hESC qui sont en effet capables de se diviser de manière illimitée, les rendant ainsi immortelles *in vitro*, mais sans altération du phénotype ou du caryotype à l'inverse des cellules cancéreuses<sup>130</sup>.

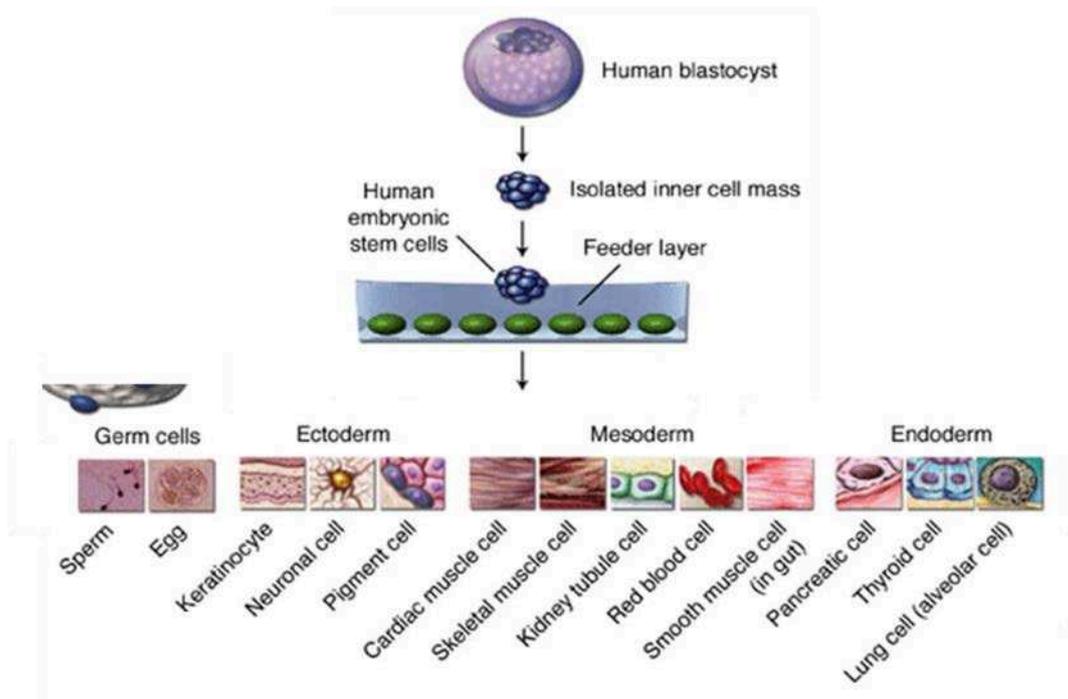
Cette particularité des hESC par rapport à toute autre cellule normale est due en premier lieu à de longs télomères doublés d'une forte activité télomérase<sup>130</sup>. Les télomères sont des séquences non codantes et répétées d'ADN localisées à l'extrémité des chromosomes qui protègent l'information génétique. En effet, lors de la division cellulaire, l'ADN polymérase n'est pas capable de copier les derniers nucléotides des chromosomes ce qui entraîne par conséquent le raccourcissement des télomères et la sénescence de la cellule une fois le télomère épuisé. Dans les hESC, la longueur des télomères reste stable à chaque division cellulaire du fait de la forte expression d'une enzyme, la télomérase, qui synthétise les nucléotides normalement non copiés et permet ainsi à la cellule de se diviser à l'infini<sup>133</sup>.

Certaines cellules peuvent également passer outre le processus de sénescence à cause d'altérations du cycle cellulaire induites notamment par l'inactivation de certaines protéines "gardiennes du génome" comme p53 et la protéine du rétinoblastome (Rb)<sup>134</sup>. Des études ont montré que ces deux protéines ainsi que de nombreuses protéines avec lesquelles elles interagissent étaient très peu voire pas du tout exprimées dans les hESC, ce qui explique donc également leur capacité d'auto-renouvellement<sup>135</sup>.

### 2. La pluripotence

Par définition, la pluripotence est la capacité d'une cellule à se différencier en cellules germinales et en l'ensemble des cellules issues des trois feuilletts embryonnaires que sont l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme (**Figure 16**). Il est possible de vérifier cette caractéristique à la fois *in vivo* et *in vitro*. *In vivo*, des hESC injectées à des souris immunodéficientes forment des tératomes, tumeurs au développement anarchique et composées de cellules le plus souvent très différenciées qui proviennent des trois feuilletts

embryonnaires. *In vitro*, cultiver ces cellules sur une matrice non adhérente induit leur aggrégation en corps embryoïdes qui vont par la suite se différencier et exprimer des marqueurs spécifiques des trois feuillets embryonnaires.



**Figure 16.** Les différents types cellulaires obtenus à partir d'une cellule pluripotente<sup>136</sup>

L'état de pluripotence est gouverné par un réseau interconnecté de gènes codant pour des facteurs de transcription qui agissent réciproquement sur leurs propres promoteurs, formant ainsi une boucle d'autorégulation<sup>137</sup>. En absence de signaux de différenciation, ces facteurs, OCT4, SOX2 et NANOG, activent également l'expression de nombreux gènes nécessaires au maintien de l'état indifférencié dont les gènes de la voie de signalisation Activine A/Nodal<sup>138</sup>. Ces derniers, via l'activation de SMAD2/3, et en synergie avec la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) activent directement l'expression de NANOG ce qui contribue au maintien de l'état non différencié<sup>139</sup>. A l'inverse, le réseau de régulation réprime l'expression des gènes impliqués dans l'induction de la différenciation comme les gènes de la famille BMP ou de la voie Wnt. Les hESC possèdent également des caractéristiques épigénétiques particulières, notamment une chromatine plastique et décondensée ayant de fortes interactions avec les histones<sup>140</sup>. Ces dernières sont notamment acétylées par l'acétate issu de la glycolyse, réprimant ainsi l'expression des gènes de différenciation ce qui contribue à la sauvegarde de l'état indifférencié<sup>141</sup>. Dans les hESC, l'extinction des gènes de différenciation est également médié par la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) catalysée par plusieurs facteurs épigénétiques comme Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) ou les domaines de liaison aux îlots CpG de certaines protéines<sup>142</sup>. L'état pluripotent est donc un état dynamique qui peut néanmoins être rapidement déstabilisé par l'induction de signaux de différenciation.

### **C. Evolution des techniques de culture vers la clinique**

Assez rapidement, l'utilisation de produits d'origine animale comme la couche nourricière ou le sérum de veau fœtal a posé un problème d'utilisation dans l'objectif d'une utilisation clinique de ces cellules du fait de la transmission possible de pathogènes animaux à l'Homme et de la composition indéfinie du sérum utilisé. Pour surmonter ces problèmes, la compréhension du comportement de la couche nourricière et des facteurs qu'elle sécrète pour le maintien et la croissance des hESC a été primordiale pour établir un environnement défini (que ce soit pour le milieu de culture ou la matrice sur laquelle ensemercer les cellules). Les facteurs Noggin et FGF2, produits par les MEF, ont depuis été montrés comme clés pour permettre le maintien des hESC à l'état indifférencié<sup>143</sup> et sont désormais ajoutés à des concentrations précises dans les milieux de culture pour éviter l'utilisation des MEF et du sérum.

L'approche complémentaire de l'ajout de facteurs de croissance définis dans le milieu de culture fût de remplacer les MEF par une matrice uniquement protéique. Le matrigel, composé entre autres de collagène IV, laminine et entactine a alors été utilisé avec succès par de nombreuses équipes comme substitut aux MEF, on parle alors de culture "feeder-free"<sup>92,144</sup>. Néanmoins, même s'il reste aujourd'hui extrêmement utilisé dans de nombreux laboratoires, sa provenance animale (le matrigel étant extrait à partir d'un sarcome de souris) et sa variabilité inter-lot n'en font pas le produit de remplacement le plus approprié. Entre temps, l'analyse de la matrice synthétisée par les hESC a permis de mettre en évidence certains composés comme la fibronectine, la laminine ou le collagène de type IV<sup>145</sup>. Sur cette base et avec l'essor de la technologie des protéines recombinantes, il est désormais possible de cultiver les hESC sur des supports définis comme la laminine ou la vitronectine, qui semble des substrats prometteurs<sup>146,147</sup>.

Tous ces ajustements des conditions de culture qui permettent à terme une utilisation clinique des hESC ne doivent cependant pas compromettre l'intégrité de ces cellules, c'est-à-dire ne pas altérer leur caryotype, leur caractère "souche" et leurs propriétés vues au paragraphe précédent.

## **II. Les cellules souches pluripotentes induites**

### **A. Historique**

Les cellules souches pluripotentes induites ou iPSC sont des cellules somatiques qui ont été génétiquement reprogrammées à l'état pluripotent par l'expression transitoire de gènes exogènes qui déclenchent l'expression de gènes de pluripotence endogènes réprimés pendant la différenciation cellulaire.

Cette prouesse technologique a été réalisée pour la première fois en 2006 chez la souris par Kazutoshi Takahashi et Shinya Yamanaka<sup>148</sup>. Cette équipe japonaise a mis en culture des fibroblastes murins transduits par des vecteurs rétroviraux codant pour 24 gènes

connus pour leur rôle critique dans le maintien de l'identité des cellules souches embryonnaires murines. Quinze jours plus tard, les premières colonies ressemblant en tous points aux cellules embryonnaires murines sont apparues sous-tendant le fait que certains fibroblastes étaient transformés et réinitialisés à l'état souche. Par la suite, les auteurs ont supprimé un à un chacun des gènes de départ afin de réduire au maximum le nombre de facteurs nécessaires à la reprogrammation et sont arrivés à une combinaison de 4 facteurs, dénommés depuis facteurs de Yamanaka, *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* et *c-Myc*.

L'année suivante, la même équipe reproduit la technique chez l'Homme<sup>149</sup> avec un temps de génération de colonies d'environ un mois, soit deux fois plus que chez la souris. Quasi simultanément, l'équipe de James Thomson décrit le même phénomène en ayant remplacé *KLF4* et *c-MYC* par *LIN28* et *NANOG*<sup>150</sup>. Signe que ce travail a représenté une avancée considérable dans nombre de domaines détaillés plus loin dans ce manuscrit, Shinya Yamanaka a été nobélisé en 2012 pour cette découverte, soit à peine 6 ans après l'avoir faite.

## B. Caractérisation

La population de départ servant à la reprogrammation en hiPSC est composée de cellules dans des états moléculaires différents. Seule une fraction de ces dernières donnera naissance à des clones d'hiPSC qui peuvent de ce fait légèrement différer les uns des autres. Il est ainsi nécessaire d'effectuer un contrôle qualité très strict pour démontrer que ces clones d'hiPSC, repiqués manuellement et individuellement, ont des caractéristiques semblables aux hESC et ont donc été pleinement reprogrammés (**Figure 17**).

Morphologie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Colonies "hESC-like" aux bordures claires</li> <li>• Haut ratio nucléocytoplasmique</li> </ul>
Marqueurs de cellules souches	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Forte expression des protéines OCT4, NANOG, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 et TRA-1-81</li> <li>• Positivité à la phosphatase alcaline</li> </ul>
Potentiel de différenciation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Formation de tératomes <i>in vivo</i></li> <li>• Formation de corps embryoides <i>in vitro</i></li> </ul>
Profil épigénétique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Déméthylation des gènes "souches" (OCT4, NANOG, SOX2)</li> <li>• Méthylation des gènes spécifiques de la cellule de départ</li> </ul>
Profil génétique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Caryotype normal (pas d'aberrations génomiques)</li> <li>• Silencing des transgènes après reprogrammation (si reprogrammation par vecteurs intégratifs)</li> </ul>

**Figure 17.** Les différents facteurs à tester pour caractériser une lignée hiPSC<sup>151</sup>

Les lignées clonales d'hiPSC doivent exprimer les marqueurs spécifiques des cellules souches précédemment énoncés (OCT4, SSEA-4, etc.). De plus, si certains facteurs de transcription ont été utilisés dans le cadre de la reprogrammation et introduits dans le génome par un vecteur intégratif, il est indispensable de vérifier que l'expression détectée est celle du

gène endogène et non celle du gène apporté de manière exogène qui a normalement été réprimé par méthylation de son promoteur.

De la même manière que pour les hESC, les hiPSC doivent posséder la capacité à produire des tératomes *in vivo* une fois transplantées dans des souris immunodéficientes ou des corps embryoïdes *in vitro* qui seront chacun composé de cellules issues des trois feuilletts embryonnaires primordiaux. Pour s'assurer que la lignée d'hiPSC provient bien des cellules somatiques de départ, il est possible d'analyser les séquences microsatellites de l'ADN qui diffèrent selon les individus et permettent ainsi d'identifier les correspondances entre les lignées générées et les cellules de départ. Une analyse de l'épigénome permet de s'assurer de la déméthylation, donc de l'expression, des promoteurs des gènes spécifiques du caractère souche et de la méthylation, donc de la répression, des promoteurs des gènes spécifiques des cellules somatiques de départ. L'étude du caryotype est quant à elle indispensable pour s'assurer de l'intégrité génomique car la reprogrammation peut entraîner d'importants réarrangements chromosomiques comme des translocations ou des absences de chromosomes<sup>152</sup>.

### C. Les différentes techniques de reprogrammation

#### 1. Méthodes intégratives

Historiquement, la première méthode utilisée par l'équipe de Yamanaka se base sur la transduction de fibroblastes par plusieurs vecteurs rétroviraux, chacun contenant un des quatre facteurs précédemment nommés, *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* et *c-Myc*<sup>148,149</sup>. Bien que relativement facile à mettre en œuvre pour introduire du matériel génétique dans le génome de cellules d'intérêt, l'un des principaux problèmes posé ici est la multiplicité et le caractère aléatoire des sites d'intégration. En effet, chaque transgène intégré doit être éteint une fois le processus de reprogrammation terminé, ce qui n'est pas toujours le cas<sup>153</sup>. De plus, il y a dans ce cas un fort risque de mutagenèse insertionnelle ou d'intégration dans un protooncogène entraînant son activation. En outre, l'efficacité de cette technique est relativement peu élevée, se situant entre 0,02 et 0,1%.

Très vite, les vecteurs lentiviraux ont suscité un intérêt grandissant pour la reprogrammation car ils peuvent infecter des cellules quiescentes comme des cellules en division à la différence des vecteurs rétroviraux qui ont besoin que les cellules soient en division pour s'intégrer. Ils s'absolvent ainsi de la question du type de cellules à utiliser pour la reprogrammation et augmente son efficacité (de 0,1 à 1,5% selon les études). De plus, ils peuvent contenir une plus grande séquence d'ADN que les vecteurs rétroviraux ce qui a permis le design de vecteurs polycistroniques uniques contenant les quatre facteurs sous contrôle d'un seul promoteur limitant ainsi le nombre de sites d'intégration et de transgènes dont l'expression devra s'éteindre. Cependant, l'extinction n'est là non plus pas optimale et le risque de mutagenèse insertionnelle est bel et bien toujours présent. Pour éviter cela, les transgènes ont été flanqués de sites LoxP afin de pouvoir exciser le vecteur polycistronique

après expression de la recombinaise Cre<sup>154</sup>. Toutefois, cette excision est souvent incomplète et peut elle aussi induire une mutagénèse insertionnelle.

Le système basé sur le transposon PiggyBac (PB) peut représenter une alternative intéressante pour éviter ce problème. Cet élément génétique mobile peut être intégré sur un chromosome au niveau d'un site TTAA sous l'effet d'une transposase et être par la suite excisé (une fois les cellules reprogrammées) sans laisser de traces sur le génome lors de la réexpression de la transposase. En utilisant les facteurs de Yamanaka clonés dans un vecteur PB, cette technique a permis de générer des hiPSC avec succès<sup>155</sup> et semble donc prometteuse mais le risque probable de réinsertion ainsi que l'absence de publications concernant l'étape d'excision du transposon chez l'humain, pourtant bien documentée chez la souris, n'en fait pas pour le moment une méthode de choix pour la reprogrammation. De plus, le niveau d'efficacité est équivalent à celui de la transduction rétrovirale (de l'ordre de 0,05%). Ainsi, si l'on se place dans un contexte clinique, il semble obligatoirement nécessaire de trouver une méthode de reprogrammation "sans empreintes" sur le génome.

## 2. Méthodes non intégratives

Il existe désormais plusieurs méthodes permettant de reprogrammer des cellules somatiques en hiPSC sans pour autant intégrer du matériel génétique dans ces cellules. Elles se basent sur l'utilisation de virus non intégratifs (comme le virus Sendai), de plasmides épisomaux, d'ARN messagers (ARNm) ou encore de protéines.

Par ses avantageuses propriétés d'être un virus à ARN qui ne pénètre pas le noyau des cellules et de produire de grandes quantités de protéines, le virus Sendai (SeV) semble être un candidat attractif pour la reprogrammation. En 2009, la première utilisation d'un vecteur basé sur le SeV a généré des hiPSC à partir de fibroblastes en 25 jours et avec une efficacité de 1%<sup>156</sup>. Depuis, différentes études ont permis de simplifier ce système en utilisant non plus quatre vecteurs portant chacun un facteur de reprogrammation mais un seul portant les 4 facteurs ainsi qu'un variant sensible à la température permettant l'élimination, après reprogrammation, des particules virales (que l'on retrouve sinon encore présentes dans les cellules après plus de 10 passages) à une température de 39°C<sup>157</sup>. Il existe désormais commercialement des systèmes de grade GMP basés sur le SeV permettant ainsi d'envisager des applications cliniques avec les hiPSC qui en sont dérivées. La technique basée sur l'utilisation des plasmides épisomaux est petit à petit devenue une des méthodes les plus utilisées dans les laboratoires. Afin que l'expression de l'ADN plasmidique perdure dans le temps pour permettre la reprogrammation sans nécessité de transfections quotidiennes, l'équipe de James Thomson a utilisé un plasmide basé sur l'Antigène 1 du virus Epstein-Barr (oriP-EBNA1) qui a la capacité de se répliquer de manière synchrone avec le génome de la cellule hôte sans pour autant s'y intégrer. Ainsi, une seule transfection devient nécessaire pour la reprogrammation<sup>158</sup>.

L'introduction d'ARNm directement dans les cellules, tout comme leur expression une fois transfectés, est plus difficile à mettre en œuvre du fait de leur faible durée de vie et de

leur forte immunogénicité (les ARNm sont reconnus par les récepteurs Toll-like Receptor (TLR) 3, impliqués dans la réponse immunitaire innée et la défense contre les microorganismes). Pour contourner ces problèmes, l'équipe de Derreck Rossi a synthétisé *in vitro* à partir des séquences codantes des facteurs de Yamanaka et de *Lin28* des ARN messagers modifiés (ARNmm). Pour cela, ils ont remplacé la cytidine par la 5-méthylcytidine et l'uridine par la pseudouridine et ont ajouté une coiffe en 5' dans le but d'augmenter la stabilité et la demi-vie de l'ARNm synthétisé ainsi que sa traduction une fois transfecté. En ajoutant un inhibiteur des interférons (B18R) dans le milieu de culture, ils ont également grandement diminué le nombre de cellules mortes du fait de la forte réponse antivirale due à l'introduction d'ARNm. Les auteurs ont ainsi généré des hiPSC en transfectant quotidiennement des fibroblastes avec ces 5 ARNmm pendant 16 jours avec une efficacité d'1,4%, bien supérieure à toutes les autres techniques utilisées jusqu'alors<sup>159</sup>. A l'heure actuelle, il s'agit de la méthode la plus rapide pour établir une lignée d'hiPSC (il faut 10 jours de moins que les autres techniques pour voir apparaître les premières colonies) mais également la plus efficace et l'une des plus sûres car il est impossible que ces ARNmm s'intègrent dans le génome. Le principal inconvénient de cette méthode, hormis les transfections quotidiennes, est qu'elle n'a pas été validée sur un autre type cellulaire que les fibroblastes. Par exemple, un sondage réalisé en 2015 dans le cadre d'une étude sur les méthodes de reprogrammation non intégratives a montré que 41% des laboratoires interrogés n'avaient pas réussi à reprogrammer des fibroblastes par les ARNmm ce qui montre bien les difficultés inhérentes à cette technique<sup>160</sup>.

L'utilisation de micro-ARN (miRNA), petits ARN non codants régulant l'expression de certains gènes, peut également aider à générer des colonies d'hiPSC. La transfection de deux miRNA (miR302 et miR372), trouvés fortement exprimés dans les hESC par analyse transcriptomique, en complément de la transduction lentivirale des facteurs de Yamanaka a généré environ 10% de colonies hiPSC dans des fibroblastes humains en deux semaines<sup>161</sup>. Dans une optique purement non intégrative, la transfection de mir-200c, mir-302 et mir-369s uniquement 6 jours durant dans des fibroblastes humains ou des cellules stromales adipeuses a aussi permis la reprogrammation de ces cellules en 20 jours avec une faible efficacité (0,002%)<sup>162</sup>. Néanmoins, il n'existe pas à l'heure actuelle d'autres études qui reproduisent ces résultats.

La reprogrammation par l'introduction directe de protéines dans les cellules reste une méthode peu utilisée. Il est en effet relativement difficile de synthétiser *in vitro* de grandes quantités de protéines qui soient capables de traverser la membrane plasmique tout en restant biologiquement actives. En transfectant 7 jours durant des protéines produites au sein de la lignée de cellules embryonnaires rénales humaines HEK 293 (après transfection plasmidique des facteurs de Yamanaka), une équipe américaine a réussi à générer des hiPSC à partir de fibroblastes avec une efficacité de 0,001% en 56 jours<sup>163</sup>, ce qui est une durée extrêmement longue en comparaison de toutes les autres méthodes.

Toutes les méthodes présentées dans ce paragraphe se trouvent résumées dans le **Tableau 1**.

**Tableau 1.** Méthodes de reprogrammation des cellules somatiques en hiPSC

Type de méthode		Avantages	Inconvénients
<b>Intégratives</b>	Basée sur des vecteurs viraux	Rétrovirus <sup>149</sup>	Assez efficace Simple d'utilisation Risque de mutagenèse insertionnelle Nécessite des cellules en division
		Lentivirus <sup>150</sup>	Très efficace Infectent un large spectre de cellules Risque de mutagenèse insertionnelle
		Virus excisables <sup>154</sup>	Possibilité d'excision Risque de mutagenèse insertionnelle Cicatrices sur le génome
	Transposons piggyBac <sup>155</sup>		Simplicité d'utilisation Risque de réinsertion Faible efficacité
<b>Non intégratives</b>	Virus Sendai <sup>156,157</sup>		Bonne efficacité Infectent différents types cellulaires Nécessite d'éliminer le virus
	Plasmides épisomaux <sup>158</sup>		Facile à utiliser Risque d'intégration génomique Faible efficacité
	ARN messagers <sup>159</sup>		Bonne efficacité Aucun risque d'intégration dans le génome Nécessité de plusieurs transfections Difficile à reproduire sur d'autres types cellulaires que les fibroblastes
	Micro-ARN <sup>161,162</sup>		Aucun risque d'intégration dans le génome Peu efficace si non combinée à une autre technique Pas reproduit
	Protéines <sup>163</sup>		Aucun risque d'intégration dans le génome Difficulté de produire les protéines Nécessité de plusieurs transfections Très faible efficacité Long délai d'apparition des colonies

#### **D. Améliorer l'efficacité de reprogrammation**

En premier lieu, un intérêt particulier doit être porté au choix du type cellulaire à reprogrammer. La majorité des preuves de concept a été effectuée sur des fibroblastes et certaines techniques (comme celles des ARNm) ont d'ailleurs du mal à être reproduites sur d'autres cellules. Néanmoins, pour obtenir des fibroblastes, il est nécessaire de réaliser une biopsie de peau, technique invasive qui laisse une cicatrice sur le patient ce qui n'est pas toujours désiré par celui-ci ou même possible (s'il est hémophile par exemple). Pour éviter cela, de nombreuses équipes se sont intéressées au potentiel de reprogrammation de cellules que l'on peut obtenir par des procédés non invasifs comme les cellules mononucléées du sang périphérique (récupérable à partir d'une prise de sang), les cellules de l'urine ou encore les kératinocytes (obtenus par la mise en culture d'un simple cheveu). Ces derniers se reprogramment 100 fois plus efficacement et deux fois plus rapidement que des fibroblastes après transduction rétrovirale des facteurs de Yamanaka prouvant que les fibroblastes ne sont pas nécessairement les cellules les plus adaptées à ce processus<sup>164</sup>. De plus, l'état de différenciation joue également un rôle : plus la cellule est différenciée, moins efficace sera la reprogrammation. Il est en effet démontré que de la reprogrammation d'hépatocytes fœtaux résulte 50 fois plus de colonies que pour des hépatocytes matures<sup>165</sup>. Ceci peut notamment s'expliquer par le fait que les modifications épigénétiques qui doivent s'effectuer (comme les méthylation et déméthylation de promoteurs) pour que la cellule soit reprogrammée sont beaucoup plus nombreuses dans une cellule pleinement différenciée que dans une cellule progénitrice. Outre les cellules, les conditions de culture peuvent également jouer un rôle dans le processus de reprogrammation. La culture en condition hypoxique à 5% d'oxygène, similaires aux conditions auxquelles sont soumises les niches de cellules souches comme celles de la moelle épinière, plutôt que les 20% atmosphériques quadruple l'efficacité de reprogrammation<sup>166</sup>. De même, l'ajout de vitamine C au milieu de reprogrammation a fortement amélioré l'efficacité de la reprogrammation de fibroblastes humains par des rétrovirus<sup>167</sup>. Cette propriété ne semble pas liée à l'activité antioxydante de la vitamine C mais plutôt à son rôle comme cofacteur et donneur d'électrons dans les réactions d'oxydo-réductions se déroulant pendant la reprogrammation.

Le choix du cocktail de gènes de reprogrammation est également une autre donnée à prendre en compte. Il doit évidemment être adapté aux cellules à reprogrammer. Par exemple, il n'est pas nécessaire de forcer l'expression de *SOX2* dans les cellules progénitrices neurales puisque celles-ci l'expriment déjà de manière intrinsèque. En plus des facteurs classiques déjà cités, l'ajout du large antigène T du virus simien SV40, qui inhibe la protéine p53 et a donc une influence sur la prolifération, est une piste intéressante car il double l'efficacité de reprogrammation sur des fibroblastes transduits par des vecteurs rétroviraux<sup>168</sup> et la décuple sur des cellules issues de sang périphérique transfectées par des plasmides épisomaux oriP-EBNA1<sup>169</sup>. Il serait aussi intéressant de trouver un moyen d'éliminer ou de remplacer définitivement les facteurs *Klf4* et *c-Myc* des cocktails de reprogrammation du fait de leur fort potentiel oncogénique. Ceci semble désormais possible avec l'ajout de composés chimiques.

Depuis 2007, l'étude des mécanismes de reprogrammation et des voies de signalisation impliquées a permis de mettre en exergue des petites molécules aidant ce processus. La reprogrammation entraîne un important remodelage de la chromatine afin d'effacer la mémoire épigénétique des cellules somatiques pour la réinitialiser à l'état souche. Traiter ces cellules avec des inhibiteurs de méthyltransférases comme la 5-azacytidine et/ou des inhibiteurs d'histone déacétylases comme la trichostatine A ou l'acide valproïque améliore ainsi le pourcentage de colonies obtenues. Ce dernier composé fut utilisé dès 2008 sur des fibroblastes en remplacement des vecteurs rétroviraux codant pour *KLF4* et *c-MYC*<sup>170</sup>. La génération de colonies d'hiPSC a dans cette étude était multipliée par 100 par rapport à l'étude princeps de Yamanaka. En 2013, une équipe a réussi à reprogrammer des fibroblastes murins néonataux et adultes en ajoutant simplement sept petites molécules au milieu de culture : l'acide valproïque, le CHIR99021 (CHIR - inhibiteur de la Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3)), le 616452 (inhibiteur du TGFβ type I receptor kinase (ALK5)), la tranlycypromine (inhibiteur de monoamine oxydase), la forskoline (activateur de l'adénate cyclase), le D4476 (inhibiteur de la caséine kinase 1) et le 2-méthyl-5-hydroxytryptamine<sup>171</sup>. Pour le moment, cette méthode n'a pas encore été transposée avec succès sur des cellules humaines mais il semble fort probable que certaines équipes travaillent actuellement dessus. Si elle s'avère concluante, cette approche pour générer des hiPSC représenterait une avancée majeure et résoudrait de nombreux problèmes précédemment évoqués. Les composés chimiques sont en effet non immunogènes et souvent moins chers et plus faciles à synthétiser que la plupart des techniques vues dans le paragraphe précédent. De plus, les petites molécules traversent la membrane plasmique sans encombre et enfin, l'effet appliqué sur les cellules peut être finement régulé grâce à la maîtrise de la concentration ajoutée.

### **E. Comparaison entre les hESC et les hiPSC**

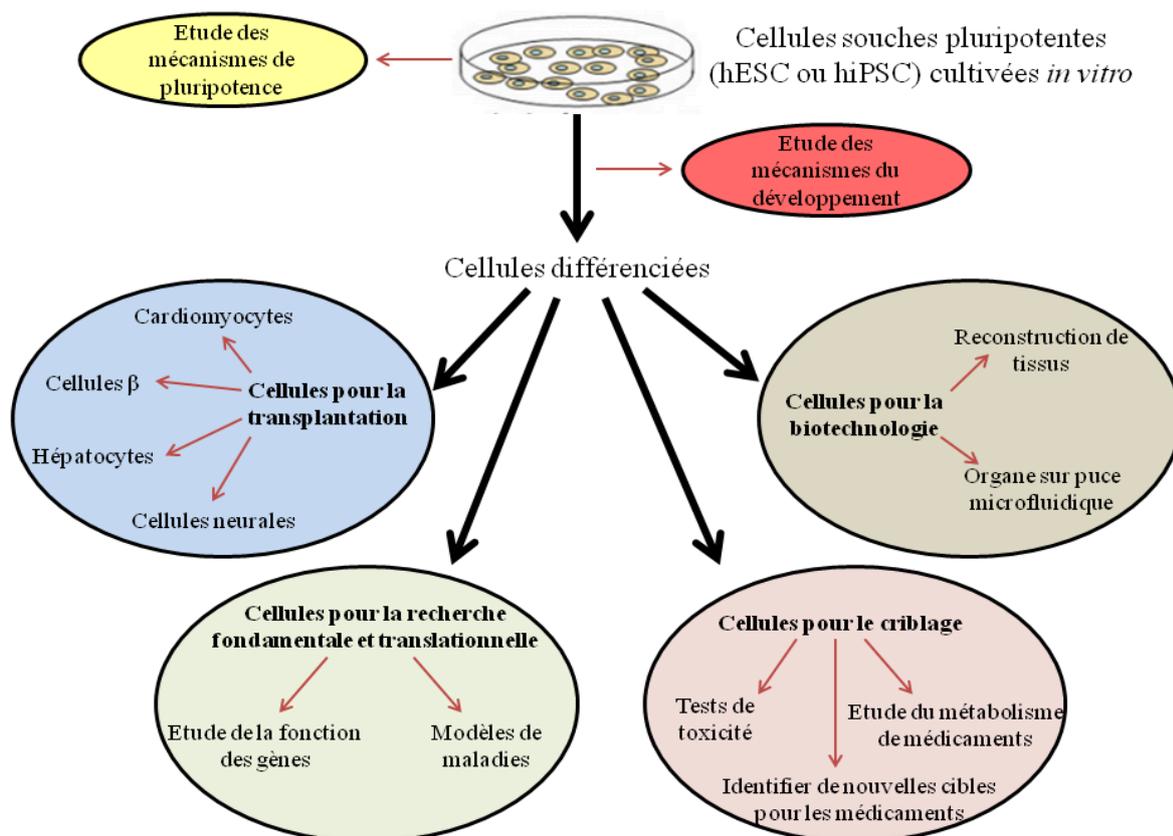
En dépit de leurs origines différentes, les hiPSC sont très semblables aux hESC en termes d'expression des marqueurs souche et de leur capacité de différenciation *in vivo* et *in vitro* en les trois feuilletts embryonnaires de l'organisme. Une étude récente a montré l'équivalence transcriptionnelle et épigénétique entre des hESC et des hiPSC reprogrammées par le SeV à partir de ces mêmes cellules hESC différenciées<sup>172</sup>. Ceci suggère donc que les principales variabilités qui subsistent entre les différentes populations de CSP sont principalement dues à la variabilité intrinsèque existante entre les patrimoines génétiques des individus d'où elles proviennent. Le processus de reprogrammation peut également entraîner la persistance d'une mémoire épigénétique provenant des cellules somatiques de départ résultant en des méthylomes différents<sup>173</sup>.

Les cellules hiPSC reproduisent parfaitement la plupart des maladies modélisées par les hESC. Il existe cependant deux contre-exemples précis : le syndrome du X fragile (responsable d'un retard mental chez les garçons) et l'anémie de Fanconi. La modélisation du syndrome de l'X fragile par les hESC issues d'un diagnostic préimplantatoire (DPI) et par les hiPSC présentent des caractéristiques phénotypiques différentes. Dans les hESC indifférenciées, le gène muté responsable de la maladie est exprimé et n'est réprimé que lors de la différenciation neurale de ces cellules. A l'inverse, ce même gène est déjà réprimé dans

les hiPSC issues d'un patient du fait d'une mémoire de l'état épigénétique de ce gène dans les cellules somatiques ayant servi à la reprogrammation<sup>174</sup>. Les premières reprogrammations de cellules somatiques de patients atteints d'anémie de Fanconi ont échoué, probablement du fait d'aberrations chromosomiques dans les cellules de départ et de l'implication de cette voie de signalisation dans le processus de reprogrammation. Des modifications de ce dernier ont été nécessaires pour parvenir à obtenir des hiPSC modèles de la maladie<sup>175</sup>. *A contrario*, cette maladie peut être modélisée dans les hESC à l'aide d'ARN interférents. L'ensemble de ces données suggère donc, à l'inverse du paragraphe précédent, que les différences existantes entre les lignées d'hESC et d'hiPSC peuvent être en partie dues au processus de reprogrammation.

### III. Intérêt et applications des cellules souches pluripotentes

Depuis leurs générations respectives, les hESC et les hiPSC sont devenues des cellules de choix pour l'étude des voies de signalisation impliquées dans le développement et la pluripotence ainsi que pour des applications en pharmaco-toxicologie, en bio-ingénierie et en thérapie cellulaire (**Figure 18**).



**Figure 18.** Applications des cellules souches pluripotentes

### **A. Un modèle pour l'étude du développement**

Bien que de nombreuses informations soient disponibles, la régulation du développement embryonnaire humain comporte encore de nombreuses zones d'ombre. Comme il est évident que l'on ne peut manipuler le développement humain comme cela peut être fait chez le ver, la drosophile ou la souris, beaucoup de données et connaissances concernant les principes généraux de notre développement sont extrapolées des études réalisées sur ces organismes modèles. Le plus souvent, les rôles des gènes et des voies de signalisation impliqués dans le destin cellulaire et la spécification tissulaire découverts chez les animaux modèles sont conservés chez l'Homme comme c'est le cas par exemple pour les gènes Hox (découverts chez la drosophile), impliqués dans l'identité cellulaire le long de l'axe antéro-postérieur<sup>176</sup>. La souris partageant avec l'Homme une taille similaire de génome (dont 99% de gènes homologues) et des similarités anatomiques et morphologiques, elle est naturellement devenue l'animal modèle de choix pour les études de développement.

Néanmoins, celui-ci souffre de plusieurs restrictions. Il existe 1% de gènes humains qui n'a aucun homologue murin identifiable, rendant difficile la compréhension de leur fonction. De plus, il existe des différences évidentes entre les deux espèces en termes de morphologie, période de gestation ainsi que de régulation spatio-temporelle des gènes pendant le développement embryonnaire. En conséquence, le modèle murin ne reproduit pas la totalité des maladies connues chez l'Homme et il n'est pas exclu de passer à côté de la fonction principale d'un gène parce qu'une autre a été extrapolée des études chez la souris. Par exemple, l'inactivation d'un allèle du gène GATA6 chez l'Homme entraîne l'absence d'une grande partie du pancréas (agénésie pancréatique) alors que les souris hétérozygotes pour GATA6 exhibent un phénotype tout à fait normal<sup>177</sup>, sous-entendant une redondance de fonctions avec un autre gène chez la souris qui n'existe pas chez l'Homme.

Dans le cadre du développement embryonnaire précoce, où peu est encore connu, la polarisation et la régionalisation qui apparaissent lors de la génération de corps embryoïdes ressemblent à ce que l'on peut observer lors de la gastrulation, phénomène qui aboutit à la formation des 3 feuilletts embryonnaires. L'analyse des profils d'expression de ces structures 3D a en effet montré une activation séquentielle de gènes correspondante à celle de la gastrulation<sup>178</sup> sous-tendant l'idée que les corps embryoïdes dérivés de CSP sont des bons modèles pour étudier les mouvements morphogénétiques. Grâce à la capacité de pluripotence des CSP, il est aussi possible de confirmer, d'infirmer puis d'affiner les mécanismes et voies de signalisation impliquées dans la différenciation vers un type cellulaire défini qui ont été préalablement étudiés dans les animaux modèles. Ceci permet alors de mettre au point des protocoles de différenciation basés sur des facteurs de croissance et des petites molécules qui miment les signaux reçus durant l'embryogénèse. En 2009, l'équipe de Ludovic Vallier a par exemple testé différents molécules, notamment l'Activine A, le FGF2 et le BMP4, à différentes doses et timings afin de déterminer le meilleur cocktail de facteurs de croissance permettant la génération de l'endoderme d'où vont dériver les futures cellules hépatiques<sup>179</sup>. Les cellules ainsi différenciées à partir des CSP permettent alors d'envisager d'autres applications à visée plus thérapeutique.

## **B. Modélisation de maladies**

La modélisation de maladies *in vitro* commence par l'établissement d'une lignée cellulaire portant le défaut moléculaire responsable de la maladie étudiée menant ainsi à un phénotype anormal. Les modèles animaux ne récapitulant pas toujours correctement le phénotype complet de la maladie et n'étant pas toujours disponibles (ou en nombre limité) voire parfois inexistantes dans le cas de certaines d'entre elles, la modélisation *in vitro* d'une maladie par les CSP représente donc un énorme atout pour étudier son étiologie et également pour trouver de nouveaux composés thérapeutiques (à travers, par exemple, le criblage pharmacologique détaillé dans le paragraphe suivant). De plus, les CSP permettent également d'étudier des types cellulaires pour lesquels il est difficile voire impossible d'obtenir des cellules primaires ou de les maintenir en culture, comme les neurones ou les hépatocytes par exemple. Il existe tout de même quelques limitations notamment pour les maladies multifactorielles où la composante "environnement" semble plus difficile à reproduire *in vitro*.

Les hESC peuvent être utilisées pour étudier les anomalies chromosomiques comme la monosomie X (responsable du syndrome de Turner) par l'isolement de cellules aneuploïdes qui apparaissent spontanément durant la dérivation puis la culture de la lignée<sup>180</sup>. Dans le cadre d'une fécondation *in vitro*, il est également possible de dériver des lignées d'hESC porteuses d'une anomalie chromosomique ou d'une mutation spécifique à partir d'un embryon non éligible pour un projet parental après identification par DPI. Cela a été réalisé pour la maladie de Steinert<sup>181</sup> (dystrophie myotonique) ou pour le syndrome du X fragile<sup>174</sup>. Néanmoins, cette technique est limitée par le spectre assez restreint de maladies recherchées lors d'un DPI et de nombreuses maladies métaboliques ne peuvent être modélisées de cette façon. Il est aussi possible d'introduire dans une lignée normale d'hESC la mutation souhaitée et causer ainsi le défaut phénotypique. La preuve de concept date de 2004 où l'introduction d'une mutation dans le gène HPRT1, responsable du syndrome de Lesch-Nyhan, dans la lignée d'hESC H13, a causé les défauts phénotypiques typiques de cette maladie<sup>182</sup>.

Par leur origine unique, les hiPSC représentent *a priori* un outil extrêmement pertinent pour la modélisation *in vitro* de maladies génétiques. En effet, les lignées générées portent le même patrimoine génétique que les cellules somatiques dont elles sont issues. Ainsi, si ces cellules portent une ou des mutation(s) à l'origine d'une maladie, les hiPSC et tous les types cellulaires que l'on pourra en dériver la/les porteront également. A l'heure actuelle, il existe de nombreuses maladies qui ont déjà été modélisées via les hiPSC comme la maladie de Huntington<sup>183</sup> (maladie neurodégénérative), le diabète<sup>183</sup> (maladie multifactorielle), le syndrome du QT long<sup>184</sup> (maladie cardiaque) ou encore la trisomie 21<sup>183</sup> (anomalie chromosomique).

Les maladies métaboliques héréditaires du foie ne font pas exception avec par exemple l'existence de modèles pour la déficience en  $\alpha$ -1 anti trypsine (A1AT), la maladie de Wilson ou encore l'hypercholestérolémie familiale :

\_ La déficience en A1AT est due à des mutations dans le gène *SERPINA1* et entraîne une accumulation de protéine A1AT mal repliée dans le réticulum endoplasmique (RE) des hépatocytes. De ce fait, elle ne peut être excrétée et induit une hépatotoxicité qui, dans certains cas, entraîne une atteinte hépatique sévère. Des hiPSC ont été générés à partir de patients atteints de cette maladie puis différenciés en hépatocytes dans lesquels les auteurs ont retrouvé la caractéristique phénotypique classique, l'accumulation de la protéine mutante dans le RE<sup>185</sup>. Une étude récente a même mis en évidence les différences existantes au niveau de l'accumulation et de la sécrétion de cette protéine mal repliée entre des patients avec ou non une atteinte hépatique, montrant ainsi que les hépatocytes différenciés à partir d'hiPSC étaient un très bon modèle pour l'étude de la physiopathologie des maladies métaboliques du foie<sup>186</sup>.

\_ La maladie de Wilson se caractérise par un défaut d'excrétion dans la bile du cuivre accumulé dans les hépatocytes à cause de mutations sur le gène *ATP7B* codant pour une pompe ATPase responsable de l'élimination du cuivre de l'organisme. Deux groupes ont publié la génération d'hiPSC "Wilson"<sup>187,188</sup> ainsi que la restauration d'un phénotype normal dans les hépatocytes différenciés à partir de ces derniers après thérapie génique médiée par des vecteurs lentiviraux ou addition de la protéine chaperone curcumine dans le milieu de culture<sup>187</sup>. Dans le cas de cette maladie, les hiPSC peuvent apporter un éclairage supplémentaire sur la compréhension de sa présentation clinique et des mécanismes mis en jeu lors de l'accumulation excessive de cuivre. En effet, les patients peuvent souffrir d'atteintes hépatiques (hépatites) et/ou neurologiques (tremblements) et/ou psychiatriques (sautes d'humeur, dépression) sans qu'il y ait de relation claire entre la mutation impliquée et le phénotype, une même mutation génétique entraînant très souvent des symptômes complètement différents.

\_ L'hypercholestérolémie familiale de type IIa, résultant en un taux élevé de lipoprotéines de basse densité (LDL) dans le sang (voir chapitre 3), est due à des mutations dans le gène *LDLR* codant pour le récepteur des LDL. Là encore, la génération d'hiPSC à partir de fibroblastes d'un patient hétérozygote composite (deux mutations différentes sur les deux allèles entraînant un phénotype équivalent à celui d'un homozygote) a permis de mettre en évidence le défaut phénotypique principal, à savoir la faible internalisation d'un ligand fluorescent du récepteur. Un traitement à base de statines, médicaments hypocholestérolémiants qui augmente la synthèse de LDL, a permis d'observer, à l'image de ce qui se passe chez les patients, une réponse à l'induction au niveau transcriptomique (augmentation de la quantité d'ARNm du LDL) qui ne se retrouve pas au niveau fonctionnel (la protéine produite étant non fonctionnelle), prouvant la pertinence de la modélisation avec les hiPSC<sup>189</sup>. Une autre étude a également montré la possibilité de réverser le phénotype malade par la transduction lentivirale des hiPSC porteurs d'une mutation homozygote par un plasmide portant le gène normal du LDL<sup>190</sup>. Désormais, il semble indispensable de générer de nouveaux modèles de cette maladie à partir de cellules de patients porteurs d'autres mutations. En effet, celles-ci sont extrêmement nombreuses et affectent différentes étapes du cycle de vie du récepteur. Ainsi, la régulation lipidique et les traitements à apporter ne sont pas nécessairement les mêmes fonction de la mutation de départ.

### C. Modélisation de l'infection par le VHC

La compréhension totale des différentes étapes du cycle viral du VHC reste difficile à atteindre par manque de modèles adéquats. En effet, les premiers essais d'infection *in vitro* de lignées cellulaires avec des sérums de patients infectés par le VHC ont rencontré un succès très limité. La réplication virale était très faible et très variable dans les premières études effectuées et les protéines virales n'ont pas été détectées dans ces lignées<sup>191</sup>. Il a alors fallu attendre le début des années 2000 avec la découverte d'un sous-clone de la lignée d'hépatocarcinome Huh-7, Huh-7.5<sup>192</sup>, hautement permissif à l'infection du VHC et le clonage de JFH1<sup>193</sup>, une souche virale de génotype 2a avec une forte capacité de réplication, pour lever une grande partie des barrières précédentes. Ces cellules ont permis pour la première fois de produire *in vitro* des particules virales infectieuses, appelées HCVcc (pour Hepatitis C Virus cell culture) qui ont par la suite permis des avancées majeures dans la compréhension dans l'étude du cycle viral du VHC.

Néanmoins, ces cellules ne sont pas le modèle idéal car elles sont transformées, prolifératives et elles ne possèdent pas certaines caractéristiques des hépatocytes différenciés en particulier au niveau des voies de régulation métaboliques et de la réponse interféron normalement attendue lors de l'infection. De plus, elles ne possèdent pas un métabolisme lipidique correct, ce qui empêche les particules virales formées de devenir des lipovirions, forme virale la plus infectieuse et la plus pertinente physiologiquement. En 2010, le groupe d'Arielle Rosenberg a mis en place un système basé sur l'infection d'hépatocytes humains primaires par les particules HCVcc qui a permis de produire des particules virales infectieuses, dénommées HCVpc (pour Hepatitis C Virus primary culture), dans des cellules physiologiquement proches de la cellule naturellement infectée *in vivo*<sup>194</sup>. Néanmoins, les problèmes déjà évoqués de disponibilité et de mise en culture des hépatocytes primaires empêchent pour le moment une utilisation à grande échelle de ces particules et de ce modèle. L'infection d'hépatocytes différenciés à partir de CSP pourrait donc permettre de contourner ce problème et d'étudier l'influence du patrimoine génétique de différents individus sur l'infection virale à condition que les hépatocytes générés soient suffisamment polarisés et matures pour exprimer les récepteurs viraux<sup>195</sup>.

Plusieurs études ont montré que les hESCs comme les hiPSCs étaient capables, après différenciation en hépatocytes plus ou moins matures, de supporter le cycle viral complet du VHC. Concernant les hESCs, une étude rapporte que les hépatocytes différenciés à partir de la lignée WA09 expriment certaines protéines connues pour leur implication dans l'entrée du VHC (claudine 1, CD81, SRB1 et occludine) en plus de facteurs hépatiques spécifiques (HNF4 $\alpha$  et albumine). Après inoculation de la souche JFH1 sur ces cellules, un marquage par immunofluorescence a mis en évidence la protéine NS5A dans environ 15% des cellules, suggérant donc que le virus y est entré et s'y est répliqué. De plus, les surnageants récupérés jusqu'à 10 jours post-infection ont permis d'infecter des cellules Huh-7.5, impliquant donc une production de particules virales infectieuses dans les hépatocytes dérivés d'hESCs<sup>196</sup>. Cependant, les taux de réplication sont faibles en comparaison avec les Huh-7.5 suggérant que le système peut être amélioré, notamment par une différenciation en hépatocytes plus matures.

La première étude démontrant la possibilité de modéliser l'infection par le VHC dans les hépatocytes différenciés à partir d'hiPSC a été publiée quasi simultanément à la précédente<sup>197</sup>. De la même façon, les auteurs ont montré que leurs cellules exprimaient les protéines d'entrée du VHC et qu'elles permettaient la production des particules virales pouvant réinfecter des Huh-7.5, fortement diminuée comme attendu lors de l'ajout d'un inhibiteur de réplication (2'CMA). Ils ont également mis en évidence l'induction d'une réponse antivirale inflammatoire médiée par le TNF $\alpha$  après infection, ce qui n'est pas possible avec le modèle classique d'HCVcc. Toutefois, l'expression de la protéine NS3/4A dans les hépatocytes différenciés à partir des hiPSC est faible et les auteurs ne précisent ni le taux de réplication ni le taux de production de virions infectieux dans ces cellules. Ceci semble suggérer que le niveau de différenciation n'est pas optimal pour la pleine exploitation de ce système. Une deuxième étude plus récente a montré en plus des caractéristiques déjà citées qu'outre la souche JFH1 de génotype 2a, leurs hépatocytes dérivés d'hiPSCs étaient infectables par des sérums de patients de différents génotypes (1a, 1b, 2, 3 et 4). Néanmoins, une fois de plus, le taux de réplication du virus restait faible par rapport aux Huh-7.5 du fait d'une population cellulaire relativement immature. Pour améliorer ce dernier point, les auteurs ont alors humanisé des foies d'un modèle de souris immunodéficientes avec une lésion hépatique entraînant une régénération (MUP-uPA/SCID/Bg) qui permet ainsi la greffe de cellules humaines. Après avoir vérifié que les hépatocytes dérivés d'hiPSCs greffés dans les souris s'étaient différenciés *in vivo*, ils ont de nouveau inoculé ces souris avec le VHC et ainsi mis en place un modèle d'infection par le VHC chez le petit animal permettant des études sur le long terme (jusqu'à 100 jours post infection contre 2 semaines maximum actuellement *in vitro*)<sup>198</sup>.

Les CSP semblent donc représenter un outil de choix pour modéliser *in vitro* (à condition d'avoir des cellules suffisamment différenciées) et *in vivo* chez le petit animal l'infection par le VHC.

#### **D. Criblage pharmaco- et toxicologique**

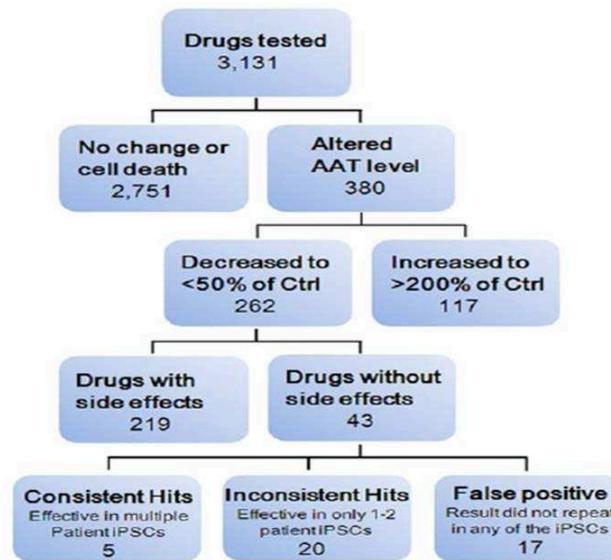
La découverte d'un nouveau médicament est un processus extrêmement long, complexe et représente un énorme coût pour les industries pharmaceutiques. Comme il faut être certain que la nouvelle molécule mise sur le marché soit sûre et efficace, il est estimé que cette mise à disposition du public prend entre 10 et 15 ans et coûte environ 2 milliards de dollars américains. De plus, nombre d'entre elles (environ 90%) n'arriveront pas au terme du processus, par manque d'efficacité ou apparition d'effets secondaires néfastes lors des essais cliniques de phase I/II ou du fait d'une toxicité imprévue apparaissant lors des phases III. Il est donc nécessaire de générer les modèles les plus fiables afin de pouvoir écarter rapidement les molécules qui ne répondent pas aux attentes et limiter ainsi la perte d'argent.

Les modèles cellulaires basés sur les lignées cellulaires immortalisées et contenant un système d'expression d'un gène reporteur ou les modèles murins génétiquement modifiés ne récapitulent ni précisément ni exactement les effets d'un médicament candidat dans des conditions physiologiques. Les CSP ouvrent donc de nouvelles possibilités dans ce domaine en permettant, après différenciation, d'établir des modèles humains *in vitro* de toxicité,

notamment sur des neurones, des cellules cardiaques ou encore des hépatocytes qui sont les 3 types cellulaires les plus atteints par les effets toxiques entraînant ainsi le retrait d'une molécule candidat lors d'un essai clinique. Par exemple, un test basé sur la prolongation de la durée de potentiel d'action de cardiomyocytes dérivés d'hESC après traitement par un médicament existe désormais et permet d'obtenir des meilleures significativités statistiques que le test standard *in vitro* précédemment existant<sup>199</sup>. Dans une autre étude, des hépatocytes dérivés d'hiPSC ont été exposés à différentes concentrations de composés hépatotoxiques connus comme l'aflatoxine B1 pour des durées allant de 2 à 14 jours (ce qui est impossible à réaliser sur des lignées primaires d'hépatocytes à cause de leur rapide différenciation) et ces cellules ont montré les réponses classiques d'hépatotoxicité au niveau mécanistique, comme la stéatose et la phospholipidose<sup>200</sup>. Ces modèles cellulaires semblent donc d'un grand intérêt pour gagner temps et argent lors de la recherche de nouveaux médicaments.

Outre la toxicité, il est également envisageable de réaliser des cribles médicamenteux dans le but direct de trouver une molécule capable de restaurer un phénotype normal dans des hiPSC pathologiques dérivées de patients. Cette application a évolué de concert avec la mise en place de modèles cellulaires de maladies. Des approches de médicaments candidats, basées sur la connaissance de l'action d'une molécule sur une voie de signalisation ou un phénotype, ont ainsi pu être testées après avoir élucidé la physiopathogénèse de la maladie grâce aux hiPSC, comme ce fut par exemple le cas pour la maladie de Charcot induite par une mutation du gène *TDP-43*. Cette dernière, responsable notamment d'erreurs d'épissage dans les neurones moteurs dérivés d'hiPSC de patients conduisant à leur mort, a pu être corrigée par un crible de molécules qui modulent la transcription par un effet sur l'épissage des ARN ou la modification des histones. Les auteurs de l'étude ont montré que parmi les 4 molécules étudiées, l'acide anacardique augmentait le taux de survie des motoneurones.

De même, grâce à ce système et à l'inverse des modèles animaux, il est tout à fait possible de réaliser des expériences de criblage à haut débit sur tout un panel de molécules à la condition toutefois d'avoir un phénotype facile à identifier pour savoir si l'une de celles-ci a eu un effet bénéfique. Cinq composés issus de la banque de médicaments de l'institut John Hopkins (3131 molécules) ont ainsi pu être mis en évidence comme des candidats possibles pour le traitement de la déficience en A1AT après un criblage à haut débit<sup>201</sup>. Ces derniers réduisent de manière significative l'accumulation de la protéine mal repliée sur au moins 3 lignées d'hépatocytes dérivés d'hiPSC issues de 3 patients différents par rapport à leurs contrôles non traités sans entraîner ni la mort cellulaire ni d'effets secondaires néfastes (**Figure 19**). De la même façon, il a été mis en évidence très récemment par criblage haut débit sur des hépatocytes dérivés d'hiPSC d'un patient atteint d'hypercholestérolémie familiale que les glycosides cardiaques (composés organiques agissant sur le rythme des contractions du cœur) permettaient de réduire la production et la sécrétion d'apolipoprotéine B100<sup>202</sup>. Ces résultats ont été confirmés dans des souris avec des foies humanisés et en examinant les dossiers médicaux de patients traités avec ces composés pour une affection cardiaque. En effet, leur taux de LDL-circulants (directement lié à la production d'ApoB100 – voir chapitre 3) après traitement était plus faible que sans traitement montrant donc la robustesse du criblage réalisé.



**Figure 19.** Pipeline pour du criblage de médicaments à haut débit appliqué à la déficience en A1AT<sup>201</sup>

La première étape élimine les molécules qui induisent la mort des hépatocytes différenciés à partir d'hiPSC ou qui n'induisent pas de changement dans l'accumulation de la protéine mal repliée. La seconde élimine les molécules induisant l'augmentation de l'accumulation de cette protéine. La troisième élimine les molécules avec des effets secondaires. Enfin, la quatrième et dernière élimine les molécules qui ne reproduisent pas leurs effets sur les cellules déjà testées ou qui ne sont pas efficaces sur d'autres lignées.

Les CSP sont également un atout considérable pour les composés qui peuvent être toxiques pour plusieurs organes ou les maladies qui affectent plusieurs cibles. En effet, la possibilité de les différencier en plusieurs types cellulaires avec le même patrimoine génétique permet de passer outre la spécificité de certains composés pour tel ou tel organe et réduire ainsi les risques d'abandon du produit en cours de développement pour cause d'inefficacité ou de toxicité non détectées en amont du processus.

### E. Thérapie cellulaire et médecine personnalisée

La médecine régénérative s'applique à la restauration fonctionnelle d'un tissu ou d'un organe atteint d'une insuffisance sévère ou d'une maladie chronique quand les réponses régénératrices de l'organisme ne suffisent plus. Les organes disponibles issus de dons ne permettent pas de faire face à l'entièreté des demandes et il est donc nécessaire de trouver des alternatives. En ce sens, les CSP représentent un potentiel énorme pour subvenir aux besoins sous plusieurs conditions strictes. Premièrement, elles doivent avoir été dérivées, cultivées puis différenciées en condition GMP (notamment sans aucun produit d'origine animale) pour obtenir un grade clinique, condition *sine qua non* pour que les autorités de santé leur accordent la possibilité d'effectuer un essai clinique. Ensuite, il est nécessaire de s'assurer que la population de cellules différenciées est homogène et ne contient aucune cellule souche résiduelle, qui possède un fort risque de tumorigénicité si injectée. Il faut également vérifier que la population obtenue soit suffisamment mature et fonctionnelle pour assurer les fonctions déficientes une fois transplantées *in vivo*. A défaut, la population doit être capable de finir sa maturation *in situ* pour suppléer les cellules non fonctionnelles. Enfin, spécifiquement pour

les hESC, il peut exister des problèmes d'immunotolérance suite à une greffe de cellules nécessairement hétérologue, pouvant amener un rejet du greffon.

Néanmoins, malgré ces restrictions, des essais cliniques impliquant les CSP ont été initiés dans le monde après des essais précliniques encourageants chez la souris ou le primate<sup>203</sup>. Le premier d'entre eux, approuvé par la Food & Drug Administration (FDA) américaine, a été réalisé en Californie par la société Geron en 2010<sup>204</sup>. Il portait sur le traitement de lésions de la moelle épinière par l'injection de cellules progénitrices des oligodendrocytes différenciées à partir d'hESC qui avait permis une remyélinisation des neurones, une croissance nerveuse et des propriétés angiogéniques chez des rats injectés<sup>205</sup>. Cependant, la société a mis un terme à l'essai un an après son début, après seulement 4 patients transplantés sur les 10 prévus, précisant vouloir recentrer son activité sur les thérapies anticancéreuses. Après avoir été racheté, Geron, devenu Asterias, a annoncé en 2014 qu'aucun effet secondaire notable n'avait été détecté dans les patients transplantés après 3 ans de suivis cliniques sans toutefois préciser si le traitement avait eu une quelconque efficacité.

D'autres essais cliniques de phase I/II utilisant les hESC sont actuellement en cours portant sur des maladies variées : la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), la dystrophie maculaire de Stargardt, le diabète de type I et les atteintes cardiaques aiguës. Pour les maladies oculaires que sont la DMLA et la dystrophie maculaire de Stargardt, les premiers résultats montrent que l'injection sous-rétinienne d'hESC différenciées en RPE n'a pas induit de rejet immunitaire et a entraîné un repeuplement de la macula permettant le maintien de l'acuité visuelle sans nouvelle détérioration en comparaison avec l'œil non injecté<sup>206</sup>. Pour le diabète, un essai multicentrique mené par la compagnie Viacyte est actuellement en cours, reposant sur la transplantation sous-cutanée de progéniteurs des cellules  $\beta$  (qui produisent l'insuline) encapsulés pour éviter tout rejet immunitaire et pour permettre la finalisation de la maturation en cellules sécrétrices d'insuline<sup>207</sup>. Pour les atteintes cardiaques aiguës, l'essai initié en 2013 a conduit à la transplantation de cardiomyocytes dérivés d'hESC intégrés dans une matrice de fibrine (permettant l'intégration des cellules greffées dans le tissu cardiaque) chez un patient atteint d'une insuffisance sévère. Trois mois après l'opération, les symptômes de la maladie se sont améliorés<sup>208</sup>.

Concernant les hiPSC, un seul essai clinique a pour le moment été mis en œuvre. Celui-ci, mené au Japon par le Pr Takahashi, concerne une fois de plus la DMLA. Ce choix s'explique certainement par la robustesse des protocoles de différenciation des CSP en RPE et la possibilité de surveillance et de suivi post-greffe relativement aisée dans l'œil pour repérer une éventuelle anomalie. Les essais précliniques réalisés chez le primate n'ont montré ni formation de tumeurs ni réaction immunitaire<sup>209</sup>. La progression de la maladie semble s'être arrêtée pour la première patiente transplantée en 2014 par des feuillets de RPE différenciés à partir de ses propres hiPSC. Cependant, l'essai clinique est pour le moment stoppé à cause de mutations spontanées retrouvées dans les hiPSC du second patient, dont l'une dans un gène potentiellement oncogénique<sup>210</sup>. Depuis, le Japon a changé sa législation, préférant des greffes d'hiPSC allogéniques plutôt qu'autologues.

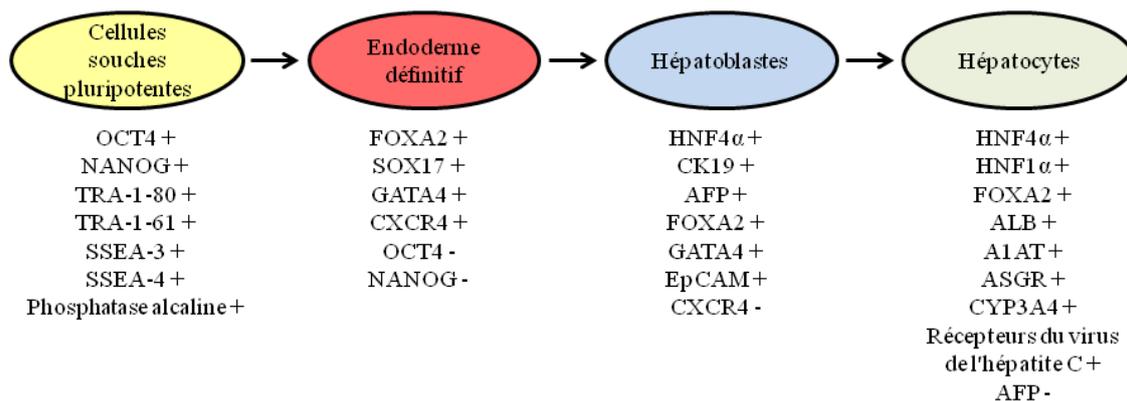
Dans le cadre plus spécifique de l'hépatologie, en plus de l'application énoncée ci-dessus, les CSP représentent une source de cellules plausible à toutes les possibilités de soigner un foie vues dans le premier chapitre de ce manuscrit. Pour la transplantation d'hépatocytes, il ne semble pas nécessaire de disposer d'une population pleinement mature en terme d'expression des enzymes de détoxification par exemple car il a été montré que les hépatocytes différenciés à partir d'hiPSC continuaient à murer après intégration dans le parenchyme hépatique<sup>198</sup>. Par contre, il est important que la prise de greffe soit suffisante afin d'assurer le remplacement des cellules défaillantes. A l'heure actuelle, les études menées dans des animaux modèles de repeuplement, comme la souris immunodéficente uPA (qui exprime la protéine activatrice du plasminogène de type urokinase, toxique pour les hépatocytes), montrent que les niveaux de repeuplement des hépatocytes différenciés à partir d'hiPSC, même s'ils peuvent atteindre 15%<sup>198</sup>, sont plus faibles que ceux obtenus avec des hépatocytes humains primaires<sup>211</sup>. Il est donc nécessaire avant d'envisager une application chez l'Homme de poursuivre les études à la fois dans les petits et les grands animaux (notamment les primates) pour continuer à améliorer les protocoles de greffe afin d'assurer l'intégration d'un maximum d'hépatocytes dans le parenchyme hépatique.

Pour servir aux applications susmentionnées, il est donc important de pouvoir différencier les CSP en une population homogène d'hépatocytes. Pour cela, il existe de nombreux protocoles à disposition dans la littérature.

#### **IV. Différenciation des CSP en hépatocytes**

L'essor des CSP et leurs intérêts potentiels ont rapidement engendré la nécessité de travailler sur la mise au point de protocoles de différenciation afin d'obtenir tout un panel de cellules différenciées pour les applications précédemment décrites. A partir des informations connues sur l'embryogénèse hépatique (détaillées dans le premier chapitre de ce manuscrit), de nombreuses équipes se sont attelées à imiter les différents signaux récapitulant l'embryogénèse hépatique reçus par les cellules au fur et à mesure de leur spécification en hépatocytes.

Les premiers protocoles publiés se basaient sur la formation de corps embryoïdes qui étaient par la suite traités par des cocktails de facteurs de croissance et de cytokines spécifiques<sup>212</sup>. Cependant, tous les protocoles existants basés sur cette méthode ont une efficacité limitée de différenciation des CSP en hépatocytes qui s'ajoute à une différenciation spontanée d'un bon nombre de cellules de l'agrégat vers des lignages non désirés. Dans le but d'obtenir la population terminale la plus pure possible, ces protocoles ont ainsi été rapidement remplacés par d'autres basés uniquement sur la différenciation d'une monocouche de CSP. Même s'ils diffèrent par les molécules utilisés, ils reposent tous sur la même idée qui est l'induction séquentielle de l'endoderme définitif, la spécification de ce dernier en endoderme hépatique puis en hépatoblastes et enfin, la différenciation de ces hépatoblastes dans le lignage hépatocytaire, chacune de ses populations devant exprimer des marqueurs spécifiques (**Figure 20**).



**Figure 20.** Principaux marqueurs à vérifier lors de la différenciation des CSP en hépatocytes

### A. Des CSP à l'endoderme définitif

Basée sur la première publication dans le domaine datant de 2005<sup>213</sup>, la majorité des protocoles actuels utilisés pour la différenciation des CSP en endoderme définitif se base sur l'activation de la voie de signalisation Activine/Nodal. Pour cela, il faut ajouter à forte concentration (100 ng/mL) au milieu de culture l'Activine A (AA), une protéine membre de la famille du TGF- $\beta$  qui permet de diriger les cellules vers le lignage endodermique. Ce traitement induit la différenciation de plus de 80% des CSP en endoderme définitif après 5 jours de traitement via notamment l'analyse de l'expression de CXCR4, récepteur membranaire normalement présent sur les cellules de l'endoderme définitif. Ce rendement a été amélioré, notamment par l'ajout d'un inhibiteur de la PI3K, le plus couramment utilisé étant le LY294002<sup>214</sup>. D'autres études ont montré que l'interaction des protéines Wnt3a, FGF2 ou encore BMP4 avec l'Activine A permettait d'augmenter la pureté de la population endodermique finale, celle-ci dépassant désormais les 98%<sup>92</sup>. Il a récemment été démontré que le traitement des CSP par le CHIR99021 (petite molécule inhibitrice de la glycogène synthase kinase 3 GSK3 et activatrice de la voie Wnt) 24 heures avant celui par l'Activine A permet l'induction de la plaque primitive dont les cellules sont les précurseurs du mésoderme et de l'endoderme, sous-tendant le fait que la différenciation en endoderme définitif est initialement indépendante de la voie Activine/Nodal<sup>215</sup>.

Les différences de méthylomes combinées aux différences de patrimoine génétique entre les différentes lignées de CSP entraînent une variabilité importante de la capacité de ces lignées à se différencier<sup>216</sup>. Il ne peut y avoir de ce fait de protocole universel, certains étant toutefois moins efficaces que d'autres selon la lignée utilisée. Cette première étape de différenciation n'en reste néanmoins pas moins cruciale pour la suite. En effet, il est important de s'assurer que la population obtenue est bien homogène d'une part et qu'il n'y a plus de CSP en son sein pour permettre une bonne différenciation en hépatocytes par la suite et éviter que les éventuelles cellules résiduelles ne se différencient en tout autre chose lorsqu'elles recevront les prochains signaux, contaminant ainsi la culture. De la même façon, il est nécessaire de s'assurer que les cellules ne se sont pas différenciées en endoderme extra-embryonnaire ce qui empêcherait le déroulement correct de la suite de la différenciation. Les

cellules doivent ainsi exprimer CXCR4, GATA4, FOXA2 et SOX17 mais surtout pas HNF4 $\alpha$  qui n'est exprimé que plus tardivement dans le processus<sup>217</sup>.

### **B. Spécification en endoderme hépatique puis en hépatoblastes**

La spécification de l'endoderme définitif en endoderme hépatique puis en progéniteurs hépatiques ne fait pas non plus consensus entre les différents protocoles existants. La plupart d'entre eux se basent sur l'induction de la voie de signalisation BMP par l'ajout de BMP2 ou BMP4 et de la voie des FGF par l'ajout de FGF2 à forte concentration qui sont les signaux reçus *in vivo* en provenance respectivement du septum transversum et du cœur en développement<sup>218,219</sup>. A ce stade de différenciation, la possibilité de générer une population cellulaire multipotente auto-renouvelable, proliférative et équivalente à l'endoderme définitif antérieur a pu être démontrée<sup>220</sup>. Cette dernière, dénommée hFSC pour human foregut stem cells, garde la capacité à se différencier par la suite en hépatocytes, en cellules pancréatiques et en cellules pulmonaires. Elle permet également de réduire la variabilité existante entre différentes lignées de CSP lors de la poursuite de la différenciation vers les cellules finales.

Dans un deuxième temps, pour obtenir des hépatoblastes, plusieurs combinaisons semblent possibles entre différentes cytokines, principalement FGF4, HGF, acide rétinoïque et dexaméthasone, et des molécules chimiques non spécifiques comme le butyrate de sodium ou le diméthyl sulfoxyde (DMSO). Les cellules ainsi obtenues expriment à la fois des marqueurs hépatocytaires comme HNF4 $\alpha$  ou l'AFP et des marqueurs des cellules biliaires comme la cytokératine 19, ce qui prouve bien leur bipotence à ce stade de la différenciation.

### **C. Différenciation hépatocytaire**

Là encore, il existe de nombreuses variantes disponibles concernant la différenciation des hépatoblastes en hépatocytes. L'utilisation de HGF semble néanmoins être une constante à tous ces protocoles<sup>92,214,218</sup>, ce facteur de croissance étant connu pour promouvoir *in vivo* la prolifération et la survie des hépatoblastes<sup>221</sup>. De même, l'ajout dans le milieu de différenciation d'OSM, sécrétée chez la souris par les cellules hématopoïétiques et induisant la maturation des hépatoblastes dans le foie fœtal murin<sup>28</sup>, est largement répandu. Récemment, une équipe américaine est partie du constat qu'*in vivo*, les cellules bordant les veines portes se différenciaient naturellement en cellules biliaires sous l'effet de signaux Notch et TGF- $\beta$  sécrétés par les cellules endothéliales de la veine porte. A l'inverse, les cellules se différenciant en hépatocytes ne recevaient pas ces signaux. Ainsi, en combinant la répression des voies de signalisation Notch et TGF- $\beta$  avec HGF, ils sont parvenus à améliorer leur protocole de différenciation<sup>222</sup>. Par ailleurs, il est aussi possible de différencier les CSP en hépatocytes en n'utilisant aucun facteur de croissance mais uniquement des petites molécules chimiques : le CHIR pour induire l'endoderme, le DMSO pour passer au stade hépatoblaste et finalement la dexaméthasone et le Dihexa (une molécule agoniste du HGF) pour obtenir des hépatocytes<sup>223</sup>. Toutefois, les molécules comme le CHIR et le DMSO ne sont pas spécifiques de ces inductions en particulier.

Les hépatocytes ainsi générés doivent exprimer un certain nombre de fonctions<sup>224</sup> :

- \_ Morphologiquement, ils sont jointifs, polygonaux et avec un fort ratio nucléo-cytoplasmique
- \_ Ils expriment les marqueurs spécifiques des hépatocytes comme l'albumine ou HNF4 $\alpha$
- \_ Ils synthétisent de l'albumine
- \_ Ils synthétisent de l'urée en présence de chlorure d'ammonium
- \_ Ils sont capables de stocker le glycogène (et sont donc positives au marquage à l'acide périodique de Schiff)
- \_ Ils possèdent des fonctions de détoxification déterminées par l'activité des enzymes cytochromes P450, qui doit également être inductibles (après traitement par la rifampicine ou le phénobarbital par exemple) ou encore par l'internalisation puis le relargage de substrats spécifiques comme le vert d'indocyanine
- \_ Ils doivent être polarisés
- \_ Ils sont infectables par le VHC

En réalité, les protocoles actuellement disponibles (liste non exhaustive en **Figure 21**) ne permettent pas d'obtenir *in fine* des hépatocytes répondant à tous les critères énoncés ci-dessus, les niveaux de synthèse d'albumine et d'urée ou d'expression des cytochromes, quand ils sont publiés, restant bien en-deçà de ce qu'il est possible d'obtenir avec des hépatocytes humains primaires. Aussi est-il admis qu'en l'état actuel des cultures en monocouches, les hépatocytes dérivés de CSP correspondent plutôt à des hépatocytes fœtaux ou néonataux<sup>225</sup>.

Substrate	Definitive endoderm induction	Hepatic specification	Hepatic differentiation	Ref.
MEFs	AA (3d)	FGF4, BMP2 (5d)	HGF (5d) + OSM (5d)	Cai <i>et al.</i> , 2007 <sup>24</sup>
MEFs/collagen I	AA, FBS, KOSR (5d)	FGF4, HGF, KOSR (3d)	BSA, FGF4, HGF, OSM, Dex (2d) + FGF4, HGF, OSM, Dex (9d)	Argawal <i>et al.</i> , 2008 <sup>64</sup>
Matrigel	AA, Wnt3a (3d)	1% DMSO, 20% KOSR (5d)	HGF, OSM (9d)	Hay <i>et al.</i> , 2008 <sup>65</sup>
MEFs	AA, FGF2 (5d)	BMP 2/4, FGF1/2 (11d)	EGF, insulin, hydrocortisone, transferrin (28d)	Brolen <i>et al.</i> , 2009 <sup>68</sup>
MEFs	AA, bFGF (3d)	HGF, DMSO (8d)	Dex (3d)	Basma <i>et al.</i> , 2009 <sup>64</sup>
Matrigel	AA (5d)	FGF4, BMP2 (5d)	HGF (5d) + OSM (5d)	Si-Tayeb <i>et al.</i> , 2010 <sup>71</sup>
Matrigel	AA, Wnt3a, (3d); +AA (2d)	1% DMSO, 20% KOSR (5d)	OSM, HGF (5d)	Sullivan <i>et al.</i> , 2010 <sup>72</sup>
Matrigel	AA, BMP4, FGF2 (3d)	FGF10 (3d)	FGF4, HGF, EGF (8d)	Toboul <i>et al.</i> , 2010 <sup>73</sup>
Fibronectin	AA, FGF2, BMP4, Ly294002, CHIR99021 (1d) + AA, FGF2, Ly294003 (1d)+AA, FGF2 (1d)	AA (5d)	HGF, OSM (17d)	Rashid <i>et al.</i> , 2010 <sup>74</sup>
MEFs	AA, Wnt3a, HFG (3d)	1% DMSO, 20% KOSR (5d)	OSM/HGF (7d)	Chen <i>et al.</i> , 2012 <sup>75</sup>
Matrigel	AA, Wnt3a (3d)	1% DMSO, 20% KOSR (5d)	HGF, OSM (9d)	Szkolnicka <i>et al.</i> , 2014; <sup>76</sup> Rashidi <i>et al.</i> , 2016 <sup>77</sup>
Matrigel	AA, Wnt3a, HFG (3d)	1% DMSO, 20% KOSR (5d)	OSM, FGF2, insulin, Dex (7d) + OSM, FGF2, insulin, Dex, LCA, MK4 (4d)	Avior <i>et al.</i> , 2015 <sup>78</sup>
Laminin	AA, Wnt3a (3d)	1% DMSO, 20% KOSR (5d)	HGF, OSM (9d)	Cameron <i>et al.</i> , 2015 <i>et al.</i> <sup>23</sup>

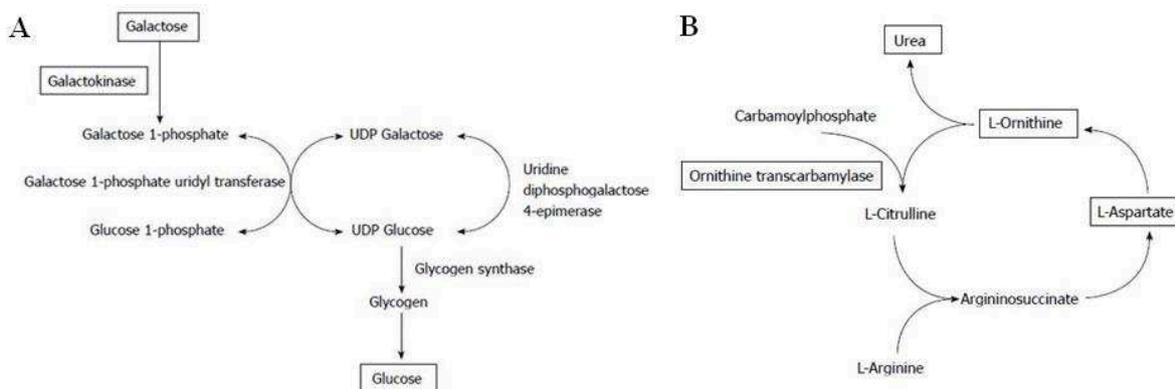
**Figure 21.** Les principaux protocoles de différenciation de CSP en hépatocytes<sup>226</sup>

Plusieurs approches sont alors envisageables pour augmenter la maturation finale des hépatocytes différenciés.

#### D. Améliorer la culture en monocouche pour obtenir des hépatocytes plus matures

Toute cellule qui ne s'engage pas dans la bonne voie de différenciation ainsi que toute cellule qui se maintient à l'état indifférencié peut devenir un contaminant potentiel au cours du processus de différenciation et envoyer des signaux contradictoires aux autres cellules, les empêchant alors de se différencier correctement. Il est donc nécessaire de disposer à chaque

étape de la population cellulaire la plus pure possible et d'éliminer les contaminants éventuels. Pour cela, hormis le tri cellulaire basé sur la reconnaissance de marqueurs membranaires de la population d'intérêt (CXCR4 pour l'endoderme, EPCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) pour les hépatoblastes ou l'asialoglycoprotéine (ASGR) pour les hépatocytes), certaines propriétés des hépatocytes peuvent être avantageusement utilisées. Premièrement, au stade de la différenciation de l'endoderme définitif en hépatoblastes, il est possible d'utiliser un milieu de culture dépourvu en méthionine afin d'éliminer les CSP non différenciées résiduelles<sup>227</sup>. En effet, ces dernières expriment fortement les enzymes liées au métabolisme de la méthionine et en ont donc besoin de forts niveaux afin d'assurer leur survie, ce qui n'est pas le cas des cellules de l'endoderme définitif. Dans un deuxième temps, au stade de la différenciation en hépatocytes, il est possible d'éliminer les cellules contaminantes qui ne se dirigent pas vers une destinée hépatocytaire. Pour cela, il est possible d'utiliser un milieu de culture dépourvu en glucose et en arginine et supplémenté en galactose et ornithine<sup>228</sup>. Les cellules en culture ont besoin d'arginine apporté par le milieu car elles n'en produisent pas assez et elles ne peuvent survivre sans glucose à l'exception des hépatocytes capables de produire le glucose à partir du galactose via la galactokinase et l'arginine à partir de l'ornithine via le cycle de l'urée (**Figure 22**). En remplaçant glucose et arginine par galactose et ornithine, il est donc possible de disposer d'un milieu de sélection pour les cellules différenciées en hépatocytes uniquement.



**Figure 22.** Gluconéogenèse et cycle de l'urée dans les hépatocytes<sup>229</sup>

(A) Le galactose est catalysé en galactose-1-phosphate par la galactokinase. Ce dernier est transformé en glucose-1-phosphate par la galactose-1-phosphate uridyl transférase permettant la synthèse du glycogène qui après glycolyse donnera le glucose. (B) L'arginine est produite par le cycle de l'urée à partir de la dégradation de l'ornithine.

De la même façon que pour le maintien des CSP à l'état indifférencié, une grande partie des protocoles actuels de différenciation se basent sur l'utilisation du matrigel, de provenance animale et de composition inconnue et variant entre les lots, comme support pour la différenciation hépatique. Dans ce cas encore, comme pour le maintien, les protéines recombinantes telles la laminine ou la vitronectine semblent des substituants idéaux pour la différenciation et la translation vers la clinique. En effet, plusieurs équipes ayant différencié des CSP en hépatocytes sur la laminine<sup>230,231</sup> (111, 511 ou 521) ou sur la vitronectine<sup>232</sup> montrent une expression au minimum équivalente des marqueurs hépatiques classiquement étudiés. Une équipe anglaise a également pu montrer une plus forte expression des

cytochromes ainsi que l'apparition de canalicules biliaires lorsque les hépatocytes sont différenciés sur un mélange de deux laminines (111 et 521) plutôt que sur matrigel<sup>230</sup>.

La culture en monocouche ne permet pas de reproduire de manière suffisamment précise la totalité des interactions cellules-cellules existantes *in vivo* et empêche également les cellules de se mouvoir les unes par rapport aux autres pour se réarranger entre elles. Pour pallier cette impossibilité de mouvement et ce manque de surface de contact entre les cellules, des systèmes de culture tridimensionnelle ont été mis en place, soit au sein d'une matrice dense de collagène mimant l'environnement naturel des cellules<sup>233</sup> (système RAFT commercialisé par Lonza) soit à l'aide de plaques de culture traitées pour empêcher l'attachement des cellules sur celles-ci<sup>234</sup>. Dans les deux cas, les cellules ont été cultivées en monocouche jusqu'au stade hépatoblaste puis détachées avant d'être mises en trois dimensions sous forme de sphéroïdes hépatiques. Les auteurs ont montré que l'augmentation des interactions cellulaires dans ces agrégats augmentait l'expression et la sécrétion d'albumine, protéine marqueur des hépatocytes matures, et réduisait drastiquement l'expression et la sécrétion d'AFP, marqueur des hépatocytes fœtaux quasiment toujours retrouvés dans les hépatocytes dérivés de CSP après différenciation en monocouche<sup>234</sup>. Dans des systèmes équivalents, d'autres équipes ont pu montrer l'augmentation de l'expression des enzymes de détoxification ainsi que la formation de canalicules biliaires, montrant ainsi une réelle polarité basolatérale dans les cellules constitutives du sphéroïde<sup>235</sup>. Ces expressions de protéines ou d'enzymes ainsi que la polarité peuvent être augmentées par l'ajout d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) dans le milieu de culture<sup>236</sup>.

Pour apporter la preuve de concept de la possibilité de réaliser un foie bioartificiel avec des hépatocytes dérivés de CSP, une équipe américaine a intégré ces cellules à l'intérieur d'un prototype de bioréacteur à fibre creuse basé sur la technologie ELAD ou HepatAssist<sup>237</sup>. Les auteurs observent, dès 3 jours après mise dans ce système fluidisé, une augmentation significative de la sécrétion d'albumine ou de prothrombine et de l'expression d'enzymes hépatiques comme la G6P ou le CYP3A4 combinée à une répression totale de l'expression d'AFP en comparaison avec leurs équivalents en monocouche. Ainsi, les agrégats d'hépatocytes mûrent rapidement et sont toujours viables après 12 jours au sein du bioréacteur. Les auteurs théorisent donc la possibilité d'utiliser ce système pour les patients comme "un pont à la greffe".

Les systèmes de co-culture semblent également être prometteurs pour permettre une meilleure fonctionnalité des cellules produites *in vitro*. Plusieurs types cellulaires comme des fibroblastes murins<sup>238</sup> ou les cellules stellaires hépatiques<sup>239</sup> ont été testés et les hépatocytes obtenus présentaient dans les deux cas des fonctions hépatiques plus matures que leurs équivalents sans co-culture. L'ensemble des résultats des techniques basées sur la tridimensionnalité et la co-culture semble tendre vers l'idée que la meilleure fonctionnalité hépatique (et l'architecture la plus proche de l'*in vivo*) serait obtenue en utilisant les deux approches en même temps. Un premier pas a été réalisé en ce sens en 2013 quand une équipe japonaise a réussi à générer *in vitro* des bourgeons hépatiques tridimensionnels, fonctionnels et vascularisés à partir de la co-culture d'hiPSC différenciées en progéniteurs hépatiques, de

cellules souches mésenchymateuses et une lignée de cellules endothéliales issue de la veine de cordon ombilical (HUVEC)<sup>240</sup>. Implantés chez la souris, ces bourgeons se sont connectés au système sanguin de l'hôte dans les 48h et 2 mois plus tard, l'analyse des gènes exprimés dans ces bourgeons a montré que les cellules avaient continué leur différenciation pour atteindre le stade d'hépatocytes fœtaux. Cette première preuve de principe doit maintenant être affinée pour pouvoir produire des bourgeons plus gros qui contiendront des cellules plus matures ainsi que la présence de cholangiocytes, ce qui n'a pas été réalisé dans cette étude.

Très récemment, un protocole permettant la différenciation d'hiPSC à la fois en hépatocytes et en cholangiocytes, le tout en 3D, a été mis au point<sup>241</sup>. Après dissociation en cellules uniques, les hiPSC ont été mises en culture dans des plaques spéciales à faible adhésion où les cellules se sont agrégées entre elles formant des sphéroïdes d'hiPSC. Ces derniers ont par la suite été différenciés en sphéroïdes endodermiques (par l'ajout d'une forte dose d'Activine A dans le milieu de culture) puis en sphéroïdes hépatoblastiques (médié notamment par le FGF10). Ensuite l'ajout d'HGF et d'OSM a induit la formation de sphéroïdes composés à la fois d'hépatocytes et de structures ductulaires, caractéristiques des cellules biliaires. La fonctionnalité de ces structures a pu être démontrée par la présence de cils, la sécrétion abondante d'acides biliaires ou d'albumine et l'activité CYP3A4 (deux à trois fois supérieure à la culture en monocouche). Il est important de noter que ces structures peuvent être à nouveau dissociées en cellules uniques qui vont à nouveau former des sphéroïdes, dits secondaires, qui restent fonctionnels en termes d'activité CYP3A4 après cinquante jours de culture (contre quatre jours pour les PHH). Enfin, une étude transcriptomique de ces mini-organoïdes a montré une signature plus proche du foie humain que des hépatocytes primaires humains, probablement du fait de la présence de cholangiocytes en leur sein. Les deux études précédemment citées semblent indiquer que la co-culture en trois dimensions pourrait permettre de lever les barrières relatives à l'état de maturité et de polarité des cellules classiquement obtenues en monocouche.

Les cellules souches pluripotentes, après différenciation en hépatocytes, représentent donc un potentiel non négligeable pour de nombreuses applications en fournissant un type cellulaire théoriquement disponible en quantité illimitée et physiologiquement plus pertinent par rapport aux systèmes actuels basés sur des cellules cancéreuses ou xénogéniques.

## CHAPITRE 3 : L'hypercholestérolémie familiale

### I. Généralités

L'hypercholestérolémie familiale (HF) (OMIM #143890) est une maladie métabolique du foie d'origine génétique et à transmission autosomique dominante. Elle se caractérise par une concentration élevée du cholestérol lié aux lipoprotéines de basse densité (LDL) dans le sérum (également appelé "mauvais cholestérol") qui entraîne des problèmes cardiovasculaires précoces. Cette maladie existe sous deux formes, la forme homozygote, également la plus grave avec une prévalence estimée à 1 cas sur 1 million de naissances et la forme hétérozygote dont la prévalence admise est de 1 cas sur 500. Néanmoins, il semble que ce dernier chiffre soit largement sous-estimé car des méta-analyses récentes de plusieurs populations (Europe du Nord<sup>242</sup>, Pologne<sup>243</sup>) semble plutôt estimer cette prévalence à 1 cas sur 200 à 250 naissances, ce qui fait de l'HF la maladie rare la plus fréquente.

#### A. Historique

Dans les années 1930, le Dr. Müller, physicien norvégien, est le premier à suggérer l'existence d'un facteur génétique pour expliquer l'hypercholestérolémie et ses symptômes<sup>244</sup>. Trois décennies plus tard, une équipe libanaise a pu mettre en évidence le caractère monogénique et la transmission héréditaire de cette maladie ainsi que les différences cliniques existantes entre les patients hétérozygotes et les patients homozygotes<sup>245</sup>. C'est en 1974 que Joseph Goldstein et Michael Brown découvrent l'existence d'un récepteur aux LDL (RLDL) à la surface des cellules en comparant l'internalisation de LDL radio-marqués dans des fibroblastes normaux et des fibroblastes de patients homozygotes atteints d'HF. Dans ce même article, ils démontrent que des mutations dans la séquence du gène codant pour ce récepteur sont à l'origine de la maladie<sup>246</sup>. La protéine du RLDL, une glycoprotéine acide de 164 000 Dalton, a été purifiée en 1982 à partir de glandes surrénales bovines<sup>247</sup> puis son ADNc cloné l'année suivante<sup>248</sup> et enfin, le gène a pu être isolé en 1985<sup>249</sup> toujours par l'équipe de Brown et Goldstein. Pour l'ensemble de leurs travaux, ils ont obtenu le prix Nobel de médecine en 1985.

Alors que l'origine génétique de l'hypercholestérolémie familiale semblait résolue, le génotypage de plusieurs patients possédant un phénotype clinique d'HF n'a pas montré de mutations dans la séquence du gène codant pour le RLDL suggérant alors que d'autres gènes pouvaient en être responsables. C'est ainsi que les gènes codant pour l'apolipoprotéine B100<sup>250</sup> ou la proprotéine convertase subtilin/kexin 9 (PCSK9)<sup>251</sup> ont été mis en évidence. Ces derniers représentent respectivement 7% et 1% des cas d'HF contre plus de quatre cas sur cinq pour le RLDL. Les mécanismes par lesquels une mutation au sein de ces gènes induit l'HF seront détaillés plus loin dans ce chapitre.

## B. Présentation clinique

Chez les patients homozygotes, les signes cliniques de la maladie sont présents dès le plus jeune âge. Ces derniers possèdent des niveaux de LDL circulant (LDL-c) jusqu'à 10 fois supérieur à ceux d'un individu sain (de 6 à 15 g/L contre un maximum d'1,6 g/L normalement)<sup>245</sup>. S'ils ne sont pas présents à la naissance, des xanthomes, amas graisseux sous-cutané de couleur jaune orangé, apparaissent au niveau des tendons ou des paupières dès l'âge de 4 ans (**Figure 23A**). Les patients développent également très rapidement des gérontoxons (également appelé arc sénile de la cornée) qui sont des anneaux opaques de couleur gris blanchâtre apparaissant en périphérie de la cornée (**Figure 23B**) ainsi qu'une athérosclérose (accumulation de gras dans les artères) généralisée. La mort prématurée déclenchée le plus souvent par un infarctus du myocarde se produit généralement avant 30 ans, voire bien avant pour les patients n'ayant reçu aucun traitement<sup>252</sup>.



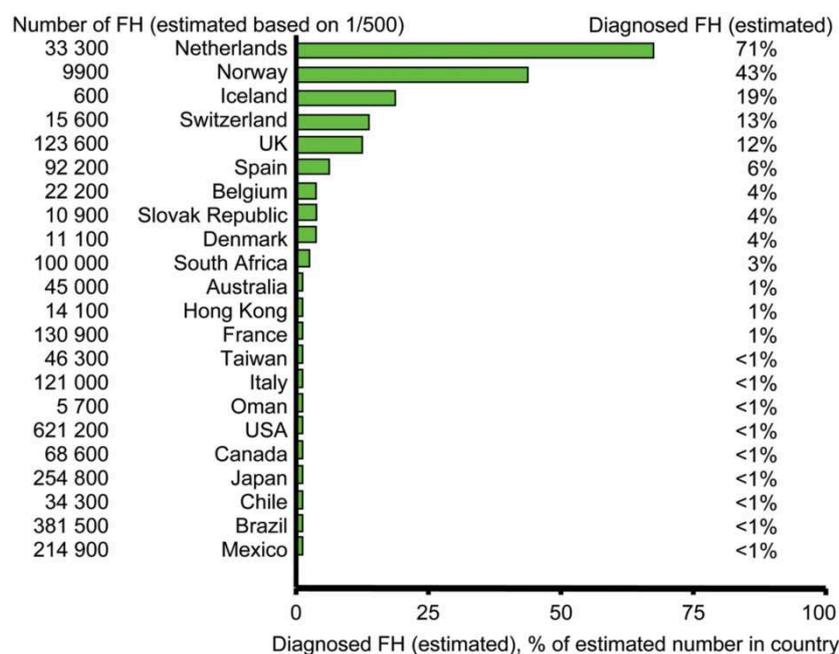
**Figure 23.** Manifestations cliniques de l'hypercholestérolémie familiale chez un patient homozygote<sup>253</sup>

(A) Présence de nombreux xanthomes au niveau des doigts, poignets, coudes et fesses.  
 (B) Gérontoxon caractéristique d'un désordre lipidique

Les patients homozygotes peuvent être classés en 3 catégories en fonction du pourcentage d'activité du RLDL. Ce dernier est en lien direct avec l'espérance de vie : moins le RLDL est fonctionnel, moins l'espérance de vie est élevée. Une activité du RLDL inférieure à 2% de la normale classe les patients dans le premier groupe où la proportion d'accidents cardiovasculaires précoces est la plus grande (35% des patients meurent prématurément dont la moitié avant l'âge de 15 ans). Dans le second groupe, l'activité est comprise entre 2 et 10% de la normale et 20% des patients meurent précocement dont un tiers avant quinze ans. Enfin, dans le dernier groupe l'activité est supérieure à 10% et le nombre de décès précoces tombe à 5% dont aucun avant 15 ans<sup>254</sup>.

De la même façon que pour les patients homozygotes, les patients hétérozygotes ont une hypercholestérolémie avérée dès la naissance bien que plus modérée (aux alentours de 3 g/L). Il est à noter que, comme pour les patients homozygotes, les taux de triglycérides et de cholestérol lié aux lipoprotéines de haute densité (HDL) (qu'on appelle également "bon cholestérol") sont dans les normales. Les xanthomes et gérontoxons surviennent de manière non systématique à partir de 20 ans et la probabilité de les développer augmente avec l'âge. Les problèmes coronariens se développent en général après 30 ans et s'amplifient également au fur et à mesure que le temps avance (5% des patients hétérozygotes développent un problème cardiovasculaire autour de 30 ans, 45% vers 50 ans et 75% à 60 ans)<sup>254</sup>. Le

diagnostic pour ces patients peut donc être difficile à réaliser et très souvent, il n'est établi qu'après un premier souci cardiovasculaire comme un infarctus du myocarde précoce ou lorsqu'un membre de la famille a été diagnostiqué. Ainsi, plus le diagnostic est tardif, plus les effets néfastes de la maladie comme l'usure des artères et les plaques d'athéroscléroses vont être difficiles à contrer. En effet, cette maladie est distincte de l'hypercholestérolémie classique car lorsque le patient est porteur de l'anomalie génétique, son taux de cholestérol est doublé à la naissance, alors que dans le cas de l'hypercholestérolémie classique, le taux de cholestérol ne commence à s'élever que vers 20, 30 ans ou même 50 ans. Ainsi, le nombre d'années pendant lesquelles les artères sont soumises à un excès de cholestérol est très différent entre un patient présentant une hypercholestérolémie classique et un patient atteint d'hypercholestérolémie familiale, ce dernier étant alors plus sujet aux infarctus. Hormis dans de rares pays comme les Pays-Bas ou la Norvège, il semble que de nombreux patients atteints de cette maladie ne sont d'ailleurs pas diagnostiqués si l'on se base sur le nombre de cas recensés par pays par rapport au nombre de cas théoriques basé sur une prévalence de 1 sur 500 (**Figure 24**)<sup>242</sup>. Pour réduire cet écart et permettre de traiter le plus grand nombre, il convient donc de suspecter une HF chez un patient aux concentrations de LDL supérieures à la moyenne avec des antécédents de maladies cardiovasculaires dans sa famille une fois éliminé les autres facteurs classiques de risque comme le diabète ou l'obésité.

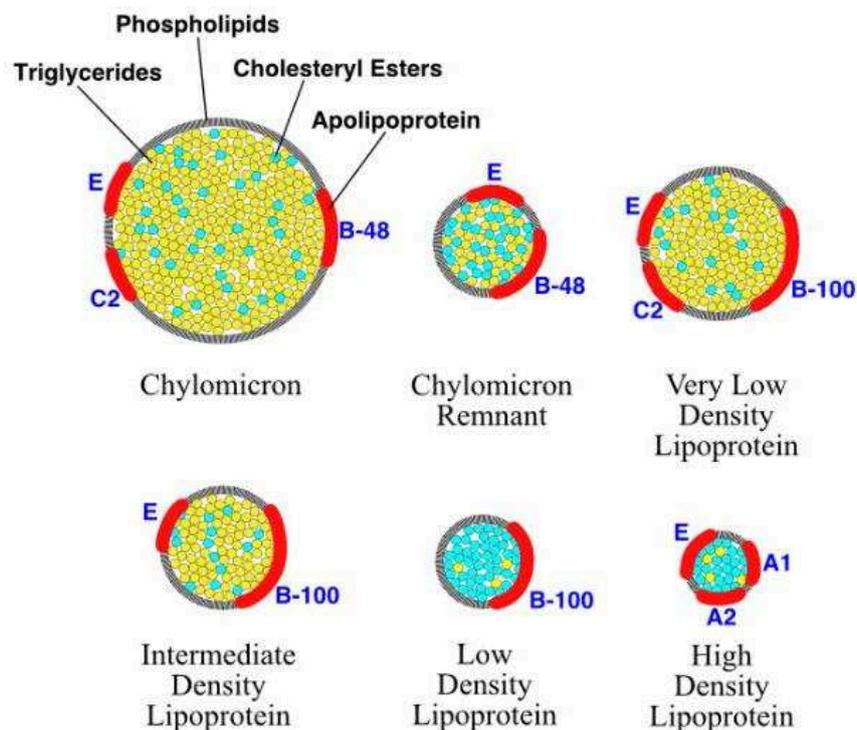


**Figure 24.** Pourcentage de patients diagnostiqués HF dans différents pays par rapport au nombre théorique de patients touchés basée sur la prévalence de 1/500<sup>242</sup>

L'hypercholestérolémie familiale est comme son nom l'indique un désordre métabolique du cholestérol. Ainsi, avant de rentrer dans le détail des gènes et protéines responsables et des traitements envisageables, il convient de faire un point sur le métabolisme du cholestérol.

## II. Métabolisme du cholestérol

Le cholestérol est un lipide qui joue un rôle vital dans le corps humain. Il est en effet un composant essentiel des membranes cellulaires, de sa quantité dépendant à la fois leur perméabilité et leur fluidité. De plus, il est également le précurseur de la vitamine D, des hormones stéroïdiennes comme la progestérone ou la testostérone et des acides biliaires, nécessaires pour l'absorption intestinale des graisses et des vitamines notamment. L'apport de cholestérol dans l'organisme se fait à la fois par l'alimentation (environ 30%) et par la synthèse *de novo* réalisée dans toutes les cellules dont majoritairement les hépatocytes (environ 70%)<sup>255</sup>. Ces derniers sont également les seules cellules capables de le métaboliser et de l'éliminer via la bile. Un équilibre subtil entre ingestion, absorption, synthèse et excrétion permet donc le maintien de l'homéostasie du cholestérol.



**Figure 25.** Les différentes lipoprotéines et leur composition<sup>256</sup>

Les lipoprotéines sont généralement classifiées selon leur densité (qui dépend du ratio entre le cholestérol (en bleu), les apolipoprotéines (en rouge) et les triglycérides(en jaune)).

Pour pouvoir être transporté dans le plasma, ce lipide insoluble doit être incorporé dans des macromolécules appelées lipoprotéines composées d'un noyau hydrophobe contenant des esters de cholestérol et des triglycérides recouvert d'une couche hydrophile comportant du cholestérol libre, des phospholipides et des apolipoprotéines. Ces dernières permettent la reconnaissance de la lipoprotéine par des récepteurs spécifiques à la surface des cellules. En effet, il existe plusieurs lipoprotéines différenciables notamment par leur densité, elle-même fonction du ratio protéines/cholestérol/triglycérides présents dans la molécule. La lipoprotéine la moins dense et qui transporte le plus de triglycérides (~85% contre 2% de cholestérol) est appelée chylomicron. Viennent ensuite la lipoprotéine de très basse densité ou

VLDL (60% de triglycérides et 20% de cholestérol), la lipoprotéine de densité intermédiaire ou IDL (50% de triglycérides et 40% de cholestérol). Le ratio s'inverse pour la lipoprotéine de basse densité ou LDL (50% de cholestérol et 20% de triglycérides) et la lipoprotéine de haute densité ou HDL (25% de cholestérol et 10% de triglycérides)<sup>257</sup> (**Figure 25**).

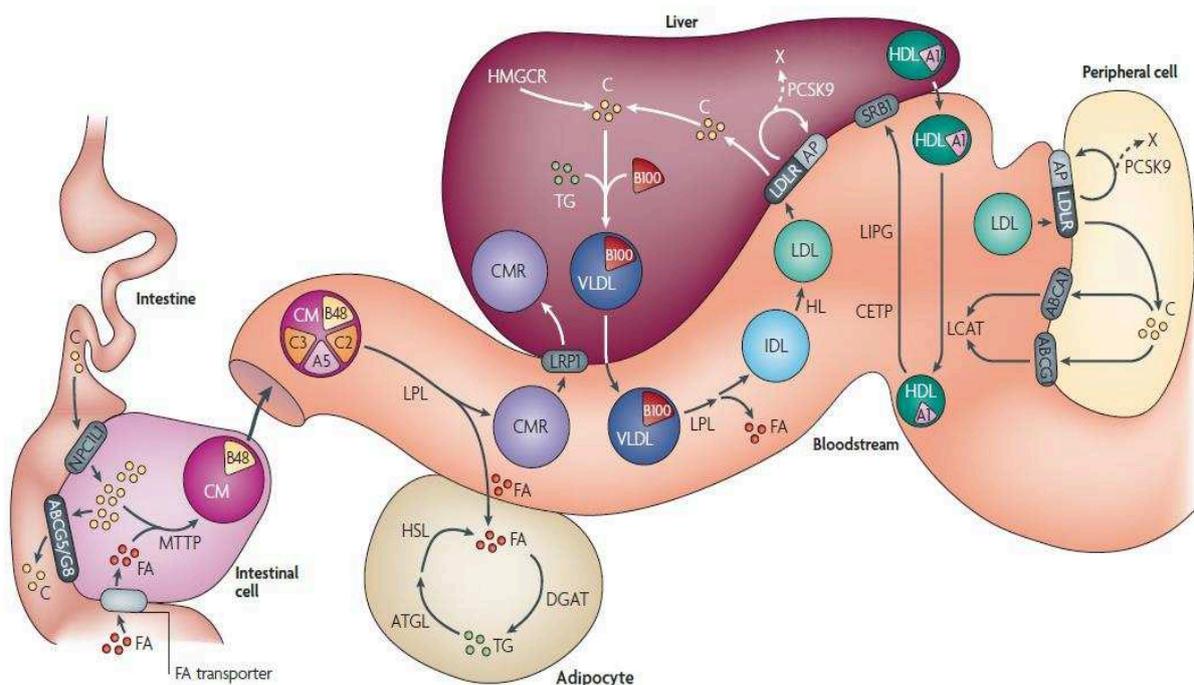
### A. Cycle entéro-hépatique du cholestérol

Une fois ingéré via l'alimentation, le cholestérol, présent à la fois sous une forme libre (~90%) et sous une forme estérifiée (~10%), entre dans le petit intestin lors de la digestion<sup>258</sup>. Là, le cholestérol libre forme des micelles avec les acides biliaires et triglycérides présents. Dans le même temps, la fraction de cholestérol estérifié est hydrolysée puis incorporée au sein des structures micellaires<sup>259</sup>. Une fois formées, ces dernières sont reconnues par la protéine NPC1L1 présente à la membrane apicale des entérocytes et y sont endocytées<sup>260</sup>. Une fois internalisé, l'acétyl-CoA acétyltransférase 2 (ACAT2) estérifie le cholestérol puis la protéine de transfert microsomal des triglycérides (MTP) assemble cet ester avec une grande quantité de triglycérides, des phospholipides et l'enrobe d'apolipoprotéine B-48 ou ApoB-48 (apolipoprotéine tronquée, spécifique de l'intestin, représentant 48% de la séquence de l'ApoB-100) pour former des chylomicrons<sup>261</sup>. Ces lipoprotéines sont ensuite excrétées vers la circulation sanguine pour la délivrance de triglycérides aux tissus périphériques.

Dans le sang, les chylomicrons se lient aux ApoC-2 et ApoE puis entrent en contact avec la lipoprotéine lipase, ancrée sur la face apicale (en contact avec la lumière) de l'endothélium vasculaire de tissus tels que les muscles squelettiques ou le tissu adipeux. Ces enzymes hydrolysent les triglycérides présents dans les chylomicrons qui, par conséquent, rétrécissent, s'enrichissent en cholestérol et perdent l'ApoC-2 pour devenir des résidus de chylomicrons. Les triglycérides et acides gras libérés sont localement captés par les adipocytes ou les myocytes. Les résidus de chylomicrons sont ensuite éliminés de la circulation par le foie, après liaison à la fois sur des sulfates d'héparane et sur la low density lipoprotein-related protein (LRP), où ils seront métabolisés afin de former du cholestérol libre qui sera soit excrété dans la bile soit transformé en acides biliaires ou à nouveau incorporé dans les lipoprotéines produites par le foie, les VLDL<sup>262</sup>.

Ces dernières sont essentiellement formées par l'action de MTP dans les hépatocytes. Cette enzyme assemble les triglycérides, l'ApoB-100 et le cholestérol qui y sont synthétisés de manière endogène<sup>263</sup> (la synthèse du cholestérol sera détaillée dans la partie B). Les VLDL sont ensuite sécrétées dans la circulation sanguine pour la délivrance des triglycérides aux tissus périphériques. Là, l'action de la cholesteryl ester transfer protein (CETP) transfère des esters de cholestérol présents sur les particules de HDL ou de LDL sur les VLDL, chargeant encore plus ces dernières en cholestérol<sup>264</sup>. De la même façon que pour les chylomicrons, elles se lient ensuite à ApoC-2 et ApoE puis sont hydrolysées par la lipoprotéine lipase qui les décharge en triglycérides induisant la formation de particules d'IDL. Ces dernières, toujours soumises à l'action de la même enzyme, continuent à perdre en taille du fait de la perte de triglycérides et à augmenter en densité pour former les LDL<sup>265</sup>.

De taille relativement petite, les LDL sont capables de traverser l'endothélium vasculaire et ainsi délivrer le cholestérol aux tissus, à l'exception du système nerveux central (SNC). En effet, les LDL ne peuvent franchir la barrière hémato-encéphalique ce qui implique la production par le SNC de ses propres lipoprotéines, des HDL riches en ApoE<sup>266</sup>. Dans le reste de l'organisme, les LDL sont captées par un récepteur, le LDLR, présent à la surface de la plupart des cellules (à l'exception des lymphocytes immatures) et hydrolysées dans les lysosomes pour donner du cholestérol, des acides aminés et des acides gras libres utiles au métabolisme de la cellule. Une autre voie d'entrée existe également et se caractérise par une endocytose passive donc indépendante du LDLR et non saturable<sup>267</sup>. Dans ce cas, plus la concentration extracellulaire en LDL est forte, plus l'entrée du cholestérol par cette voie est importante. Dans le cadre d'une alimentation riche en matières grasses, il est par exemple estimé que l'entrée des LDL par la voie non médiée par le LDLR compte pour 2/3 de la totalité des LDL entrant dans la cellule. L'accumulation de LDL circulantes entraîne alors une athérosclérose pouvant à terme conduire à des accidents cardio-vasculaires. C'est pourquoi les LDL sont qualifiées de "mauvais" cholestérol lors d'examens biochimiques classiques comme les prises de sang.

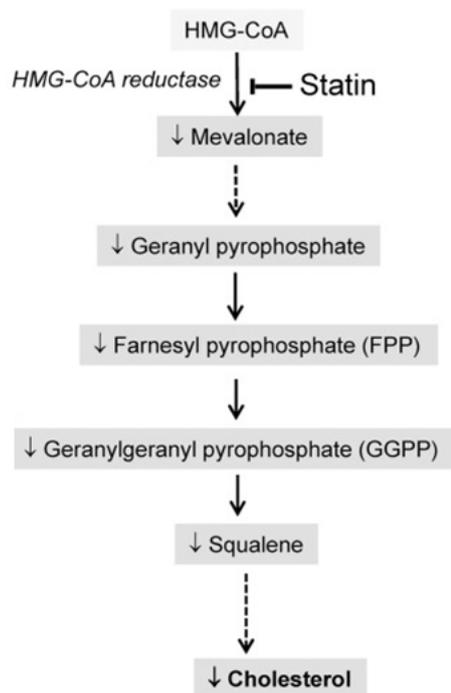


**Figure 26.** Cycle entéro-hépatique du cholestérol<sup>268</sup>

Dans les entérocytes, le cholestérol intestinal (C) est internalisé par la protéine Niemann–Pick C1-like 1 (NPC1L1) puis empaqueté dans un chylomicron avec des acides gras (FA) sous forme de triglycérides (TG) et l'ApoB-48. Une fois sécrétés, les chylomicrons se lient à d'autres apolipoprotéines (A5, C2, C3) et entrent en contact avec la lipoprotéine lipase (LPL) qui les décharge en acides gras à destination des cellules périphériques. Les résidus de chylomicrons (CMR) sont internalisés par le foie via la low density lipoprotein-related protein (LRP1). Dans les hépatocytes, les TG et le cholestérol sont empaquetés avec l'ApoB-100 pour former les VLDL. Une fois sécrétés, l'hydrolyse des TG par la LPL les transforme en IDL puis en LDL. Les LDL sont endocytées dans les cellules périphériques et les hépatocytes via le LDLR. Ces derniers sécrètent également des molécules de HDL, chargées du transport inverse du cholestérol par l'interaction avec l'ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1). La lecitine-cholestérol acétyltransférase (LCAT) estérifie le cholestérol libre pour le lier aux HDL qui sont réinternalisées par les hépatocytes via le scavenger receptor B1 (SRB1).

Les hépatocytes synthétisent également des particules de HDL sous forme d'un disque de phospholipides couplé aux ApoA-1 et ApoA-2. Leur fonction, qui leur vaut le nom de "bon" cholestérol est de capter l'excès de cholestérol libre circulant provenant de l'excrétion par les cellules périphériques via l'ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1). Une enzyme, la lecithine-cholesterol acetyltransferase (LCAT), estérifie le cholestérol libre circulant et les esters de cholestérol formés sont alors captés dans le noyau de la particule HDL qui au fur et à mesure de l'insertion de nouveaux esters, grossissent en taille et deviennent sphériques. Une fois chargées, les HDL retournent vers les hépatocytes où elles sont internalisées via le SRB1<sup>269</sup>. Dans le foie, le cholestérol est alors sécrété dans la bile (soit sous forme libre soit après dégradation en acides biliaires) qui s'évacue dans le petit intestin. Là, il pourra être réabsorbé en partie par les entérocytes, le reste étant éliminé définitivement avec les selles. Tout ce processus est résumé dans la **Figure 26**.

### B. Synthèse *de novo* du cholestérol



**Figure 27.** Synthèse *de novo* du cholestérol (adapté de<sup>270</sup>)

Toutes les cellules nucléées sont capables de synthétiser le cholestérol à partir de l'acetyl-Coenzyme A (acétyl-CoA), molécule dérivée de l'oxydation des acides gras ou du pyruvate, par la voie du mévalonate (**Figure 27**). Brièvement, trois molécules d'acétyl-CoA sont condensées pour obtenir une molécule de 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA). Cette dernière est ensuite réduite en mévalonate par l'action d'une enzyme spécifique, la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A reductase (HMGCR). Cette étape est considérée comme l'une des étapes clés et limitantes de la réaction et l'HMGCR est de ce fait la cible de nombreuses stratégies thérapeutiques visant à réduire le taux de cholestérol sanguin. Le mévalonate est par la suite phosphorylé puis décarboxylé en isoprénoïdes (notamment en isopentenyl pyrophosphate ou IPP). Six de ces molécules sont alors

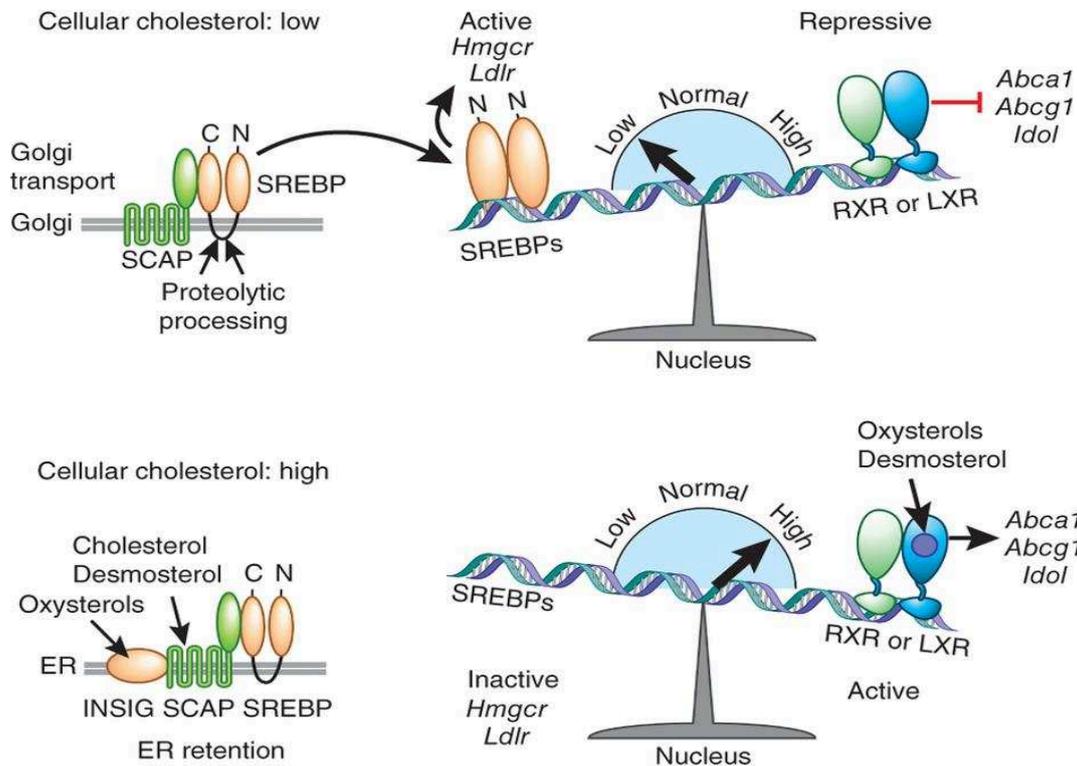
condensées pour former une structure insaturée à 30 carbones, le squalène. Ces insaturations vont alors servir de base à une série de réactions pour former les cycles de la molécule finale de cholestérol à partir d'un intermédiaire de réactions, le lanostérol.

### C. Homéostasie du cholestérol

Par nature essentiel mais dangereux en trop grande quantité, le cholestérol est un lipide finement régulé dans toutes les étapes de son cycle de vie (absorption, synthèse, dégradation, etc.). Deux gènes majeurs codant pour des facteurs de transcription sont impliqués dans cette régulation, le premier code pour la protéine régulatrice Sterol Regulatory Element Binding Protein 2 (SREBP2) et le second pour le récepteur des oxystérols Liver X Receptor  $\alpha$  (LXR $\alpha$ ) (**Figure 28**).

Lorsque la concentration intracellulaire en cholestérol est faible, la protéine senseur de cholestérol SCAP (SREBP Cleavage-Activating Protein), présente à la membrane du réticulum endoplasmique, se lie à SREBP2, également situé sur cette membrane, et joue le rôle de chaperone afin de permettre à SREBP2 de migrer dans le Golgi. Là, SREBP2 va être clivée par deux protéases, S1P et S2P, qui vont libérer la partie régulatrice N-terminale de SREBP2 qui va ainsi pouvoir migrer dans le noyau<sup>271</sup>. Ce facteur de transcription reconnaît alors les Sterol Regulatory Element (SRE) présents dans les promoteurs des gènes impliqués dans la biosynthèse<sup>272</sup> (HMG-CoA synthase, HMGCR) et l'internalisation<sup>273</sup> (notamment le RLDL) du cholestérol accélérant ainsi ces 2 processus dans le but de rétablir une cholestérolémie correcte dans la cellule. A l'inverse, quand le taux de cholestérol est trop élevé, SCAP change de conformation et se retrouve complexé dans le réticulum endoplasmique avec une autre protéine, INSIG1 (Insuline-induced gene 1 protein), inactivant SREBP2 en l'empêchant de migrer vers le Golgi puis le noyau<sup>274</sup>. Le cholestérol en excès est alors stocké sous forme estérifiée par l'action de l'acyl-coA cholesterol transférase (ACAT) dont l'expression est induite en cas de forte concentration intracellulaire en cholestérol.

La régulation médiée par LXR $\alpha$  est dépendante des oxystérols. Ces derniers sont à la fois issus de l'alimentation, de réactions enzymatiques d'oxydation du cholestérol pour synthétiser des hormones ou des acides biliaires et de la dégradation du cholestérol intracellulaire en excès. Lorsque la concentration en oxystérols est trop importante, LXR $\alpha$  est activé et va alors induire l'expression de gènes impliqués à la fois dans la synthèse et l'excrétion des acides biliaires<sup>275</sup> (UDP-glucuronosyltransférase 1-3 (UGT1A3), cytochrome P450 cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1)), dans le transport inverse du cholestérol<sup>276</sup> (ABCA1, SRB1), dans l'excrétion du cholestérol libre vers la bile<sup>277</sup> (ATP-binding cassette sub-family G (ABCG) 5 et ABCG8) tout en réprimant les gènes de biosynthèse<sup>278</sup> (squalène synthase) et d'internalisation du cholestérol (RLDL) dans le but de réduire le niveau de cholestérol intracellulaire. Pour limiter l'internalisation du cholestérol par le RLDL, LXR $\alpha$  induit la synthèse d'IDOL (inducible degrader of the LDLR), une E3 ubiquitine ligase qui ubiquitinylye le RLDL provoquant sa dégradation par les lysosomes<sup>279</sup>.



**Figure 28.** Homéostasie du cholestérol<sup>280</sup>

Quand il y a peu de cholestérol intracellulaire (panel du haut), le complexe SCAP/SREBP2 migre dans le Golgi puis SREBP2 est clivé et entre dans le noyau pour activer les gènes de synthèse et d'internalisation du cholestérol. Quand il y a beaucoup de cholestérol intracellulaire (panel du bas), le complexe SCAP/SREBP2 est piégé dans le réticulum endoplasmique par INSIG et les oxystérols en excès active LXR $\alpha$  qui active les gènes de synthèse et d'excrétion des acides biliaires ainsi que le transport inverse du cholestérol.

La régulation du cholestérol est donc un processus fin qui peut être dérégulé par une alimentation trop riche en gras, une perturbation de l'horloge biologique<sup>281</sup> ou par des mutations dans un des gènes impliqués dans son homéostasie causant alors l'hypercholestérolémie familiale. Le gène retrouvé le plus souvent muté dans cette maladie code pour le récepteur des protéines de faible densité.

### III. Le récepteur des lipoprotéines de faible densité

#### A. Gène et structure du RLDL

Le gène codant pour le RLDL se situe sur le petit bras du chromosome 19 (p13.1-p13.3) et s'étend sur 45 kb. Il comporte au total 18 exons qui codent les 5 grands domaines fonctionnels qui composent le RLDL<sup>248</sup> (**Figure 29**):

- \_ Le premier exon code pour 21 acides aminés constituant le peptide signal. Ce dernier, nécessaire pour assurer le transport de la protéine vers la membrane plasmique, est clivé après translocation dans le réticulum endoplasmique.
- \_ Les exons 2 à 6 codent pour 292 acides aminés représentant le domaine de liaison aux ligands. Celui-ci se compose de 7 répétitions en tandem de séquences d'environ 40 acides aminés appelées répétitions du récepteur au LDL type A (ou LDL receptor type A repeats).

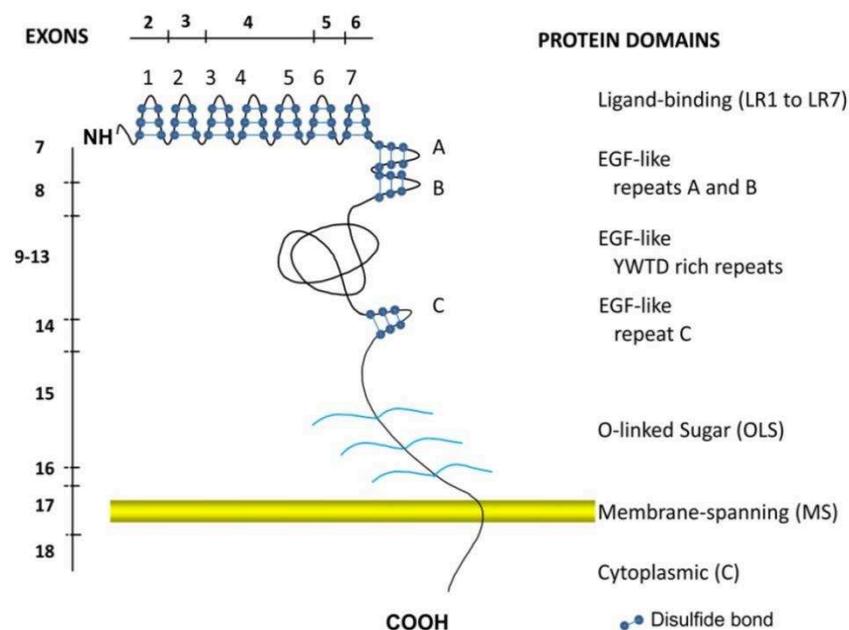
Chaque exon code pour une répétition excepté l'exon 4 qui code pour les répétitions 3 à 5. Chacune de ces séquences contient six résidus cystéine formant trois ponts disulfure chacun et un groupe d'acides aminés chargés négativement (Asp-X-Ser-Asp-Glu ou DxSDE) à l'extrémité C-terminale de chaque répétition. Par interactions ioniques, cette région se lie à des séquences chargées positivement et riches en acides aminés basiques présentes sur l'ApoE et l'ApoB-100 qui constituent le site de liaison au RLDL. La délétion d'une des répétitions 2 à 6 entraîne un déficit de la liaison ligand-récepteur de l'ordre de 95%.

\_ Les exons 7 à 14 codent pour 400 acides aminés ayant 35% d'homologie de séquence avec le précurseur de l'EGF humain. Ce domaine est constitué de 2 répétitions de 40 acides aminés homologues à l'EGF (EGF-A et EGF-B) séparé de la 3<sup>ème</sup> (EGF-C) par une séquence de 280 acides aminés contenant cinq copies du motif YWTD (Tyr-Trp-Thr-Asp) répétés tous les 40 à 60 acides aminés.

\_ Le 15<sup>ème</sup> exon code pour 58 acides aminés riches en sérine et thréonine dont une grande partie sert de site de fixation pour les chaînes glycosylées d'O-glycosylation.

\_ L'exon 16 et l'extrémité 5' de l'exon 17 codent pour 22 acides aminés hydrophobes qui vont former le domaine transmembranaire du RLDL, permettant ainsi son ancrage à la membrane plasmique.

\_ Le reste de l'exon 17 et la partie 5' de l'exon 18 codent pour 50 acides aminés représentant le domaine cytoplasmique du RLDL, qui contient un motif NPxY (Asn-Pro-X-Tyr) important pour le cycle de vie du récepteur (voir paragraphe suivant). Le reste de l'exon 18 code pour la région 3' non traduite de l'ARN messager (2,6 kb).



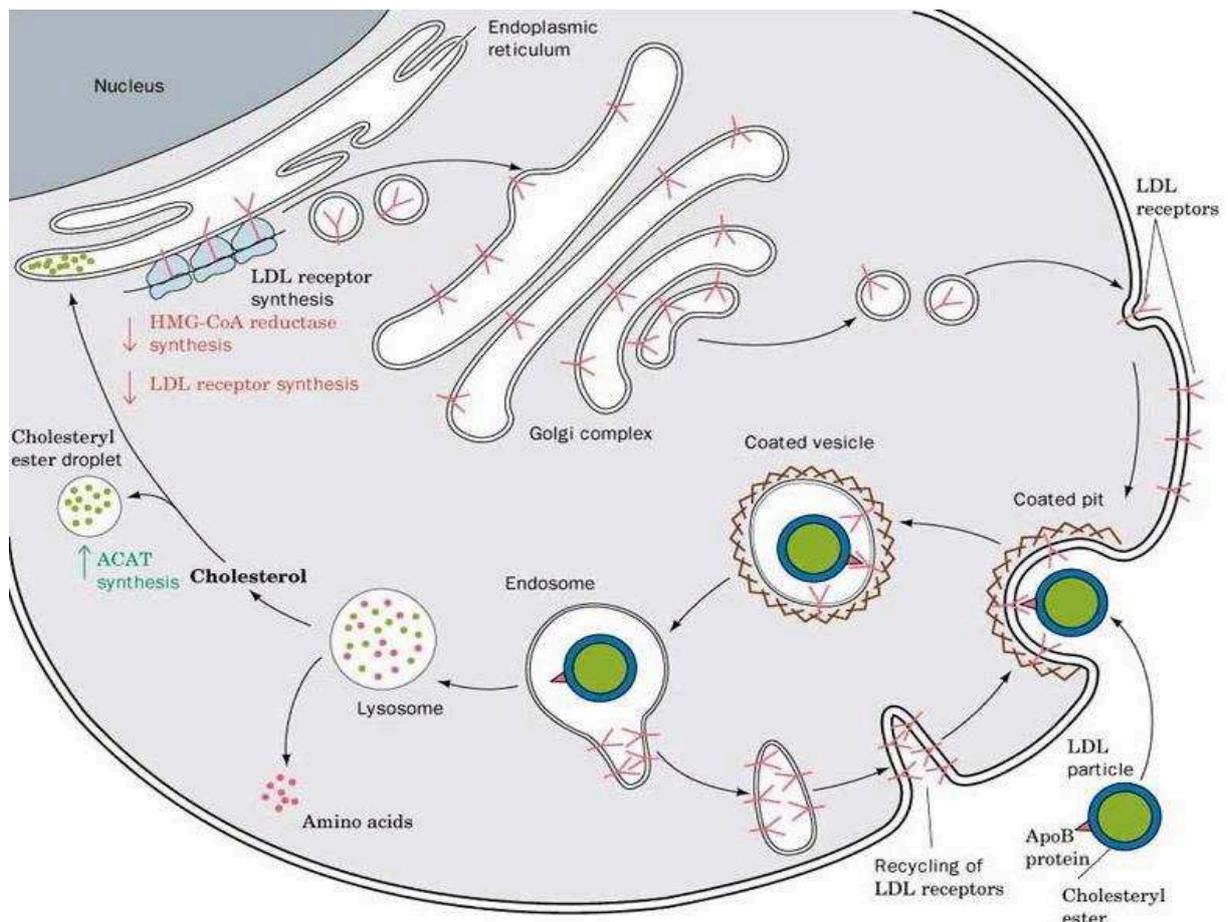
**Figure 29.** Structure du RLDL<sup>282</sup>

La correspondance entre les exons et les domaines fonctionnels est précisée.

## B. Cycle du RLDL

Le RLDL est une glycoprotéine ubiquitaire située au niveau de la membrane plasmique et composée de 839 acides aminés. Le récepteur est d'abord synthétisé dans le

réticulum endoplasmique rugueux sous une forme précurseur de 120 kDa avant d'être transporté dans l'appareil de Golgi pour y subir un processus de maturation au niveau des chaînes glycosylées, portant son poids moléculaire final à 160 kDa<sup>248</sup>. Quarante-cinq minutes après leur synthèse, les RLDL se retrouvent à la membrane de la cellule et se regroupent, grâce au motif NPxY du domaine cytoplasmique, dans les vésicules à manteau de clathrine, des zones où la membrane plasmique est doublée par la clathrine, une protéine fibreuse impliquée dans les processus d'endocytose. Là, les RLDL captent leurs ligands et les vésicules s'invaginent très rapidement (5 minutes après formation) pour devenir des endosomes. A l'intérieur de ces derniers, le pH diminue jusqu'à devenir acide, entraînant un changement de conformation des RLDL au niveau du 2<sup>ème</sup> domaine (EGF repeat) résultant en leur dissociation des LDL. Les RLDL sont alors recyclés vers la membrane plasmique pour effectuer de nouveaux cycles d'internalisation/recyclage. Ces derniers, d'une durée d'environ 10 minutes, se répètent en continu que le ligand soit lié ou non au RLDL. Les endosomes, quant à eux, fusionnent alors avec les lysosomes pour donner des endolysosomes où les LDL vont être dégradés par l'action d'enzymes hydrolytiques acides donnant ainsi du cholestérol et des acides aminés issus de la dégradation de l'ApoB-100 (**Figure 30**).



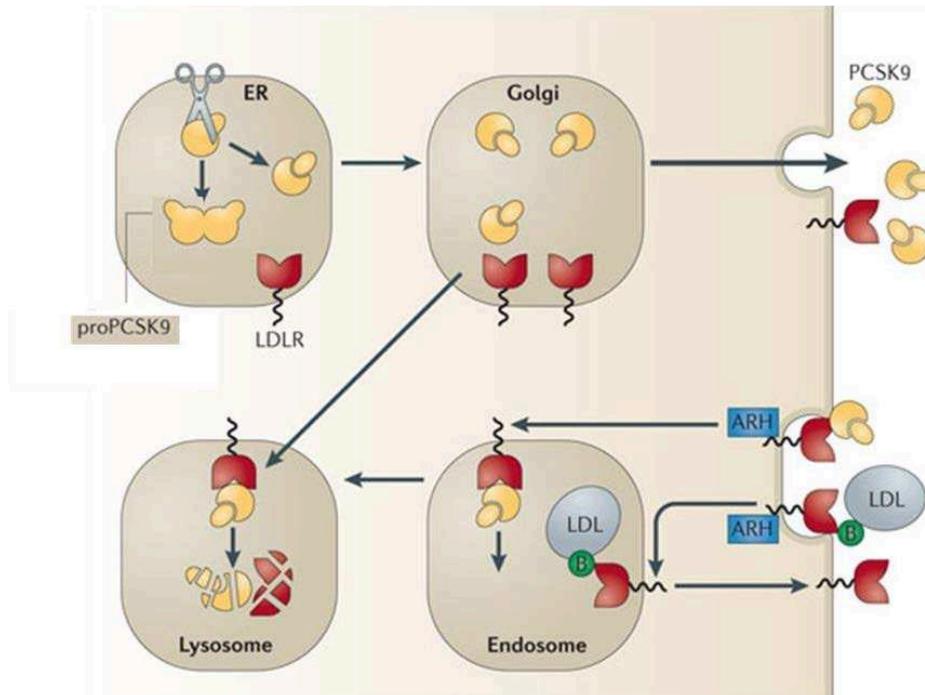
**Figure 30.** Cycle de vie du RLDL<sup>283</sup>

Après synthèse dans le réticulum endoplasmique puis maturation dans le Golgi, les RLDL sont dirigés vers la membrane où ils se regroupent dans des puits de clathrine. Là, ils sont internalisés très rapidement dans des vésicules qui deviennent des endosomes, qu'il y ait eu ou non liaison avec les LDL. Le pH des endosomes diminue assurant la séparation entre les LDL et le récepteur redirigé à la membrane. Les LDL sont dégradés dans les lysosomes.

De sa synthèse au phénomène de recyclage, le RLDL est régulé par l'action d'une enzyme particulière, PCSK9. Cette protéine de 72 kDa est majoritairement exprimée dans le foie, les intestins, le rein et le système nerveux central. Elle est constituée de trois grands domaines : un pro-domaine clivé lors de sa maturation mais toujours lié de manière non covalente à la protéine après clivage, un domaine catalytique libéré après clivage du pro-domaine et un domaine C-terminal riche en cystéine et histidine<sup>284</sup>. Sa principale fonction consiste en la maturation protéolytique de protéines sécrétées (hormones, facteurs de croissance, etc.) et de récepteurs membranaires<sup>285</sup>. Son interaction avec le RLDL est le mécanisme le plus décrit dans la littérature car il revêt un effet paradoxal.

PCSK9 est synthétisée dans le réticulum endoplasmique, comme l'est le précurseur du RLDL. Là, elle se lie à ce dernier et agit comme chaperone pour le transporter dans le Golgi où il va acquérir ses résidus carbohydrates et ainsi terminer sa maturation<sup>286</sup>. Dans le même temps, PCSK9 s'auto-clive pour libérer son domaine catalytique et parachever sa maturation avant d'être sécrétée à l'extérieur de la cellule. Avant même le transport du RLDL à la membrane, PCSK9 régule l'expression des RLDL matures en induisant, via son domaine catalytique, leur dégradation<sup>287,288</sup>. Une fois sécrétée, son rôle est, une nouvelle fois, la régulation post-traductionnelle du nombre de RLDL présents à la surface. Pour cela, elle se lie au domaine EGF-A du RLDL ce qui empêche le changement de conformation nécessaire à sa dissociation du LDL. Ainsi, le cycle du recyclage ne peut se dérouler comme prévu et le RLDL, ne se dissociant plus de son ligand, est dégradé avec lui dans les lysosomes<sup>289</sup> (**Figure 31**). Pour ce processus, le domaine catalytique de la protéine n'entre pas en jeu. PCSK9 semble donc avoir deux effets contraires sur la quantité finale de RLDL dans la cellule en accélérant d'un côté leur maturation tout en augmentant leur dégradation de l'autre. Néanmoins, même en l'absence de PCSK9, les RLDL sont transportés à la membrane, suggérant que cette activité chaperone est facultative et redondante et que la fonction de dégradation est bien la principale et la plus importante quantitativement.

Comme pour le RLDL, PCSK9 est finement régulé par la balance de la concentration intracellulaire en cholestérol et par conséquent, par l'activation ou non de SREBP2<sup>290</sup>. L'augmentation de PCSK9 médiée par l'activation de SREBP2 montre une fois de plus un effet contradictoire. En effet, SREBP2 est activé pour augmenter la concentration de cholestérol dans la cellule (activation des gènes de biosynthèse et d'internalisation comme le RLDL). Pourtant, il active également PCSK9 qui va entraîner la dégradation des RLDL limitant ainsi les effets de SREBP2. Cette donnée peut en partie expliquer les raisons pour lesquelles certains traitements pour réduire la cholestérolémie comme les statines, médicaments hypocholestérolémiants agissant sur SREBP2, accusent un plateau d'efficacité dans la diminution des LDL circulants.



**Figure 31.** PCSK9 régule le nombre de RLDL à la membrane cellulaire<sup>291</sup>

Synthétisée dans le réticulum endoplasmique, PCSK9 agit comme chaperone pour le transport du RLDL dans le Golgi, accélérant sa maturation. Mais, en se fixant sur le RLDL, PCSK9 induit également la dégradation du RLDL mature dans les lysosomes soit avant son transport à la membrane cellulaire, soit après sécrétion, en empêchant le cycle de recyclage du RLDL d'avoir lieu.

### C. Implication du RLDL dans l'hypercholestérolémie familiale

A ce jour, 1413 mutations différentes, dont 20% rien que sur l'exon 4, ont été découvertes sur ce gène et décrites dans différentes bases de données (<http://www.umd.be/LDLR/> ou <http://www.ucl.ac.uk/ldlr/>). Parmi elles, 58% sont des mutations faux-sens, 22% sont des insertions ou délétions d'acides aminés, 11% résultent en un codon STOP prématuré et 9% sont des mutations du site d'épissage. En fonction de leur effet sur le cycle du RLDL, ces mutations sont classées en cinq grandes catégories (**Figure 32**) :

#### 1. Mutations de classe 1 ou allèle nul

Les patients porteurs d'une mutation de classe 1 ont une activité du RLDL inférieure à 2% de l'activité normale du récepteur. Il n'y a donc ni répression de l'activité HMGCR et de la synthèse de cholestérol ni activation de la formation d'esters de cholestérol dans ces cellules<sup>292</sup>. La production de protéines y est grandement altérée voire inexistante, comme dans le cas de la délétion du promoteur et de l'exon 1 ; le promoteur étant absent, il n'y a pas de transcription possible en ARNm<sup>293</sup>. La grande majorité des mutations non sens fait également partie de cette classe car, même s'il y a bien transcription d'un ARNm, la protéine traduite est tronquée, donc instable et non viable.

## 2. Mutations de classe 2 ou transport-déficient

Les mutations de classe 2 constituent un défaut de transport du RLDL vers la membrane plasmique. Dans une cellule normale, le RLDL est synthétisé dans le réticulum endoplasmique puis transporté vers le Golgi pour y être maturé. Dans le cadre de ce type de mutation, le transport du RLDL vers le Golgi est complètement aboli (classe 2A) ou grandement ralenti (classe 2B) entraînant très souvent une dégradation de la protéine avant même qu'elle n'ait atteint la surface cellulaire<sup>294</sup>. La plupart du temps, ce type de mutations est retrouvé dans les exons codant pour le domaine de liaison au ligand (le peu de récepteurs atteignant la surface a donc également une affinité moindre pour les LDL) ou pour le domaine homologue au précurseur de l'EGF.

## 3. Mutations de classe 3 ou liaison-déficient

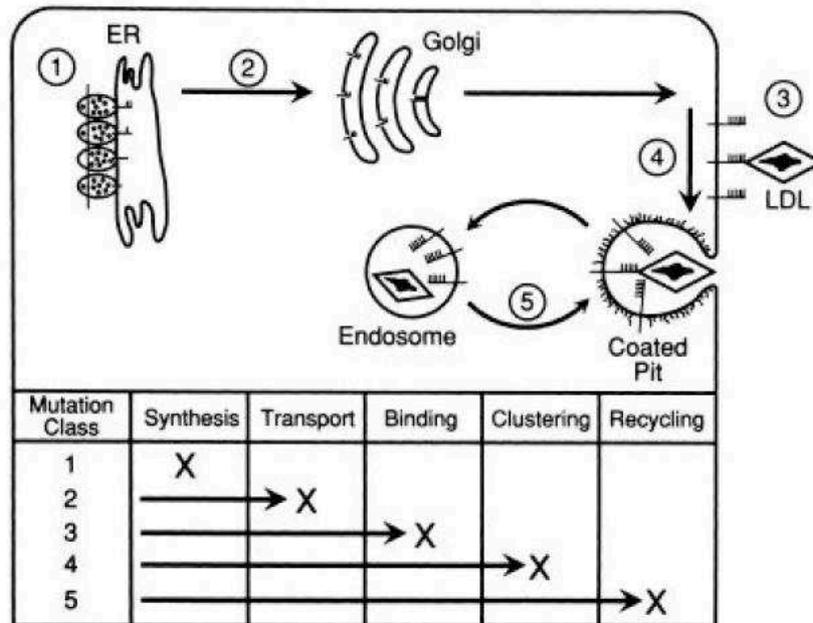
Dans une cellule portant une mutation de classe 3, le RLDL est correctement synthétisé, maturé et transporté à la membrane plasmique. Cependant, il est incapable de lier correctement son ligand, c'est-à-dire soit l'ApoE soit l'ApoB-100, réduisant ainsi l'affinité du couple récepteur/ligand et augmentant par conséquent le taux de LDL sanguin. Ces mutations sont généralement causées par des insertions ou des délétions dans les exons codant pour le site de liaison au ligand ou pour le domaine homologue au précurseur de l'EGF mais elles ne modifient pas le cadre de lecture lors de la traduction.

## 4. Mutations de classe 4 ou internalisation-déficient

Les récepteurs de classe 4 sont produits et transportés normalement à la membrane cellulaire où ils sont capables de lier correctement leur ligand mais ils sont distribués de manière diffuse plutôt que d'être regroupés dans les puits tapissés de clathrine<sup>295</sup>. De ce fait, ils ne peuvent internaliser les LDL auxquels ils se sont liés. Ce type de mutation se retrouve dans les exons codant pour les domaines transmembranaires et cytoplasmiques, qui sont les domaines nécessaires à l'ancrage dans la membrane et au regroupement des récepteurs dans les puits tapissés de clathrine. La mutation est classée 4A si le domaine cytoplasmique est le seul touché et 4B si les deux domaines sont affectés. Dans cette dernière, la majorité des récepteurs est sécrétée à l'extérieur de la cellule et le peu qui arrive à s'ancrer à la membrane est incapable d'internaliser les LDL<sup>296</sup>.

## 5. Mutations de classe 5 ou recyclage-déficient

Dans le cadre d'une mutation de classe 5, le RLDL est produit normalement, transporté sans encombre à la membrane, lie les LDL et est correctement internalisé dans les puits à manteau de clathrine. Cependant, la dissociation du complexe RLDL/ligand dans l'endosome ne se produit pas, ce qui empêche le recyclage du récepteur à la membrane et entraîne de ce fait sa dégradation dans le lysosome. Ce type de mutation touche principalement les exons codant pour le domaine homologue au précurseur de l'EGF, principal médiateur de la dissociation lors de la diminution du pH dans l'endosome<sup>297</sup>.



**Figure 32.** Les différentes classes de mutation affectant le RLDL<sup>298</sup>

La classe 1 concerne les mutations entraînant un défaut de synthèse du récepteur ; la classe 2, celles qui abolissent ou réduisent drastiquement le transport du récepteur vers le Golgi pour sa maturation ; la classe 3, celles qui diminuent l'affinité du couple ligand/récepteur ; la classe 4, celles qui empêchent le récepteur de se regrouper dans les puits à manteau de clathrine pour être internalisé et la classe 5, les mutations qui empêchent la dissociation du couple ligand/récepteur dans l'endosome et donc le recyclage du récepteur à la membrane.

#### D. Implication du RLDL dans les infections virales

A l'instar de nombreuses protéines membranaires, le RLDL est impliqué dans le cycle de vie de certains virus, parfois comme protéine d'ancrage, parfois comme corécepteur d'entrée ou également par son rôle d'internalisation des lipides dans la cellule.

##### 1. Le virus de la dengue

La dengue (DENV), aussi appelée grippe tropicale, est une maladie transmise par les piqûres de moustique due à un virus à ARN de la famille des *Flaviviridae*. Les souches du virus se répartissent en 4 sérotypes distincts, DEN-1, DEN-2, DEN-3 et DEN-4. L'Organisation Mondiale de la Santé estime à 50 millions le nombre de cas annuels. Les symptômes majeurs de la dengue classique sont l'apparition d'une forte fièvre accompagnée de maux de tête, de nausées et de douleurs musculo-articulaires. Ces derniers régressent rapidement au bout d'une semaine, la guérison complète étant observée après environ deux semaines de convalescence. Même si elle est fort invalidante (à l'image d'une vraie grippe), elle n'est pas considérée comme une maladie grave. Néanmoins, 500 000 personnes par an développent la forme la plus sévère de la maladie, la dengue hémorragique, caractérisée par des hémorragies multiples (intestinales, cérébrales, etc.). Cette dernière est mortelle dans 2,5% des cas après développement d'un syndrome de choc.

Le virus de la dengue est un virus dont les protéines d'enveloppe et de capsid contiennent des séquences analogues aux séquences de liaison d'ApoB-100 et d'ApoE au RLDL<sup>299</sup>. De plus, la périlipine 3, ligand situé sur les gouttelettes lipidiques d'une des protéines de la capsid du DENV (la protéine C), a de fortes analogies structurales avec l'ApoE. Ces données suggèrent donc que le DENV, via sa protéine de capsid C, est capable de se lier notamment à l'ApoE présente sur les VLDL afin de former des lipoviroparticules. De cette façon, le DENV est capable d'utiliser, entre autres, les voies métaboliques des VLDL et des LDL, dont notamment le RLDL, afin d'entrer dans les cellules<sup>300</sup>. Récemment, il a été montré qu'après infection d'Huh-7 par le DENV, le taux de cholestérol intracellulaire était augmenté tout comme le nombre de RLDL à la surface de la cellule et l'activité HMGCR. Le DENV a donc besoin d'une composition lipidique déterminée pour se répliquer dans les meilleures conditions et pour ce faire, il module l'internalisation des LDL et l'activité enzymatique de biosynthèse du cholestérol dans la cellule infectée<sup>301</sup>. *A contrario*, si la cellule infectée est traitée par des statines (lovastatine ou pravastatine), le taux de cholestérol intracellulaire décroît et ceci entraîne une diminution de la capacité de réplication du DENV<sup>301</sup>.

## 2. Le virus de la stomatite vésiculeuse

Le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) est un virus à ARN de la famille des *Rhabdoviridae* (comme le virus de la rage). Les principaux symptômes de l'infection sont une forte fièvre couplée à des maux de tête et des douleurs musculaires. Certains patients développent des vésicules sur les muqueuses du nez, des lèvres ou de la bouche. Cette infection est peu grave ; le traitement, non spécifique, consistant principalement à prendre en charge les symptômes. Néanmoins, l'infectiosité de ce virus, médiée par l'une des ses protéines de surface, la glycoprotéine G (VSV-G), est quasi pantropicque<sup>302</sup>. Cette capacité revêt un intérêt particulier pour les approches de thérapie génique. Pour infecter le plus grand nombre de types cellulaires possibles, une grande partie des vecteurs utilisés dans ce cadre (vecteurs rétroviraux comme lentiviraux), sont ainsi pseudotypés avec la protéine d'enveloppe VSV-G<sup>303,304</sup>.

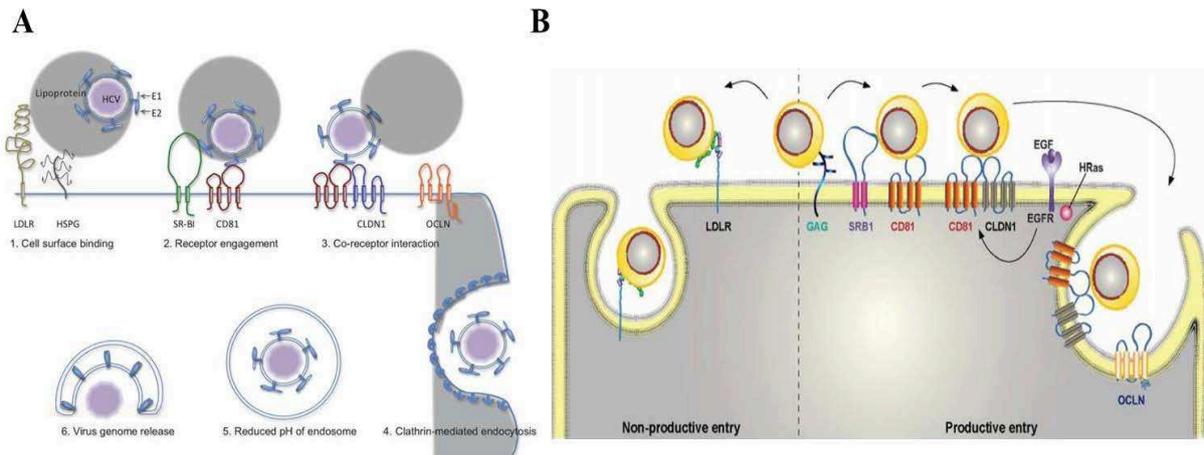
Le récepteur cellulaire de ce virus a longtemps été source de controverses. Dans les années 1990, il a été montré qu'une lignée cellulaire humaine sécrétait une protéine tronquée et soluble de 28 kDa après induction de la résistance antivirale par les interférons IFN- $\alpha$ 2 et IFN- $\beta$ <sup>305</sup>. Cette dernière correspond aux 292 acides aminés qui composent le domaine de liaison au ligand du RLDL (soluble LDLR ou sLDLR). Lorsque les cellules ont été traitées avec le sLDLR ou des interférons, aucune infection par le VSV n'a pu être mise en évidence, suggérant que le RLDL est le récepteur du VSV et que le sLDLR agit sur le virus par un mécanisme de compétition, empêchant ainsi la liaison virus/récepteur. Vingt ans plus tard, cette même équipe mettra en évidence le RLDL comme récepteur majeur du VSV et les protéines de la famille du RLDL (notamment LRP1) comme voies alternatives d'entrée pour le virus<sup>306</sup>. Ce résultat a été par la suite étayé par une autre étude qui place le RLDL comme récepteur principal d'entrée du VSV et explique la raison pour laquelle les vecteurs lentiviraux

pseudotypés avec VSV-G ne permettent pas un transfert génique efficace dans les cellules B et T non stimulées car ces dernières n'expriment pas le RLDL de manière constitutive<sup>307</sup>.

### 3. Le virus de l'hépatite C

La composition lipidique précise du VHC montre que plus de la moitié des lipides que les particules virales contiennent sont des esters de cholestérol, les rapprochant ainsi des particules de VLDL ou LDL<sup>308</sup>. Le RLDL dont le rôle est la captation de ces deux dernières molécules a de ce fait été suggéré comme ayant une implication dans le cycle viral. Néanmoins, le rôle précis qu'il y joue est encore débattu à l'heure actuelle. La première mention du RLDL comme facteur clé pour l'entrée du VHC dans les cellules date de la fin des années 1990 quand a été montrée l'inhibition complète de l'endocytose du virus après traitement de lignées cellulaires par un anticorps anti-RLDL<sup>309</sup>. En lien avec cette observation, une autre équipe a rapporté que le pourcentage de cellules infectées par le virus était plus faible lorsque le milieu de culture était surchargé en LDL circulants, semblant indiquer un mécanisme de compétition entre LDL et VHC<sup>310</sup>. Depuis, ces résultats ont été reproduits sur des hépatocytes humains primaires<sup>311</sup>, montrant un rôle très précoce du RLDL dans l'infection virale qui correspondrait à la phase d'ancrage de la même façon que pour les glycosaminoglycanes (**Figure 33A**). De plus, comme pour ces derniers, des études récentes semblent une nouvelle fois pointer du doigt le rôle d'ApoE plutôt que des glycoprotéines d'enveloppe dans la liaison des lipoviriparticules au RLDL<sup>312</sup>.

En 2012, une équipe française a montré que le RLDL n'était pas nécessaire à l'entrée des particules virales infectieuses dans les cellules mais que sa fonction de captation des VLDL et LDL circulantes était importante pour une réplication optimale du génome viral<sup>313</sup>. En effet, les cinétiques d'internalisation des lipoprotéines par le RLDL sont bien plus rapides que celles des particules virales infectieuses suggérant des voies d'internalisation différentes. De plus, l'ajout d'un anticorps anti-RLDL 8h post-infection, bloquant la liaison du RLDL à son ligand, entraîne une diminution de moitié de l'infectiosité des particules virales sous-tendant le fait que le RLDL est impliqué dans une étape postérieure à l'entrée virale. De plus, lors du blocage du RLDL par cet anticorps spécifique, la composition lipidique de la cellule est modifiée (augmentation du ratio phosphatidylethanolamine/phosphatidylcholine). L'hypothèse privilégiée dans cette étude est que l'entrée du virus médiée directement par le RLDL est une voie d'internalisation non productive (**Figure 33B**). *A contrario*, le RLDL jouerait un rôle majeur dans la réplication du génome viral en captant dans la circulation les lipides essentiels à celle-ci. Cette hypothèse est appuyée par plusieurs études montrant que le VHC déclenche la synthèse *de novo* de lipides dans la cellule infectée tout en inhibant leur sécrétion et leur export<sup>314</sup> et qu'il augmente le nombre de RLDL à la surface cellulaire<sup>315</sup> tout en réprimant l'expression de PCSK9 dans le but de favoriser l'internalisation des lipides circulants<sup>316</sup>.



**Figure 33.** Différentes hypothèses sur le rôle du RLDL dans l'entrée du VHC

(A) Le VHC se lie via sa partie lipoprotéique aux glycosaminoglycanes et au RLDL avant d'interagir avec SRB1 puis CD81 via sa glycoprotéine d'enveloppe E2. CD81 forme un complexe avec la claudine 1 permettant, avec l'aide de l'occludine, l'endocytose du virus<sup>317</sup>

(B) Le VHC se lie aux glycosaminoglycanes avant son interaction avec CD81 et SRB1. Si le VHC interagit avec le RLDL alors la voie d'internalisation du virus est non productive<sup>318</sup>

#### IV. Autres gènes induisant une hypercholestérolémie familiale

Outre le RLDL, des mutations sur d'autres gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol produisent un phénotype clinico-biologique similaire.

##### A. ApoB

Le gène de l'ApoB est un gène de 43 kb qui comprend 29 exons et se situe sur le bras court du chromosome 2 (2p24-p23). Ce dernier code pour deux isoformes, l'ApoB-100, protéine de 550 kDa synthétisée dans les hépatocytes et qui est retrouvée en exemplaire unique sur chaque particule de LDL. Cette dernière correspond à la transcription puis la traduction de la totalité des exons du gène. Dans les entérocytes, un phénomène particulier d'édition (modification post-transcriptionnelle des ARN changeant la séquence codante) entraîne la synthèse d'une protéine tronquée représentant 48% de la taille totale de l'ApoB-100, l'ApoB-48. Cette dernière est un constituant important des chylomicrons.

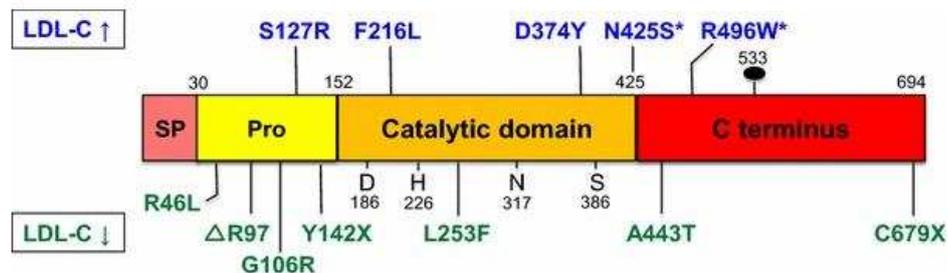
Les travaux de Brown et Goldstein ont longtemps occulté la possibilité d'une autre origine génétique à l'hypercholestérolémie familiale que le RLDL. Pourtant, certaines formes plus modérées de cette maladie ne pouvaient s'expliquer en ne prenant en compte que le RLDL. Ainsi, en 1987, l'affinité pour le RLDL des LDL de plusieurs patients hypercholestérolémiques a été testée. Dans un patient particulier, cette dernière n'était que de 32% par rapport à la normale. Or, les propriétés de ses LDL étaient tout à fait normales suggérant donc un défaut minime sur l'ApoB-100 responsable de cette diminution drastique d'affinité<sup>250</sup>. Cette anomalie fut alors dénommée Familial Defective ApoB ou FDB. La mutation responsable fut découverte l'année suivante. Il s'agit d'une substitution d'une arginine par une glutamine en position 3527 (R3500Q)<sup>319</sup>. Cette mutation se situe non loin du domaine

de liaison de l'ApoB-100 au LDL et entraîne une déstabilisation de la conformation de la protéine réduisant de fait l'affinité pour son récepteur. Elle est l'une des plus courantes en Europe et dans les populations américaines d'origine européenne et représente 2 à 5% de la totalité des phénotypes FH<sup>320</sup>.

Dans de nombreux cas, il est d'ailleurs difficile de distinguer cliniquement un patient avec une mutation hétérozygote sur le LDLR ou sur l'ApoB-100. De plus, comparativement à la taille du gène, il existe seulement une dizaine de mutations responsables d'un phénotype FH. La plupart est retrouvée dans les populations caucasienne ou asiatique (R3527W)<sup>321</sup> alors que les populations arabes et du Moyen-Orient sont les moins touchées<sup>322</sup>.

## B. PCSK9

Au début des années 2000, la découverte de deux mutations délétères dans la population française a permis de faire émerger un troisième gène responsable d'une hypercholestérolémie, PCSK9<sup>251</sup>. Ce gène constitué de 12 exons s'étendant sur 25 kb et situé sur le chromosome 1 (1p32), code pour la protéine décrite plus en amont dans ce chapitre qui régule le nombre de LDLR à la surface membranaire. Depuis, de nombreuses autres mutations ont été découvertes portant le total de variants alléliques à 163.



**Figure 34.** Structure du gène PCSK9 et principales mutations<sup>323</sup>

En bleu, les mutations "gain de fonction" entraînant une hypercholestérolémie et en vert, les mutations "perte de fonction" entraînant une hypocholestérolémie.

Les mutations de ce gène peuvent être classées en 2 catégories qui induisent deux phénotypes bien distincts (**Figure 34**). Les mutations "gain de fonction", comme celles découvertes en 2003, entraînent un phénotype hypercholestérolémique classique. A l'inverse, d'autres substitutions nucléotidiques ou les mutations non sens sont classifiées comme des mutations "perte de fonction". Dans ce cas, les personnes portant cette mutation ont un taux très faible de LDL circulants qui s'accompagne d'une diminution du risque d'atteintes cardiovasculaires de l'ordre de 88%<sup>324</sup>. Néanmoins, ces mutations "perte de fonction" semblent tout de même favoriser d'autres pathologies comme l'accident vasculaire cérébral hémorragique<sup>325</sup> ou le diabète de type 2<sup>326</sup>. Le gène codant pour PCSK9 est également sujet à de nombreux polymorphismes nucléotidiques qui affectent différemment la régulation de la cholestérolémie. Ces polymorphismes peuvent donc expliquer la grande variabilité phénotypique observée entre deux patients portant la même mutation sur le gène du LDLR<sup>327</sup>.

### C. LDLRAP1

Dans les années 1970, plusieurs publications décrivent des enfants au phénotype FH homozygote, nés de parents normocholestérolémiques, suggérant l'existence d'un mode de transmission récessif pour cette maladie<sup>328,329</sup>. Il a par la suite été montré que le gène responsable était celui du LDLRAP1 (LDL Receptor Adapter Protein 1). Ce gène, constitué de 9 exons s'étendant sur 25 kb et situé sur le chromosome 1 (1p36-35), code pour une protéine adaptatrice du RLDL<sup>330</sup>. Par son interaction avec la partie cytoplasmique du récepteur et les clathrines, elle agit comme médiateur de l'internalisation du complexe LDL/RLDL<sup>331</sup>. Une mutation sur ce gène entraîne alors une impossibilité de celle-ci, les récepteurs s'accumulant de ce fait à la membrane plasmique. Il faut néanmoins souligner que ces mutations sont extrêmement rares, il n'y a en effet que très peu de cas décrits dans la littérature.

### V. Modèles animaux de la maladie

Le premier modèle animal d'hypercholestérolémie familiale a été découvert par hasard en 1973 par un vétérinaire japonais, le Dr. Yoshio Watanabe. En examinant les effets de l'alimentation sur des lapins, il a trouvé un mâle dans la colonie avec un taux de cholestérol plasmatique dix fois plus élevé que pour les autres lapins. Il a donc isolé cet individu afin de créer une nouvelle lignée, le lapin Watanabe Heritable Hyperlipidemic (WHHL), modèle de l'hypercholestérolémie familiale<sup>332</sup>. Comme pour les humains, les lapins WHHL homozygotes présentent plusieurs signes cliniques de la maladie : xanthomes, taux très élevé de LDL dans le plasma corrélé à une diminution de celui des HDL et un développement rapide et sévère de l'athérosclérose<sup>333</sup>. Les lapins hétérozygotes ne développent quant à eux qu'une légère athérosclérose sous un régime pauvre en graisses et en cholestérol. Néanmoins, ils développent les mêmes lésions des artères que les homozygotes s'ils suivent en régime riche en gras<sup>334</sup>. La mutation responsable de ce phénotype a depuis été identifiée, il s'agit d'une délétion de douze paires de bases entraînant la disparition de quatre acides aminés dans la 4<sup>ème</sup> répétition du domaine de liaison aux LDL<sup>335</sup>. Celle-ci entraîne un délai dans le processus de maturation dans le Golgi (classe 2B) et donc dans le transport à la membrane<sup>336</sup>. Une grande majorité des protéines matures est alors dégradée avant même son arrivée à la membrane. De plus, les quelques récepteurs à la membrane peuvent toujours se lier aux VLDL mais ont une très faible affinité pour les LDL (classe 3). Ce modèle a notamment permis de montrer l'augmentation de la prise de greffe d'hépatocytes autologues après embolisation portale partielle ainsi que la restauration phénotypique post-greffe induite par la transduction *ex vivo* de ces hépatocytes par un vecteur lentiviral portant le gène du RLDL<sup>337</sup>. Malheureusement, à l'heure actuelle, ce modèle n'est plus disponible en France.

Il existe également un deuxième modèle naturel d'hypercholestérolémie familiale chez les primates non humains. Une équipe américaine a en effet isolé plusieurs individus de singe rhésus avec un taux de cholestérol supérieur à la normale et associé à une augmentation du taux de LDL et d'ApoB<sup>338</sup>. L'hypercholestérolémie est encore plus marquée chez ces animaux après un régime riche en gras (5 à 8 g/L contre 2 g/L chez un individu sain de la même

population soumis au même régime). Dans les fibroblastes de ces animaux, l'activité du RLDL est réduite de 50% par rapport aux animaux sains. La mutation a par la suite été identifiée comme étant une mutation non-sens dans le 6<sup>ème</sup> exon du gène RLDL au niveau de l'acide aminé 284 et qui entraîne une diminution de 50% de l'expression de l'ARNm du RLDL<sup>339</sup>.

Hormis ces deux modèles, il existe surtout des souris transgéniques générées à partir de cellules souches embryonnaires murines ayant subi une recombinaison homologe afin de rendre le gène *rldl* inopérant<sup>340</sup>. Ces souris *rldl*<sup>-/-</sup> sont viables et fertiles mais à la différence des lapins, elles ne reproduisent pas complètement le phénotype attendu. Soumises à un régime classique, elles ont un taux de cholestérol double de celui des souris normales mais qui reste bas (~2,25 g/L). De plus, après un régime riche en cholestérol, bien que le taux de lipides augmente fortement dans le sérum de ces animaux, la fraction principale qui y est retrouvée n'est pas constituée de LDL mais de VLDL<sup>341</sup>. Enfin, ces souris ne développent pas d'athérosclérose majeures ni, en conséquence, d'infarctus du myocarde. Toutes ces données peuvent s'expliquer par le fait que les foies de ces souris produisent l'ApoB-48 préférentiellement à l'ApoB-100, ce que ne font pas les foies humains (qui ne produisent pas du tout d'ApoB-48). Ainsi, les lipoprotéines contenant l'ApoB-48 sont éliminées par d'autres récepteurs que le RLDL, comme la LRP, diminuant donc le taux de LDL plasmatiques. Afin de créer un modèle plus proche de la réalité de la maladie chez l'Homme, ces souris *rldl*<sup>-/-</sup> ont été croisées avec des souris exprimant un transgène humain de l'ApoB-100<sup>342</sup> ou des souris dont les hépatocytes produisent exclusivement l'ApoB-100<sup>343</sup>. Dans ce cas, ces deux lignées ont des taux de LDL-c aussi élevés que ceux des homozygotes humains et développent également une athérosclérose sévère et ce, même avec un régime pauvre en gras. Très récemment, ces souris ont été utilisées par l'équipe de James Wilson comme essai préclinique pour étudier la toxicité de la thérapie génique *in vivo* par les AAV. Quelle que soit la dose d'AAV8 porteur du gène *rldl* murin ou humain injectée dans ces animaux, les auteurs n'ont pas relevé d'élévation des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, suggérant que la dose la plus élevée testée dans cette étude ( $6 \times 10^{13}$  nombre de copies par kilogramme) est plus faible que la dose maximale tolérée<sup>344</sup>.

Toutefois, ces souris n'expriment pas l'enzyme CETP, *a contrario* des autres espèces et ne régulent de ce fait pas les HDL de la même façon. Une équipe américaine a donc récemment humanisé un modèle de souris hautement immunosupprimées (souris FRG, *Fah*<sup>-/-</sup>, *Rag2*<sup>-/-</sup> et *Il2rg*<sup>-/-</sup> déficientes en lymphocytes B et T et cellules natural killer) qui est le modèle le plus utilisé pour les xélogreffes hépatiques chez la souris. Ils y ont injecté des hépatocytes primaires issus d'une patiente atteinte d'HF homozygote ou des hépatocytes humains primaires normaux pour apporter la preuve de concept de la faisabilité de la thérapie génique de l'HF par les vecteurs associés aux adénovirus (AAV)<sup>345</sup>. L'injection dans la veine de la queue de ces souris d'un AAV9 portant le gène humain du RLDL a permis l'expression de la protéine dans 15 à 25% des hépatocytes et la réduction par trois du taux de cholestérol plasmatique. Ce modèle particulier reposant sur l'utilisation d'hépatocytes primaires semble prometteur pour mimer au plus proche ce qu'il se produit chez l'humain mais difficile à

généraliser à moins d'utiliser des hépatocytes différenciés à partir d'iPSC de patients HF et préalablement cryoconservés, ce qui est impossible pour le moment.

En plus des lignées cellulaires *in vitro*, ces modèles animaux permettent donc de tester de nouveaux traitements pour l'hypercholestérolémie familiale et de réaliser des essais précliniques avant de passer aux essais cliniques chez l'Homme.

## VI. Traitements disponibles

A l'heure actuelle, il existe sur le marché différents traitements médicamenteux agissant sur plusieurs cibles distinctes et visant tous à lutter contre l'hypercholestérolémie familiale en diminuant le taux de LDL-c dans le sang. L'application de ces derniers dépend du niveau de gravité de la maladie et du phénotype du patient, un patient homozygote ne répondant pas aux mêmes signaux qu'un patient hétérozygote. Il est néanmoins nécessaire pour tous les patients, quel que soit leur phénotype, d'adopter certaines mesures d'hygiène de vie et de diététique pour permettre une première diminution du taux de LDL-c (jusqu'à 15%<sup>346</sup>) qui, même si elle n'est pas suffisante pour atteindre le taux souhaité, vient s'ajouter à la diminution médiée par le traitement.

Tout d'abord, et de manière évidente, l'apport de graisses par l'alimentation doit être le plus faible possible, c'est-à-dire inférieur à 35% de l'apport énergétique total avec au maximum 7% d'acides gras saturés. L'apport de cholestérol doit quant à lui représenter moins de 150 mg par jour. Il est également recommandé d'ingérer des stérols ou des stanols végétaux<sup>347</sup> et des fibres solubles<sup>348</sup> qui diminuent naturellement l'absorption intestinale de cholestérol. Les patients sont également fortement encouragés à faire du sport afin de maintenir un poids satisfaisant, chaque kilo perdu représentant une diminution de près de 0.08 g/L des LDL-c<sup>349</sup>. Finalement, fumer est totalement à proscrire lorsque l'on est atteint par une hypercholestérolémie car cela augmente de manière considérable le risque d'accident cardiovasculaire.

En plus de ces recommandations, des traitements pharmacologiques sont parallèlement mis en place pour accentuer la diminution des LDL-c.

### A. Patients hétérozygotes

#### 1. Thérapies classiques

Le traitement phare utilisé en première intention pour diminuer le taux de LDL-c est l'administration de statines<sup>350</sup>. Ces molécules naturelles (lovastatine, pravastatine ou simvastatine) ou synthétiques (atorvastatine ou fluvastatine) sont des inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase, l'enzyme limitante de la réaction de biosynthèse du cholestérol. Ainsi, la diminution de synthèse du cholestérol entraîne une diminution de synthèse et d'excrétion des VLDL et donc une diminution des LDL-c. De plus, ce défaut entraîne en parallèle

l'augmentation de la synthèse et du nombre de RLDL à la surface cellulaire dans le but de capter le maximum de LDL-c. Les patients hétérozygotes, ayant donc environ 50% de récepteurs fonctionnels, répondent très bien à ce traitement, surtout s'ils portent une mutation de classe 5 ; des réductions du taux de LDL-c jusqu'à 60% ont en effet pu être observées chez certains d'entre eux<sup>351</sup>.

Néanmoins, les statines activent aussi SREBP2 qui va, entre autres, induire la synthèse d'HMG-CoA réductase contrebalançant donc leur effet sur l'inhibition directe de cette enzyme<sup>352</sup>. De plus, elles présentent quelques effets secondaires variables en fonction des individus. Les plus courants concernent une élévation du taux de transaminases hépatiques dans le sang (signe d'une lésion hépatique) et des problèmes musculaires (comme des crampes). Elles peuvent également entraîner une augmentation du taux de créatine kinase dans le sang et provoquer de ce fait un risque de rhabdomyolyse (destruction des cellules musculaires)<sup>353</sup>. Il a par ailleurs été rapporté qu'elles influaient sur le métabolisme des HDL et notamment sur leur taille<sup>354</sup> : la diminution de la synthèse du cholestérol hépatique induit par conséquent la diminution de l'efflux de celui-ci par la voie du transport inverse via ABCA1. De ce fait, les molécules d'HDL vont s'enrichir en ApoA1 plutôt qu'en cholestérol et augmenter en taille, jusqu'à devenir suffisamment volumineuses pour ne plus pouvoir être catabolisé par le glomérule rénal. Il peut également se produire une augmentation de la captation du cholestérol présent sur les HDL via SRB1 après traitement par les statines. Ces deux mécanismes entraînent donc la diminution du taux de HDL dans le sang, en parallèle de celles des LDL-c.

D'autres solutions pharmacologiques sont disponibles sur le marché soit en complément soit en remplacement des statines si le patient ne les tolère pas. Parmi elles, la cholestyramine (Questran) ou le colestipol sont des résines échangeuses d'anions et séquestrantes des acides biliaires pour lesquels elles ont une forte affinité. Elles fixent ces derniers dans la lumière intestinale sous forme d'un complexe insoluble ce qui empêche ainsi leur absorption par l'intestin et favorise leur élimination fécale. Pour compenser cette non réabsorption, l'activité de l'enzyme CYP7A1 est augmentée et induit l'augmentation de la synthèse des acides biliaires à partir du cholestérol réduisant ainsi le taux de cholestérol intracellulaire. Cette carence en cholestérol est alors contrebalancée par l'augmentation de l'expression du RLDL dans les hépatocytes<sup>355</sup>. Néanmoins, en monothérapie, ce traitement est peu efficace (réduction du taux de LDL-c d'environ 10%, pouvant aller jusqu'à 30% chez les meilleurs répondants<sup>356</sup>) du fait de l'augmentation de la biosynthèse du cholestérol dans les cellules parallèle à l'augmentation des RLDL pour pallier le manque de cholestérol. De plus, ce traitement entraîne relativement fréquemment d'importants troubles digestifs et, s'il est combiné aux statines, doit être administré *a minima* quatre heures avant elles pour éviter toute interférence au moment de l'absorption qui réduirait l'efficacité globale de la médication<sup>357</sup>.

Parmi les autres solutions possibles se trouve l'ézétimibe, l'acide nicotinique et les fénofibrates. L'ézétimibe est un inhibiteur spécifique de NPC1L1 donc de l'absorption du cholestérol intestinal entraînant ainsi un déficit de cholestérol dans les hépatocytes et une induction des RLDL<sup>358</sup>. Il a été montré qu'il était capable d'induire en monothérapie une

baisse des LDL-c de l'ordre de 19%<sup>359</sup>. L'acide nicotinique quant à lui joue un rôle dans le métabolisme lipidique : il est en effet connu qu'il réduit non seulement le taux de LDL-c (de 10 à 15%<sup>360</sup>) mais également ceux de VLDL et de triglycérides tout en augmentant celui des HDL<sup>361</sup>. Enfin, les fénofibrates, via l'activation du Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ), entraînent une diminution du taux de LDL-c du même ordre que l'acide nicotinique<sup>360</sup>. L'utilisation de ces composés en monothérapie est insuffisante pour ramener le niveau de cholestérol d'un patient hétérozygote à un niveau de risque cardiovasculaire minimal et il convient donc d'en réaliser des associations en fonction de la tolérance des patients pour telle ou telle molécule afin de garantir le meilleur traitement possible.

## 2. Thérapies émergentes

L'identification de mutations nulles du gène PCSK9 entraînant une réduction drastique (80%) du risque de maladies cardiovasculaires chez les patients porteurs a soulevé l'hypothèse que cette protéine était une cible thérapeutique potentielle pour réduire le taux de LDL-c<sup>362</sup>. Différentes stratégies ont alors été mises en place dans le but de diminuer de façon notable l'activité de cette protéine. La première, basée sur les oligonucléotides anti-sens (injection d'un ARN anti-sens de l'ARN messenger pour empêcher sa traduction), a permis une diminution de 38% des LDL-c et une expression doublée des RLDL dans une étude de concept chez un modèle murin<sup>363</sup>. Cependant, le développement de ces molécules a été stoppé en phase I. La seconde et la plus avancée des stratégies se base sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux humanisés anti-PCSK9<sup>364,365</sup>. Deux d'entre eux ont d'ores et déjà été approuvés : l'evolocumab (vendu par Amgen sous le nom Repatha) en Europe et l'alirocumab (vendu par SANOFI sous le nom Praluent) aux Etats-Unis.

Les premiers essais cliniques concernant ces anticorps ont montré des diminutions du taux de LDL-c dose-dépendantes pouvant atteindre 75% par rapport au témoin sans traitement dans le cas des doses les plus élevées<sup>366</sup> (**Tableau 2**). La tolérance à ces produits est plutôt bonne, avec comme effet secondaire majeur une possible réaction cutanée au site d'injection. De plus, ces produits sont vendus sous forme d'auto-injecteur (toutes les 2 ou 4 semaines) permettant de donner de l'autonomie au patient et d'améliorer ainsi son cadre de vie. Ils sont également parfaitement compatibles avec un autre traitement comme les statines ou l'ézétimibe et ensemble, ils permettent de réduire de manière significative l'incidence des événements cardiovasculaires (au-delà de 50% en moyenne)<sup>367,368</sup>. Néanmoins, ce traitement par anticorps monoclonaux reste pour le moment extrêmement onéreux et les autorités de santé limiteront très probablement l'usage de celui-ci aux patients qui ne répondent à aucun autre traitement ou qui ont des antécédents ou de multiples facteurs de risque cardiovasculaire.

Produits	<i>alirocumab</i> (Praluent® de SANOFI/ REGENERON)	<i>évolocumab</i> (Repatha® de AMGEN)
Etudes	ODYSSEY LONG TERM	OSLER 1 et 2
Nombre de patients	2338 (1550 alirocumab et 788 placebo)	4465 (2976 evolcumab et 1489 « standard of care »)
Durée de <i>follow up</i>	52 semaines	44 semaines
Réductions observées du LDL-C	70 mg/dL (62% réduction)	73 mg/dL (61% réduction)
Réductions calculées des incidents cardiovasculaires (calculés sur base de la droite de régression du CTT)	35%	36%
Réductions observées des incidents cardiovasculaires	54% (18% à 74%)	53% (22% à 72%)

**Tableau 2.** Réduction du taux de LDL-c et des incidents cardiovasculaires après traitement par anticorps monoclonaux anti-PCSK9 (<https://www.louvainmedical.be/en/node/214>)

## B. Patients homozygotes

### 1. Thérapies classiques

Nombre des traitements énoncés auparavant et qui influent sur la régulation de la copie fonctionnelle du gène RLDL sont d'une très faible efficacité voir totalement inefficaces chez les patients homozygotes. Par exemple, le traitement par evolocumab ne réduit que de 16,5% le taux de LDL-c contre plus de 50% chez un patient hétérozygote et il est totalement inefficace chez les porteurs de mutation de classe 1 (allèle nul)<sup>369</sup>. D'autres thérapies sont donc à mettre en place pour empêcher une mort très prématurée de ces patients. Chirurgicalement, il est possible de réaliser un shunt porto-cave afin de relier directement la veine porte à la veine cave, permettant au sang intestinal de contourner le foie. Cette opération réduit la synthèse de cholestérol dans l'ensemble des cellules du corps humain, la synthèse d'acides biliaires et surtout le taux de LDL-c<sup>370</sup>. Néanmoins, elle ne constitue pas en elle-même un traitement suffisamment puissant pour atteindre un niveau de LDL-c correct.

L'unique traitement curatif pour cette maladie reste encore la transplantation orthotopique du foie. La greffe cœur-foie chez une patiente atteinte d'hypercholestérolémie familiale a permis une réduction conséquente de son taux de cholestérol sanguin, de 11 g/L à 2-3 g/L sous-entendant que le foie transplanté a apporté des RLDL fonctionnels. Cette patiente a ensuite été traitée par la lovastatine pour amplifier la réduction de son taux de cholestérol qui est passé à 1,5-2 g/L<sup>371</sup>. 20 ans après cette intervention, le taux de cholestérol était toujours stable et les xanthomes tendineux dont elle souffrait avant greffe avaient complètement régressé<sup>372</sup>. D'autres cas occasionnels de transplantation ont depuis été rapportés, montrant également une forte diminution du taux de LDL-c accompagnée d'une régression des autres symptômes<sup>373,374</sup>. Néanmoins, au vu des problèmes liés à la prise de traitements immunosuppresseurs à vie et de disponibilités de donneurs déjà évoqués au chapitre 1, la transplantation orthotopique n'est pas considérée dans le cadre de cette maladie, même pour les cas les plus graves.

A l'heure actuelle, le traitement recommandé et utilisé pour les patients homozygotes (ou les hétérozygotes réfractaires aux autres traitements médicamenteux) est une aphérèse des LDL. Cette technique consiste à faire passer le sang dans des systèmes extracorporels constitués de colonnes qui vont retenir uniquement les lipoprotéines contenant l'ApoB100 (donc les VLDL, LDL et IDL) via soit l'héparine-agarose, l'agarose fonctionnalisé avec un anticorps anti-LDL ou le sulfate de dextran lié à une matrice de cellulose. La réduction du taux de LDL-c est de l'ordre de 60 à 70% avec cette technique<sup>375</sup>. Cependant, ce taux remonte rapidement, retrouvant 50% du taux pré-aphérèse après quatre jours et 90% après deux semaines obligeant les patients à subir cette procédure très régulièrement, en moyenne deux fois par mois<sup>376</sup>. Sur le long terme, ce traitement est efficace puisqu'il permet une régression des xanthomes tendineux et diminue la progression de l'athérosclérose tout en réduisant l'inflammation artérielle caractéristique de la maladie.

Le traitement par aphérèse restant extrêmement contraignant, il est nécessaire de trouver des alternatives qui, même s'ils ne permettront probablement jamais de le remplacer, puissent au moins permettre d'espacer les séances.

## 2. Thérapies émergentes

Plusieurs cibles impliquées dans le métabolisme du cholestérol autres que le RLDL et PCSK9 sont actuellement à l'étude pour réduire du taux de LDL-c : CETP, MTP et ApoB.

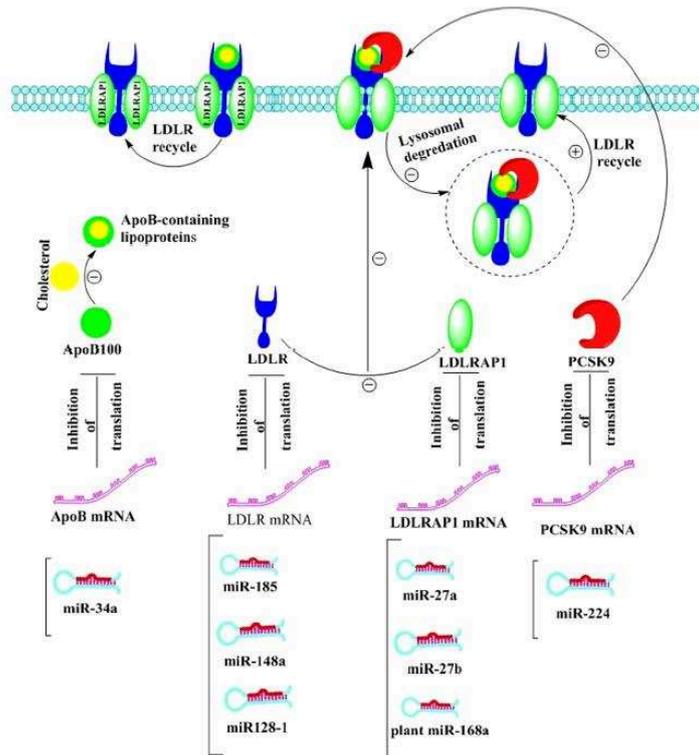
Un taux élevé d'enzyme CETP, qui transfère des esters de cholestérol contenus sur les HDL sur des lipoprotéines portant l'ApoB, chez un sujet sain augmente le risque d'accidents cardiovasculaires<sup>377</sup> alors que son inhibition dans un modèle de lapin d'athérosclérose diminue significativement la progression de la maladie<sup>378</sup>, suggérant une potentielle application dans le cadre de l'hypercholestérolémie familiale. Deux approches ont été décrites dans la littérature, un vaccin basé sur des résidus peptidiques de l'enzyme qui n'a montré que très peu d'efficacité lors d'un essai clinique de phase I<sup>379</sup> ainsi que l'inhibition de l'enzyme par des petites molécules antagonistes. La plus connue d'entre elles est le torcetrapib (produite par Pfizer) qui induit une augmentation du taux de HDL-c parallèle à une diminution de celle des LDL-c. Néanmoins, cet effet n'induit aucun bénéfice en termes de régression de l'athérosclérose et les essais cliniques ont dû être stoppés du fait d'une augmentation inattendue de la morbi-mortalité chez les patients traités par l'atorvastatine plus le torcetrapib, suggérant des effets hors cibles de cette molécule en plus de son effet inhibiteur de CETP<sup>264</sup>. D'autres études sur d'autres inhibiteurs sont actuellement en cours afin de déterminer si CETP peut être une réelle cible envisageable dans le traitement de l'hypercholestérolémie familiale.

L'enzyme MTP joue un rôle primordial dans l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines portant l'ApoB. Des patients porteurs de mutations "perte de fonction" sur le gène codant pour cette enzyme développent une maladie rare appelée hypo- $\beta$ -lipoprotéïnémie caractérisée par l'absence quasi-totale de LDL dans le sang du fait de la non sécrétion des VLDL par le foie<sup>380</sup>. Ceci suggère que la MTP pourrait être une cible intéressante pour diminuer la production des VLDL et par la même occasion, la concentration de LDL-c. Le

lomitapide a donc été développé comme un inhibiteur de cette enzyme. Dans un essai clinique de phase 3 incluant 29 patients homozygotes, cette molécule, ajoutée au traitement conventionnel par aphérèse, a montré une capacité à réduire le taux de LDL-c d'environ 40% après 78 semaines de traitement<sup>381</sup>. Néanmoins, en empêchant la sécrétion de VLDL, les triglycérides sont alors retenus dans le foie induisant chez tous les patients une stéatose hépatique. Les autres effets indésirables rapportés sont la diarrhée et des problèmes gastro-intestinaux ainsi qu'un taux élevé de transaminases hépatiques (trois fois la normale) pour dix des patients<sup>381</sup>.

De la même façon que pour la protéine MTP, inhiber la production d'ApoB100 diminuerait *de facto* la sécrétion de VLDL et par conséquent le taux de LDL-c. Un oligonucléotide antisens, le mipomersen, a été développé pour dégrader l'ARNm de l'ApoB100 et empêcher sa traduction. Dans un essai clinique de phase III, l'injection de mipomersen (200 mg par semaine) chez 51 patients homozygotes en plus d'un traitement hypolipidémiant optimal (hors aphérèse) a permis une diminution des LDL-c de l'ordre de 25%<sup>382</sup>, équivalente à celle retrouvée chez des patients hétérozygotes ayant suivi un essai clinique strictement similaire<sup>383</sup>. De plus, aucune interaction n'a pu être démontrée avec les statines ou l'ézétimibe suggérant une bonne efficacité si l'on additionne cette molécule aux autres traitements<sup>384</sup>. Les principaux effets secondaires reportés sont une réaction cutanée au site de l'injection pour la grande majorité des patients ainsi que des symptômes s'apparentant à la grippe pour 1/3 des patients et une élévation des transaminases hépatiques, non liée à l'apparition d'une stéatose, chez 10% d'entre eux<sup>382,383</sup>.

Enfin, des études sont en cours pour tester la possibilité de réduire le taux de LDL-c via l'interférence par ARN. Un essai de phase II chez 500 patients sur un petit ARN interférent (siRNA), l'inclisiran, conçu pour cibler l'ARNm de PCSK9 a montré une diminution moyenne de 45% du taux de LDL-c quatre-vingt-dix jours après l'injection pour la dose la plus élevée<sup>385</sup>. Cette diminution persiste dans le temps puisque six mois post-injection, elle est toujours de 40% en moyenne. L'effet secondaire majeur, constaté chez 10% des patients, fut encore une fois une réaction cutanée au site d'injection. L'inclisiran semble donc assurer une diminution durable du taux de LDL-c (et de PCSK9) avec des injections relativement espacées dans le temps. Néanmoins, cette technologie n'est pas véritablement applicable aux patients homozygotes puisqu'elle cible PCSK9 et donc nécessite des LDL fonctionnels. De plus, certains de ces siRNA peuvent entraîner des effets hors cibles potentiellement toxiques pour les cellules<sup>386</sup>.



**Figure 35.** Régulation des gènes du métabolisme du cholestérol par les micro-ARN<sup>387</sup>

D'autres études ciblant cette fois les micro-ARN (ou miRNA) impliqués dans la régulation des protéines du métabolisme du cholestérol (**Figure 35**) commencent à émerger sur des cellules *in vitro* ou sur des modèles animaux. Par exemple, l'inhibition du miR128-1 par un antagonomiR réduit significativement le taux de LDL-c dans un modèle murin d'hypercholestérolémie via l'augmentation de la synthèse de LDL, normalement réprimée par ce miR<sup>388</sup>. Dans le cas de PCSK9, il a été récemment rapporté que le miR-224 diminuait significativement son expression<sup>389</sup>. Ainsi, trouver des molécules capables de stimuler ou de mimer l'action du miR-224 dans le but d'augmenter l'inhibition d'expression de PCSK9 est une piste envisageable afin de réduire les niveaux de LDL-c dans le sang. Pour les patients homozygotes, il est également possible de réduire la production d'ApoB100, et par conséquent de LDL, en mimant l'action du miR-34a, démontré comme étant un régulateur clé de celle-ci<sup>390</sup>.

Comme beaucoup d'autres maladies génétiques, l'hypercholestérolémie familiale est une maladie que l'on peut traiter mais que l'on ne guérit pas encore véritablement. Avec l'explosion récente de nouvelles techniques génétiques, comme l'édition du génome, de nouvelles voies thérapeutiques s'offrent aux chercheurs et médecins pour continuer à développer de nouvelles médicaments et améliorer ainsi les conditions de vie des personnes atteintes.

## CHAPITRE 4 : L'édition du génome

### I. Intérêt des systèmes d'édition du génome

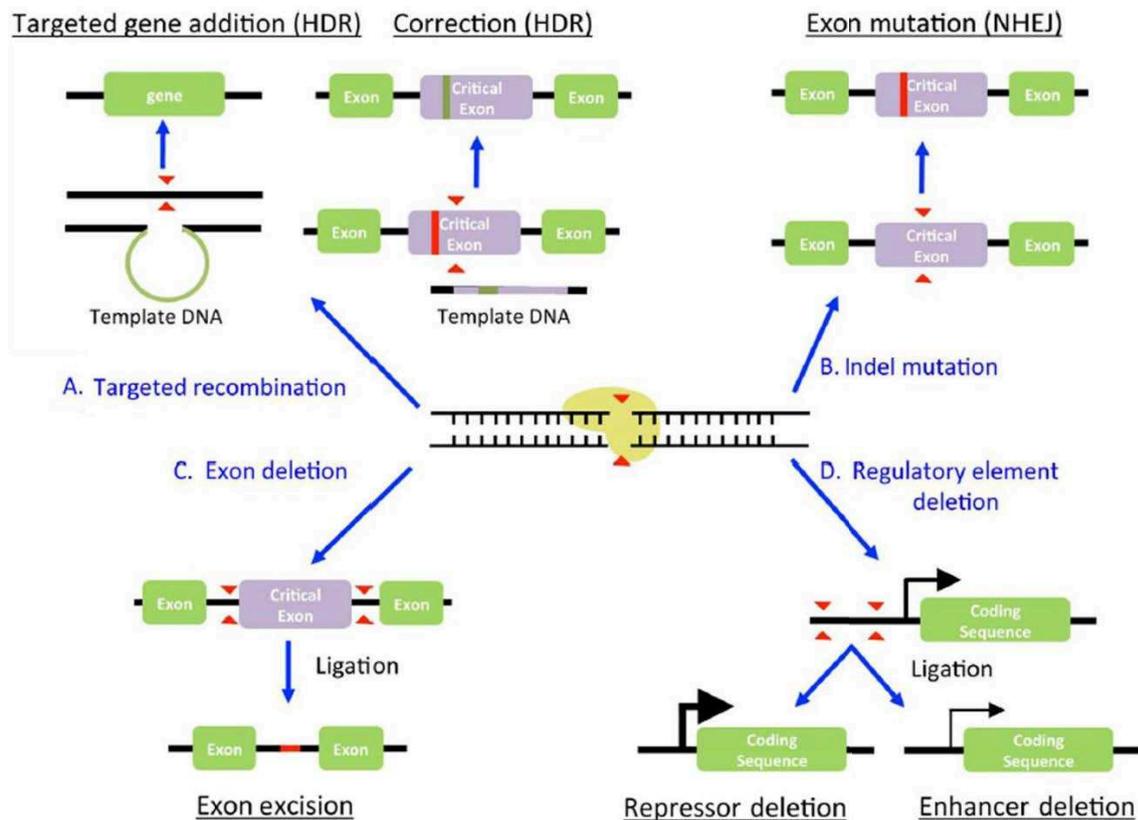
#### A. Pour la compréhension des relations entre génotype et phénotype

Un caractère phénotypique particulier n'est que très rarement la résultante de l'expression d'un gène unique mais plutôt de processus complexes impliquant plusieurs gènes, le microenvironnement cellulaire voire des conditions physico-chimiques particulières<sup>391</sup>. Par exemple, la pigmentation brune des cheveux ne dépend pas uniquement de la présence et de l'expression du gène codant pour les enzymes synthétisant le pigment en question mais également de la présence d'autres cellules produisant les substrats de cette enzyme (dans ce cas, la tyrosine pour synthétiser la mélanine) et cette couleur est susceptible de varier suivant la quantité de rayons solaires reçue sur les cheveux<sup>392</sup>. Néanmoins, la composante génétique reste une part non négligeable et il semble tout de même indispensable de savoir quel gène code pour quelle protéine pour pouvoir ensuite appréhender la totalité des mécanismes mis en jeu dans l'établissement d'un caractère phénotypique.

Pour comprendre les effets d'un gène codant pour une protéine de fonction inconnue sur le phénotype, il est donc nécessaire de pouvoir réaliser des études d'inactivation de ce gène ("knock-out" ou KO) dans des lignées cellulaires *in vitro* ou par la création d'animaux modèles. Pour cela, il est possible d'utiliser une technique basée sur la recombinaison homologue de l'ADN (HDR ou Homology Directed-Repair) qui permet l'échange de fragments d'ADN entre des doubles brins possédant des séquences identiques. La première souris KO a ainsi été créée par cette technique en 1987 soit par l'insertion du gène de résistance à la néomycine dans le gène codant pour l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (*hprt*) soit par le remplacement d'une partie de ce gène par le gène de résistance dans des cellules souches murines réinjectées après sélection dans le blastocyte, lui-même réimplanté dans une souris pour donner naissance à une souris transgénique *hprt*<sup>-/-</sup><sup>393</sup>. Pour cela, les auteurs de l'étude avaient désigné des vecteurs portant la séquence du gène de résistance à la néomycine flanquée par des séquences d'ADN homologues au site d'insertion désiré dans le gène *hprt*. Cependant, la fréquence des événements de recombinaison homologue dans les cellules est très faible, de l'ordre de 0.1% dans cette étude et jusqu'à 1 pour un million voire 1 pour dix millions chez les eucaryotes supérieurs rendant cette approche laborieuse en temps et en processus de sélection.

Pour réprimer ou inactiver totalement un gène, il est également possible d'utiliser la technologie qui s'appuie sur l'interférence par ARN. Dans ce cas, l'ARN interférent est complémentaire de l'ARNm du gène à réprimer et va induire sa dégradation et de ce fait, la diminution voire l'abolition de la traduction de la protéine codée par cet ARNm rendant ainsi le gène "silencieux" et permettant d'étudier les conséquences de cette inactivation sur le phénotype<sup>394</sup>. Néanmoins, le KO généré par ces ARN interférents est temporaire et de plus, il est souvent incomplet (traduction d'une quantité détectable de protéine fonctionnelle)<sup>395</sup>, non

spécifique (présence d'effets hors-cible, c'est-à-dire inactivation d'autres ARNm que celui ciblé)<sup>396</sup> et variant entre les expériences et les laboratoires en termes de pourcentage d'inhibition.



**Figure 36.** Les différentes possibilités permises par l'édition du génome<sup>397</sup>

Après coupure double brin de l'ADN (triangles rouges) induite de manière ciblée par une nucléase (jaune), il est possible (A) d'introduire un gène ou de remplacer une séquence existante en introduisant ou corrigeant une mutation via l'HDR, (B) d'introduire des indels en laissant l'ADN se réparer par NHEJ provoquant le KO du gène ciblé. Dans les cas de 2 coupures proches, il est possible (C) d'éliminer totalement un exon ou (D) une séquence régulatrice pour étudier les effets de ces délétions sur la protéine codée.

Les techniques d'édition du génome, c'est-à-dire la modification (insertion, délétion ou remplacement) du génome à un locus précis et prédéterminé, représentent donc une alternative prometteuse en remplacement de celles précédemment citées. Pour ce faire, ces techniques se basent sur la reconnaissance, soit par une protéine soit par un ARN, de la séquence d'ADN à éditer suivie par la coupure double brin de cette séquence par des nucléases, enzymes de restriction communément appelées "ciseaux moléculaires". Cette coupure double brin active les deux mécanismes de réparation de l'ADN. Elle induit tout d'abord une augmentation de l'efficacité de l'HDR (d'au moins 2 ordres de grandeur)<sup>398</sup> et provoque également la jonction d'extrémités non homologues ou NHEJ (Non-Homologous End-Joining). En introduisant dans la cellule une séquence d'ADN flanquée de séquences homologues au site de coupure, il est alors possible d'insérer un nouveau gène à cet endroit précis du génome (on parle alors de "knock-in" ou KI) ou de remplacer un gène existant pour amener ou réparer une mutation sur la séquence endogène par HDR (**Figure 36A**). La NHEJ quant à elle est un mécanisme non conservatif qui assure simplement la continuité de l'ADN

endommagé et non la restauration de la séquence initiale. Ainsi, ce mécanisme est souvent source d'erreurs et entraîne très fréquemment des mutations, le plus souvent des insertions ou des délétions ou "indels", décalant le cadre de lecture du gène et aboutissant à une protéine tronquée (si apparition d'un codon STOP) ou non fonctionnelle (mal repliée) et donc à un KO du gène<sup>399</sup> (**Figure 36B**). Pour des études plus fines sur la régulation d'un gène particulier ou l'effet de la délétion d'un exon sur la protéine finale, il est également possible d'imaginer deux coupures ciblées à des locus proches dans le génome afin de supprimer ledit exon (**Figure 36C**) ou les sites de régulation situés dans le promoteur du gène afin d'augmenter ou de diminuer son expression (**Figure 36D**).

## B. Pour le traitement des maladies héréditaires

A l'heure actuelle, plus de 3000 gènes ont été identifiés en lien avec une maladie monogénique et ce nombre devrait doubler d'ici la fin de la décennie<sup>400</sup>. Néanmoins, malgré les progrès incessants dans l'étude du génome et le développement de médicaments, des thérapies innovantes et efficaces restent toujours à mettre au point pour guérir nombre de patients, à peine 5% des maladies rares disposant aujourd'hui d'un traitement curatif. Les approches chirurgicales étant très souvent impossibles, restreintes ou inefficaces dans le cas de maladies monogéniques, la majorité des traitements disponibles vise donc à diminuer les symptômes de la maladie par la prise de petites molécules ou de protéines recombinantes. Par exemple, dans le cadre de la mucoviscidose, des petites molécules comme l'ivacaftor ciblent la protéine déficiente (en l'occurrence le canal chlorure cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)) et améliorent ainsi la fonctionnalité pulmonaire chez environ la moitié des patients<sup>401</sup>. Les protéines recombinantes quant à elles ne peuvent traverser les membranes plasmiques, elles sont donc utiles en thérapie de remplacement pour des maladies où la protéine manquante ou déficiente est sécrétée dans le milieu extracellulaire. C'est par exemple le cas pour les hémophilies A et B où les facteurs de coagulation recombinants VIII et IX respectivement injectés dans la circulation sanguine viennent pallier la non synthèse du facteur endogène dans le but d'éviter d'éventuelles hémorragies<sup>402</sup>. Cependant, l'utilisation d'une telle technique reste limitée à un très faible nombre de maladies génétiques et il est donc nécessaire de trouver des alternatives pour traiter les autres maladies.

Dans le même temps, avec l'essor de la vectorologie, le concept de thérapie génique s'est rapidement imposé dans le but de soigner les maladies génétiques. Cette technique consiste à insérer directement et de manière permanente du matériel génétique dans le génome des cellules soit pour remplacer un gène muté par une copie saine de celui-ci, soit pour inactiver un gène muté qui ne fonctionne pas correctement ou soit pour introduire un nouveau gène dans l'organisme. Bien que théorisée dès les années 1950, les premiers succès de cette technique ne sont arrivés qu'un demi-siècle plus tard. En 1999, l'équipe d'Alain Fischer, basée à l'hôpital Necker de Paris, a traité par thérapie génique des bébés atteints de déficit immunitaire combiné sévère (syndrome du bébé bulle : absence de lymphocytes T et natural killer et non fonctionnalité des lymphocytes B) par transduction rétrovirale (oncovirus murins) *ex vivo* du gène sain dans les cellules souches hématopoïétiques des patients avant leur réimplantation dans la moelle épinière<sup>403</sup>. Quelques semaines après l'étude, 9 des 11

patients greffés ont pu rentrer chez eux et mener une vie normale, preuve de l'efficacité de la thérapie réalisée.

Néanmoins, ce succès est à tempérer car trois ans après la greffe, deux des enfants ont développé une leucémie liée à la dérégulation d'un protooncogène causée par l'insertion du vecteur thérapeutique non loin du promoteur de celui-ci<sup>404</sup>. L'insertion de matériel génétique par le biais de vecteurs viraux reste donc sujette à caution car elle aboutit à une insertion aléatoire du transgène dans le génome qui peut entraîner des risques de mutagenèse insertionnelle, d'inactivation d'un gène endogène si l'introduction se fait dans celui-ci, de perturbation de la régulation des gènes autour du site d'insertion (activation possible d'oncogènes ou répression de gènes suppresseurs de tumeurs si insertion proche d'un promoteur par exemple) ou encore d'extinction du transgène<sup>405</sup>. D'autres vecteurs non intégratifs, comme les vecteurs basés sur les virus associés aux adénovirus (AAV), ont alors été mis en avant pour remplacer les précédents. Néanmoins, ils possèdent eux aussi quelques inconvénients : leur expression épisodale entraîne la dilution du transgène, et donc de l'effet thérapeutique, dans le cas de cellules en division ou d'organes en croissance<sup>406</sup> (si l'on traite des enfants par exemple) ; le transgène encapsulé dans un tel vecteur ne peut excéder cinq kilobases en taille ce qui limite le nombre de gènes candidats<sup>407</sup> ; l'organisme possède une immunité pré-existante contre les AAV avec notamment l'expression d'anticorps anti-protéines de capsid<sup>408</sup>. Malgré ces restrictions, un premier médicament de thérapie génique basé sur les AAV, le Glybera®, a reçu une autorisation de mise sur le marché par l'Union Européenne en 2012. Ce médicament soigne le déficit en lipoprotéine lipase, affection pancréatique rare touchant une personne sur un million, et ouvre donc la porte à cette nouvelle forme de traitement.

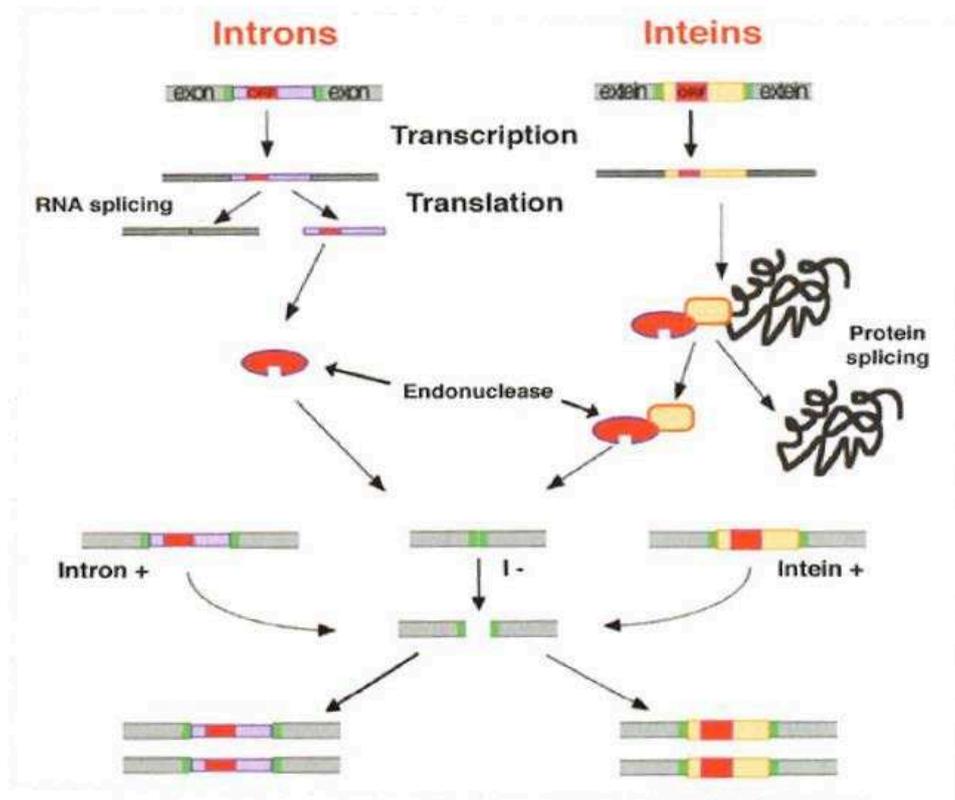
Dans ce cadre, les techniques d'édition du génome, et notamment celles basées sur l'HDR pour remplacer un gène muté par un gène sain (si la protéine codée est délétère) ou directement ajouter le gène sain dans le génome (**Figure 36A**), représentent un espoir certain à condition de lever certaines barrières qui seront discutées plus loin dans ce chapitre. Il existe actuellement quatre grands outils permettant de réaliser des coupures double brin ciblées dans le génome : les méganucléases (MNs), les nucléases à doigt de zinc (ZFNs ou Zinc-Finger Nucleases), les nucléases effectrices de type activateur de transcription (TALENs ou Transcription Activator-Like Effector Nucleases) et enfin, les courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées (CRISPR ou Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats).

## II. Les différents systèmes d'édition du génome existants

### A. Les méganucléases

Les méganucléases, ou endonucléases de homing, sont considérées comme les enzymes de restriction les plus spécifiques existantes car elles reconnaissent une séquence d'ADN de grande taille, allant de quatorze à quarante-quatre paires de bases<sup>409</sup>. Il est donc fortement improbable que la séquence ciblée soit présente à plus d'une seule reprise dans un

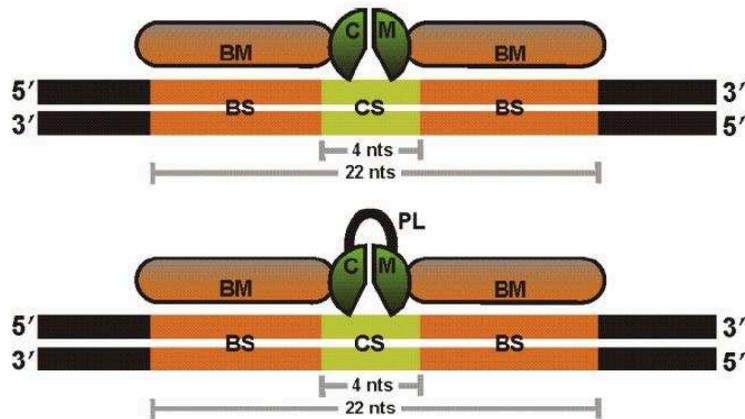
génomique. Découvertes dans les années 1980<sup>410</sup>, ces protéines sont retrouvées dans de nombreux organismes (bactéries, phages, levures, champignons et certaines plantes) et sont codées par des gènes localisés dans des éléments génétiques mobiles, principalement des introns de groupe I et II et des intéines<sup>411</sup>. Elles promeuvent ainsi leur mobilité en plus de celle de l'élément génétique au sein duquel elles se trouvent (**Figure 37**).



**Figure 37.** Mode d'action naturel des méganucléases<sup>412</sup>

Les méganucléases sont situées au sein d'introns ou d'intéines. Dans le cas des introns, après transcription de l'ADN, l'ARNm est épissé puis l'endonucléase de homing est traduite. Elle reconnaît et se fixe ensuite sur une séquence d'ADN particulière où elle va réaliser une cassure double brin. L'intron possédant l'allèle codant pour la méganucléase sert par la suite de base pour la réparation par recombinaison homologue. Dans le cas des intéines, la méganucléase est épissée après traduction mais le processus de coupure/recombinaison est exactement le même.

Il existe quatre grandes familles de méganucléases, qui ne sont pas toutes retrouvées dans les mêmes organismes et qui sont nommées par rapport à une séquence d'acides aminés conservée entre chaque membre de la famille : LAGLIDADG, H-N-H, His-Cys box et GIY-YIG<sup>412</sup>. La famille LAGLIDADG est la plus représentée parmi les organismes précédents et deux des méganucléases les plus utilisées dans le cadre de l'édition du génome, I-SceI (découverte dans des mitochondries de la levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae*)<sup>413</sup> et I-CreI (provenant des chloroplastes de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*)<sup>414</sup>, en sont issues. Pour réaliser la coupure double brin de l'ADN, ces enzymes se présentent soit sous forme d'homodimères (I-CreI) comportant chacun un domaine LAGLIDADG ou de monomères comportant deux domaines LAGLIDADG reliés entre eux par une liaison peptidique (I-SceI). Ces domaines sont impliqués dans la coupure et sont donc situés de part et d'autre du site de clivage double brin (**Figure 38**).



**Figure 38.** Mode d'action des méganucléases LAGLIDADG dans le cadre de l'édition du génome<sup>415</sup>

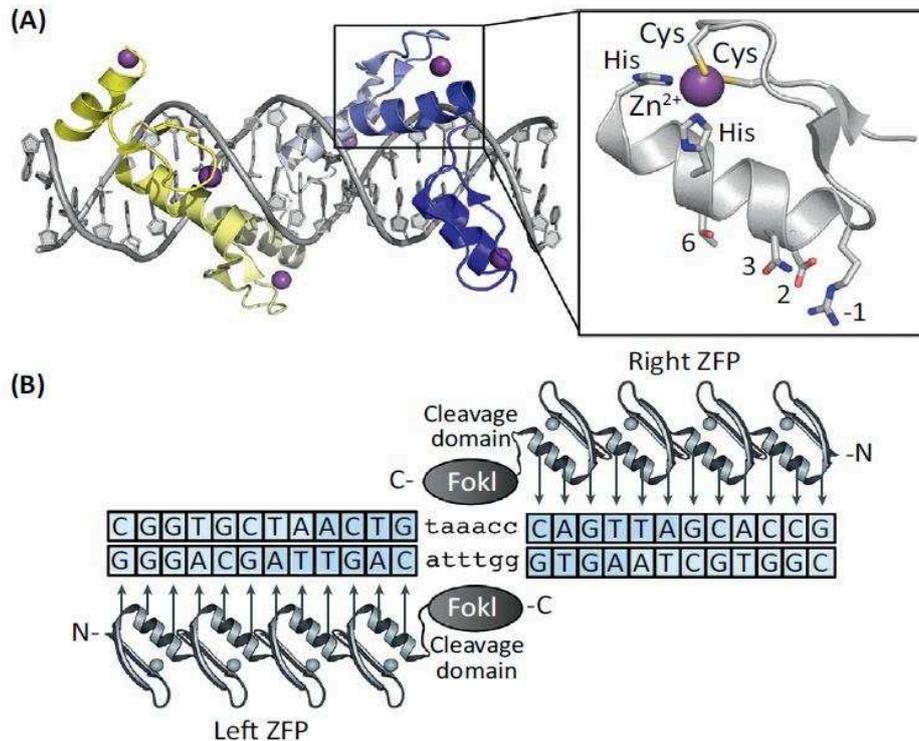
La méganucléase agit sous forme d'homodimères (panel du haut) ou de monomères (panel du bas) composés respectivement d'un ou de deux domaines LAGLIDADG, impliqués dans la coupure de la séquence d'ADN. Les sites de reconnaissances sont relativement longs (généralement supérieurs à 20 nucléotides) rendant ces enzymes très spécifiques de la séquence ciblée. BM : module de liaison à l'ADN, BS : séquence d'ADN cible, CM : Module de clivage de l'ADN, CS : site de coupure, PL : liaison peptidique.

## B. Les nucléases à doigt de zinc

Les protéines à doigt de zinc constituent la classe de facteurs de transcription la plus abondante dans les eucaryotes supérieurs. La famille la plus étudiée de ces protéines contient un domaine spécifique, appelé Cys<sub>2</sub>–His<sub>2</sub>, composé d'un motif commun comprenant 2 cystéines puis 2 histidines et qui représente l'un des domaines de liaison à l'ADN les plus couramment encodés par le génome humain<sup>416</sup>. La cristallisation d'une protéine particulière de cette famille, ZIF268, a permis de mieux appréhender les mécanismes régissant la liaison de ce type de protéine sur l'ADN : en présence d'un atome de zinc, les trente acides aminés la constituant adoptent une conformation particulière composée de deux feuilletts  $\beta$  et d'une hélice  $\alpha$ . Cette dernière permet de reconnaître trois paires de bases présentes sur l'ADN (**Figure 39A**)<sup>417</sup>. Il a par la suite été montré que ces protéines peuvent être fusionnées à d'autres protéines de la même famille, qui reconnaissent d'autres triplets de nucléotides, afin d'étendre la séquence d'ADN à reconnaître et par la même occasion, la spécificité de la protéine artificielle ainsi créée<sup>418</sup>.

La technologie des nucléases à doigt de zinc (ZFNs) a été rendue possible par la découverte de l'indépendance fonctionnelle entre le domaine de liaison à l'ADN et le domaine catalytique de l'enzyme de restriction FokI<sup>419</sup>. Ainsi, en remplaçant le domaine de liaison à l'ADN de cette protéine par un domaine de liaison de type zinc finger, il est donc devenu possible de générer de nouvelles nucléases avec de nouvelles spécificités de liaison<sup>420</sup>. L'activité nucléase de FokI, bien que non spécifique, fonctionne de manière dimérique ; il est donc nécessaire de recourir à deux ZFNs liant les deux brins d'ADN de manière symétrique et anti-parallèle au site de coupure double brin souhaité<sup>421</sup>. Généralement, chaque ZFNs est constitué de trois à quatre domaines zinc finger fusionnés ce qui représente une liaison sur

neuf à douze paires de bases sur chaque brin d'ADN, soit dix-huit à vingt-quatre paires de bases au total (**Figure 39B**).



**Figure 39.** Structure des protéines à doigt de zinc et des ZFNs<sup>422</sup>

(A) Quatre protéines à doigts de zinc (jaune et bleu) liées à l'ADN (gris). Les résidus Cys et Hys lient l'ion zinc pour conformer la protéine en deux feuillets  $\beta$  et une hélice  $\alpha$  (insert). Les résidus de l'hélice lient 3 paires de bases de l'ADN sont indiqués.

(B) Dimères de ZFNs liant l'ADN. Les sites de liaisons des deux dimères sont séparés de cinq à sept paires de bases reconnues par le domaine de clivage de l'enzyme de restriction FokI.

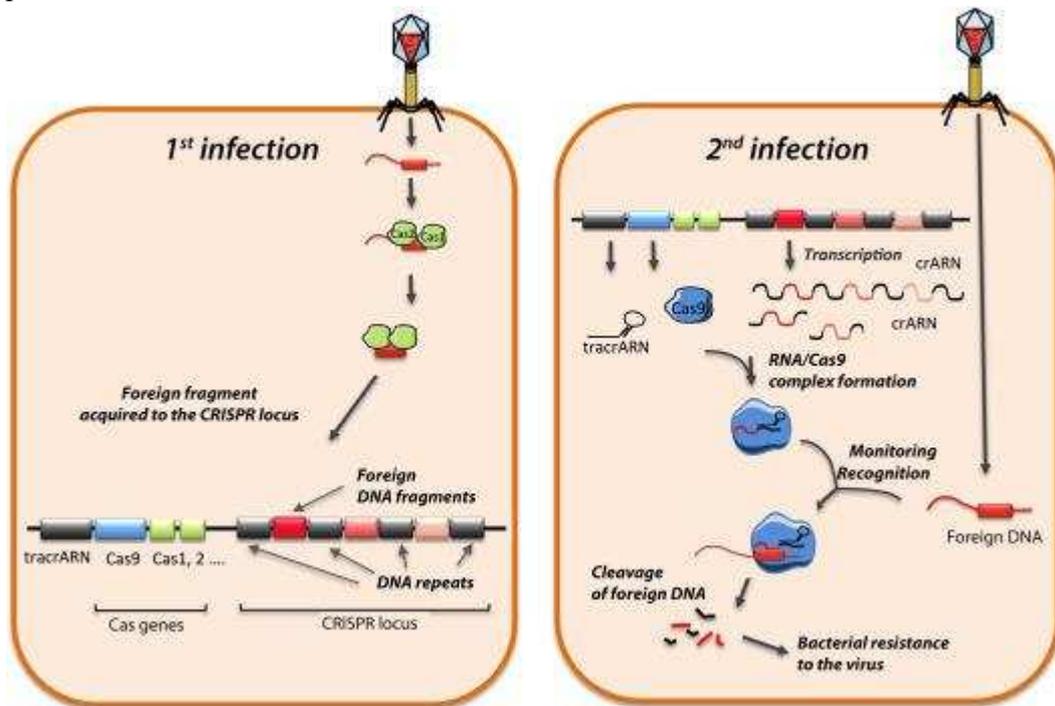
### C. Les nucléases effectrices de type activateur de transcription

Découvertes en 2009, les Transcription Activator-like effector (TALE) sont des protéines naturelles présentes au sein d'une bactérie affectant les plantes, *Xanthomonas*<sup>423</sup>. Elles sont constituées de répétitions d'une série de 33 à 35 acides aminés qui reconnaissent chacune une paire de bases particulière<sup>424</sup>. Cette spécificité est déterminée par deux acides aminés hypervariables situés en position 12 et 13 de chaque répétition, les séquences asparagine-asparagine (NN), asparagine-isoleucine (NI), histidine-acide aspartique (HD) et asparagine-glycine (NG) reconnaissant respectivement une guanine, une adénine, une cytosine et une thymine<sup>423</sup>. Chaque TALE est constituée de deux hélices  $\alpha$  connectées par une boucle où sont présents les deux résidus hypervariables (**Figure 40A**). De la même façon que pour les protéines à doigt de zinc, les TALE peuvent être liées ensemble pour reconnaître une plus longue séquence d'ADN<sup>425</sup>.

Grâce à l'expérience acquise par les deux décennies de travaux sur les ZFNs, la découverte des TALE a rapidement été suivie par l'ingénierie des TALENs comme outil d'édition du génome en fusionnant une nouvelle fois le domaine catalytique de l'enzyme de



hôte de ces séquences "espaceurs" a pu être mise en évidence et leur mécanisme d'acquisition décortiqué<sup>431</sup>.



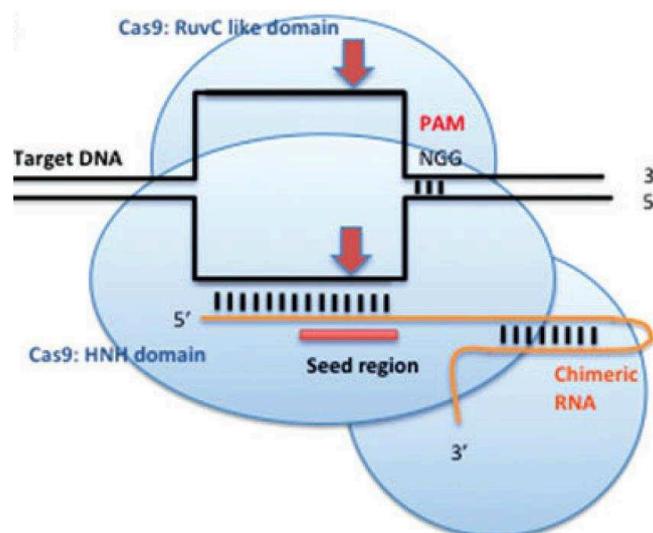
**Figure 41.** Immunité adaptative bactérienne : le système CRISPR<sup>432</sup>

Lors de la première infection, l'ADN phagique est clivé puis introduit dans le génome bactérien au locus CRISPR entre deux séquences répétées (panel de gauche). Lors de la seconde infection, cet ADN intégré est transcrit en ARN qui, une fois mûr, se complexe avec un autre ARN et une endonucléase, la Cas9. Ce complexe reconnaît alors par complémentarité l'ADN du phage infectant et le dégrade via son activité nucléase, conférant ainsi une résistance à la bactérie (panel de droite).

Les CRISPR jouent en réalité un rôle clé dans l'immunité adaptative des bactéries et notamment dans la résistance aux phages. Celui-ci a été mis en lumière chez la bactérie *Streptococcus pyogenes*<sup>433</sup> dont le système CRISPR est qualifié de type II. Il est à noter qu'il existe deux autres systèmes, de type I et de type III, fonctionnant de manière légèrement différente mais ayant toujours le même but. Les systèmes de type II étant les plus étudiés et les plus utilisés, ils seront les seuls à être détaillés dans ce manuscrit. Lors de l'infection par un phage, la bactérie synthétise des nucléases encodées par des gènes de la famille des gènes CRISPR-associés (cas) dont les locus sont proches des locus CRISPR. Ces nucléases sont capables de reconnaître des séquences précises de l'ADN du phage, appelées les motifs protospacer-adjacent (PAM) puis de les cliver<sup>434</sup>. Il en résulte des fragments d'ADN phagique de petites tailles (vingt paires de bases environ) qui vont être intégrés au sein des locus CRISPR (**Figure 41**). Ainsi, lors d'une nouvelle infection par ce même phage, la bactérie va transcrire la séquence préalablement intégrée dans son génome sous forme d'ARN pré-CRISPR (ou pré-crRNA) qui va ensuite être processé pour donner l'ARN CRISPR (ou crRNA) spécifique de la séquence cible. De ce locus est également transcrit un ARN CRISPR trans-activateur (ou tracrRNA) qui contribue à la maturation du pré-crRNA en crRNA et une endonucléase particulière, la Cas9. Le crRNA va alors agir de la même manière qu'un ARN interférent chez les eucaryotes en allant se fixer sur son ADN cible et ainsi induire la

dégradation de l'ADN du phage par le recrutement de la Cas9 médié par le complexe entre le crRNA et le tracrRNA (**Figure 41**).

Ce système a très vite montré sa fonctionnalité dans le cadre de l'édition de génomes eucaryotes, comme celui des primates non humains<sup>435</sup> ou humains<sup>436,437</sup>. Il a de plus été simplifié en 2012 quand l'équipe de Jennifer Doudna et Emmanuelle Charpentier a réussi à montrer qu'un ARN chimérique, fusion entre le crRNA et le tracrRNA et dénommé "single guide RNA" (sgRNA), était capable de recruter la Cas9 pour induire une coupure double brin au site ciblé avec la même efficacité que lors de l'utilisation d'un duplex crRNA-tracrRNA<sup>438</sup>. Dans ce nouveau système, le complexe sgRNA/Cas9 parcourt le génome jusqu'à trouver une séquence complémentaire du sgRNA (basé sur l'appariement des paires de bases établi par Watson et Crick). Après la reconnaissance de la séquence cible et la création d'un hétéroduplex ADN-ARN, la Cas9 change de conformation et fait intervenir ses deux domaines nucléases (RuvC et HNH), chacun coupant un des deux brins d'ADN environ 3 nucléotides avant le PAM<sup>439</sup> (**Figure 42**). La limitation principale de ce système réside dans la nécessité d'une séquence PAM, reconnue par la Cas9 et nécessaire pour induire le clivage, non loin de la séquence à cliver. Néanmoins, la séquence du PAM reconnue par la Cas9 de *Streptococcus pyogenes* est NGG<sup>434</sup> (où N désigne une base azotée, peu importe laquelle). Cette dernière est très fréquente puisqu'elle est statistiquement présente environ une fois toutes les huit paires de bases, ce qui laisse un choix confortable pour le design du sgRNA. De plus, il existe d'autres Cas9 provenant d'autres bactéries qui reconnaissent des séquences différentes permettant ainsi d'augmenter le nombre de sites reconnus et par la même occasion, le nombre de zones clivables.



**Figure 42.** Le système CRISPR/Cas9 pour l'édition du génome<sup>422</sup>

Ce système est constitué d'un ARN chimérique ou single guide RNA (sgRNA), fusion des ARN crRNA et tracrRNA trouvés dans le système naturel bactérien, capable de reconnaître la séquence d'ADN cible, et d'une endonucléase, la Cas9, qui va cliver l'ADN de manière double brin environ trois nucléotides avant un motif qu'elle reconnaît, le motif protospacer adjacent.

L'ensemble des points discutés dans cette partie et la suivante est résumé dans le **Tableau 3**.

**Tableau 3.** Comparaison des différents systèmes d'édition du génome

Outil	Méganucléases	ZFNs	TALENs	CRISPR
Source <sup>411,416,423,430</sup>	Bactéries, Phages	Eucaryotes	Bactéries ( <i>Xanthomonas</i> )	Bactéries ( <i>Streptococcus</i> )
Nombre de composants <sup>440</sup>	1	2	2	2
Type de reconnaissance	Protéine - ADN	Protéine - ADN	Protéine - ADN	ARN - ADN
Taille de la séquence cible (pb) <sup>440</sup>	14 - 44	18 - 36	24 - 40	17 - 23
Nécessité de dimérisation <sup>421</sup>	Non	Oui	Oui	Non
Facilité de conception <sup>441</sup>	Difficile	Difficile	Modéré	Facile
Spécificité <sup>442</sup>	Elevée	Faible à modérée	Modérée	Faible à modérée
Coût de fabrication <sup>442</sup>	~ 4000 €	4000 à 8000 €	Moins de 1000 €	Moins de 100 €
Possibilité de délivrance dans un vecteur AAV <sup>442</sup>	Oui	Oui	Difficile du fait de leur grande taille	Difficile du fait de la grande taille de la Cas9
Première utilisation sur des cellules humaines <sup>440</sup>	1994	2003	2011	2013
Contraintes d'utilisation <sup>441</sup>	Le répertoire des séquences cibles ne couvrent pas tout le génome	Les séquences riches en guanosine sont difficiles à cibler	La première base reconnue doit être une thymine	La séquence PAM doit suivre le site de reconnaissance

### III. Avantages et inconvénients des différents systèmes

#### A. Facilité de design

Les méganucléases naturelles reconnaissent une séquence cible bien précise qui, au vu de sa taille, n'est *a priori* présente qu'en un seul exemplaire dans le génome. Pour l'édition du génome, il convient néanmoins de pouvoir cibler à sa guise la séquence souhaitée. Bien qu'il existe plusieurs centaines de méganucléases identifiées<sup>409</sup>, le répertoire de cibles reste cependant assez restreint et la probabilité de trouver une méganucléase qui coupe un gène donné à l'endroit voulu est extrêmement mince. Pour pouvoir utiliser pleinement le potentiel de cet outil, il a donc fallu créer des nucléases "à façon". Pour cela, deux types d'approches qui peuvent également être combinées ont été utilisées. Dans la première, l'introduction de variations au sein de la chaîne d'acides aminés suivie de la sélection des protéines fonctionnelles grâce à des mutants du site de reconnaissance naturel a permis la modification de la spécificité des méganucléases existantes<sup>443</sup>. Dans la seconde, l'association ou la fusion de deux monomères issus d'enzymes différentes a permis la génération de méganucléases chimériques dont le site de reconnaissance est désormais la combinaison des deux moitiés des sites de reconnaissance reconnus par les monomères<sup>444</sup>.

De la même façon que pour les méganucléases, les ZFNs et les TALENs sont basées sur la reconnaissance d'une séquence d'ADN par une protéine mais également sur l'assemblage de plusieurs de ces protéines pour cibler une plus grande séquence et augmenter ainsi la spécificité de ces outils d'édition génomique. Or, l'ingénierie des protéines se liant à l'ADN est un domaine extrêmement complexe et la génération de nouvelles ZFNs ou TALENs s'avère en réalité longue (des mois pour les ZFNs et des semaines pour les TALENs). En effet, les ZFNs néo-générées perdent souvent leur activité de ciblage de l'ADN<sup>445</sup> ou peuvent devenir cytotoxiques en allant cibler d'autres séquences imprévues<sup>446</sup>. De même pour les TALENs où il convient d'associer entre eux non plus trois à quatre domaines de liaison à l'ADN mais vingt qui plus est, hautement homologues et ayant donc la possibilité de se recombiner entre eux dans les cellules<sup>447</sup>. Il est ainsi nécessaire d'utiliser des méthodes particulières, comme les systèmes de clonage Golden Gate<sup>448</sup> ou l'assemblage en phase solide<sup>449</sup>. Ces trois systèmes sont donc relativement contraignants et coûteux à produire.

*A contrario*, les CRISPR étant basés sur une reconnaissance de l'ADN cible par un ARN, il devient très simple d'en générer de nouveaux. En utilisant la technologie développée par Emmanuelle Charpentier et Jennifer Doudna, il suffit désormais de cloner un plasmide contenant les vingt paires de bases complémentaires de la séquence d'intérêt dans un vecteur qui code pour le sgRNA<sup>450</sup>. Il n'y a de plus pas d'ingénierie de protéines à réaliser avec cette méthode car dans tous les cas, la Cas9 reste la même. Cet outil représente donc une avancée considérable dans le domaine de l'édition génomique par sa facilité de design et son faible coût.

## B. Mode de délivrance

Il existe différentes méthodes afin de délivrer les outils d'édition du génome qui se présentent sous formes d'ADN, d'ARN ou de protéines et éventuellement les séquences à intégrer par HDR dans le cas d'un KI de gène. Elles sont généralement classées en deux catégories : les méthodes basées sur les vecteurs viraux non intégratifs (lentivirus intégration-déficient, adénovirus ou vecteurs AAV) et les méthodes qui n'y sont pas basées (lipofection, électroporation, délivrance par nanoparticules, microinjection). Selon l'application désirée et l'outil d'édition du génome à disposition, il convient donc de choisir la méthode la plus adaptée. Des techniques comme l'électroporation ne peuvent par exemple pas être réalisées *in vivo* et sont réservées à des applications *in vitro* (sur des lignées cellulaires) ou *ex vivo* (les cellules primaires du patient comme les cellules souches hématopoïétiques sont récupérées, éditées puis transplantées à nouveau dans le patient<sup>451</sup>).

Concernant les approches non virales, il ne semble pas y avoir de problèmes à les coupler à l'un des quatre des systèmes d'édition génomique présentés dans ce manuscrit. En revanche, pour les approches virales, la quantité maximale d'ADN que peut empaqueter chaque vecteur est limitée. Ainsi, les vecteurs lentiviraux et adénoviraux ont une capacité d'empaquetage d'au moins huit kilobases, ce qui est suffisant quel que soit l'outil d'édition génomique choisi. Mais les vecteurs basés sur les AAV représentent une attractivité supplémentaire car leur tropisme est plus large que celui des vecteurs adénoviraux et ils sont utilisables *in vivo* contrairement aux vecteurs dérivés des lentivirus<sup>452</sup>. Néanmoins, les vecteurs basés sur les AAV peuvent contenir moins de cinq kilobases de matériel génétique. Si cela ne pose aucun problème pour les méganucléases et les ZFNs<sup>453</sup> qui mesurent respectivement un et deux kilobases, il n'en va pas de même pour les TALENs, qui requièrent deux monomères de plus de quatre kilobases de taille, ni pour les CRISPR où la Cas9 de *Streptococcus pyogenes* mesure environ 4,2 kilobases. Ce problème n'a pour le moment pas trouvé de solution pour l'utilisation des TALENs. Par contre, pour les CRISPR, il est possible d'utiliser d'autres Cas9 comme celle issue de *Staphylococcus aureus* qui ne mesure que 3,1 kilobases permettant ainsi de réduire la taille du matériel génétique à empaqueter<sup>454</sup>.

## C. Spécificité

L'un des points les plus importants à vérifier lors de l'utilisation des outils d'édition du génome est la présence de clivages double brin au niveau de sites non ciblés qui pourraient induire des effets indésirables comme une activation ou une répression non souhaitée de certains gènes ou des réarrangements chromosomiques et donc à terme, une génotoxicité. En théorie, une séquence constituée de seize acides aminés consécutifs est unique dans le génome humain car sa complexité ( $4^{16} = 4,3 \times 10^9$ ) est plus grande que la taille du génome humain ( $\sim 3,2 \times 10^9$  paires de bases). Ainsi, si les séquences de reconnaissance des différents systèmes d'édition génomique ciblent *a minima* seize paires de bases, il devrait *a priori* ne pas y avoir d'effets hors-cible. En réalité pourtant, même avec un domaine de liaison à l'ADN qui reconnaît un nombre de paire de bases plus important, ces systèmes peuvent induire de tels effets<sup>455–457</sup>. La seule exception semble être les méganucléases LAGLIDADG où il a été

montré que la majorité des acides aminés constituant le site de liaison à l'ADN était spécifique du nucléotide reconnu et n'admettait pas d'autre appariement<sup>458</sup>. Ainsi, cette famille d'outil est réputée pour être la plus spécifique car elle n'induit quasiment aucun effet hors-cible. Néanmoins, du fait du faible nombre de séquences reconnues pour le moment, leur utilisation reste assez marginale.

Comme déjà évoqué précédemment, la spécificité des ZFNs peut être modulée en modifiant le nombre de domaines zinc finger. Ainsi, plus la nucléase en compte, plus la séquence d'ADN reconnue est longue et plus sa spécificité est importante. Néanmoins, il a été montré que les ZFNs qui possédaient le plus de domaines de liaison à l'ADN induisaient également de nombreux effets hors-cible, suggérant une interaction entre une partie seulement du domaine de liaison et l'ADN<sup>455</sup>. La modification des propriétés de dimérisation du domaine de clivage FokI, réduisant notamment les phénomènes d'homodimérisation<sup>459</sup>, ont tout de même permis de réduire ces effets et d'augmenter considérablement la spécificité des ZFNs. Les TALENs, quant à elles, sont peu cytotoxiques en comparaison des ZFNs, ce qui sous-entend une meilleure spécificité et moins d'effets hors-cible<sup>456</sup>. Ceci est probablement dû à la reconnaissance d'une plus longue séquence d'ADN par chaque monomère que pour les autres systèmes. Néanmoins, elles sont très sensibles aux changements épigénétiques, notamment la méthylation : elles sont par exemple capables de cibler le promoteur OCT4 quand il est activé dans les ESC mais pas quand il est éteint dans les cellules souches neurales qui dérivent de ces ESC<sup>460</sup>.

S'agissant des CRISPR, là encore, de nombreuses études ont rapporté des effets hors-cible non négligeables. En effet, certains d'entre eux ont été rapportés sur des séquences variant de cinq nucléotides par rapport à la séquence cible<sup>457</sup>. Ces séquences sont toujours suivies du PAM et il a été remarqué que les nucléotides les plus proches de ce motif étaient moins fréquemment sujets à une erreur d'appariement *a contrario* des nucléotides plus éloignés<sup>457,461</sup>. Ces mésappariements peuvent s'expliquer par la nécessité qu'a le système bactérien d'origine à se prémunir contre la variabilité des ADN phagiques infectants mais ils posent de nombreux problèmes dans le cadre de l'édition du génome. Des efforts considérables ont donc été réalisés dans le but d'augmenter la spécificité de ce système. Pour cela, en s'inspirant des ZFNs et des TALENs, des mutations ont été introduites dans chacun des domaines catalytiques de la Cas9 afin de générer des nickases qui ne coupent qu'un seul des deux brins d'ADN<sup>462</sup>. Ainsi, en amenant deux sgrNA, chacun couplé avec une Cas9-nickase, au niveau du site de coupure souhaité, la séquence reconnue, donc la spécificité, est plus grande et le risque de coupure double brin à un autre endroit du génome est drastiquement réduit (jusqu'à 1500 fois selon la lignée cellulaire utilisée). De plus, il a également été montré que la mutation de certains acides aminés de la Cas9 augmentait la spécificité du système<sup>463</sup>. Enfin, il est aussi possible de travailler sur le sgrNA pour diminuer la possibilité d'effets hors-cible. En effet, l'utilisation d'un sgrNA tronqué (passant de vingt à dix-sept nucléotides) augmente également la spécificité du système<sup>464</sup>.

Quelle que soit la technologie utilisée, il reste difficile de déterminer la totalité du spectre des effets hors-cible dans un génome aussi complexe que celui de l'Homme. En effet,

les études de spécificité se basent principalement sur la prédiction *in silico* de ces séquences hors-cible (plus évidente à déterminer dans le cas des CRISPR que celui des ZFNs car basée uniquement sur l'appariement des paires de bases de Watson et Crick). Pour pouvoir avancer plus loin vers la clinique, il semble toutefois nécessaire d'effectuer des séquençages de la totalité du génome afin de vérifier l'absence de coupures double brin (et de NHEJ ou HDR à un locus non désiré) induites par les nucléases de ces systèmes.

## IV. Applications à l'hépatologie et aux CSP

### A. Les méganucléases

A cause de la difficulté pour générer des nouvelles méganucléases chimériques, il n'existe que très peu d'études d'édition du génome avec cet outil. La première concerne la correction par HDR du gène *RAG1*, impliqué dans le déficit immunitaire combiné sévère, grâce à une chimère dérivée de I-CreI. Après transfection de la méganucléase et de la séquence de correction pour la recombinaison homologue dans une lignée cellulaire, 6% des cellules ont été montrés l'insertion de cette séquence sans induction apparente de toxicité<sup>465</sup>. Dans une seconde étude, l'induction d'indels sur le gène de la dystrophine (responsable de la dystrophie musculaire de Duchenne) après ciblage par une méganucléase a permis un décalage du cadre de lecture de cette protéine après NHEJ et la production d'une protéine fonctionnelle<sup>466</sup>.

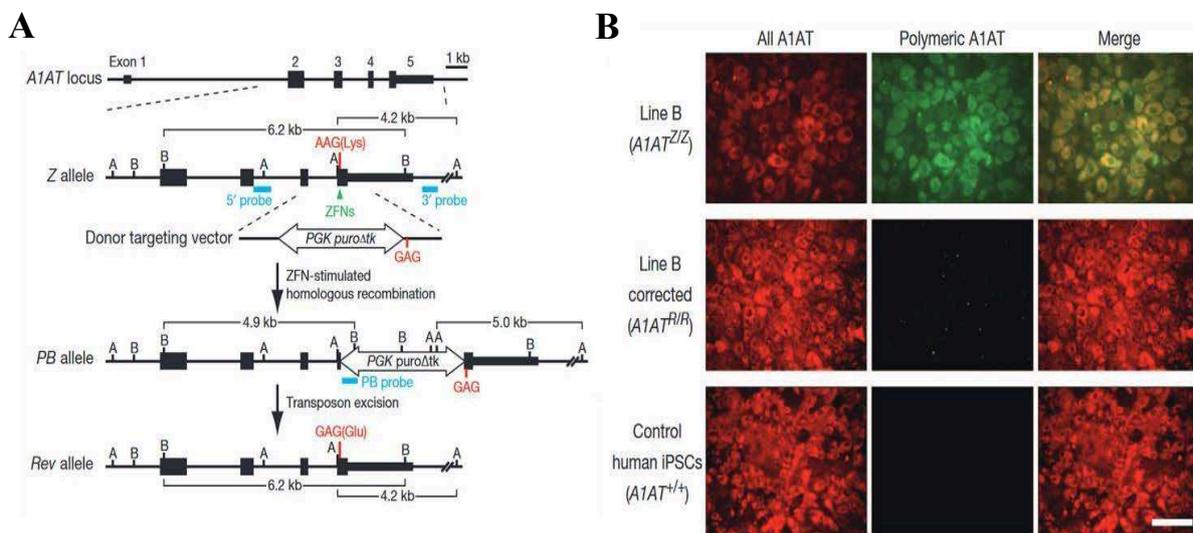
Même si elles n'ont pas de rapport direct avec l'hépatologie ou les cellules souches pluripotentes, ces deux études apportent la preuve de concept qu'à partir du moment où une méganucléase a été générée pour cibler une séquence d'intérêt dans le génome humain alors il est possible de réaliser une coupure double brin à ce site et d'induire les mécanismes de réparations de l'ADN. Il est donc tout à fait envisageable de trouver dans le futur des remaniements de ces enzymes qui permettent de cibler un gène d'intérêt directement *in vivo* dans le foie ou *ex vivo* dans les iPSC modèles d'une maladie hépatique.

### B. Les ZFNs

En 2011 fut publiée la première étude utilisant les ZFNs pour corriger une maladie hépatique, l'hémophilie B, due à des mutations sur le gène codant pour le facteur IX de coagulation<sup>453</sup>. Bien qu'il s'agisse d'une maladie affectant le sang, elle est tout de même considérée comme une maladie hépatique car les hépatocytes sont les seules cellules synthétisant le facteur IX. Les auteurs ont tout d'abord désigné une paire de ZFNs ciblant le premier intron du gène codant pour le facteur IX. Par la suite, ils ont généré deux vecteurs AAV8 (vecteur hépatotropique) exprimant pour l'un, ces deux ZFNs et pour l'autre, la séquence contenant un ADN complémentaire des exons 2 à 8 du gène du facteur IX humain où se situent 95% des mutations responsables de la maladie. Cet ADNc était flanqué de deux bras d'homologie aux séquences du site de coupure pour permettre la recombinaison homologue. L'injection de ces deux vecteurs dans un modèle de souris hémophiles a résulté en une expression de facteur IX humain de l'ordre de 3 à 7% des niveaux circulants chez un

animal sain. Sachant que la restauration d'1% de l'activité du facteur IX suffit à améliorer considérablement le phénotype, cette étude a ainsi montré une correction permanente et cliniquement significative des phénomènes de coagulation grâce à la délivrance directe de ZFNs *in vivo*. Elle a été réalisée sur des souriceaux nouveau-nés où les hépatocytes sont en phase de prolifération et où le phénomène d'HDR est bien actif. Cette stratégie a également montré son potentiel dans des hépatocytes murins adultes, qui ne prolifèrent plus, étendant ainsi son applicabilité<sup>467</sup>.

Les ZFNs ont également été utilisées pour corriger la mutation responsable de la déficience en  $\alpha$ -1 anti trypsine (voir chapitre 2 – partie III) sur des iPSC dérivées à partir d'un patient atteint de cette maladie<sup>468</sup>. Pour cela, les auteurs ont désigné une paire de ZFNs ciblant spécifiquement le site de la mutation. A l'aide d'un transposon PiggyBac, ils ont intégré un gène de résistance à la puromycine suivi par le codon non muté en lieu et place du codon muté après coupure par la paire de ZFNs. Après sélection à la puromycine des clones ayant intégré le transposon (54%), ils ont utilisé les propriétés du transposon pour l'exciser et ne laisser que le codon non muté (**Figure 43A**). Les iPSC corrigées ont conservé l'expression de marqueurs de cellules souches et leur capacité de différenciation en les trois feuillettes de l'organisme indiquant donc que la modification de leur génome n'a pas affecté leur pluripotence. Après différenciation en hépatocytes, les auteurs ont montré que la correction génétique induite par les ZFNs a permis la restauration d'un phénotype normal, c'est-à-dire la sécrétion de la protéine produite et non son accumulation sous forme de polymères dans le réticulum endoplasmique (**Figure 43B**).



**Figure 43.** Restauration d'un phénotype normal dans des iPSC modèles de la déficience en  $\alpha$ -1 anti trypsine par les ZFNs<sup>468</sup>

(A) Les ZFNs ciblant le site de la mutation sur le gène A1AT ont permis l'insertion par recombinaison homologue d'une séquence portant un gène de résistance à la puromycine, nécessaire à la sélection des iPSC corrigées, qui sera excisée à l'aide de la technologie des transposons et du codon non muté pour corriger le phénotype

(B) Dans la lignée d'iPSCs mutantes, la protéine s'accumule sous forme de polymères dans la cellule (panel du haut) alors qu'elle est excrétée dans la lignée d'iPSC corrigées comme dans la lignée contrôle prouvant que la correction médiée par les ZFNs a fonctionné

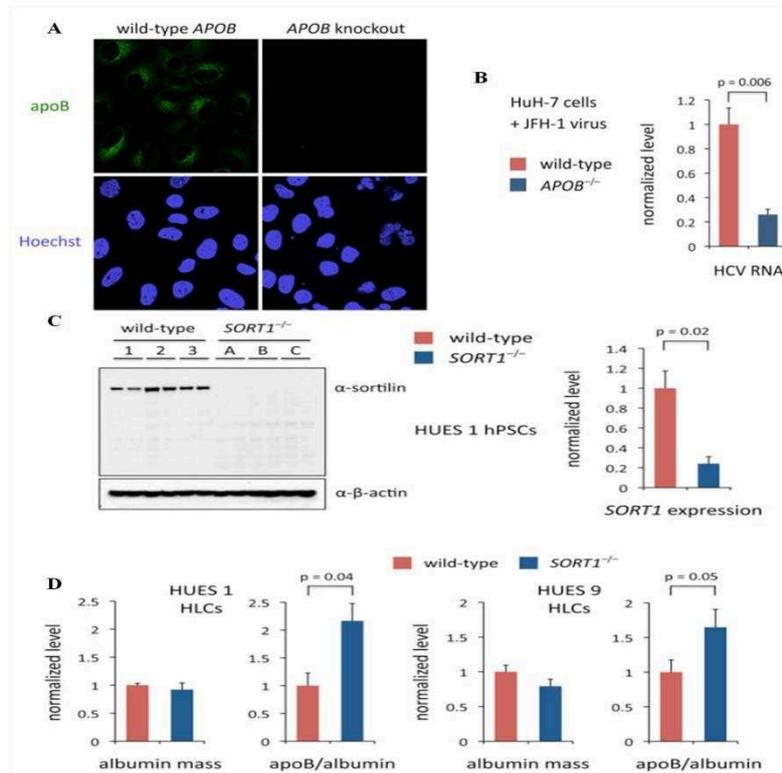
Une autre étude rapporte l'utilisation des ZFNs dans le but d'inhiber la réplication virale de virus de l'hépatite B (VHB)<sup>469</sup>. Malgré un vaccin existant, ce virus reste un problème de santé publique majeur. Les auteurs ont donc désigné 3 paires de ZFNs ciblant respectivement les gènes codant pour la polymérase virale ainsi que les protéines cœur et X du virus. Ils ont délivré ces ZFNs via un vecteur AAV dans une lignée cellulaire où se réplique le HBV, les HepAD38<sup>470</sup>. Elles y ont induit des coupures double brin qui, après réparation par NHEJ, ont décalé le cadre de lecture et ainsi inactivé les gènes ciblés provoquant l'inhibition de la réplication et de la production de virions VHB. De plus, les auteurs n'ont pas retrouvé d'effets hors-cible dans leurs cellules et après deux semaines de culture, l'effet inhibiteur était toujours présent prouvant donc la persistance temporelle de ce système, envisagé comme une thérapie "d'éradication" du virus.

### C. Les TALENs

De leur côté, les TALENs ont servi à établir des modèles *in vitro* de plusieurs maladies dont les déficiences en ApoB-100 ou en sortiline<sup>471</sup>. Les auteurs de cette étude ont désigné seize paires de TALENs ciblant quinze gènes, dont les deux précités, qu'ils ont ensuite introduits dans des lignées cellulaires, comme Huh-7, ou des cellules souches pluripotentes afin de réaliser des KO. En générant un clone Huh-7 déficient en ApoB-100 par cette technique, ils ont ainsi pu démontrer qu'ApoB-100 était une protéine impliquée dans le cycle viral du VHC et que les thérapies visant à diminuer la production d'ApoB-100 comme le mipomersen pouvaient donc être efficaces dans le traitement des patients infectés. En effet, le clone mutant infecté par des virions de la souche JFH1 présentait 74% de réduction dans la réplication virale par rapport à un clone non muté pour ApoB-100 ainsi qu'un niveau de protéine cœur détectable extrêmement faible (**Figure 44A-B**). De la même façon, en générant via une paire de TALENs des KO pour le gène *SORT1*, qui code pour la sortiline, dans des hESC ensuite différenciées en hépatocytes, les auteurs ont pu montrer que le rôle de cette protéine consistait en la diminution du taux d'ApoB-100 circulant ce qui résulte en une diminution du cholestérol (**Figure 44C-D**).

En 2013, une équipe a reproduit la correction génétique de la mutation responsable de la déficience en  $\alpha$ -1 anti trypsine avec les TALENs pour la comparer à celle réalisée avec les ZFNs<sup>201</sup>. Les auteurs ont suivi exactement la même méthodologie et ont ainsi intégré dans des hiPSC modèles de la maladie une séquence identique (avec le gène de la puromycine transposable) au même site génomique que dans l'étude précédente. Ils ont pu montrer une efficacité de correction de 100% (avec 25% de clones corrigés sur les deux allèles) supérieure aux 54% de correction (et 4% de biallélisme) qui avait été observé lors de l'étude avec les ZFNs<sup>468</sup>. Néanmoins, une comparaison précise de la différence d'efficacité entre les deux techniques est difficile à obtenir car les auteurs ont dû désigner une paire de TALENs qui ne ciblaient pas exactement les mêmes séquences que la paire de ZFNs du fait de l'espacement plus grand entre les deux séquences cibles nécessaire avec l'utilisation des TALENs pour un clivage double brin par FokI. En 2014, un modèle *in vitro* du syndrome de Crigler-Najjar (déficit de l'activité de la bilirubine-glucuronosyltransférase entraînant une augmentation du taux de bilirubine pouvant mener à la mort) a été généré par les TALENs sur une lignée

cellulaire hépatique murine dans l'optique de réaliser par la suite un modèle murin *in vivo*<sup>472</sup>. Les auteurs ont ciblé le gène *Ugt1* murin, dont les mutations sont responsables de la maladie, pour introduire des indels dans ce dernier. Les cellules ciblées présentaient alors un déficit d'expression et d'activité de l'enzyme, prouvant l'efficacité du système.



**Figure 44.** Etablissement de modèles *in vitro* via les TALENs pour les déficiences en ApoB-100 et en sortiline<sup>471</sup>

(A) Immunofluorescence montrant le KO d'ApoB-100 médiée par les TALENs dans les Huh-7

(B) La réplication du HCV est réprimée dans les Huh-7 KO pour ApoB-100 par rapport aux Huh-7 sauvages

(C) Western Blot montrant le KO de la sortiline médiée par les TALENs dans trois clones d'hESC concomitant avec la réduction d'expression du gène en qRT-PCR

(D) Les cellules KO pour la sortiline expriment un niveau plus important d'ApoB-100 suggérant un rôle de la sortiline dans la régulation de cette protéine

Un modèle murin de l'hypéuricémie (excès d'acide urique dans le sang entraînant notamment des perturbations rénales ou la goutte) a également pu être mis en place à l'aide des TALENs<sup>473</sup>. Lors de l'évolution des espèces, les Hommes ont perdu le gène codant pour l'uricase (*Uox*) ce qui les a rendus sensibles à cette maladie<sup>474</sup>. *A contrario*, l'uricase est exprimée dans les foies des rongeurs ce qui a pendant longtemps empêché le développement d'un modèle animal de l'hyperuricémie qui pourrait pourtant permettre la compréhension des mécanismes moléculaires en jeu dans cette maladie et la découverte de nouvelles thérapeutiques. Les auteurs ont donc injecté des ARNm codant pour la paire de TALENs ciblant le gène *Uox* dans des zygotes de souris. Après naissances des animaux, les analyses par RT-qPCR et western blot ont montré que l'expression de l'ARNm et de la protéine uricase étaient fortement diminuées dans ces souris par rapport à des souris sauvages. Ces animaux ont par ailleurs développé les symptômes cliniques classiques de la maladie comme des problèmes rénaux, un désordre lipidique et une hypertension, tous dus à une élévation du taux

d'acide urique sanguin. Le phénotype a également pu être amélioré par l'administration de médicaments connus pour diminuer ce taux. L'ensemble de ces résultats tend à montrer que le KO du gène *Uox* médié par les TALENs a permis l'établissement d'un modèle animal cliniquement pertinent.

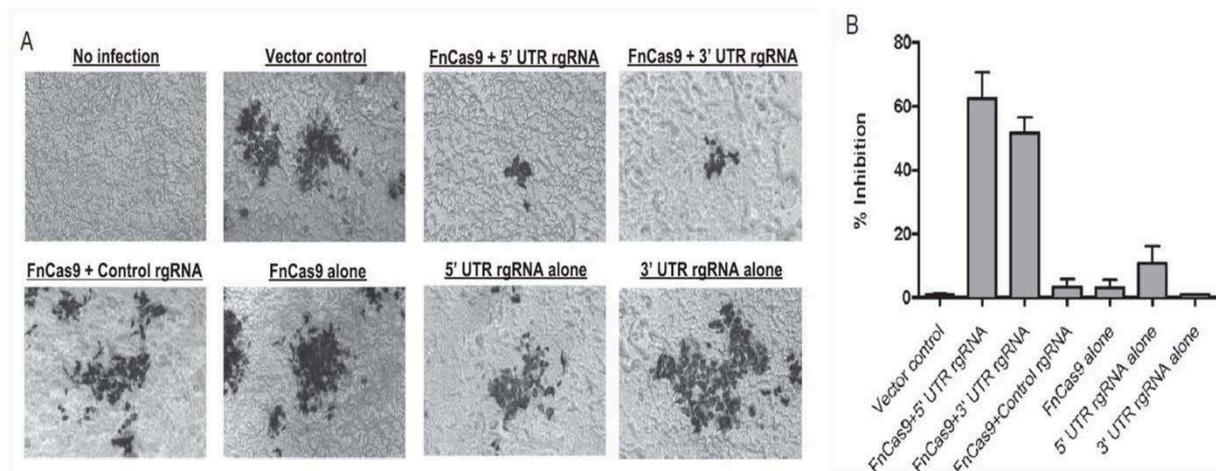
#### D. Les CRISPR

Bien que la technologie basée sur les CRISPR ait moins de cinq ans d'existence, elle a depuis sa découverte subi un essor exponentiel lié à la facilité de génération d'un ARN guide contre de nouvelles séquences cibles qui plus est à faible coût. Il existe donc dans la littérature de nombreuses études qui s'appuient sur ce système pour réaliser des KO ou des KI de gènes *in vitro*, dans des lignées cellulaires, des cellules primaires ou des CSP, comme *in vivo* dans des modèles animaux.

En 2016, les CRISPR ont ainsi été utilisés pour restaurer l'uréogénèse dans des hépatocytes dérivés d'hiPSC reprogrammées à partir d'un patient possédant une mutation sur le gène *ARG1*<sup>437</sup>. Cette dernière entraîne une déficience en arginase, enzyme régulant la dernière étape de l'uréogénèse, ce qui provoque chez les patients des anomalies du développement, des crises d'épilepsie et dans les cas les plus graves, la mort. Par électroporation des hiPSC, les auteurs ont intégré dans les cellules des plasmides portant d'un côté, le système CRISPR pour effectuer la coupure et de l'autre, une cassette d'expression composée de l'ADNc du gène *ARG1* normal et d'un gène de résistance à la puromycine sous contrôle d'un promoteur ubiquitaire. Ces séquences étaient flanquées par deux séquences homologues au site de coupure afin de permettre l'HDR. Dans cette étude, la séquence ciblée ne se situe pas directement sur le gène muté mais au niveau du premier exon du gène codant pour l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (*HPRT*). Ce site a été préféré au site porteur de la mutation car il permet notamment d'effectuer, en plus de la sélection basée sur la résistance à la puromycine, une deuxième sélection des cellules où la cassette de correction s'est insérée. En effet, les cellules exprimant l'enzyme HPRT meurent quand elles sont exposées au 6-thioguanine<sup>475</sup>. L'insertion de la cassette de correction dans le gène *HPRT* entraîne de fait une interruption de l'expression de l'enzyme codée par ce gène et donc une résistance au 6-thioguanine. Il est à noter que cette enzyme est normalement impliquée dans la voie de sauvetage de la purine, processus non essentiel à la cellule pour assurer sa croissance et sa survie<sup>476</sup>. De ce fait, réaliser un KO du gène *HPRT* n'induit pas de toxicité au niveau cellulaire. Après sélection et vérification de l'insertion correcte de la cassette de correction, les auteurs ont pu démontrer la restauration de l'expression et de la fonctionnalité de l'arginase après différenciation hépatocytaire de leurs hiPSC à des niveaux similaires à ceux du foie fœtal.

Peu de temps après, une seconde étude portant sur la même maladie a été publiée<sup>477</sup>. Dans celle-ci, les auteurs ont générés des iPSC à partir de fibroblastes de souris modélisant la déficience en arginase (délétion des exons 7 et 8 du gène *arg1*). En utilisant la stratégie déjà présentée précédemment dans ce chapitre basée sur le transposon PiggyBac mais cette fois-ci avec une coupure réalisée par les CRISPR, les auteurs ont pu réinsérer par HDR les exons 7 et

8 manquants dans les iPSC murines. Après différenciation en hépatocytes ou en macrophages, ils ont également montré une restauration de l'expression et de la fonctionnalité de l'enzyme. Récemment, une autre étude a utilisé des hiPSC provenant d'un patient portant une mutation homozygote sur le gène *MTTP* codant pour l'enzyme MTP qui joue un rôle dans l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines portant l'ApoB<sup>478</sup>. Après différenciation hépatocytaire, les auteurs ont montré que les cellules reproduisaient le phénotype de la maladie caractérisé par l'absence de sécrétion d'ApoB-100 et l'accumulation intracellulaire de lipides. Le phénotype normal a pu être restauré en ciblant directement par les CRISPR l'exon 2 du gène *MTTP* porteur de la mutation pour permettre le remplacement par HDR de l'acide aminé muté par l'acide aminé normal. Ces trois études apportent la preuve de concept de la faisabilité de l'édition génomique en utilisant les CRISPR dans le but de restaurer un phénotype déficient.



**Figure 45.** Inhibition de la production virale de VHC par le système CRISPR/Cas issu de *Francisella novicida*<sup>479</sup>

(A) La transfection d'Huh-7 avec les combinaisons indiquées de FnCas9 et de rgRNA suivie, deux jours plus tard, de l'infection par le VHC montre une plus faible production de protéines virales (immunofluorescence sur la protéine d'enveloppe E2) dans les combinaisons FnCas9 + rgRNA ciblant les régions 5' ou 3' non traduites. (B) Quantification des immunofluorescences anti-E2 exprimée en pourcentage d'inhibition par comparaison avec le vecteur contrôle

Outre l'ADN, il a également été démontré que certaines Cas9 particulières, comme celle provenant de la bactérie *Francisella novicida* (FnCas9), était capable de reconnaître des séquences simple brin comme l'ARN<sup>480</sup>. Dès lors, grâce à cette enzyme, il devient alors envisageable de cibler des virus à ARN comme le VHC. Une étude en ce sens a ainsi été publiée deux ans après la découverte de la FnCas9 par l'équipe à l'origine de celle-ci<sup>479</sup>. Dans cette dernière, les auteurs ont conçu des ARN guides capables de se lier à l'ARN (rgRNA : RNA-targeting guide RNA) et ciblant soit la région 5' non traduite du VHC, impliquée dans la transcription et la réplication des protéines virales, soit la région 3' non traduite, impliquée uniquement dans la réplication virale. Le recrutement de la FnCas9 par ces rgRNA a entraîné une forte inhibition de l'expression des protéines virales dans les Huh-7, modèle classique d'infection *in vitro*, que le système CRISPR soit inséré avant ou après infection des cellules par le VHC (**Figure 45**). Fait important, l'inhibition est maintenue même si les domaines nucléases de la FnCas9 sont inactivés. Ceci suggère donc que la simple liaison de cette

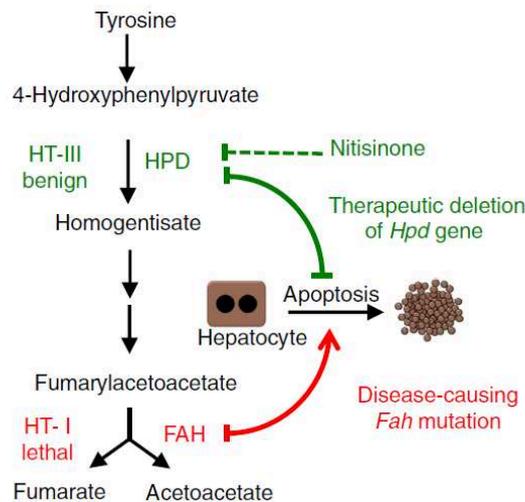
enzyme sur l'ARN viral suffit à perturber sa réplication et par conséquent, la production de protéines virales.

*In vivo*, les CRISPR ont également permis de générer de nombreux modèles animaux murins. Plusieurs équipes les ont par exemple utilisées dans le but de réaliser des KO de gènes suppresseurs de tumeurs afin de déclencher des cancers chez les souris. Parmi elles, une équipe américaine a choisi de cibler *Pten* et *p53*<sup>481</sup>. Les plasmides exprimant la Cas9 et les sgRNA dirigés contre les deux gènes précédents ont été injectés dans les souris par injection hydrodynamique dans la veine de la queue, technique qui permet une transfection directe des hépatocytes. Les CRISPR ont bien provoqué des indels dans les gènes cibles et de ce fait empêché la traduction des protéines codées par ces derniers. Néanmoins, la fréquence de ces indels reste relativement faible (2 à 7%). Le KO simultané de *Pten* et *p53* a provoqué des tumeurs hépatiques similaires à celles retrouvées dans les animaux transgéniques déjà existants où les délétions de ces deux gènes sont générées à l'aide d'un système d'excision CRE-loxP dans les ESC murines. Cette étude démontre donc la faisabilité de l'ingénierie génomique *in vivo* via les CRISPR. De plus, elle présente une technologie plus rapide à mettre en place que le précédent système pour étudier le développement de cancers hépatiques murins.

L'édition du génome *in vivo* par les CRISPR a également été utilisée avec succès pour la restauration de phénotypes normaux dans des modèles de maladies, comme par exemple la tyrosinémie héréditaire de type 1 (souris *fah*<sup>-/-</sup>). Une nouvelle fois à l'aide de l'injection hydrodynamique dans la veine de la queue a pu être réalisée la transfection du sgRNA ciblant le gène *fah* muté, de la Cas9 et de la séquence nécessaire à l'HDR<sup>482</sup>. Les auteurs ont pu observer une expression de la protéine *fah* normale dans un hépatocyte sur deux cent cinquante, suggérant une efficacité du processus de recombinaison homologue de 0,4%, ce qui est assez faible. Cependant, ces hépatocytes corrigés possédaient un avantage sélectif sur les autres et ont donc proliféré davantage, jusqu'à repeupler environ 1/3 du foie. Ceci a alors permis une restauration du phénotype normal caractérisé par un arrêt de la perte de poids des animaux. Deux ans après cette étude, la même équipe a publié une amélioration du protocole de délivrance des outils d'édition génomique (nanoparticules pour la Cas9 et vecteur AAV pour le sgRNA et la séquence nécessaire à l'HDR injectés en intraveineuse) qui a permis d'augmenter le taux d'efficacité de l'HDR à 6%<sup>483</sup>.

Cette souris *fah*<sup>-/-</sup> a également été utilisée pour apporter la preuve de la faisabilité d'un nouveau concept, la "reprogrammation des voies de signalisation". Cette approche consiste en la délétion d'un gène impliqué dans une voie de signalisation associée à une maladie dans le but de rerouter la totalité de cette voie pour améliorer ainsi les conditions métaboliques<sup>484</sup> (**Figure 46**). Les patients atteints de tyrosinémie de type 1 peuvent être traités avec le nitisinone, inhibiteur de l'enzyme hydroxyphenylpyruvate dioxygénase (HPD) impliquée dans la seconde étape du catabolisme de la tyrosine, réduisant ainsi le risque de développement d'hépatocarcinomes<sup>485</sup>. Il a d'autre part été montré que les souris *fah*<sup>-/-</sup> croisées avec les souris *hpd*<sup>-/-</sup> ne développaient plus de cancers hépatiques du fait de la conversion du phénotype malin (accumulation de fumarylacétoacétate entraînant l'apoptose des hépatocytes) en

phénotype bénin dénommé tyrosinémie de type 3<sup>486</sup>. A partir de ce constat, les auteurs ont alors généré l'excision dans les souris *fah*<sup>-/-</sup> des exons 3 et 4 du gène *hpd* en utilisant la technologie des CRISPR avec deux sgRNA distincts<sup>484</sup>. Les hépatocytes double-négatifs possédaient un avantage sélectif sur les autres et ont pu repeupler le foie de certaines souris en à peine huit semaines les préservant du développement de cancers hépatiques. Les auteurs de cette étude suggèrent donc que ce système pourrait s'appliquer à l'Homme sous couvert d'un taux de repeuplement hépatique au moins équivalent à celui trouvé chez la souris.



**Figure 46.** Principe de la reprogrammation des voies de signalisation métabolique appliqué à la tyrosinémie de type 1<sup>484</sup>

Dans cette maladie, l'enzyme FAH est muté et entraîne l'accumulation de fumarylacétoacétate dans les hépatocytes, métabolite toxique qui induit leur apoptose. En empêchant l'enzyme HPD de fonctionner (inhibition directe par le nitisinone ou délétion d'une partie du gène par les CRISPR), cette accumulation de fumarylacétoacétate ne peut avoir lieu et les hépatocytes ne rentrent donc pas en apoptose

Dans le cas plus particulier de l'hypercholestérolémie familiale, les deux gènes *pcsk9* et *rldl* ont été ciblés par les CRISPR. S'agissant de *pcsk9*, trois études différentes aboutissant à des conclusions similaires ont été publiées<sup>487-489</sup> :

\_ Dans la première étude<sup>487</sup>, le sgRNA ciblant le gène *pcsk9* et la Cas9 empaquetés dans un vecteur AAV8 ont été injectés de manière rétro-orbitale dans des souris saines. Après quatre jours, le taux d'indels relevés dans les hépatocytes dépassait les 50% dans certaines souris, concomitant avec une diminution de l'expression de Pcsk9 dans leurs sérums. Les auteurs ont également noté une augmentation de l'expression de la protéine Rldl dans les hépatocytes murins et surtout une diminution du taux de cholestérol sanguin de l'ordre de 40% dans ces animaux. Aucun effet hors cible n'a été trouvé au niveau de dix locus prédits par similarité de séquences.

\_ Dans la seconde étude<sup>488</sup>, les auteurs ont utilisé la Cas9 provenant de *Staphylococcus aureus*, plus petite que la Cas9 classiquement utilisée, afin de l'empaqueter dans un seul vecteur AAV8 avec le sgRNA. Après injection hydrodynamique de ce vecteur dans la veine de la queue de souris normales, les auteurs ont pu montrer un taux de mutagenèse supérieur à 40% ainsi qu'une diminution de l'expression de Pcsk9 murin et du taux cholestérol dans le sérum de ces animaux.

\_ La dernière étude a quant à elle utilisé le modèle murin FRG repeuplé avec des hépatocytes primaires humains (taux de repeuplement variant de 10 à 60%)<sup>489</sup>. Le sgRNA ciblant le gène *PCSK9* humain et la Cas9 ont été injectés en rétro-orbital dans les souris FRG. Une fois encore, le taux de mutagenèse constaté était supérieur à 50% et le taux d'expression de la protéine PCSK9 humaine était fortement diminué (52%). Néanmoins, les auteurs ont montré un mécanisme compensatoire des hépatocytes murins restants : en effet, l'expression de la protéine Pcsk9 murine a été doublée après injection du système d'édition du génome, empêchant de fait la diminution du taux de cholestérol dans ces animaux. Ces trois études précédentes suggèrent donc que la dysfonction du gène *PCSK9* médiée par les CRISPR est un moyen efficace de réduire le taux de cholestérol sanguin.

Très récemment, un nouveau modèle animal d'hypercholestérolémie familiale a été développé<sup>490</sup>. Ici, les auteurs ont réalisé l'interruption du gène *rldl* de manière somatique sur des souris normales adultes plutôt que sur des ESC murines, s'affranchissant ainsi des contraintes et complications liées à l'utilisation de ces dernières. Le taux de mutagenèse constaté dans ces animaux dépassait les 50% en accord avec la diminution de moitié de l'ARNm du *rldl* ce qui a entraîné la perte quasi complète de l'expression de la protéine. Les auteurs observent également un effet de coupure hors cible dans un site unique du génome (intron du gène *Stx8*) à une fréquence de 5% sans influence sur le phénotype des souris. Sous un régime alimentaire riche en gras, ces dernières ont développé une hypercholestérolémie sévère (jusqu'à 7 g/L) ainsi que des plaques d'athérosclérose, phénotype classique de la maladie. De façon intéressante, la co-interruption du gène *apoB* par le même système a montré une réversion du phénotype (forte diminution du taux de cholestérol et protection contre l'athérosclérose), suggérant ce gène et la protéine encodée par celui-ci comme des cibles thérapeutiques importantes pour la réduction du taux de cholestérol sanguin chez les patients atteints d'hypercholestérolémie familiale.

Les outils d'édition du génome représentent donc un formidable espoir de thérapie pour des maladies qui n'ont pas de traitements curatifs à l'heure actuelle. Néanmoins, il y a encore quelques barrières à lever, en termes d'efficacité et de sûreté notamment avant de pouvoir les utiliser pleinement en clinique.

# Objectifs

---

Notre laboratoire possède une expertise dans le domaine de la différenciation des cellules souches pluripotentes en hépatocytes et en cholangiocytes. A l'initiation de ma thèse à l'automne 2013, mon sujet portait sur la modélisation *in vitro* de l'hypercholestérolémie familiale et de la maladie de Wilson par les cellules souches pluripotentes induites. Concernant la première pathologie, la biopsie de peau du patient avait déjà été effectuée avant mon arrivée et ses fibroblastes mis en culture et congelés. Pendant la reprogrammation des cellules par un prestataire extérieur (hiPSC reçues en juin 2014), j'ai pu m'impliquer dans un autre projet qui portait sur la différenciation d'hépatocytes différenciés à partir d'une lignée de cellules souches embryonnaires et la démonstration de leur fonctionnalité *in vitro* et *in vivo* par repeuplement de foies d'un modèle murin d'insuffisance hépatique aiguë et qui constitue, en tant que deuxième auteur, la première publication de mon travail de thèse.

Concernant la modélisation de la maladie de Wilson, après initiation du projet, les prélèvements sanguins de six patients sont arrivés courant 2014. J'en ai isolé les cellules mononucléées du sang périphérique en vue de leur reprogrammation en hiPSC. Néanmoins, ce projet a été mis en pause du fait de doutes sur l'obtention d'un phénotype malade détectable *in vitro* et d'un recentrage sur les hiPSC dérivées de fibroblastes d'un patient homozygote pour l'hypercholestérolémie type IIA et totalement déficient en récepteur des LDL. Nos objectifs pour cette étude, actuellement soumise, étaient de :

- \_ Vérifier que les hiPSC dérivées du patient reproduisaient *in vitro* le phénotype d'absence de la protéine caractéristique du patient
- \_ Définir une approche pour différencier ces hiPSC en hépatocytes fonctionnels les plus matures possibles
- \_ Tester des composés thérapeutiques pouvant permettre une restauration du phénotype
- \_ Corriger génétiquement les hiPSC par la technologie des CRISPR/Cas et vérifier l'intégrité de cette correction
- \_ Prouver l'efficacité de cette correction en montrant la restauration d'un phénotype normal après différenciation hépatocytaire
- \_ Utiliser ces modèles pour étudier le rôle du RLDL dans le cycle du virus de l'hépatite C

# Résultats

---

## Article 1

### Transplantation of hESC-derived hepatocytes protects mice from liver injury

La majorité des protocoles de différenciation des cellules hESC en hépatocytes se base sur quelques lignées principalement dérivées aux Etats-Unis, dont notamment la lignée H9<sup>213,214,218,230</sup>, toutes brevetées et difficilement utilisables dans des perspectives d'application clinique. De plus, les protocoles de dérivation, de culture et de différenciation des cellules souches pluripotentes utilisent très fréquemment des produits d'origine animale comme la couche nourricière de fibroblastes murins et le sérum de veau fœtal. Ces composés apportent des facteurs de croissance en quantité et en qualité inconnues pouvant influencer sur les mécanismes mis en jeu lors de l'autorenouveau et de la différenciation. De même, les modificateurs chromatinien comme le DMSO, parfois utilisé pour induire les stades hépatoblastes et hépatocytes, entraîne des bouleversements moléculaires importants et non spécifiques. Pour envisager une utilisation clinique des hépatocytes dérivés des CSP, il convient ainsi de connaître parfaitement la totalité des composants utilisés dès la dérivation de la lignée.

Pour notre étude, nous avons choisi une nouvelle lignée d'hESC, dérivée en Espagne sans aucun produit d'origine animale, les VAL9<sup>491</sup>. Nous avons pu générer des hépatoblastes capables de se différencier en cholangiocytes qui adoptent une morphologie tridimensionnelle caractéristique en cystes et en tubules ainsi qu'en hépatocytes au phénotype proche de celui des hépatocytes néonataux, notamment caractérisés par l'expression et l'activité des enzymes UGT1A1, CYP2D6 et CYP1A2, indétectables dans des stades plus précoces comme les hépatocytes fœtaux. Ces hépatocytes ont par la suite été transplantés dans un modèle murin d'insuffisance hépatique aiguë causée par une overdose de paracétamol. Ce modèle a été choisi car il s'agit de la cause la plus commune d'insuffisance hépatique aiguë en Grande-Bretagne et aux Etats-Unis et il revêt ainsi un intérêt médical particulier<sup>492</sup>. Nous avons montré que les hépatocytes différenciés à partir des VAL9 qui ont été transplantés dans ces souris ont repeuplé en moyenne 15% des foies transplantés et ont permis la survie des animaux en assurant les fonctions hépatiques déficientes du fait de l'apoptose et de la nécrose des hépatocytes résidents induites par le paracétamol. Cette étude est ainsi la première à montrer la possibilité d'utiliser des hépatocytes dérivés d'hESC pour traiter une insuffisance hépatique aiguë due à une overdose médicamenteuse.

La transplantation d'hépatocytes requiert un nombre conséquent de cellules (de un à plusieurs milliards pour un adulte). Ainsi, dans la perspective d'une greffe chez l'Homme, il semble difficile d'obtenir le nombre suffisant de cellules différenciées à transplanter en une seule différenciation et il devient donc nécessaire de pouvoir cryoconserver les différents lots

de cellules différenciés avant transplantation. Comme les hépatocytes supportent mal ce processus<sup>88</sup>, nous nous sommes intéressés à la congélation et décongélation des hépatoblastes dérivés des VAL9. Après décongélation, ces derniers reprennent leur prolifération et leur différenciation vers les hépatocytes en maintenant une très bonne viabilité (plus de 80%), ce qui permet alors d'envisager la cryoconservation au stade hépatoblaste comme un jalon possible du processus de transplantation. Ceci se révèle particulièrement crucial dans le cadre d'une insuffisance hépatique aiguë car l'obtention d'hépatocytes à partir de cellules souches pluripotentes prend en moyenne de 25 jours selon les protocoles ce qui représente un temps d'attente trop long, inenvisageable pour ces patients.

Dans ce travail, j'ai participé à toutes les expériences *in vitro*, c'est-à-dire à la mise au point du protocole de différenciation des VAL9 (et de la lignée hiPSC utilisée pour comparaison) en hépatocytes et en cholangiocytes, aux caractérisations de ces populations cellulaires *in vitro* (RT-PCR, immunofluorescence, cytométrie en flux et internalisation et excrétion du vert d'indocyanine) ainsi qu'à la mise au point du protocole de congélation et décongélation des progéniteurs hépatiques.

RESEARCH

Open Access



# Transplantation of hESC-derived hepatocytes protects mice from liver injury

Laia Tolosa<sup>1,2,3,4</sup>, Jérôme Caron<sup>1,3,4</sup>, Zara Hannoun<sup>1,3,4</sup>, Marc Antoni<sup>1,3,4</sup>, Silvia López<sup>2</sup>, Deborah Burks<sup>5</sup>, Jose Vicente Castell<sup>2,6</sup>, Anne Weber<sup>1,3,4</sup>, Maria-Jose Gomez-Lechon<sup>2,6\*</sup> and Anne Dubart-Kupperschmitt<sup>1,3,4\*</sup>

## Abstract

**Background:** Hepatic cell therapy has become a viable alternative to liver transplantation for life-threatening liver diseases. However, the supply of human hepatocytes is limited due to the shortage of suitable donor organs required to isolate high-quality cells. Human pluripotent stem cells reflect a potential renewable source for generating functional hepatocytes. However, most differentiation protocols use undefined matrices or factors of animal origin; as such, the resulting hepatocytes are not Good Manufacturing Practice compliant. Moreover, the preclinical studies employed to assess safety and function of human embryonic stem cell (hESC)-derived hepatocytes are generally limited to immunodeficient mice. In the present study, we evaluate the generation of hepatocytes under defined conditions using a European hESC line (VAL9) which was derived under animal-free conditions. The function capacity of VAL9-derived hepatocytes was assessed by transplantation into mice with acetaminophen-induced acute liver failure, a clinically relevant model.

**Methods:** We developed a protocol that successfully differentiates hESCs into bipotent hepatic progenitors under defined conditions, without the use of chromatin modifiers such as dimethyl sulphoxide. These progenitors can be cryopreserved and are able to generate both committed precursors of cholangiocytes and neonate-like hepatocytes.

**Results:** Thirty days post-differentiation, hESCs expressed hepatocyte-specific markers such as asialoglycoprotein receptor and hepatic nuclear factors including HNF4 $\alpha$ . The cells exhibited properties of mature hepatocytes such as urea secretion and UGT1A1 and cytochrome P450 activities. When transplanted into mice with acetaminophen-induced acute liver failure, a model of liver damage, the VAL9-derived hepatocytes efficiently engrafted and proliferated, repopulating up to 10 % of the liver. In these transplanted livers, we observed a significant decrease of liver transaminases and found no evidence of tumourigenicity. Thus, VAL9-derived hepatocytes were able to rescue hepatic function in acetaminophen-treated animals.

**Conclusions:** Our study reveals an efficient protocol for differentiating VAL9 hESCs to neonatal hepatocytes which are then able to repopulate livers in vivo without tumour induction. The human hepatocytes are able to rescue liver function in mice with acetaminophen-induced acute toxicity. These results provide proof-of-concept that replacement therapies using hESC-derived hepatocytes are effective for treating liver diseases.

**Keywords:** Human embryonic stem cells (hESCs), Directed differentiation, Hepatocytes, Transplantation, Liver injury, Preclinical animal model, Cell therapy

\* Correspondence: gomez\_mjo@gva.es; anne.dubart@inserm.fr  
Maria-Jose Gomez-Lechon and Anne Dubart-Kupperschmitt are co-authorship.

<sup>2</sup>Unidad de Hepatología Experimental, IIS LA Fe, Valencia S-46026, Spain

<sup>1</sup>INSERM, U 1193, Hôpital Paul Brousse, Villejuif F-94807, France

Full list of author information is available at the end of the article

## Background

Hepatocyte transplantation has been proposed as an alternative to orthotopic liver transplantation for treatment of patients with acute liver failure (ALF) and metabolic disorders. Various clinical trials using hepatocyte transplantation have demonstrated partial improvement of liver function. However, the transplanted hepatocytes are unable to rescue patients due to the inadequate levels of engraftment [1, 2]. Moreover, there is an increasing shortage of viable and functional sources of human hepatocytes and the number of patients who die (15 %) while on the liver transplant waiting list has increased over the last few years. Recent advances targeted towards the differentiation of human embryonic stem cells (hESCs) or reprogrammed human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) to various cell lineages offer significant promise for *in vitro* studies and as a source of viable cells for use in therapy. In the case of liver injuries or metabolic diseases, only a single cell type, the hepatocyte, is required [3]. Thus, the generation of an unlimited supply of these cells from pluripotent stem cells should be an important factor when translating stem cell biology into the clinic. Lastly, clinical data from patients with macular degeneration treated with hESC-derived retinal cells have demonstrated that hESCs may provide a potentially safe renewable and reliable source of cells for the treatment of various disorders [4]. Studies on liver development in model organisms have identified genes and signalling pathways vital for the formation of the hepatic lineage [5, 6] and, in recent years, a number of laboratories have reported various protocols that can successfully differentiate both hESCs and hiPSCs into hepatocyte-like cells by recapitulating liver development. The differentiation process is based on the initial induction of definitive endoderm [7, 8], followed by hepatic specification then differentiation into foetal hepatocyte-like cells (HLCs) [9–15] and, finally, further maturation into albumin-producing HLCs lacking nevertheless important features of adult primary hepatocytes. However, these approaches are based on culture media that contain serum and or chromatin modifiers (such as dimethyl sulphoxide or sodium butyrate), complex matrices such as Matrigel and/or the use of mouse embryonic fibroblasts as feeder cells. All of above are a source of unknown factors that could obscure the molecular mechanisms controlling human liver development or render the resulting tissues incompatible with future clinical applications. Over the last decade, our team and others have developed approaches using fully defined culture conditions required to generate HLCs from hESCs and hiPSCs [16–19]. Pluripotent stem cells were differentiated into a homogenous population of endoderm cells, which were then induced to differentiate

further into hepatic bipotent progenitors, hepatoblasts, and then into foetal hepatocytes. It should be noted that all the approaches that have been developed on hESC differentiation into HLCs, including ours, have been conducted almost exclusively on a few US hESC lines, H9 being the most popular for generating HLCs [14, 20].

In the liver, heterotypic cell interactions between parenchymal cells and their non-parenchymal neighbours result in the regulation of differentiation and tissue proliferation in a three-dimensional microenvironment [21, 22]. The *in vitro* differentiation protocol does not reproduce this complex, three-dimensional, multicellular environment of the native liver. In this context, the engraftment and survival of HLCs in a native liver parenchyma should promote further maturation and long-term repopulation of transplanted cells. To date, the engraftment of human stem cell-derived HLCs has been described in a few models of immunodeficient mice with transgene-induced [13, 16, 23] or chemically induced [24–26] liver toxicity with low efficiencies. These data suggest that the transplanted cells were not responsive to the regenerative stimuli of host mouse liver and, therefore, not functional *in vivo*. However, the relationship between the level of HLC differentiation from pluripotent cells and the engraftment efficiency is not known. We previously demonstrated that foetal hepatoblasts isolated from human livers at an early stage of development (11–13 weeks of gestation) were able to engraft and exhibit *in vivo* mature functions such as CYP3A4 and  $\alpha$ -glutathione-S-transferase activity [27–29]. Taken together, these data suggest that the transplanted stem cell-derived hepatic cells lacked various functions involved in their engraftment within the host parenchyma compared to foetal cells [23].

Utilising a hESC line derived in Centro de Investigación Principe Felipe (CIPF) [30], we report a strategy for the efficient generation of functional human hepatocytes from VAL9 hESCs in animal-free conditions. Using sequential modulation of the different signalling pathways involved in the various developmental stages, we were able to generate cells that mimic functions of neonate hepatocytes (taken as reference) that also demonstrate key features of hepatocytes including the expression and activation of crucial cytochrome P450 enzymes and UDP glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1). Finally, we demonstrate, for the first time, that the VAL9 hepatocytes (VAL9-HEP) were able to engraft and repopulate up to 20 % of the liver and rescue mice with acetaminophen-induced acute liver injury post-transplantation. These findings emphasize the potential value of these cells for use in liver cell therapy.

## Methods

### Cell culture

VAL9 hESCs were obtained from the Spanish National Stem Cell Bank (<http://www.isciii.es/ISCIII/es>) after approval of the InnovaLiv project by the following ethics committees: Spanish "Comision Nacional Medicina Regenerativa" on 21 May 2012 and French Agency of Biomedicine on 25 June 2012. VAL9 hESCs were cultured in feeder-free conditions on culture dishes pre-coated with 0.05 mg/ml Geltrex (Life technologies) in Nutristem medium (Biological industries) supplemented with 8 ng/ml fibroblast growth factor (FGF)2 (CellGenix) at 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> in animal-free conditions [30].

The hiPSC line was already established in the laboratory from human foreskin fibroblasts. hiPSCs were maintained on MEF feeders in DMEM/F12 medium supplemented with 20 % knockout serum replacement, 1 mM L-glutamine, 1 % non-essential amino acids, 0.1 mM β-mercaptoethanol and 4 ng/ml FGF2 at 37 °C/5 % CO<sub>2</sub>. Prior to differentiation, hiPSCs were plated on culture dishes pre-coated with Geltrex and maintained in the same conditions as VAL9 hESCs for a few passages before starting differentiation.

### Hepatic differentiation

Hepatic differentiation of hESCs and hiPSCs was performed following a multistep protocol adapted from Hannan et al. [19] up to the hepatoblast stage. First, Val9 hESCs at 80–90 % confluence are subjected to a 1-day treatment with 100 ng/ml Activin A (CellGenix), 100 ng/ml basic (b)FGF (CellGenix), 10 ng/ml BMP4 (R&D Systems), 10 μM LY294002 (Cayman Chemical Company) and 3 μM CHIR99021 (Miltenyi Biotec). On day 2, cells are exposed to the same cytokines in the absence of CHIR, and finally, on day 3, cells are exposed to 100 ng/ml Activin A, 100 ng/ml bFGF to induce definitive endoderm (DE). The efficiency of induction of DE was then assessed by immunofluorescence for SOX17, FOXA2 and GATA binding protein 4 (GATA4) and flow cytometry for CXCR4. Only cell preparations with above 85 % of CXCR4-positive cells were used for further differentiation. Cells were then exposed to 50 ng/ml Activin A for 3 days and 4 additional days to 10 ng/ml BMP4 and 10 ng/ml FGF10 (Biovalley) to promote hepatic specification. The hepatoblast stage was then assessed by immunofluorescence of hepatocyte nuclear factor (HNF)4α, CK19 and alpha foetoprotein (AFP) and flow cytometry for epithelial cell adhesion molecule (EpCAM). Confluent hepatoblast cells were then passed 1 to 2 in the presence of hepatocyte growth factor (HGF) 50 ng/ml to collagen-coated dishes and cultured in hepatocyte culture medium (HCM; Lonza) in the presence of HGF (Peprotech) and oncostatin M (OSM; Peprotech) for 3 days. Finally, cells were maintained in

HCM in the presence of 20 ng/ml HGF up to day 30. The percentage of asialoglycoprotein receptor (ASGR)-positive cells was used to validate the efficiency of differentiation. The differentiation was also determined by immunofluorescence of hepatocyte markers such as albumin (ALB) and HNF4.

### Immunofluorescence

Cells were fixed with 4 % paraformaldehyde for 15 minutes at room temperature and permeabilized with 0.5 % Triton X-100 for 15 minutes. They were then incubated in 3 % bovine serum albumin (BSA)-phosphate-buffered saline (PBS) for 30 minutes at room temperature. Primary antibodies were diluted in 1 % BSA-PBS, and incubated overnight at 4 °C. Secondary antibodies were diluted in 1 % BSA-PBS and incubated for 1 hour at room temperature. (See primary and secondary antibody dilutions and information in Additional file 1: Table S1). All the photographs were taken with a Leica HMR microscope (Leica Microsystems).

### Flow cytometry analysis

Cells were dissociated with cell dissociation buffer, and suspended in 3 % BSA-PBS. They were then incubated with SSEA4-PE, CXCR4-APC or EpCAM-FITC conjugated antibodies or in control isotypes for 30 minutes at 4 °C in the dark. Cells were then washed with PBS, centrifuged, and suspended in PBS-BSA 1 % for analysis. Cells were detected in FL2 and FL4 channels with an Accuri C6 flow cytometer (BD biosciences). Dead cells were eliminated with 7AAD staining (Beckman coulter A07704). For ASGR analysis, cells were incubated with anti-ASGR antibody for 30 minutes at 4 °C and then with the secondary antibody Alexafluor 488 in the dark for 30 minutes at room temperature. Cells were then washed twice and suspended in PBS-BSA 1 % for analysis in the Accuri C6 flow cytometer. Quantification of cell death after thawing was analyzed by 7AAD staining.

### RNA extraction and real-time quantitative PCR

Total RNA was extracted from hepatocytes using a commercial kit (Qiagen) following the manufacturer's recommendations. The amount of isolated RNA was estimated by ribogreen fluorescence and its purity was assessed by the absorbance ratio 260/280 nm. Total RNA (1 μg) was reverse-transcribed and real-time quantified using SYBR Green I Master and the appropriate primers (Additional file 2: Table S2) in a LightCycler 480 instrument. In parallel, the mRNA concentration of human housekeeping β-actin was always analysed as an internal normalization control. The real-time monitoring of the polymerase chain reaction (PCR) and the precise quantification of the products in the exponential phase of the amplification were performed with the LightCycler Relative Quantification

Analysis software (Roche Applied Sciences) in accordance with the manufacturer's recommendations. Moreover, a positive sample with a stable ratio of target and reference cDNA (a calibrator) was included in each PCR run to normalize all the samples within one run and to provide a constant calibration point among several amplification runs.

#### **Lentivector production and transduction of VAL9-derived cells**

The EF1 $\alpha$ -green fluorescent protein (GFP) and CYP3A4-GFP lentivectors were constructed and produced by Vectalys. The apolipoprotein A-II (APOA-II)-GFP lentivector was constructed in the laboratory and produced by Vectalys.

On day 13 of hepatic differentiation, cells were washed once with PBS, and fresh HamF12/Williams (HPM) supplemented with HGF (20 ng/ml final concentration) was added. The lentivectors were used at a multiplicity of infection (MOI) of 10 and were incubated with cells overnight. The cells were then cultured following the normal protocol.

For transplantation experiments, the VAL9-HEP were transduced at day 28 of differentiation and subsequently injected 2 days later.

#### **Functional characterization of differentiated cells**

Ureogenesis was assessed in the thawed cells by measuring the formation of urea from NH $_4^+$ , according to [31]. The periodic acid-Schiff (PAS) staining system was purchased from Sigma-Aldrich. In order to assess the response to hormones, VAL9-HEP were incubated with insulin ( $10^{-7}$  M) and/or glucagon ( $10^{-6}$  M) for 24 hours prior to the assay. Culture dishes containing cells were fixed in 4 % paraformaldehyde. Further assay was under the manufacturer's instruction.

The indocyanine green (ICG) uptake test was assayed by incubating differentiated cells in medium containing 1 mg/ml ICG for 60 minutes at 37 °C. Cells were then washed three times with media and fresh HCM is added. ICG release was evaluated 24 hours later.

Cytochrome P450 activities were assayed by differentiated cells with a cocktail mixture of substrates for five individual P450 enzymes: 10  $\mu$ M phenacetin (CYP1A2), 10  $\mu$ M diclofenac (CYP2C9), 10  $\mu$ M bupropion (CYP2D6), 50  $\mu$ M chlorzoxazone (CYP2E1) and 5  $\mu$ M midazolam (CYP3A4). After 24 hours of incubation at 37 °C, cell media were recovered and stored at -80 °C until analysis. Formation of the corresponding metabolites was quantified by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC/MS; Waters) as previously described [32].

UGT1A1 activity was assayed by incubating differentiated cells in medium containing 15  $\mu$ M  $\beta$ -estradiol for 24 hours. Cell media were recovered and stored at -80 °C

until analysis. The formation of the corresponding metabolite was measured by HPLC/MS, as previously described [33].

#### **Animals and induction of acute liver failure (ALF)**

Animals were housed at the animal facilities of the Instituto de Investigación Sanitaria La Fe. All animals had free access to food and water in a temperature-controlled room with a 12-hour dark/light cycle. All the animals received human care and all the experimental protocols were approved by the Institutional Animal Ethics Committee (Comite Etico de Bienestar Animal) of the La Fe Hospital and performed in accordance with Spanish national and institutional regulations. Male NOD/SCID mice (4–6 weeks) were treated with 300 mg acetaminophen (APAP)/kg to induce ALF 3 hours prior to cell transplantation. ALF was evaluated by means of histological staining and determination of transaminases in the sera of treated animals.

#### **Transplantation of VAL9-HEP into mice with ALF**

At day 30 of differentiation, VAL9-HEP were collected and injected into the spleen of NOD/SCID mice with ALF. Three hours after the injection of APAP, mice were anaesthetized with a sevoflurane/O $_2$  mixture and the lower pole of the spleen was exposed. Animals received an intrasplenic injection of  $1 \times 10^6$  VAL9-HEP in 200  $\mu$ l infusion medium within seconds. The control mice, which had also received APAP treatment, received an intrasplenic injection of only the infusion medium [20].

At different time points, mice were sacrificed under anaesthesia (sevoflurane/O $_2$  mixture). Blood was collected and serum aliquots were protected from light and stored at -80 °C until analysis. Liver and spleen were collected and stored at -80 °C until the histological analyses. From each tissue specimen, serial sections (7  $\mu$ m) were cut with a cryostat (Micron HM 505 N) for fluorescent microscopy.

#### **Evaluation of tumourigenicity of differentiated cells**

In order to assess the tumourigenic potential of VAL9-HEP, different tissues were histologically analysed. For this purpose, hematoxylin-eosin staining was performed and samples were examined by a pathologist in search of any sign of tumourigenicity.

#### **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) analysis**

The human ALB values secreted into the medium of VAL9 cells (prior to or after differentiation) and secreted into the sera of transplanted animals were determined by the Human Albumin ELISA Quantitation kit (Bethyl; <http://www.bethyl.com>) following manufacturer's instructions.

### Evaluation of engraftment of VAL9-HEP

Several sections from different lobes were used for the evaluation of the engrafted cells. The number of GFP-hepatocytes around portal and centrilobular veins was counted and referred to the total number of hepatocytes.

### Cholangiocyte differentiation and biliary cyst formation

hESC were differentiated into cholangiocytes as described by Dianat et al. [34].

The biliary cysts were generated as follows: day 18 cells were detached with trypsin, centrifuged and resuspended in biliary differentiation media (BDM; William's E/Ham F12 1:1,  $10^{-5}$  M linoleic acid-albumin (Sigma L9530),  $5 \times 10^{-8}$  M 3,3',5-triiodo-L-thyronine (Sigma T2752), 0.2 IU insulin,  $6.10^{-4}$  M vitamin C (Boyer),  $6 \times 10^{-4}$  M human apo-transferrin (Sigma T5391), 1 mM sodium pyruvate (Gibco)). The cells were then added to a mixture of rat-tail type I collagen (BD Biosciences), Matrigel 40 % (BD Biosciences), HEPES (0.02 M) and  $\text{NaHCO}_3$  (2.35 mg/ml). A cell suspension containing 5000 cells was added to 24-well inserts (BD biosciences 353104) and incubated at 37 °C for 3 hours. BDM medium (1 ml) supplemented with 20 ng/ml HGF and 10 ng/ml epidermal growth factor (EGF) was added on top of the insert as well as in the well, and incubated at 37 °C/5 %  $\text{CO}_2$  up to 2 weeks. The cells were fed every other day and, after 2 weeks, the cells were fixed in 3 % paraformaldehyde and stained.

## Results

### The differentiation of VAL9 hESCs into hepatic progenitors

At day 0 of the differentiation protocol, the VAL9-hESC colonies were positive for the pluripotency markers octamer-binding transcription factor 4 (OCT4), homeobox transcription factor (NANOG), tumour resistance antigen 1–60 (TRA1-60), SSEA4 and SSEA3. The cells also exhibited a normal karyotype (Additional file 3: Figure S1A–D).

We assessed the ability of a previously published protocol to generate hepatoblasts using the VAL9 cell line [19]. The VAL9 cells were subjected to a multistep differentiation protocol outlined in Fig. 1a. Clusters of hESC line were induced into definitive endoderm, followed by 6 days of hepatic specification, where the cells differentiated into hepatic bipotent progenitors. At day 5 more than 98 % of the cells expressed CXCR4 (Fig. 1c), a marker of DE. These cells were also found to be significantly positive for Sox17 and HNF3 $\beta$ , also markers of DE. Furthermore, less than 0.1 % of the cells expressed pluripotency markers (Fig. 1b). These data suggest that the VAL9 hESCs can be successfully differentiated into a homogenous population of endoderm cells. At day 11, the majority of the cells expressed CK19, GATA4, HNF3 $\beta$ , HNF6 and HNF4 $\alpha$ , a master regulator of hepatic differentiation (Fig. 1d) and

97 % of the cells expressed EpCAM, a hepatoblast marker (Fig. 1e).

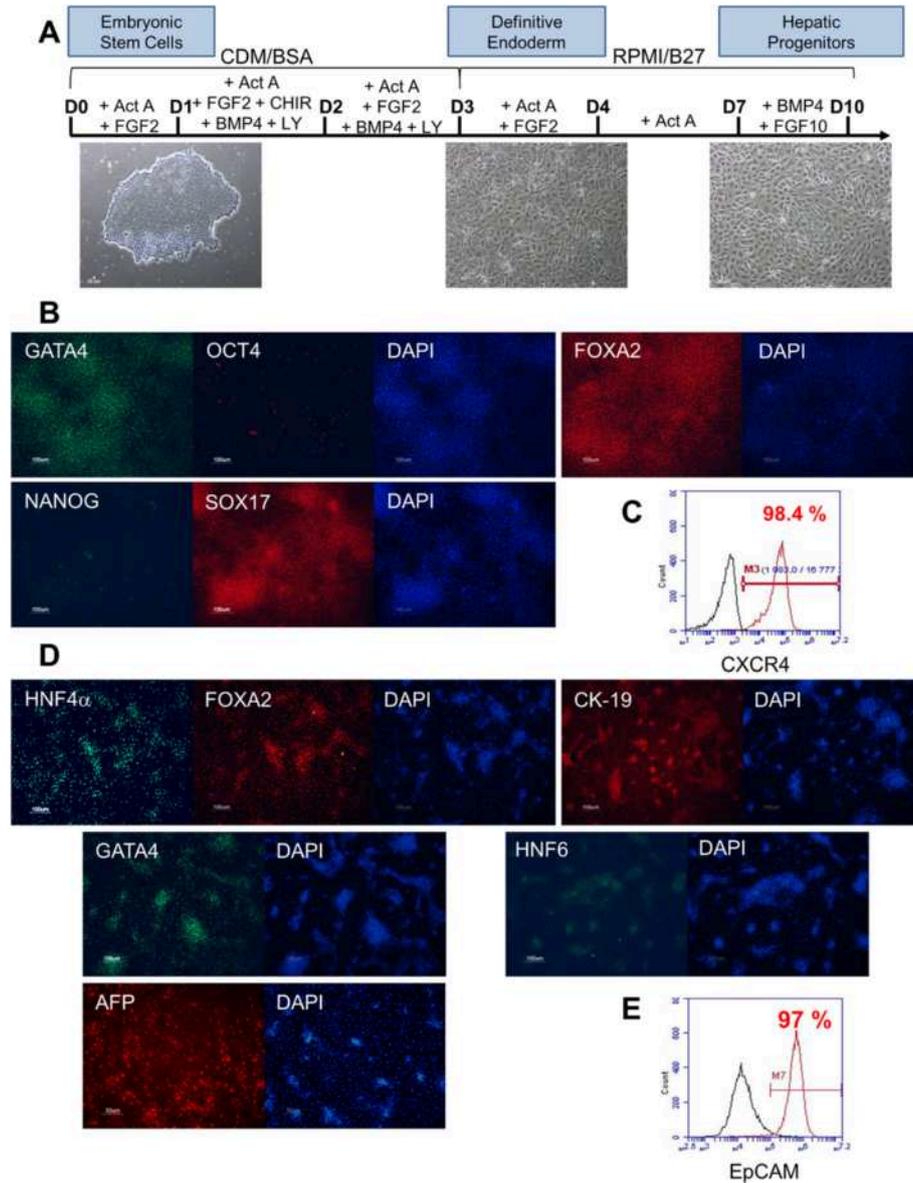
Transcriptional analysis of the in vitro differentiated progenitors demonstrated that these cells also expressed hepatic markers such as HNF4 $\alpha$ , AFP, FOXM1B, and LDLR (Fig. 3f).

Cryopreservation and thawing procedures have been reported to have detrimental effects on the viability and function of primary human hepatocytes when compared to freshly isolated cells [35]. The successful cryopreservation of human hepatic progenitors that retain high viability, as well as the ability to be cultured and further differentiated, would allow for long-term banking of the cells required for subsequent research and clinical applications. We therefore assessed the ability of VAL9-derived progenitors to be thawed and cultured post-cryopreservation. As shown in Additional file 4 (Figure S2A–D) the hepatic progenitors maintained their cuboid morphology and were able to proliferate and express hepatic-specific markers such as AFP, HNF4 $\alpha$ , FOXA2, CK19, EpCAM and AFP. Interestingly, the thawed cells also expressed claudin 1 (CLDN1), a co-receptor for hepatitis C virus (HCV) and a significant proportion of the cells also expressed CD81, another co-receptor for HCV. They also maintained a good viability (>80 %) along the post-thawing differentiation (Additional file 4: Figure S2D).

As the hepatoblasts are bipotent progenitors, they are able to give rise not only to hepatocytes but also to cholangiocytes; we therefore investigated the capacity of VAL9-hepatoblasts to differentiate into committed cholangiocyte precursors. Treatment of hepatoblasts with GH/EGF, then interleukin-6 allowed the cells to reach confluence at around day 17 (Fig. 2a). This population of proliferating biliary-committed cells expressed osteopontin (OPN), a downstream target of NOTCH during normal liver development, HNF6 and HNF1 $\beta$ , whereas HNF4 $\alpha$  expression was not detected, as shown by co-staining experiments with CK7/HNF4 $\alpha$  (Fig. 2b). When grown in three dimensions these cells were able to generate ducts and tubules which showed polarity as demonstrated with F-actin and  $\beta$ -catenin staining (Fig. 2c).

### Differentiation of VAL9 hepatic progenitors into VAL9-HEP

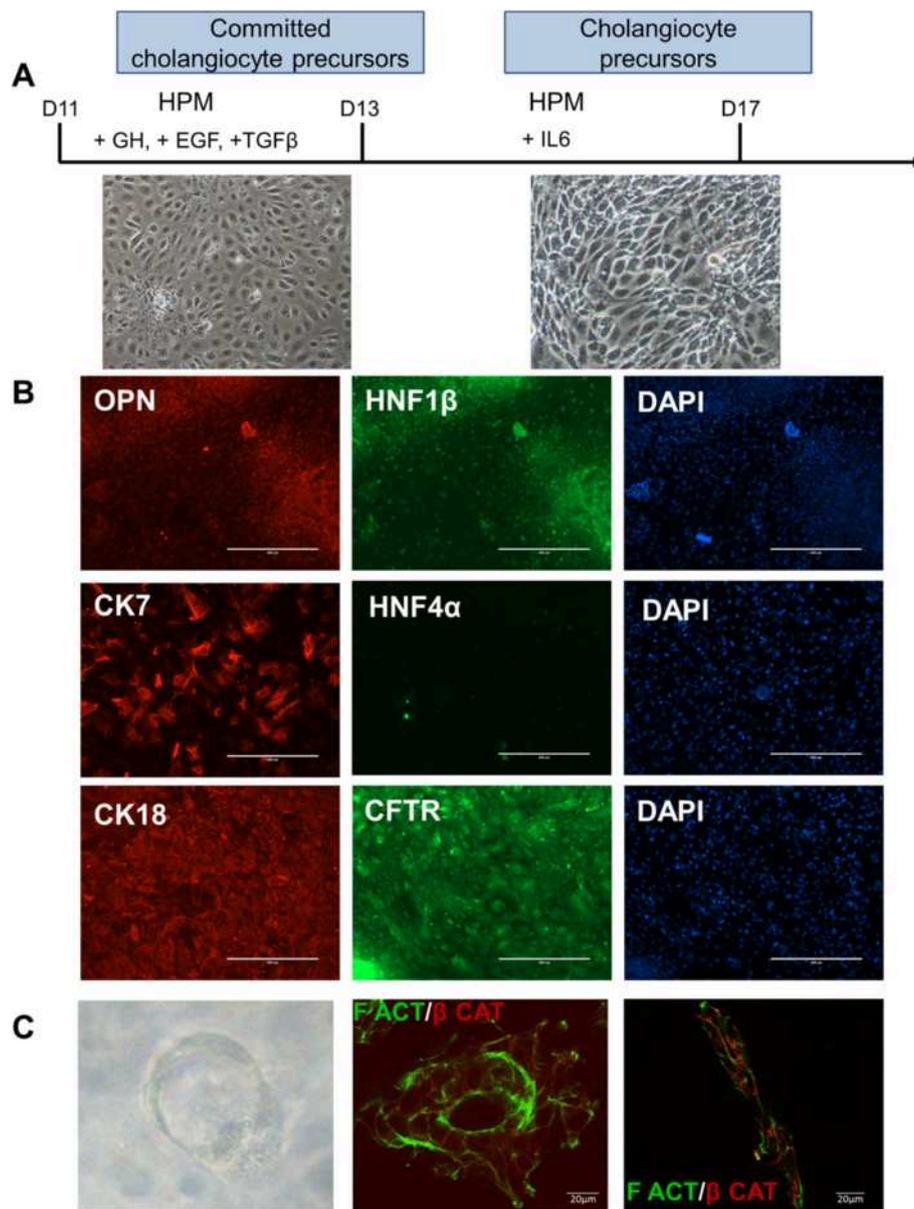
Confluent hepatic progenitors were passaged at a ratio of 1:2 onto collagen 1-coated plates and allowed to further differentiate in the presence of HGF in medium supplemented with 10 ng/ml oncostatin for 3 days in addition to several other hepatic maturation factors (see Methods section) (Fig. 3a). At the end of this protocol, the differentiated cells exhibited characteristic hepatic morphology presenting a polygonal shape and round single or double nuclei (Fig. 3b). Immunostaining of the differentiated VAL9-HEP showed that the cells were positive for alpha-1-antitrypsin (A1AT)



**Fig. 1** Differentiation of VAL9 hESCs into hepatic progenitors. **a** Stages of differentiation and phase contrast microscopy images showing corresponding cell morphology. **b** Representative images of immunofluorescence from definitive endoderm. Cells express GATA binding protein (GATA)4, SOX17, hepatic nuclear factor (HNF)3 $\beta$  and are negative for human octamer-binding transcription factor (OCT)4 and homeobox transcription factor (NANOG), two markers characteristic of undifferentiated cells. **c** Representative fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis of VAL9 at endoderm stage where 98.4 % cells were CXCR4-positive. **d** Representative immunofluorescence of hepatic progenitors. Cells express GATA4, HNF4 $\alpha$ , HNF6, HNF3 $\beta$ , cytokeratin (CK)19 and AFP. **e** Representative FACS analysis of VAL9 at hepatic progenitor stage where 97 % cells were epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)-positive.

and ALB and the hepatic transcription factors HNF4 $\alpha$  and HNF3 $\beta$ . Notably, ALB-expressing cells also expressed CYP3A4 (Fig. 3c). VAL9-HEP also expressed the entry cellular factors necessary for productive HCV infection, such as CD81 and CLDN1 (Fig. 3c). Fluorescence-activated cell sorting analysis revealed that 85 % of the cell population expressed ASGR, a cell surface receptor specifically expressed in the normal hepatocyte membrane (Fig. 3d).

The expression of liver-specific genes was assessed by quantitative reverse transcription PCR (Fig. 3e). The results showed the appearance of *HNF4 $\alpha$* , as expected, as early as day 11, and *ALB*, *MRP*, *UGT1A1*, *CYP1A2*, and *CYP2C9*, whereas expression of *OCT4* was abolished (Fig. 3e). The cells also expressed *ALB*, *LDLR* and the gene encoding the transcription factor *FOXM1B* as shown by RT-PCR (Fig. 3f).

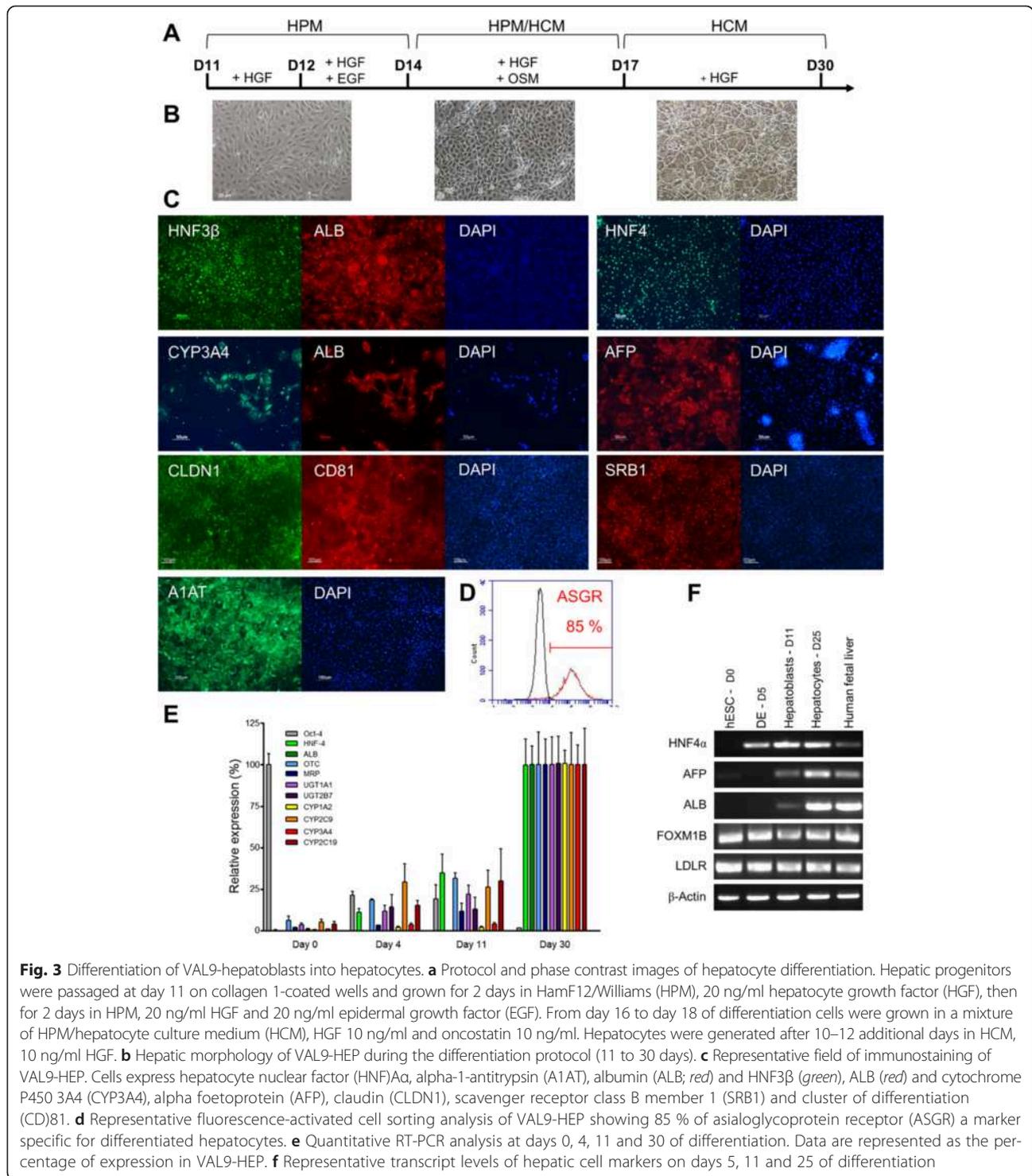


**Fig. 2** Differentiation of hepatoblasts into precursors of cholangiocytes. **a** Protocol and phase contrast images of cholangiocyte precursors. Hepatic progenitors were passed at day 11 onto collagen 1-coated wells and grown for 2 days in HamF12/Williams (HPM), 20 ng/ml HGF, then for 2 days in HPM, 20 ng/ml HGF and 20 ng/ml epidermal growth factor (EGF). From day 16 to day 18 of differentiation cells were grown in a mixture of HPM/HCM. **b** Representative field of immunostaining of cholangiocyte precursor cells. Cells express osteopontin (OPN), hepatic nuclear factor (HNF1) 1 $\beta$ , cytokeratin (CK)7, CK18, cystic fibrosis transmembrane receptor (CFTR) and are negative for HNF4 $\alpha$ , a hepatocyte transcription factor. **c** Representative phase contrast image ( $\times 40$ ) of cysts obtained 1 week after seeding in matrigel at day 18 of differentiation (*left panel*). Immunostaining of cyst (*middle panel*) and tubule (*right panel*) showing the polarity of the cells in these structures. GH Growth hormone, IL Interleukin, TGF Transforming growth factor

### Characterization of VAL9-HEP functions in vitro

VAL9-HEP demonstrated the ability to accumulate glycogen detected by PAS staining and these PAS-positive cells had the corresponding hepatocyte morphology. Moreover, the VAL9-HEP were responsive to hormones. Addition of insulin and glucose resulted in an increase in glycogen storage; by contrast, addition of glucagon to the cells

resulted in a significant depletion of glycogen content (Fig. 4a). We also examined the cellular uptake and excretion of ICG, an organic dye that is taken up and subsequently eliminated specifically by hepatocytes. The cellular uptake was observed in VAL9-HEP in a very high percentage of cells and the majority of the ICG was excreted within a few hours and almost

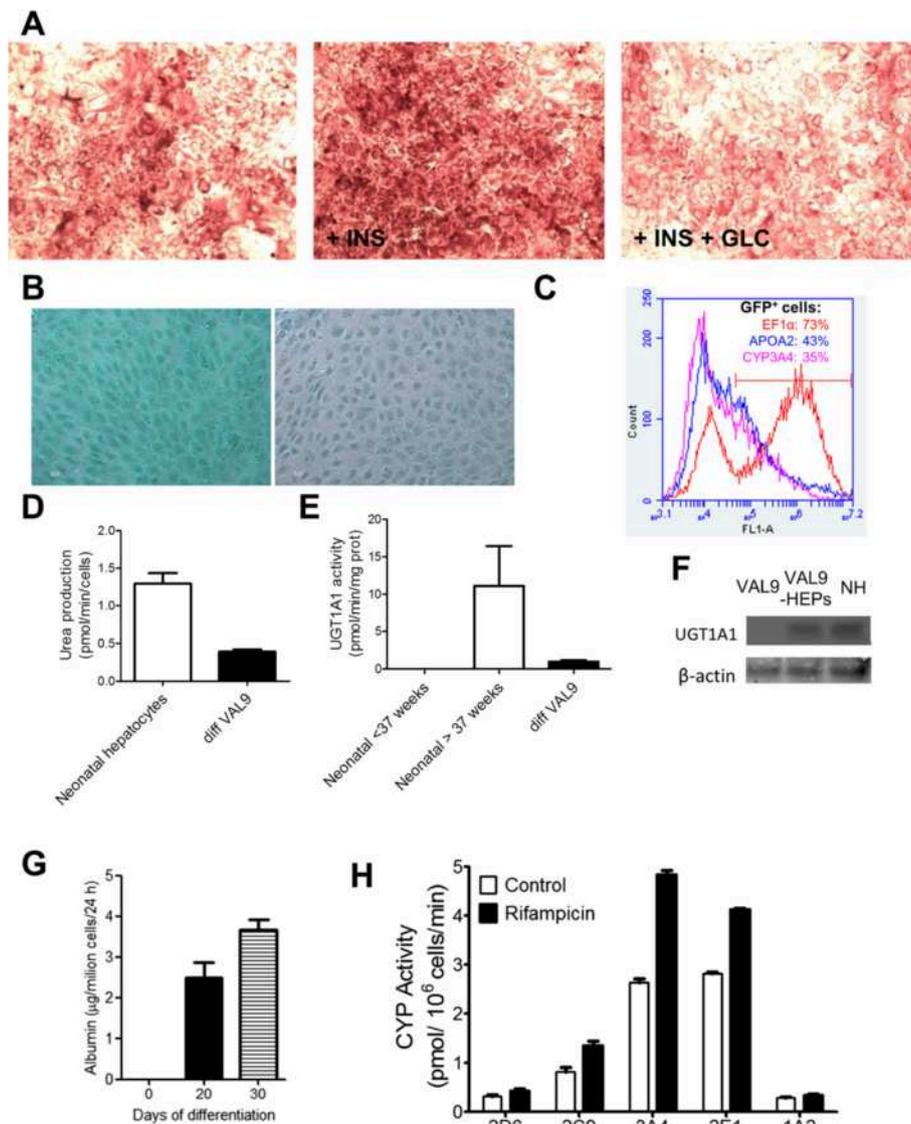


completely disappeared 24 hours later, indicating that a functional biotransforming system was generated in our VAL9-HEP (Fig. 4b).

An important function of hepatocytes is the ability to synthesize urea from ammonia and excrete it as urea. Therefore, we analysed the VAL9-HEP for urea excretion and compared the values to that of neonates [36]. We

found that the VAL9-HEP values represented 28 % of mean neonatal values: 0.36 nmol/min/10<sup>6</sup> cells and 1.30 ± 0.47 (0.76–2.19) nmol/min/10<sup>6</sup> cells, respectively (Fig. 4d).

In contrast to foetal hepatocytes, the VAL9-HEP displayed UGT1A1 activity (1 pmol/mg/min) representing 10 % of that of newborn hepatocytes (Fig. 4e). In order



**Fig. 4** Functional characterization of VAL9-HEP in vitro at day 30 of differentiation. **a** Glycogen storage was assessed by PAS staining. Cells were incubated with insulin  $10^{-7}$  M (INS) or INS  $10^{-7}$  M + glucagon  $10^{-6}$  M (GLC). **b** Cells were examined for uptake and excretion of ICG. **c** Differentiation of VAL9 hESCs was assessed by flow cytometry after transduction with lentivectors expressing green fluorescent protein (GFP) under the control of apolipoprotein A-II (*APOAII*) and cytochrome P450 3A4 (*CYP3A4*) promoters or *EF1a* promoter in control vectors. **d** Ureagenesis was assessed by measuring the formation of urea from  $\text{NH}_4^{++}$  after incubation of the cells for 24 hours in the presence of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and by comparison to neonate hepatocytes. **e** UDP glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) activity was assessed by incubating VAL9-HEP with  $15 \mu\text{M}$   $\beta$ -estradiol for 24 hours and by comparison to neonate hepatocytes. **f** Western blot analysis showing expression of uridine 5'-diphospho-(UDP) glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1 (UGT1A1) in VAL9-HEP and in neonatal hepatocytes (NH) using  $\beta$ -actin as loading control. **g** Human (h)ALB secreted to the media by VAL9-HEP after 20 and 30 days of differentiation. hALB was determined in the culture medium by ELISA. **h** CYP activity levels in VAL9-HEP were determined in cells exposed to  $25 \mu\text{M}$  rifampicin and were compared to the control cells. Cells were incubated for 24 hours with a cocktail of specific substrates as previously described [55]. Activity values are expressed as pmol of the corresponding metabolite formed per minute and per million cells

to assess the specificity of the assay, the expression of UGT1A1 was also assessed by western blot. The VAL9-HEP expressed UGT1A1 when compared to undifferentiated VAL9, where the protein was not detected (Fig. 4f).

Another important function displayed by mature hepatocytes is serum protein production. ALB secretion was

assessed using ELISA, and confirmed that post 20 and 30 days of differentiation ALB-secreting VAL9-HEP were generated, indicating their successful maturation (Fig. 4g).

The drug detoxification capability of VAL9-HEP was assessed by measuring the activities of the major

cytochrome P450 enzymes responsible for the oxidative metabolism of drugs in the human liver (CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1 and CYP3A4). Differentiated cells displayed significant cytochrome P450 activity (Fig. 4f). An important property of hepatocyte function is the ability to respond to compounds able to induce the biosynthesis of an isozyme. The activity of CYP3A4 was significantly increased (100 %) when cells were treated with rifampicin when compared with untreated VAL9-HEP (Fig. 4h).

#### Differentiation of hiPSCs

hiPSCs were differentiated using the same protocol as described above for VAL9 hESCs. As in VAL9 differentiation, hiPSC gave rise to a homogeneous population of endoderm cells expressing GATA4 and FOXA2 at day 5, then to bipotent progenitors expressing HNF4 $\alpha$  and CK19 at day 11. They further differentiated into hiPSC-HEP expressing AFP and ALB (Additional file 5: Figure S3A–C). After 26 days of differentiation, hiPSC-HEP expressed hepatocytes markers, although the levels of gene expression were lower than in VAL9-HEP (Additional file 3: Figure S3E).

#### VAL9-HEP rescue acetaminophen-induced ALF

A major challenge for stem cell-derived HLCs is their limited ability to mimic their *in vivo* counterparts. To assess the therapeutic potential of VAL9-HEP *in vivo*, we used the well-defined model of acetaminophen toxicity (APAP) in immunocompromised mice, which mimics ALF. This model was chosen because consistent hepatotoxicity has been shown in murine models and hepatocyte damage occurs at doses similar to those reported to provoke damage in human liver [37]. ALF is a multistep process that involves apoptosis followed by necrosis of hepatocytes in humans.

A dose of acetaminophen at 300 mg/kg body weight resulted in lethality in 50 % of the control animals 2 weeks after the administration of APAP.

Histological analysis indicated the presence of massive necrosis in the liver which became apparent as soon as 3 hours after APAP injection (Fig. 5b) and was concomitant with the release of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in the circulation (Fig. 5e).

To genetically trace the transplanted cells *in vivo*, VAL9-HEP were transduced *in vitro* with a GFP-expressing lentiviral vector under the control of the hepatic specific promoter of the human *AIAT* gene. Thus, GFP was expected to be expressed in the differentiated VAL9 cells only. As shown in Fig. 5a, 75 % of the transduced VAL9-HEP expressed GFP, suggesting that the majority of the transduced cells were differentiated hepatocytes.

VAL9-HEP transplantation resulted in a three- and fivefold reduction in AST and ALT values, respectively, when compared to control animals (Fig. 5f).

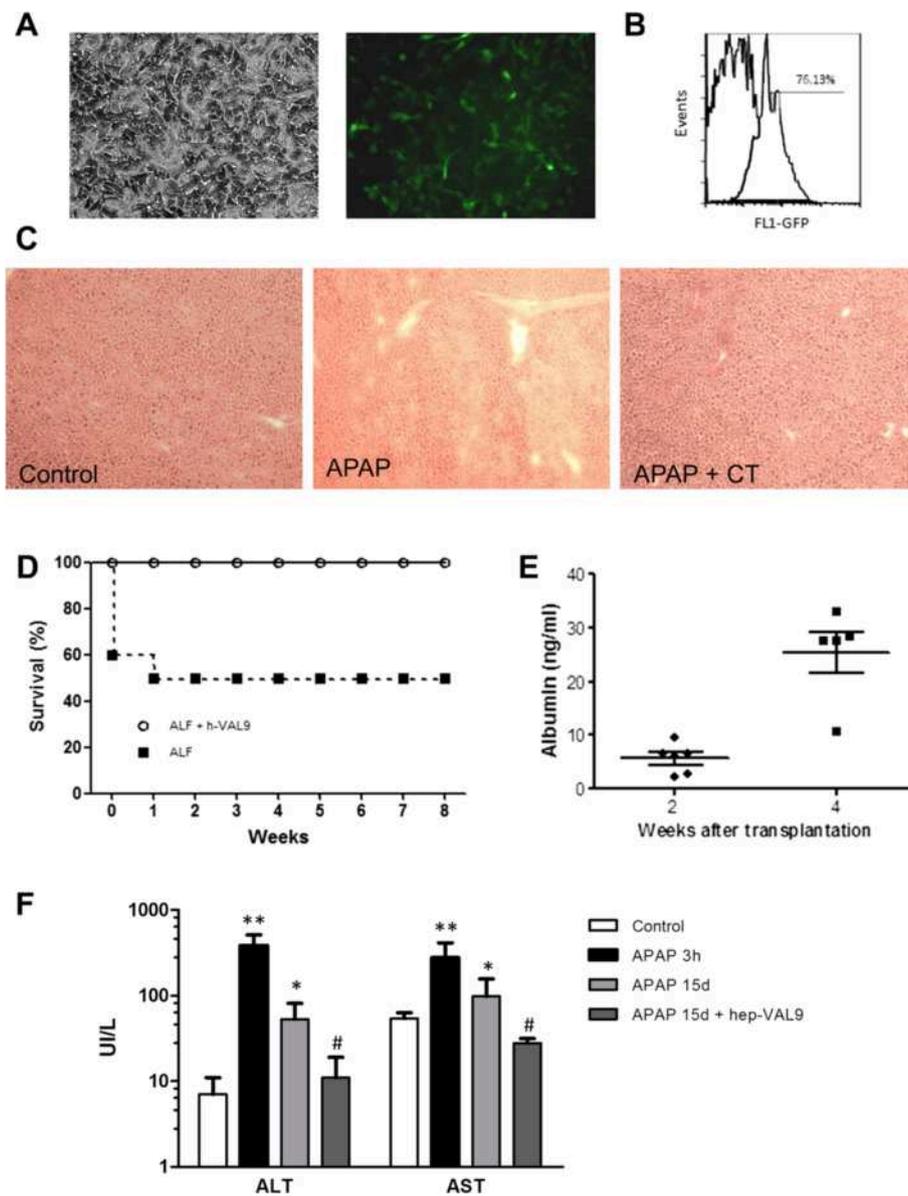
Fifty percent of the untreated control animals with ALF died within 2 weeks of transplantation, whereas all the animals which were transplanted with VAL9-HEP survived, indicating a survival advantage for those animals receiving cell therapy (Fig. 5c). Thus, the VAL9-HEP display sufficient detoxifying enzyme activity required to rescue the animals. Transplanted mice were sacrificed at three time points (2, 4 and 8 weeks) after transplantation. To verify that the transplanted hepatocytes homed towards the liver without migrating to other organs, we analysed the transplanted cell distribution in other organs such as the spleen and lungs 8 weeks after transplantation. No human cells were detected in any of the analysed organs as assessed by immunohistochemistry (IHC) against GFP (data not shown). IHC revealed that the liver displayed a normal histology with no sign of tumours (data not shown). The spleen, lung and kidneys were also normal. No signs of adenocarcinomas were visible in the peritoneum (data not shown).

#### Engraftment of VAL9-HEP in APAP-treated mice

In order to investigate whether the transplanted cells were engrafted within the livers of the recipient mice, we first used an antibody against GFP to detect the presence of human VAL9-HEP. Human cells were visible throughout the liver parenchyma in the form of clusters. This indicates that, in response to liver failure, the transplanted cells have not only engrafted but also proliferated (Fig. 6a). GFP-expressing VAL9-HEP were found in all the mice analysed ( $n = 8$ ). By counting several sections from each mouse and different lobes we calculated that the percentage of liver repopulation ranged from 0.6 to 10.2 % of the liver parenchyma. Since 75 % of transplanted cells expressed GFP, the proportion of engrafted cells is underestimated.

Human ALB was then measured using ELISA in the sera of transplanted mice and control non-transplanted mice for 2 and 4 weeks post-engraftment (Fig. 5e). Human ALB was detected in every injected mouse, confirming the successful engraftment of VAL9-HEP.

In addition, the hepatic functions of the engrafted VAL9-HEP were identified using IHC; namely the detection of human ALB expression. A large number of positive cells co-expressing ALB and GFP were detected in the parenchyma at 4 weeks after transplantation confirming that VAL9-HEP were integrated and functional post-transplantation. We also performed co-immunostaining on sections of engrafted livers at day 30 and compared them to the VAL9-HEP used for the transplantation. Before transplantation a significant proportion

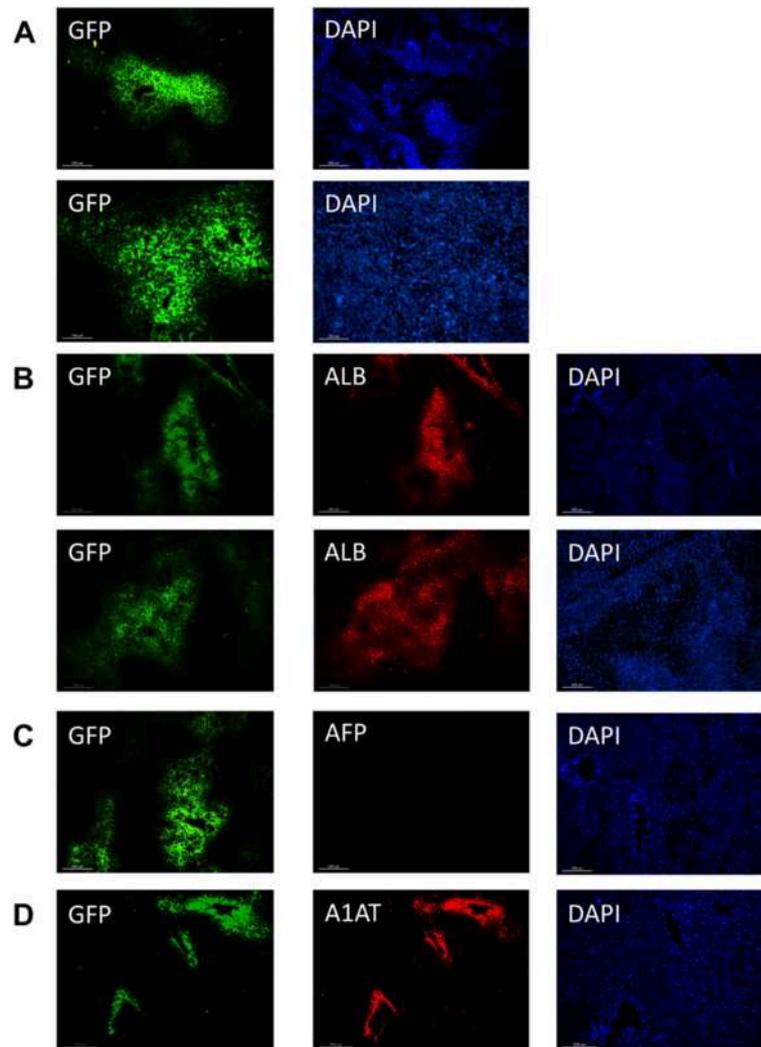


**Fig. 5** VAL9- HEP can rescue acetaminophen (APAP)-induced acute liver failure (ALF). **a** Representative images of transduced VAL9-HEP (phase-contrast and fluorescence) for green fluorescent protein (GFP). **b** Flow cytometry analysis of GFP expression from transduced VAL9-HEP 2 days after transduction with A1AT-GFP lentivector. The numbers indicate the percentages of GFP-positive cells in the analyzed gate. **c** Representative histopathology of livers of control, acetaminophen-treated mice and acetaminophen-treated mice after transplantation with VAL9-HEP. **d** Survival curves of immunodeficient mice (n = 10 in each group) that received intrasplenic cell transplantation with  $1.0 \times 10^6$  VAL9-derived hepatocytes. **e** Secreted ALB in the serum of transplanted animals at different time points. **f** Liver function test after infusion of acetaminophen then saline or VAL9-HEP at different time points. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  versus control; # $p < 0.05$  versus APAP-treated mice. ALT Alanine aminotransferase, AST Aspartate aminotransferase

of VAL9-HEP expressed AFP (Fig. 3). However, 4 weeks after transplantation all engrafted ALB-positive cells were negative for human AFP expression, demonstrating that it was downregulated as in endogenous hepatocytes (Fig. 6c). Non-transplanted control liver tissues were negative for human proteins (data not shown). Together, these results demonstrate that engrafted VAL9-HEP underwent maturation in situ.

### Discussion

We report the development of a new strategy to generate a homogenous population of hepatocytes. We used a new cohort of hESC, VAL9 cells, which were established in traceable conditions easily transposable to Good Manufacturing Practice (GMP) compatible conditions. We demonstrate that VAL9 hESCs can be efficiently differentiated, recapitulating the key stages of liver development,



**Fig. 6** Engraftment of VAL9-HEP in the liver parenchyma of transplanted acetaminophen-treated mice. **a** Visualization of engrafted cells 30 days post-transplantation using immunohistochemistry (IHC) to detect green fluorescent protein (GFP). The clusters confirm proliferation of engrafted cells. **b** Representative IHC staining on serial sections showing co-expression of GFP and albumin (ALB). **c** Representative IHC staining on serial sections demonstrating downregulation of alpha foetoprotein (AFP). **d** Representative IHC staining on serial sections showing co-expression of GFP and alpha-1-anti-trypsin (A1AT)

into viable hepatic cells with various hepatocyte-specific functions both *in vitro* and *in vivo*, where the hepatocytes were able to rescue mice with ALF. This was accomplished by the stepwise addition of defined factors, without the addition of mesenchymal or endothelial cells or any other liver cells that normally accompany hepatocyte development, nor serum or complex matrixes. However, although recombinant proteins such as fibronectin can be used (unpublished data), we utilized gelatin for cell differentiation up to hepatoblast stage and then collagen which is the matrix currently used for primary cell culture. Although in our experiments both of these matrix components were from animal origin, it is noteworthy that GMP-compatible, recombinant human collagen is now available as well as GMP-grade gelatin, suggesting that in

the near future differentiation of pluripotent stem cells into hepatocytes will be possible under conditions appropriate for clinical applications. hiPSCs were also differentiated into hepatocyte-like cells following the same protocol used with VAL9-hESCs, highlighting the therapeutic potential of our approach.

At the progenitor stage, hepatoblasts could be cryopreserved and further differentiated into hepatocytes. They were also successfully induced to differentiate along the cholangiocyte lineage as previously reported [34], although conditions for further differentiation need to be improved.

At the hepatocyte stage, VAL9-HEP retain some characteristics of foetal hepatocytes, such as expression of AFP. However, the differentiated cells reproduce key features of

mature hepatocytes, such as ICG metabolism. Due to the importance of maintaining blood glucose levels, the synthesis and degradation of hepatic glycogen, the storage form of glucose in the liver, are tightly regulated and the binding of hormones, such as glucagon, to cell receptors signals the need for glycogen to be degraded. Although the signalling pathways were not investigated, our data show that, upon the addition of glucagon, the amount of glycogen storage decreased in VAL9-HEP. It should be noted that fresh and thawed VAL9-HEP also exhibited the expression of receptors known to be involved in HCV infection.

Different strategies have been used to improve the differentiation of the hepatocyte-like cells (HLCs) *in vitro*, such as the use of special matrices, co-culture with stromal cells or purification of hepatoblasts [20, 38, 39]. However, to date, a protocol has yet to be developed resulting in the maturation of the HLCs at a comparable level to that of primary adult hepatocytes. This was reported by Baxter and colleagues after the extensive characterization of several hESC and iPSC lines including the evaluation of CYP activities [18]. To date, the expression of cytochrome P450 enzymes was mostly studied at the transcriptional level and CYP activities, when measured, were assessed by luminometry, which was misleading [18].

Drug-metabolizing enzymes are expressed at negligible or very low levels in the foetus. Recently, we have demonstrated the importance of both gestational and post-natal development for the maturation of CYPs in neonatal hepatocytes [36]. CYP2D6 and CYP1A2 activity was not detected in the younger neonatal hepatocytes [36]. Although CYP3A4 activity was low in VAL9-HEP, CYP2D6 and CYP1A2 activities were in the range of that detected in new-born hepatocytes, suggesting that the “adult” levels could be reached in transplanted cells after *in vivo* maturation.

Urea is formed within the urea cycle and represents the major end-product of ammonia detoxification in the liver. It is a good indicator of the degree of hepatocyte mitochondria preservation. VAL9-HEP were able to synthesize urea from ammonia at rates representing one-quarter to one-half of neonate values, indicating that this pathway is active in our cells [36]. The cells also displayed UGT1A1 activity, representing one-tenth of neonate values. In humans, UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) are an important group of Phase II (conjugative) metabolizing enzymes that play a critical role in human health and disease. UGTs are involved in the metabolism and detoxification of numerous endogenous compounds and xenobiotic chemicals including therapeutic agents such as acetaminophen [40]. The activity of UGT1A1, the major enzyme responsible for bilirubin glucuronidation, is not detected in the foetal liver [41]; it is induced after birth,

which accounts for the onset of hyperbilirubinemia. Interestingly, type 1 Crigler-Najjar syndrome, a genetic deficiency in hepatic UGT1A1, is a metabolic disorder treated by hepatocyte transplantation.

Since transplantation of foetal stem or progenitor cells into livers of immunodeficient mice resulted in cell expansion and maturation [27, 28, 42, 43], we evaluated these properties after VAL9-HEP transplantation. It was reported that immature iPSC-derived HLCs (with a few cells weakly positive for CYP3A4) could engraft in Mu-uPA SCID transgenic mice expressing urokinase in the liver [44]. This model has been widely employed to produce an ideal chronic liver injury model used for transplanting primary hepatocytes and HLCs. Several studies suggest that uPA facilitates the engraftment and proliferation of transplanted hepatocytes. In liver regeneration, uPA activates plasminogen, which degrades the extracellular matrix to promote reorganization of the hepatic architecture [45]. In a model of CCL4-intoxicated animals, subpopulations of HLCs were transplanted after laser microdissection and pressure capturing, which selected for ICG high cells. This resulted in 10 % of ALB-expressing cells [26]. Although these models cannot be transposed to clinical situations, the data suggest that the maturity level of the pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells plays a vital role in the efficiency of engraftment.

To assess the function of VAL9-HEP, we chose the mouse model of APAP-induced hepatotoxicity due to its clinical relevance. APAP overdose accounts for the majority of cases of drug liver injury resulting in fatal ALF [46]. It has become the most common cause of ALF in the United Kingdom and accounts for approximately half of ALF cases in the United States [47, 48].

Our data show significant engraftment of VAL9-HEP in the liver parenchyma for at least 1 month. The efficiency of repopulation was approximately 15 %. Given that a mean of 75 % of hepatocytes expressed GFP prior to transplantation, efficiency of repopulation is underestimated and should more likely represent 18–20 %. Importantly, the engrafted cells also demonstrated *in vivo* maturation.

Moreover, it is imperative that therapeutically advantageous hepatocyte-like cells are safe (i.e. non tumorigenic), express hepatic-specific genes comparable to mature hepatocytes, and contribute to liver function *in vivo* as demonstrated by VAL9-HEP. The potential of hESCs and their differentiated progeny to generate spontaneous tumours is of particular concern with regards to their use in clinical applications. Several reports show tumour formation post-transplantation of hESC-derived cells despite pre-differentiation [10, 49–51] and demonstrate that the transplanted cells contain a number of undifferentiated hESCs [52]. On the other hand, additional studies have demonstrated that the transplantation of

highly differentiated cells did not result in tumour formation [53, 54], thus suggesting that directing hESCs to an appropriate state is an important step for their safe and effective use in cell therapies. To this end, well-defined methods should be established to reduce the tumorigenicity of transplanted cells and a strict elimination of undifferentiated hESCs from transplanted cells [55, 56]. In our VAL9-HEP engrafted mice, we investigated the appearance of tumours at the time of sacrifice. No sign of tumour formation was evident in grafted livers or in other major organs. However, additional long-term studies are required to confirm the ultimate safety of VAL9-HEP.

We demonstrate in this study, for the first time, that engrafted human VAL9-HEP are able to rescue mice with ALF. This was evaluated by the significant decrease in AST and ALT and by the rescue of transplanted animals. The data suggest that the VAL9-HEP expressed sufficient levels of detoxification enzymes at the time of transplantation. Different models show a correlation between the number of infused cells and the percentage of repopulation; up to 2 to 7 M HLCs were infused per mouse [25, 26, 44]. We infused a significantly lower amount of cells, 1 million, which corresponds to 1–1.5 % of the mouse hepatocyte mass, which was enough to rescue half of the animals. Interestingly, hepatocytes derived from the HepaRG cell line were able to rescue CCL4-treated animals only when the cells were transduced with LXR $\alpha$  [57].

In humans, transplanting no more than 1–2 % of liver mass per cell infusion is recommended in order to avoid portal hypertension [58–60]. The scarce supply of donated cadaveric livers combined with the fact that mature hepatocytes display short-term survival, poor in vitro proliferation and tolerance to cryopreservation, results in limited transplantation options for patients, as well as use in other applications such as high-throughput drug screening. Clinical trials have been ongoing for years to assess the effects of foetal liver cells transplanted into patients with various liver diseases, in particular cirrhosis or inborn metabolic diseases [61]. Recently, a clinical trial was performed with freshly isolated biliary tree stem cells to treat patients with advanced cirrhosis. This procedure resulted in a 6- to 12-month improvement in both biochemical and clinical features [62].

Immunosuppression is an important issue in cell therapy strategies for liver diseases, but optimal regimens for inducing tolerance to transplanted liver cells are not well established. Even if hESC-hepatocytes could be antigen-matched to the recipient, immunosuppression would still be required, since hESCs express low levels of HLA class I antigens [63] and they are still subjected to immune system targeting. Therefore, this question will have to be addressed, but in a

specific study using embryonic stem cells and an animal model from the same species.

The strategy that we describe here may address the problem of cell limitation, as it utilizes a renewable cell source. It offers the advantage of immediate availability and unlimited supply of functional donor hepatocytes for emergency treatments required by patients with ALF when an organ is not immediately available. In addition, unrestricted availability of donor hepatocytes could allow programmed and repeated treatment of patients with debilitating, liver-based metabolic disorders, which are not now considered candidates for organ transplantation, such as familial hypercholesterolemia and partial urea cycle disorders. The generation of hepatocytes also provides a potentially useful step toward the generation of hepatic organs. Tissue engineering of a hepatic organ will require the incorporation of hepatic niche cells, such as mesenchymal, stellate, endothelial cells and cholangiocytes, into cultures of stem cell-derived hepatocytes [64, 65].

## Conclusions

In summary, our strategy allows the stepwise differentiation in defined conditions of the new VAL9 hESC line into bipotent progenitors that are able to give rise to cholangiocyte precursors, then into neonate-like hepatocytes with detoxification activities. VAL9-HEP were able to successfully engraft and proliferate into mice livers suffering from acute failure in a clinically relevant model, resulting in a decrease of transaminases to control levels and the rescue of transplanted mice. Taken together, our data suggest that cell therapy using hESC-derived hepatocytes may be an effective treatment for liver diseases.

## Additional files

**Additional file 1: Table S1.** Antibodies used in this study. (PDF 48.5 KB)

**Additional file 2: Table S2.** Primers used for RT-PCR of Human mRNAs. (PDF 79.6 KB)

**Additional file 3: Figure S1.** Pluripotency of VAL9 hESCs. (A) Phase-contrast image of a representative VAL9 hESC colony. (B) Representative immunofluorescence staining for human OCT-4, NANOG and TRA1-60. (C) Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis of the expression of stem cell specific surface markers: TRA1-81, SSEA-3, SSEA-4. (D) Karyotype analysis of VAL9 hESCs. (TIF 4911 kb)

**Additional file 4: Figure S2.** Cryopreservation of VAL9-hepatoblasts. (A) Phase-contrast image of a representative VAL9-hepatoblasts at day 15 of differentiation before (fresh) and after cryopreservation (4 days after thawing). (B) Phase-contrast image of a representative VAL9-hepatoblasts at day 20 of differentiation (9 days after thawing). (C) Representative immunofluorescence staining for human cytokeratin (CK)19, hepatic nuclear factor (HNF)1 $\alpha$ , alpha foetoprotein (AFP), FOXA2 ; and co-staining for human hepatic nuclear factor (HNF)4 $\alpha$ /epithelial cell adhesion molecule (EpcAM), and for human claudin (CLDN)1/CD81. (D) Representative fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis for cell viability of thawed VAL9 cells at different time points after thawing as detected by 7AAD staining (TIF 5667 kb)

**Additional file 5: Figure S3.** Differentiation of hiPSCs into hepatocytes. **(A)** Phase contrast microscopy images of cell morphology at different key steps of the differentiation protocol. **(B)** Representative immunofluorescence staining of definitive endoderm. Cells express GATA binding protein (GATA)4, and hepatic nuclear factor (HNF)3 $\beta$  (FOXA2). **(C)** Representative immunofluorescence staining of hepatic progenitors. Cells express HNF4 $\alpha$ , cytokeratin (CK)19, FOXA2 and GATA4. **(D)** Representative immunofluorescence staining of hepatic progenitors. Cells express HNF4 $\alpha$ , AFP and ALB. **(E)** Quantitative RT-PCR analysis at day 0,4,11 and 30 of differentiation of hiPSCs. Data are expressed as a percentage of the value obtained for differentiated VAL9 cells. (TIF 6373 kb)

### Abbreviations

A1AT: Alpha-1-anti-trypsin; AFP: Alpha foetoprotein; ALB: Albumin; ALF: Acute liver failure; ALT: Alanine aminotransferase; APAP: Acetaminophen; ASGR: Asialoglycoprotein receptor; AST: Aspartate aminotransferase; BDM: Biliary differentiation media; bFGF: Basic fibroblast growth factor; BSA: Bovine serum albumin; CD81: Cluster of differentiation 81 (tetraspanin 28); CHIR99021: Glycogen synthase kinase 3 inhibitor; CK: Cytokeratin; CLDN1: Claudin 1; CYP3A4: Cytochrome P450 3A4; DE: Definitive endoderm; EGF: Epidermal growth factor; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; EpCAM: Epithelial cell adhesion molecule; FGF: Fibroblast growth factor; GATA4: GATA binding protein 4; GFP: Green fluorescent protein; GMP: Good Manufacturing Practice; HCM: Hepatocyte culture medium; HCV: Hepatitis C virus; hESC: Human embryonic stem cell; HGF: Hepatocyte growth factor; HLC: Hepatocyte-like cell; ICG: Indocyanine green; hiPSC: Human induced pluripotent stem cell; HLC: Hepatocyte-like cell; HNF: Hepatocyte nuclear factor; HPLC/MS: High-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; HPM: HamF12/Williams; IHC: Immunohistochemistry; LY294002: Phosphoinositide-3-kinase inhibitor; MOI: Multiplicity of infection; NANOG: Homeobox transcription factor; OCT4: Octamer-binding transcription factor 4; OPN: Osteopontin; PAS: Periodic acid-Schiff; PBS: Phosphate-buffered saline; PCT: Polymerase chain reaction; SOX: Sex determining region box; TRA-1-60: Tumour resistance antigen 1-60; UGT: UDP glucuronosyltransferase; VAL9-HEP: VAL9 hepatocytes.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Authors' contributions

LT was involved in conception and design, data collection, analysis and interpretation, and manuscript writing. JC and ZH were involved in data collection, analysis and interpretation and manuscript writing. MA and SL were involved in data collection and in drafting the manuscript. DB made critical contributions to conception, design and implementation and manuscript writing. JVC was involved in analysis and interpretation and critical reading of the manuscript. AW, MJGL and ADK conceived the project, interpreted the results, supervised the work and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### Acknowledgements

This work was supported by the European Commission's Seventh Framework Programme FP7-HEALTH.2011.1.4.2 under grant agreement No. 278152 "InnovaLiv", and from French National Research agency (ANR, 2010-RFCS-004 « Liv-IPS »). LT was a recipient of a Sara Borrell Contract from the "Instituto de Salud Carlos III" of the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. JC has a fellowship from the French Ministry of Research. ZH and MA were supported by the InnovaLiv grant.

### Author details

<sup>1</sup>INSERM, U 1193, Hôpital Paul Brousse, Villejuif F-94807, France. <sup>2</sup>Unidad de Hepatología Experimental, IIS LA Fe, Valencia S-46026, Spain. <sup>3</sup>Univ Paris-Sud, UMR-S 1193, Villejuif F-94800, France. <sup>4</sup>DHU Hepatinov, Villejuif F-94800, France. <sup>5</sup>CIBERDEM, Centro de Investigación Principe Felipe, Valencia S-46012, Spain. <sup>6</sup>CIBERehd, FIS, Barcelona S-08036, Spain.

Received: 2 June 2015 Revised: 25 October 2015

Accepted: 6 November 2015 Published online: 12 December 2015

### References

- Dhawan A, Puppi J, Hughes RD, Mitry RR. Human hepatocyte transplantation: current experience and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;7(5):288–98. doi:10.1038/nrgastro.2010.44.
- 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):1–10. doi:10.3727/096368911X566208.
- Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A. Current status of hepatocyte transplantation. *Transplantation*. 2012;93(4):342–7. doi:10.1097/TP.0b013e31823b72d6.
- Schwartz SD, Regillo CD, Lam BL, Elliott D, Rosenfeld PJ, Gregori NZ, et al. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet*. 2015;385(9967):509–16. doi:10.1016/S0140-6736(14)61376-3.
- Lemaigre FP. Mechanisms of liver development: concepts for understanding liver disorders and design of novel therapies. *Gastroenterology*. 2009;137(1):62–79. doi:10.1053/j.gastro.2009.03.035.
- Zaret KS, Carroll JS. Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes Dev*. 2011;25(21):2227–41. doi:10.1101/gad.176826.111.
- Vallier L, Touboul T, Chng Z, Brimpari M, Hannan N, Millan E, et al. Early cell fate decisions of human embryonic stem cells and mouse epiblast stem cells are controlled by the same signalling pathways. *PLoS One*. 2009;4(6):e6082. doi:10.1371/journal.pone.0006082.
- D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazer S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol*. 2005;23(12):1534–41. doi:10.1038/nbt1163.
- Duan Y, Catana A, Meng Y, Yamamoto N, He S, Gupta S, et al. Differentiation and enrichment of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells in vitro and in vivo. *Stem Cells*. 2007;25(12):3058–68. doi:10.1634/stemcells.2007-0291.
- Basma H, Soto-Gutierrez A, Yannam GR, Liu L, Ito R, Yamamoto T, et al. Differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived hepatocytes. *Gastroenterology*. 2009;136(3):990–9. doi:10.1053/j.gastro.2008.10.047.
- Cai J, Zhao Y, Liu Y, Ye F, Song Z, Qin H, et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology*. 2007;45(5):1229–39. doi:10.1002/hep.21582.
- Hay DC, Fletcher J, Payne C, Terrace JD, Gallagher RC, Snoeys J, et al. Highly efficient differentiation of hESCs to functional hepatic endoderm requires ActivinA and Wnt3a signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(34):12301–6. doi:10.1073/pnas.0806522105.
- Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, Li J, Battle MA, Duris C, et al. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology*. 2010;51(1):297–305. doi:10.1002/hep.23354.
- Roelandt P, Pauwelyn KA, Sancho-Bru P, Subramanian K, Bose B, Ordovas L, et al. Human embryonic and rat adult stem cells with primitive endoderm-like phenotype can be fated to definitive endoderm, and finally hepatocyte-like cells. *PLoS One*. 2010;5(8):e12101. doi:10.1371/journal.pone.0012101.
- Chen YF, Tseng CY, Wang HW, Kuo HC, Yang VW, Lee OK. Rapid generation of mature hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells by an efficient three-step protocol. *Hepatology*. 2012;55(4):1193–203. doi:10.1002/hep.24790.
- Touboul T, Hannan NR, Corbineau S, Martinez A, Martinet C, Branchereau S, et al. Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions that recapitulate liver development. *Hepatology*. 2010;51(5):1754–65. doi:10.1002/hep.23506.
- Rashid ST, Corbineau S, Hannan N, Marciniak SJ, Miranda E, Alexander G, et al. Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. *J Clin Invest*. 2010;120(9):3127–36. doi:10.1172/JCI43122.
- Baxter M, Withey S, Harrison S, Segeritz CP, Zhang F, Atkinson-Dell R, et al. Phenotypic and functional analyses show stem cell-derived hepatocyte-like cells better mimic fetal rather than adult hepatocytes. *J Hepatol*. 2015;62(3):581–9. doi:10.1016/j.jhep.2014.10.016.
- Hannan NR, Segeritz CP, Touboul T, Vallier L. Production of hepatocyte-like cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*. 2013;8(2):430–7.
- Yang G, Si-Tayeb K, Corbineau S, Vernet R, Gayon R, Dianat N, et al. Integration-deficient lentivectors: an effective strategy to purify and

- differentiate human embryonic stem cell-derived hepatic progenitors. *BMC Biol.* 2013;11:86. doi:10.1186/1741-7007-11-86.
21. Kubota H, Yao HL, Reid LM. Identification and characterization of vitamin A-storing cells in fetal liver: implications for functional importance of hepatic stellate cells in liver development and hematopoiesis. *Stem Cells.* 2007;25(9):2339–49. doi:10.1634/stemcells.2006-0316.
  22. Lozoya OA, Wauthier E, Turner RA, Barbier C, Prestwich GD, Guilak F, et al. Regulation of hepatic stem/progenitor phenotype by microenvironment stiffness in hydrogel models of the human liver stem cell niche. *Biomaterials.* 2011;32(30):7389–402. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.06.042.
  23. Haridass D, Yuan Q, Becker PD, Cantz T, Iken M, Rothe M, et al. Repopulation efficiencies of adult hepatocytes, fetal liver progenitor cells, and embryonic stem cell-derived hepatic cells in albumin-promoter-enhancer urokinase-type plasminogen activator mice. *Am J Pathol.* 2009;175(4):1483–92. doi:10.2353/ajpath.2009.090117.
  24. Asgari S, Moslem M, Bagheri-Lankarani K, Pournasr B, Miryounesi M, Baharvand H. Differentiation and transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells. *Stem Cell Rev.* 2013;9(4):493–504. doi:10.1007/s12015-011-9330-y.
  25. Liu H, Kim Y, Sharkis S, Marchionni L, Jang YY. In vivo liver regeneration potential of human induced pluripotent stem cells from diverse origins. *Sci Transl Med.* 2011;3(82):82ra39. doi:10.1126/scitranslmed.3002376.
  26. Woo DH, Kim SK, Lim HJ, Heo J, Park HS, Kang GY, et al. Direct and indirect contribution of human embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells to liver repair in mice. *Gastroenterology.* 2012;142(3):602–11. doi:10.1053/j.gastro.2011.11.030.
  27. 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(19):3396–405. doi:10.1016/j.yexcr.2009.07.007.
  28. Mahieu-Caputo D, Allain JE, Branger J, Coulomb A, Delgado JP, Andreoletti M, et al. Repopulation of athymic mouse liver by cryopreserved early human fetal hepatoblasts. *Hum Gene Ther.* 2004;15(12):1219–28. doi:10.1089/hum.2004.15.1219.
  29. Malhi H, Irani AN, Gagandeep S, Gupta S. Isolation of human progenitor liver epithelial cells with extensive replication capacity and differentiation into mature hepatocytes. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 13):2679–88.
  30. Aguilar-Gallardo C, Poo M, Gomez E, Galan A, Sanchez E, Marques-Mari A, et al. Derivation, characterization, differentiation, and registration of seven human embryonic stem cell lines (VAL-3, -4, -5, -6 M, -7, -8, and -9) on human feeder. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2010;46(3–4):317–26. doi:10.1007/s11626-010-9285-3.
  31. Donato MT, Lahoz A, Montero S, Bonora A, Pareja E, Mir J, et al. Functional assessment of the quality of human hepatocyte preparations for cell transplantation. *Cell Transplant.* 2008;17(10–11):1211–9.
  32. Gomez-Lechon MJ, Lahoz A, Castell JV, Donato MT. Evaluation of cytochrome P450 activities in human hepatocytes in vitro. *Methods Mol Biol.* 2012;806:87–97. doi:10.1007/978-1-61779-367-7\_7.
  33. Donato MT, Montero S, Castell JV, Gomez-Lechon MJ, Lahoz A. Validated assay for studying activity profiles of human liver UGTs after drug exposure: inhibition and induction studies. *Anal Bioanal Chem.* 2010;396(6):2251–63. doi:10.1007/s00216-009-3441-1.
  34. Dianat N, Dubois-Pot-Schneider H, Steichen C, Desterke C, Leclerc P, Raveux A, et al. Generation of functional cholangiocyte-like cells from human pluripotent stem cells and HepaRG cells. *Hepatology.* 2014;60(2):700–14. doi:10.1002/hep.27165.
  35. Terry C, Dhawan A, Mithy RR, Lehec SC, Hughes RD. Optimization of the cryopreservation and thawing protocol for human hepatocytes for use in cell transplantation. *Liver Transpl.* 2010;16(2):229–37. doi:10.1002/lt.21983.
  36. Tolosa L, Pareja-Ibars E, Donato MT, Cortes M, Lopez S, Jimenez N, et al. Neonatal livers: a source for the isolation of good-performing hepatocytes for cell transplantation. *Cell Transplant.* 2014;23(10):1229–42. doi:10.3727/096368913X669743.
  37. Newsome PN, Plevris JN, Nelson LJ, Hayes PC. Animal models of fulminant hepatic failure: a critical evaluation. *Liver Transpl.* 2000;6(1):21–31. doi:10.1002/lt.500060110.
  38. Farzaneh Z, Pournasr B, Ebrahimi M, Aghdami N, Baharvand H. Enhanced functions of human embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells on three-dimensional nanofibrillar surfaces. *Stem Cell Rev.* 2010;6(4):601–10. doi:10.1007/s12015-010-9179-5.
  39. Yu YD, Kim KH, Lee SG, Choi SY, Kim YC, Byun KS, et al. Hepatic differentiation from human embryonic stem cells using stromal cells. *J Surg Res.* 2011;170(2):e253–61. doi:10.1016/j.jss.2011.06.032.
  40. Liu W, Ramirez J, Gamazon ER, Mirkov S, Chen P, Wu K, et al. Genetic factors affecting gene transcription and catalytic activity of UDP-glucuronosyltransferases in human liver. *Hum Mol Genet.* 2014;23(20):5558–69. doi:10.1093/hmg/ddu268.
  41. Hines RN. The ontogeny of drug metabolism enzymes and implications for adverse drug events. *Pharmacol Ther.* 2008;118(2):250–67. doi:10.1016/j.pharmthera.2008.02.005.
  42. Schmelzer E, Zhang L, Bruce A, Wauthier E, Ludlow J, Yao HL, et al. Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med.* 2007;204(8):1973–87. doi:10.1084/jem.20061603.
  43. Turner RA, Wauthier E, Lozoya O, McClelland R, Bowsher JE, Barbier C, et al. Successful transplantation of human hepatic stem cells with restricted localization to liver using hyaluronan grafts. *Hepatology.* 2013;57(2):775–84. doi:10.1002/hep.26065.
  44. Carpentier A, Tesfaye A, Chu V, Nimgaonkar I, Zhang F, Lee SB, et al. Engrafted human stem cell-derived hepatocytes establish an infectious HCV murine model. *J Clin Invest.* 2014;124(11):4953–64. doi:10.1172/JCI75456.
  45. Song X, Guo Y, Duo S, Che J, Wu C, Ochiya T, et al. A mouse model of inducible liver injury caused by tet-on regulated urokinase for studies of hepatocyte transplantation. *Am J Pathol.* 2009;175(5):1975–83. doi:10.2353/ajpath.2009.090349.
  46. Steinebrunner N, Mogler C, Vittas S, Hoyler B, Sandig C, Stremmel W, et al. Pharmacologic cholinesterase inhibition improves survival in acetaminophen-induced acute liver failure in the mouse. *BMC Gastroenterol.* 2014;14:148. doi:10.1186/1471-230X-14-148.
  47. Ju C. Damage-associated molecular patterns: their impact on the liver and beyond during acetaminophen overdose. *Hepatology.* 2012;56(5):1599–601. doi:10.1002/hep.25920.
  48. Lee WM, Larson AM, Arenas J. Thinking through acetaminophen hepatotoxicity and liver transplantation: choosing worthy recipients. *Liver Transpl.* 2009;15(6):567–9. doi:10.1002/lt.21728.
  49. Ben-David U, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(4):268–77. doi:10.1038/nrc3034.
  50. Cui L, Guan Y, Qu Z, Zhang J, Liao B, Ma B, et al. WNT signaling determines tumorigenicity and function of ESC-derived retinal progenitors. *J Clin Invest.* 2013;123(4):1647–61. doi:10.1172/JCI65048.
  51. Doi D, Morizane A, Kikuchi T, Onoe H, Hayashi T, Kawasaki T, et al. Prolonged maturation culture favors a reduction in the tumorigenicity and the dopaminergic function of human ESC-derived neural cells in a primate model of Parkinson's disease. *Stem Cells.* 2012;30(5):935–45. doi:10.1002/stem.1060.
  52. Chinzai R, Tanaka Y, Shimizu-Saito K, Hara Y, Kakinuma S, Watanabe M, et al. Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes. *Hepatology.* 2002;36(1):22–9. doi:10.1053/jhep.2002.34136.
  53. Amarglio N, Hirshberg A, Scheithauer BW, Cohen Y, Loewenthal R, Trakhtenbrot L, et al. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med.* 2009;6(2):e1000029. doi:10.1371/journal.pmed.1000029.
  54. Cyrankoski D. Strange lesions after stem-cell therapy. *Nature.* 2010;465(7301):997. doi:10.1038/465997a.
  55. Harding J, Mirochnitchenko O. Preclinical studies for induced pluripotent stem cell-based therapeutics. *J Biol Chem.* 2014;289(8):4585–93. doi:10.1074/jbc.R113.463737.
  56. Tan Y, Ooi S, Wang L. Immunogenicity and tumorigenicity of pluripotent stem cells and their derivatives: genetic and epigenetic perspectives. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2014;9(1):63–72.
  57. Chen KT, Pernelle K, Tsai YH, Wu YH, Hsieh JY, Liao KH, et al. Liver X receptor alpha (LXRalpha/NR1H3) regulates differentiation of hepatocyte-like cells via reciprocal regulation of HNF4alpha. *J Hepatol.* 2014;61(6):1276–86. doi:10.1016/j.jhep.2014.07.025.
  58. Fitzpatrick E, Mithy RR, Dhawan A. Human hepatocyte transplantation: state of the art. *J Intern Med.* 2009;266(4):339–57. doi:10.1111/j.1365-2796.2009.02152.x.
  59. Selden C, Hodgson H. Cellular therapies for liver replacement. *Transpl Immunol.* 2004;12(3–4):273–88. doi:10.1016/j.trim.2003.12.008.
  60. Ribes-Koninckx C, Ibars EP, Calzado Agrasot MA, Bonora-Centelles A, Miquel BP, Vila Carbo JJ, et al. Clinical outcome of hepatocyte transplantation in

- four pediatric patients with inherited metabolic diseases. *Cell Transplant*. 2012;21(10):2267–82. doi:10.3727/096368912X637505.
61. Lanzoni G, Oikawa T, Wang Y, Cui CB, Carpino G, Cardinale V, et al. Concise review: clinical programs of stem cell therapies for liver and pancreas. *Stem Cells*. 2013;31(10):2047–60. doi:10.1002/stem.1457.
  62. Cardinale V, Carpino G, Gentile R, Napoletano C, Rahimi H, Franchitto A, et al. Transplantation of human fetal biliary tree stem/progenitor cells into two patients with advanced liver cirrhosis. *BMC Gastroenterol*. 2014;14(1):204. doi:10.1186/s12876-014-0204-z.
  63. Li L, Baroja ML, Majumdar A, Chadwick K, Rouleau A, Gallacher L, et al. Human embryonic stem cells possess immune-privileged properties. *Stem Cells*. 2004;22(4):448–56. doi:10.1634/stemcells.22-4-448.
  64. Bhatia SN, Underhill GH, Zaret KS, Fox JJ. Cell and tissue engineering for liver disease. *Sci Transl Med*. 2014;6(245):245 sr2. doi:10.1126/scitranslmed.3005975.
  65. Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*. 2013;499(7459):481–4. doi:10.1038/nature12271.

**Submit your next manuscript to BioMed Central  
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



**Supplementary Table 1 Antibodies used in this study**

<b>Antibody</b>	<b>Company</b>	<b>Reference number</b>	<b>Dilution</b>
Primary			
OCT4	Santa Cruz	SC-5279	1:200
NANOG	R&D	AF1997	1:100
TRA-1-60	Millipore	MAB4360	1:150
GATA4	Santa Cruz	SC-1237	1:200
SOX17	R&D	MAB1924	1:150
FOXA2	Santa Cruz	SC-6554	1:100
HNF4 $\alpha$	Santa Cruz	SC-8987	1:200
CK19	Dako	M0888	1:200
HNF6	Santa Cruz	SC-13050	1:200
HNF1 $\alpha$	Santa Cruz	SC-135939	1:200
EPCAM	AbCys	ABC171	1:200
AFP	Santa Cruz	SC-8399	1:200
ALB	Cedarlane	CL2531A	1:200
CYP3A4	Santa Cruz	SC-27639	1:100
A1AT	Dako	A0012	1:400
CLDN1	Life Technologies	187362	1:200
CD81	BD Pharmingen	555675	1:200
SRB1	Novus Biologicals	NB400-131	1:100
OPN	Santa Cruz	SC-21742	1:200
HNF1 $\beta$	Santa Cruz	SC-7411	1:200
CK7	Dako	M7018	1:200
CK18	Chemicon	CBL185	1:100
CFTR	AbCam	AB2784	1:500
Secondary			
Donkey anti-goat	Molecular Probes	A11055 - A11057	1:1000
Donkey anti-rabbit	Molecular Probes	A32306 - A10042	1:1000
Donkey anti-mouse	Molecular Probes	A21202 - A10037	1:1000

## Supplementary Table 2

### Primers used for RT-PCR of Human mRNAs

Gene	Direction	Primer sequence 5' → 3'	Annealing temperature, °C	Amplicon size, bp
<i>HNF4α</i>	Forward	CGGGTGTCCATACGCATCCTTG	60	347
	Reverse	GACCCTCCCAGCAGCATCTCCT		
<i>AFP</i>	Forward	AGCTTGGTGGTGGATGAAAC	58	248
	Reverse	CCCTCTTCAGCAAAGCAGAC		
<i>ALB</i>	Forward	CCTTTGGCACAATGAAGTGGGTAACC	58	354
	Reverse	CAGCAGTCAGCCATTCACCATAGG		
<i>FOXM1B</i>	Forward	GGGCGCACGGCGGAAGATGAA	63	493
	Reverse	CCACTCTTCCAAGGGAGGGCTC		
<i>LDLR</i>	Forward	GGGCTGGAAATTGCGCTGGACCGTC	60	374
	Reverse	TCACAGACGAACTGCCGAGAGATGC		
<i>β-ACTIN</i>	Forward	GCACTCTTCCAGCCTTCCTTCC	60	521
	Reverse	CTGCTGTCACCTTCACCGTTCC		

**Primers used for qRT-PCR of Human mRNAs**

<b>Gene</b>	<b>Direction</b>	<b>Primer sequence 5' → 3'</b>
<i>OCT-4</i>	Forward	GGTATTCAGCCAAACGACCA
	Reverse	TTGCCTCTCACTCGGTTCTC
<i>HNF-4<math>\alpha</math></i>	Forward	GCCTACCTCAAAGCCATCAT
	Reverse	GACCCTCCCAGCAGCATC TC
<i>ALBUMIN</i>	Forward	TGAGAAAACGCCAGTAAGTGAC
	Reverse	TGCGAAATCATCCATAACAGC
<i>OTC</i>	Forward	GCTGATTACCTCACGCTCCA
	Reverse	TGGTTACACTAGCATCCGGC
<i>MRP</i>	Forward	GCCGGTGGTCAGATTATCAT
	Reverse	GATCTTGGATTTCCGAAGCA
<i>UGT1A1</i>	Forward	AGACGTACCCTGTGCCATTC
	Reverse	CCGTCAGCATGACATCAAAG
<i>UGT2B7</i>	Forward	TCAGCTTCTCTCCTGGCTACTT
	Reverse	ACGTCAGCTTTCCCCATTGTCTCAG

---

<i>CYP1A2</i>	Forward	AACAAGGGACACAACGCTGAAT
	Reverse	GGAAGAGAAACAAGGGCTGAGT
<i>CYP2C9</i>	Forward	CCTCTGGGGCATTATCCATC
	Reverse	ATATTTGCACAGTGAAACATAGGA
<i>CYP2C19</i>	Forward	TTCATGCCTTTCTCAGCAGG
	Reverse	ACAGATAGTGAAATTTGGAC
<i>CYP3A4</i>	Forward	CCTTACATATACACACCCTTTGGAAGT
	Reverse	AGCTCAATGCATGTACAGAATCCCCGGTTA

---

Figure S1

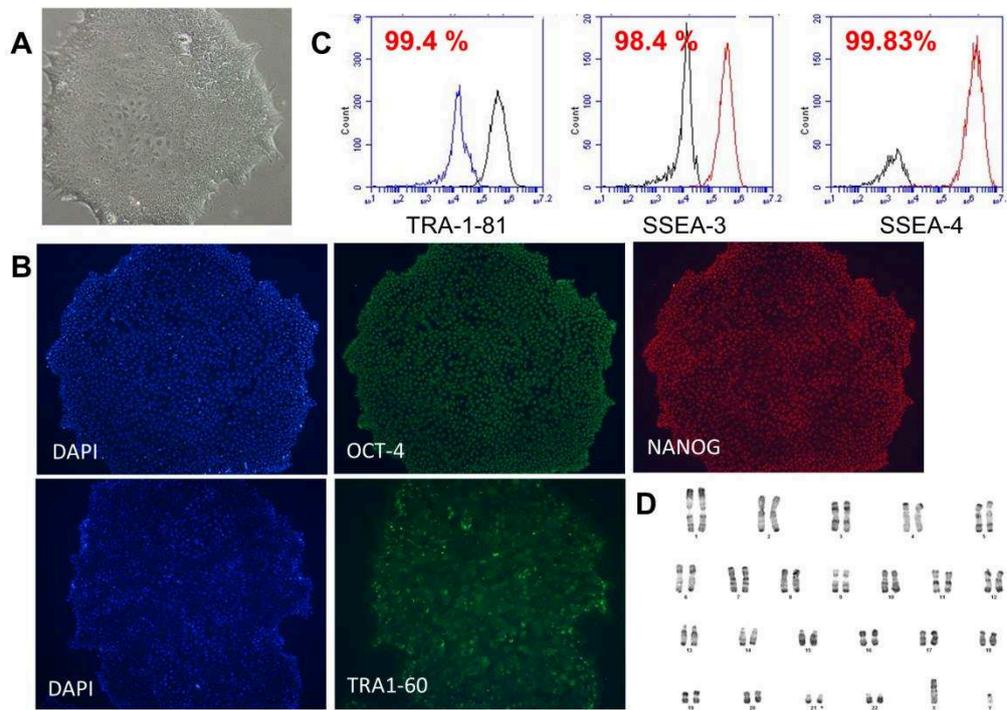


Figure S2

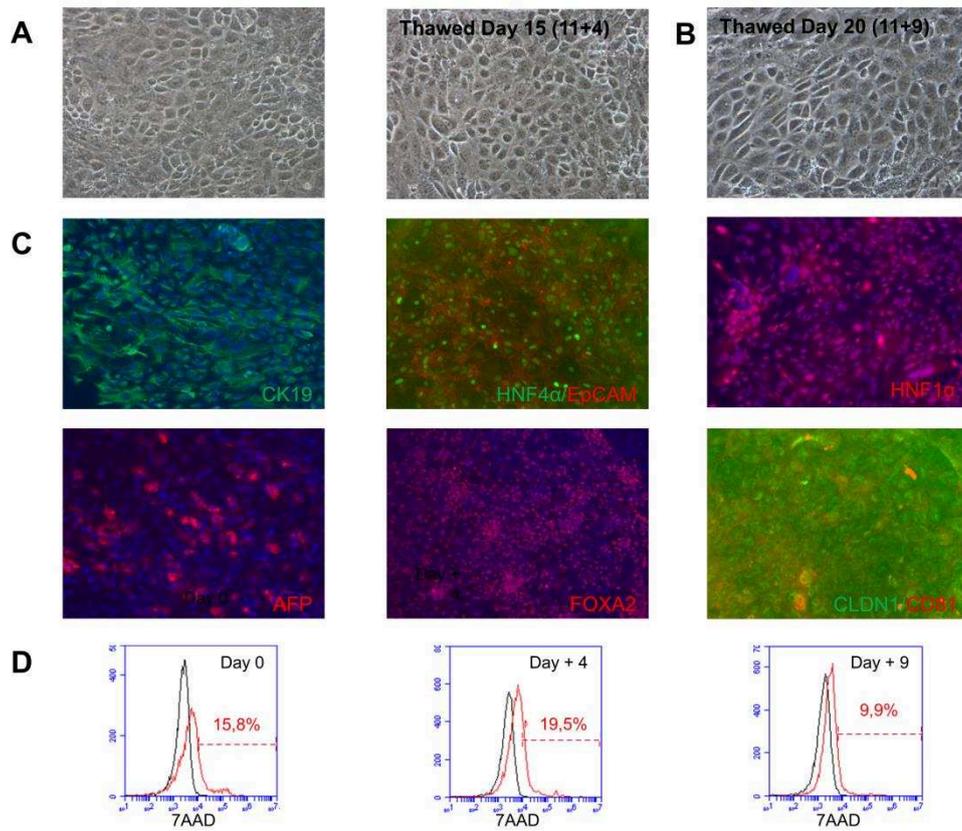
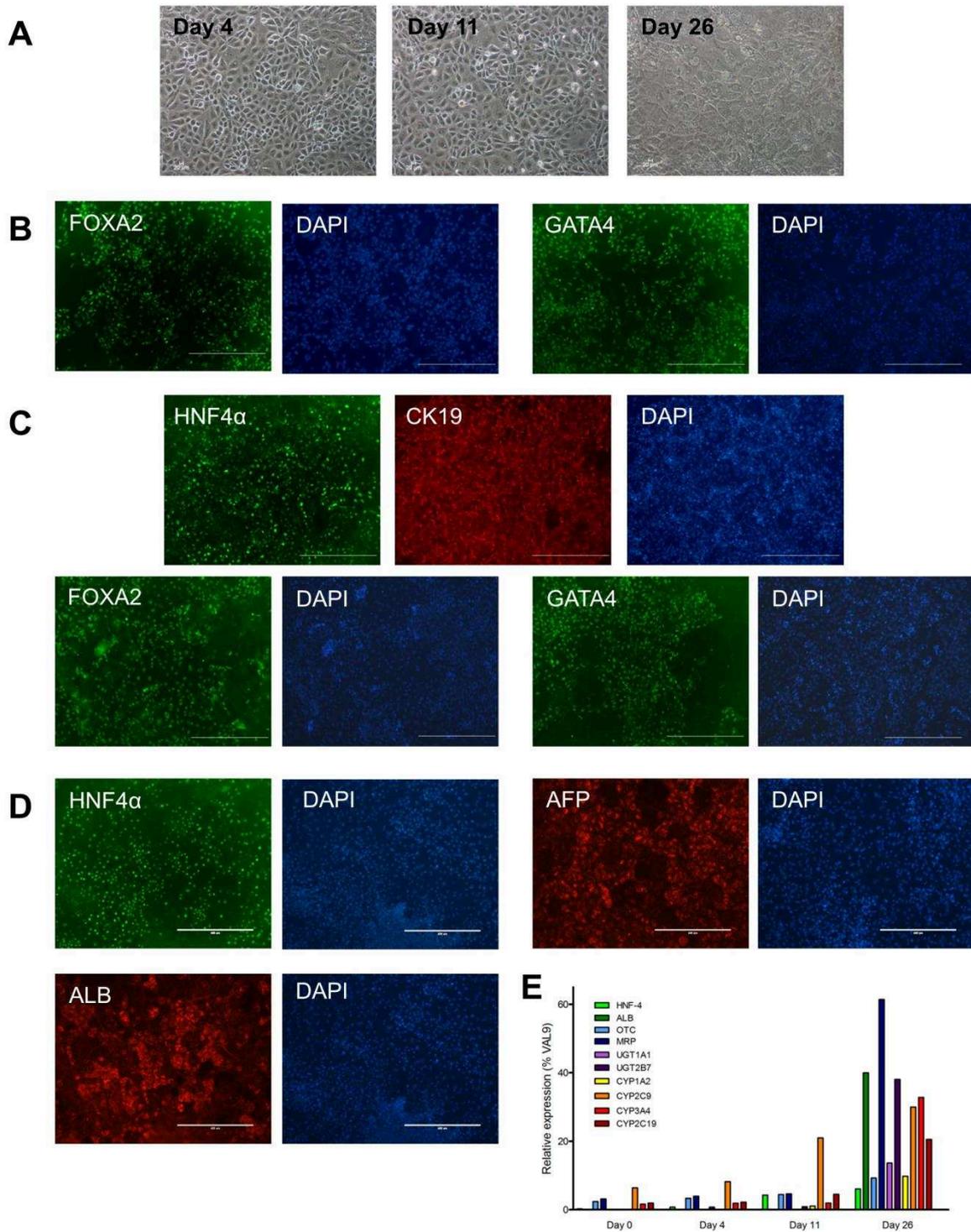


Figure S3



## Article 2

### **CRISPR/Cas9-mediated correction and productive HCV infection in Familial Hypercholesterolemia-iPSC-derived hepatocytes**

Il existe dans la littérature scientifique deux modélisations de l'hypercholestérolémie familiale par les hiPSC. Celles-ci portent sur différentes mutations (soit inconnue<sup>185</sup> soit localisées dans le 17<sup>ème</sup> exon du LDLR qui code pour les domaines transmembranaires et cytoplasmiques<sup>189,190</sup>) et ont en commun une fonctionnalité très réduite du récepteur, démontré par le défaut d'internalisation d'un ligand fluorescent (Dil-LDL), bien que celui-ci soit exprimé dans les cellules. Dans notre étude, nous avons utilisé, pour modéliser *in vitro* cette maladie, des hiPSC reprogrammées à partir de fibroblastes de peau d'un patient porteur d'une mutation non sens de classe 1 très précoce qui ont été obtenus grâce à une collaboration avec le Dr Saheb et le Pr Bruckert de l'hôpital Pitié-Salpêtrière. Ce codon STOP prématuré situé au niveau du 12<sup>ème</sup> acide aminé (sur les 839 que compte normalement cette protéine) entraîne une absence totale de récepteurs dans la cellule. Ce modèle permet ainsi pour la première fois d'envisager l'étude du rôle du LDLR dans différents mécanismes comme la régulation lipidique et l'infection par certains virus, notamment celui de l'hépatite C.

## **CRISPR/Cas9-mediated correction and productive HCV infection in Familial Hypercholesterolemia-iPSC-derived hepatocytes**

Jérôme Caron<sup>1</sup>, Véronique Pène<sup>2+</sup>, Laia Tolosa<sup>3+</sup>, Maxime Villaret<sup>2</sup>, Eléanor Luce<sup>1</sup>,  
Angélique Fourier<sup>4</sup>, Samir Saheb<sup>5</sup>, Eric Bruckert<sup>5</sup>, María José Gómez-Lechón<sup>3,7</sup>,  
Tuan Huy Nguyen<sup>4\*</sup>, Arielle R. Rosenberg<sup>2,6\*</sup>,  
Anne Weber<sup>1#</sup>, Anne Dubart-Kupperschmitt<sup>1#</sup>

1 INSERM UMR\_S1193, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France; UMR-S1193, Université Paris-Sud, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France; DHU Hépatinov, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, F94800, France

2 Université Paris Descartes, EA4474 « Hépatite C Virologie », Paris, France

3 Unidad de Hepatología Experimental, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia, Spain

4 Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR1064, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France

5 Service d'Endocrinologie Métabolisme, Hôpital Pitié-Salpêtrière Paris, F75651, France

6 AP-HP, Hôpital Cochin, Service de Virologie, Paris, France

7 CIBERehd, FIS, Barcelona, Spain

<sup>+,\*,#</sup>The authors contributed equally to the work

**Abstract**

Familial hypercholesterolemia type IIA (FH) is due to mutations in the low-density lipoprotein receptor (LDLR) resulting in elevated levels of low-density lipoprotein cholesterol in plasma and premature cardiovascular diseases. Hepatocytes are the only cells capable of metabolizing cholesterol but access to patient cells is restricted. The LDLR has been reported to be involved in HCV entry into hepatocytes, however, its role in the virus infection cycle is still disputed. We investigated whether hepatocytes differentiated from induced pluripotent stem cells (iPSCs) from an FH-homozygous patient with a null mutation (FH-iHeps) could model the disease pathophysiology and be corrected by CRISPR/Cas9-mediated targeted recombination, and whether FH-iHeps and corrected iHeps (corr-FH-iHeps) were permissive to hepatitis C virus (HCV) infection. We generated iPSCs from an LDLR-deficient FH-patient (FH-iPSCs) and designed a step-wise approach to differentiate them into hepatocytes. These FH-iHeps showed functional hallmarks of human hepatocytes and recapitulated the pathophysiology of FH. Targeted insertion of a correcting cassette bearing LDLR cDNA under the control of the human hepatic apolipoprotein A2 regulatory sequences into the adeno-associated virus integration site *AAVS1* resulted in genetic correction of FH-iPSCs (corr-FH-iPSCs). After differentiation of corrected cells into functional hepatocytes, expression of LDLR and of genes involved in cholesterol metabolism was upregulated by pravastatin. FH- and corr-FH-iHeps were highly permissive to HCV infection but virus production in FH-iHeps was significantly decreased compared to corr-FH-iHeps suggesting a role of the LDLR in HCV morphogenesis.

*Conclusion:* Our system provides new approaches to model metabolic diseases and the HCV life cycle. It also provides a platform to screen drugs for treating dyslipidemia and HCV infection, and cell models to test cell therapy procedures.

**Key words**

Cardiovascular disease, Liver, Differentiation, Genome editing, Lipoprotein-cholesterol regulation

**Address correspondence**

Dr Anne Dubart-Kupperschmitt  
 Inserm U1193, Hôpital Paul Brousse  
 12 avenue Paul Vaillant-Couturier, 94807 Villejuif, France  
 E-mail: [anne.dubart@inserm.fr](mailto:anne.dubart@inserm.fr)  
 Tel: 33 1 45 59 51 38

Dr Anne Weber  
 Inserm U1193, Hôpital Paul Brousse  
 12 avenue Paul Vaillant-Couturier, 94807 Villejuif, France  
 E-mail: [anne.weber@inserm.fr](mailto:anne.weber@inserm.fr)  
 Tel: 33 1 45 59 51 36

**List of Abbreviations**

FH, familial hypercholesterolemia; LDLR, low-density lipoprotein receptor; LDL-c, low-density lipoprotein cholesterol; PHH, primary human hepatocytes; iPSCs, induced pluripotent stem cells; CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats; Cas, CRISPR-associated system; AAVS1, adeno-associated virus integration site 1; HCV, hepatitis C virus; VLDL, very-low-density lipoprotein; iHeps, iPSC-derived hepatocytes; Dil-LDL, 1,1'-dioctadecyl-3,3,3,3'-tetramethylindocarbocyanineperchlorate; VSV, vesicular stomatitis virus; VSV-G LV, lentiviral vectors pseudotyped with VSV-G protein; MOI, multiplicity of infection; APOB-100, apolipoprotein B100; APOA2, apolipoprotein A2; HMGCR, 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase; SREBP, sterol regulatory element-binding protein; PCSK9; proprotein convertase subtilisin kexin/type 9.

**Financial support**

This work was supported by FP7-HEALTH.2011.1.4-2-278152 “InnovaLiv”, ANR-2010-RFCS-004 “Liv-iPS”. J.C. was supported by a scholarship from the MESR (French Ministry for Education and Research), by the Fondation pour la Recherche Médicale (FDT20160435349) and by the DHU Hepatinov. V.P. was supported by a fellowship from the DHU Hepatinov. E.L. was supported by Région Ile de France/DIM Biothérapies and French Society for Hematology (SFH). L.T. was a recipient of a Miguel Servet I Contract (CP16/00097) from the “*Instituto de Salud Carlos III*” (Plan Estatal de I+D+i 2013-2016 and European Development Regional Fund) of the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. T.N. and GenoCellEdit platform were supported by ANR-14-CE16-0026 and by the IHU-Cesti project (French

government financial support via the investment of the future program ANR-10-IBHU-005 and supports from Nantes Métropole and the Pays de la Loire Region).

Familial hypercholesterolemia type IIA (FH) is an autosomal dominant inherited disorder of lipid/cholesterol metabolism due to mutations in the gene encoding the Low-Density Lipoprotein receptor (LDLR). This disease is characterized by elevated plasma low density lipoprotein-cholesterol (LDL-c) levels which lead to severe premature cardiovascular diseases and early death(1). FH is one of the most common genetic diseases, with a prevalence of 1/500 in its heterozygous form. This number might however be underestimated as recently, direct screening in a general Northern European population diagnosed approximately 1/200 patients with heterozygous FH(2). Homozygous FH patients ( $1/10^6$ ) have very high plasmatic cholesterol levels ( $>1000$  mg/dL) and LDL-apheresis is the only available treatment to avoid heart failure and death occurring at an early age in absence of treatment(3, 4).

Hepatocytes play a central role in cholesterol and lipid homeostasis. They produce more than 20% of endogenously synthesized cholesterol in the body, and are the only cells in the organism able to regulate cholesterolemia by secreting cholesterol into the blood via apolipoproteins and metabolizing it into bile acids. Orthotopic liver transplantation is therefore the only curative treatment for homozygous patients but they do not have priority because of organ shortage. Primary human hepatocyte (PHH) transplantation as alternative treatment suffers the same restriction. Current model systems to study hepatocyte function and biological mechanisms including cholesterol metabolism suffer from significant limitations. PHH sources are limited due to the scarce availability of suitable liver tissue. Moreover, PHH do not proliferate, and show poor viability and unstable functionality. Transformed hepatic cell lines are metabolically compromised and/or do not recapitulate key aspects of normal human hepatocyte functions(5). The generation of patient-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) has created the opportunity to generate new models allowing to recapitulate disease phenotypes(6, 7). Concerning FH, we and others used iPSCs derived from FH-patients, either with an unknown genetic mutation or mutations resulting in truncated non-functional LDLR protein, to analyze the impaired LDL-c internalization(8-10). To date, the generation of iPSCs from patients with a homozygous null *LDLR* mutation has not been achieved.

The recent advancement of customized engineered endonucleases has demonstrated that clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas (CRISPR-associated system) yielded efficient gene targeting in

human iPSCs. A number of studies have used CRISPR/Cas9 *in vitro* and *in vivo* to explore various aspects of liver biology(11, 12). The most used safe harbor locus for gene targeting, where transgenes can be stably inserted and expressed from external promoters without showing any signs of genotoxic effects, is the Adeno-Associated Virus Integration Site 1 (*AAVS1*) locus(13).

An estimated 171 million people worldwide are chronically infected with hepatitis C virus (HCV), a major cause of chronic liver disease. However, this hepatotropic virus is notoriously difficult to culture. The most robust and widely used system is based on the highly replicative JFH1 isolate and highly permissive subclones of the human hepatocellular carcinoma-derived cell line Huh-7(14). However, these transformed cells diverge significantly from the natural host cells of HCV, implying that any hijacking or perturbation of physiological hepatocyte functions by the virus cannot be studied accurately. PHHs support the complete infection cycle including production of workable titres of progeny virus, but these cells are not widely available and display large inter-donor variable quality(15). Hepatocyte-like cells derived from human pluripotent stem cells were reported to be permissive to HCV but the titres of progeny virus, when measured, were very low(16-19). Unique to iPSC-based models is the possibility of investigating the impact of patient-specific genetics on HCV infection, pathophysiology and treatment. As HCV particles are physically associated with very-low-density lipoprotein (VLDL) components in hybrid structures referred to as lipoviro-particles, the LDLR has been proposed to be one of the host factors participating in HCV entry into hepatocytes, although the role of this molecule in the virus infection cycle is still disputed(20-24).

We report here the first models of patient-specific FH-iPSCs and FH-iPSC-derived hepatocytes (FH-iHeps) with homozygous *LDLR* null mutation, which recapitulate disease pathophysiology. We provide the proof of concept for the correction of a metabolic liver disease via targeted insertion of a LDLR expression cassette at the *AAVS1* locus using the CRISPR/Cas9 system. We show that our correcting LDLR cassette controlled by hepatic specific regulatory sequences of *apolipoprotein A2* gene is specifically expressed and regulated by a lipid-lowering drug in hepatocytes. Finally, we establish that FH-iHeps and corr-FH-iHeps support robust HCV genome replication but that production of infectious virus particles in FH-iHeps is significantly lower compared to that in corr-FH-iHeps, indicating a role of the LDLR in HCV morphogenesis rather than in virus entry. Overall, our data emphasize the relevance

of our model for drug screening and therapeutic perspectives as well as for HCV life cycle and functional virus-host interaction studies.

## **Material and Methods**

### **ETHICS STATEMENT**

This study was performed in agreement with the French and European regulations. Approval was obtained from INSERM ethical research committee and legal instances (Comité de protection des personnes). Written informed consent was obtained from an FH patient homozygous for the p.Q12X mutation leading to the absence of LDLR expression.

### **CELL CULTURE**

Generation of iPSCs from a healthy donor has been previously described(25). Detailed information regarding patient-specific iPSC generation and maintenance is provided in the Supporting Information as well as differentiation protocol and characterization of resulting iHeps.

### **HCV INFECTION AND VIROLOGICAL ANALYSES**

A high-titre stock of JFH1-HCV(14) was produced in Huh-7.5.1 cells as described(15). At day 18 of the differentiation protocol, iHeps were incubated with the virus inoculum (MOI of 2 ffu per cell) in a minimal volume of fresh medium for 6 hours at 37°C. The inoculum was removed, cells were washed 3 times with PBS, then cultured in fresh medium for the indicated times post-inoculation. For comparison, PHHs purchased from Biopredic International (Saint-Grégoire, France) were inoculated in the same conditions. Analyses were performed at day 3 post-inoculation except for assessment of HCV genome replication, which was done at day 1 post-inoculation, i.e., under conditions of a single infection cycle. Indeed, at later time points multiple rounds of infection are expected to cause a bias in the assessment of viral genome replication per se if production of viral particles is affected(26).

To assess HCV genome replication, intracellular amounts of negative-strand HCV RNA were quantified by a strand-specific qRT-PCR technique(15).

To assess production of total HCV particles, HCV RNA levels in filtered culture supernatants were quantified by qRT-PCR using the m2000sp and m2000rt instruments and RealTime HCV kit (Abbott Diagnostics), a commercial standardized assay used for viral load quantification in clinical practice, as previously described(15).

To assess production of infectious HCV particles, infectious titres in filtered culture supernatants were determined by focus-formation assay, as described previously(15).

#### **ADDITIONAL METHODS**

Detailed methodology is described in the Supporting information

## Results

### **PATIENT-SPECIFIC iPSCs DISPLAY AN FH PHENOTYPE *IN VITRO***

Clonal iPSC lines from a homozygous FH patient carrying a nonsense mutation at codon 12 were generated by reprogramming skin fibroblasts (Fig. 1A). One of the expanded clones was fully characterized. It displayed hallmarks of pluripotency as judged by mRNA expression, immunostaining and flow cytometry analyses of stem cell markers (Fig. 1B,C; Supporting Fig. S1A). It generated embryoid bodies expressing proteins specific to derivatives from the 3 embryonic germ layers and its karyotype remained normal (Supporting Fig. S1B,C).

Next, we sequenced exon 2 of the *LDLR* gene in FH-iPSCs by comparison with FH and normal fibroblasts. The c.97C->T *LDLR* mutation present in the patient's fibroblasts, resulting in a premature nonsense codon in the protein sequence (p.Q12X) was also found in FH-iPSCs (Fig. 1D).

Western blot analyses confirmed the absence of LDLR protein in FH-iPSCs by contrast to normal iPSCs (Fig. 1E). Accordingly, LDL-cholesterol uptake was impaired in the patient's fibroblasts and FH-iPSCs compared to their respective controls, assessed by internalization of a fluorescent LDLR ligand, 1,1'-dioctadecyl-3,3,3,3'-tetramethylindocarbocyanineperchlorate (DiI-LDL) (Fig. 1F).

LDLR was recently identified as the major entry port of the Vesicular Stomatitis Virus (VSV) via its envelope G protein in human cells and of VSV-G pseudotyped lentiviral vectors (VSV-G LV)(27). We therefore used deficient FH-iPSCs to evaluate the role of LDLR in transduction efficiency of GFP-expressing VSV-G LV and measured a significantly lower percentage of GFP-expressing cells in transduced FH-iPSCs compared to transduced normal ones (Supporting Fig. S2). These findings confirm the role of LDLR in the VSV cell entry but also the existence of alternative virus entry routes as previously reported(27), and they further suggest the potential utility of FH-iPSCs for modelling virus entry.

### **DIFFERENTIATION OF FH-iPSCs INTO HEPATOCYTES**

Despite significant improvements in protocols for generating hepatocyte-like cells from either hESCs or hiPSCs, these iHeps still exhibit an immature phenotype(28-31). We therefore refined our approaches to differentiate normal and FH-iPSCs into more differentiated hepatocytes (Fig. 2A). First, GSK-3 $\beta$  inhibition directs hESCs into a primitive streak-like cell type with mesoderm and endoderm differentiation potential

via activation of the canonical Wnt-pathway(32). Therefore, iPSCs were treated for 24h with CHIR99021, an inhibitor of GSK-3 $\beta$ , prior to addition of high concentrations of Activin A to direct cells towards endodermal cell fates. This resulted in a homogenous cell population, 98% of which expressing the definitive endoderm specific marker CXCR4 at D5 of the differentiation protocol as assessed by flow cytometry, as well as GATA4 and FOXA2 (Fig. 2B; Supporting Fig. S3A,B,C).

Second, after the hepatic specification stage that generated a homogenous population expressing EPCAM (Fig. 2B) and co-expressing hepatic nuclear transcription factor (HNF4 $\alpha$ ) and biliary (CK19) markers (Supporting Fig. S3A,D,E), these hepatoblasts (committed bipotent hepatic progenitors) were passaged on day 10 onto a collagen/fibronectin matrix to promote their proliferation and differentiation. We found that this induction of hepatoblast proliferation resulted in a more robust differentiation toward hepatocytes. This observation fits well with a recent study in which hepatoblasts were not passaged but induced to proliferate with CHIR, which activates the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, prior to being differentiated into iHeps(31).

Third, it was previously shown that TGF $\beta$  and Notch signalling pathways are involved in cholangiocyte lineage specification *in vivo*(33) and that addition of activin A (a member of the TGF $\beta$  superfamily) in combination with other factors gave rise to committed cholangiocyte precursors(34). Recently, inhibitors of these factors were successfully used in a different approach(31). Applying these inhibitors to our cultures from day 16 of differentiation improved differentiation efficiency for both control and FH-iPSCs. Their morphology closely resembled that of PHHs, including the presence of lipid vesicles, granular cytoplasm, prominent nucleoli and two nuclei in some cells (Fig. 2D). The RT-PCR results showed that cells expressed specific markers such as albumin,  $\alpha$ -1 anti-trypsin (A1AT), clotting factor IX, and HNF1 $\alpha$  (Fig. 2C). Most cells stained positive for asialoglycoprotein receptor (ASGR), cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) and albumin. FH-iHeps also expressed host molecules used as co-receptors for HCV entry (scavenger receptor BI (SRBI), CD81 and claudin-1). The cells displayed signs of apical-basal polarity, a fundamental feature of epithelial cells required for structural and functional integrity, as shown by immunofluorescence staining for the apical marker tight junction protein ZO1 (Fig. 2D). Gap junction-mediated intercellular communication (GJIC) is critical for maintaining integral cellular processes including differentiation and growth control. Connexin 32 (CX32, gap junction protein  $\beta$ 1) is involved in functional differentiation of hESCs into

hepatocytes(35) and represents 90% of GJIC in normal adult liver, whereas CX43 is specific to fetal hepatocytes. Most of FH-iHeps expressed CX32, and gap junction plaques are visible by z-stack reconstruction (Fig. 2E). Both control and FH-iHeps secreted apolipoprotein B-100 (APOB-100), but FH-iHeps displayed an approximate 3-fold increase in the level of secreted APOB-100 compared to control iHeps (Fig. 2F), in agreement with studies using mouse and human FH models(8, 36). Altogether, these results provide further evidence that the cells are moving towards a functional mature hepatocyte state and therefore are a relevant FH model.

### **GENETIC CORRECTION OF LDLR DEFECT BY USING CRISPR/CAS9 GENOME ENGINEERING**

Next we explored the potential of the CRISPR/Cas9 site-specific nuclease system to target the insertion of a correcting cassette into the *AAVS1* safe harbor locus.

We designed and constructed an expression cassette that harbors the entire wild-type LDLR cDNA under the control of the hepatic-specific promoter of the apolipoprotein A2 (*APOA2*) gene, and expressing a puromycin resistance element (Fig. 3A). After transfection, iPSCs resistant to puromycin were cloned. Junction PCR analyses on genomic DNA using primers spanning the 5' and 3' homology arms showed that 45% of the puromycin-resistant iPSC clones (15/34) were accurately integrated (Fig. 3B). In addition, an intact endogenous *AAVS1* allele was detected in the 15 clones indicating a monoallelic integration of the cassette (Fig. 3C).

Four positive clones were expanded based on their morphology and pluripotency and one of them was chosen for further characterization. DNA sequencing analyses did not detect any mutation in the inserted LDLR cDNA (data not shown). Corrected FH-iPSCs (corr-FH-iPSCs) also expressed stem cell markers and maintained a normal karyotype (Supporting Fig. S4).

### **Corr-FH-iPSCs DISPLAY NORMAL COMMITMENT TOWARD HEPATOCYTES AND GENE CORRECTION RESCUES THE FH PHENOTYPE IN Corr-FH-iHEPs**

Corr-FH-iPSCs were differentiated into definitive endoderm, then into hepatoblasts (Supporting Fig. S5A,B,C,D), and then into hepatocytes using our newly defined protocol. At day 25, morphology of corr-FH-iHeps resembled both that of their uncorrected counterparts and that of control iHeps, and there were no significant changes in differentiation kinetics after the genetic correction. Immunofluorescence

stainings showed that cells expressed HNF4 $\alpha$ , HNF1 $\alpha$  and other hepatocyte markers, such as A1AT, albumin and ASGR as well as co-receptors to HCV entry. Uniform distribution of CX32 was also observed, with gap junction plaques visible by z-stack reconstruction (Supporting Fig. S5E, for control stainings, see Fig. 2D,E). Corr-FH-iHeps exhibited a panel of different metabolic functions. The hepatocyte-specific cellular uptake of indocyanin green (ICG) and subsequent excretion were observed in a very high percentage of corr-FH-iHeps (Fig. 4A). We also used 5(6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFA) to examine biliary efflux, through multidrug resistance protein transporter 2, which allows to visualise bile canalicular network(29) and cell polarity. Its derivative, CDF, excreted into the bile canaliculi by corr-FH-iHeps and visible in usual top view and z-stack reconstruction showed the functionality of the bile canaliculi (Fig. 4B). Corr-FH-iHeps expressed different apolipoproteins and three of the major cytochromes (*CYP3A4*, *CYP2A6* and *CYP2D6*) as shown by quantitative RT-PCR. They also displayed other hepatocyte functions including lipids and glycogen storage and albumin secretion (Supporting Fig. S6). Activities of the three cytochromes as well as urea secretion were also detected (Fig. 4C,D).

Western blot analyses showed that LDLR was detected in corr-FH-iHeps but not in corr-FH-iPSCs by contrast to control iPSCs, confirming that the hepatic specificity of the *APOA2* promoter was maintained in our model (Fig. 4E). We measured intracellular Dil-LDL level after internalization in corr-FH-iHeps (Fig. 4F). The level detected corresponded to 62% of control iHeps consistent with monoallelic correction. Thus, FH phenotype and function were rescued in corr-FH-iHeps.

### **FH-iPSCs RECAPITULATE THE REGULATION OF GENES INVOLVED IN CHOLESTEROL METABOLISM**

Statins are lipid-lowering drugs acting on LDLR expression, by inhibition of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase (HMGCR), the rate-limiting enzyme in cholesterol biosynthesis(1). *APOA2* regulatory sequences that regulate LDLR expression in our construct are also activated by statins(37, 38). Proprotein convertase subtilisin kexin/type 9 (PCSK9) is associated with familial autosomal dominant hypercholesterolemia and is a natural inhibitor of the LDLR, which directs it to lysosomes for degradation(39, 40). Transcription of these genes shares a common regulatory mechanism mediated by sterol regulatory element-binding protein 2

(SREBP2), a transcription factor which activates cholesterol biosynthesis and uptake. Their expressions are coordinately upregulated by statins through proteolytic activation of SREBP2. Activation of SREBP2 results in translocation of its active form from the endoplasmic reticulum to the nucleus, where it binds to the promoters of SREBP target genes, and its regulation is mostly post-transcriptional(1, 41).

The effect of pravastatin on *HMGCR*, *PCSK9* and *SREBP2* was checked by quantitative RT-PCR. Addition of 10 $\mu$ M pravastatin to control iHeps and corr-FH-iHeps for 24h-48h resulted in a significant induction of HMGCR and PCSK9 mRNA. As expected, transcription of *SREBP2* was unchanged (Fig. 5A). At the protein level, LDLR expression was induced 3- and 2.5-fold in control-iHeps and in corr-FH-iHeps respectively (Fig. 5B). This demonstrates that our *APOA2* promoter is functional and can be activated by pravastatin. PCSK9 is synthesized as an inactive zymogen of 72-kDa (proPCSK9) that undergoes intra-molecular autocatalytic cleavage in the endoplasmic reticulum, producing the 60-kDa mature and active form of PCSK9, which is secreted(40). Both forms were visible and were also induced by pravastatin in both FH-Heps and corr-FH-iHeps (Fig. 5C). Pravastatin also increased LDL uptake: 40% in control cells and 20% in corr-FH-iHeps (Fig. 5D,E). In FH-iHeps and corr-FH-iHeps, SREBP2 was located in extranuclear membranes. In pravastatin-treated cells, it was mostly found in the nucleus (Fig. 5F). Altogether our results show that FH-iHeps and corr-FH-iHeps faithfully recapitulate the regulation of genes involved in cholesterol metabolism.

### **iHEPs SUPPORT THE COMPLETE, PRODUCTIVE HCV INFECTION CYCLE, ALBEIT WITH DIFFERENCES BETWEEN FH-iHEPs AND CORR-FH-iHEPs**

To investigate whether iHeps generated with our differentiation protocol were permissive to HCV infection, we inoculated them with JFH1-HCV. We quantified the intracellular levels of negative-strand HCV RNA at day 1 post-inoculation, i.e., under conditions of a single infection cycle, which accurately assess HCV genome replication following virus entry(26). Not only was this marker detected but its levels were comparably high in iHeps and in PHHs inoculated under identical conditions (Fig. 6A). The specific HCV polymerase inhibitor sofosbuvir significantly reduced the levels of negative-strand HCV RNA, confirming authentic de novo replication (Fig. 6B). We then used a commercial standardized viral load test and a titration assay to assess the production of total and infectious HCV particles, respectively. Although

the mean viral load was 1.17 log lower in iHeps compared to PHHs, the infectious titres were not significantly different and consistently reached  $10^4$ - $10^5$  focus-forming units (ffu) per mL (Fig. 6A). We conclude that iHeps in our system reproduce the complete HCV life cycle including production of high titres of infectious particles.

We next compared normal iHeps, FH-iHeps and corr-FH-iHeps to reassess the role of the LDLR in the HCV infection cycle. Negative-strand HCV RNA was present at equivalent levels in the three cell types (Fig. 6B), suggesting that neither virus entry nor viral genome replication was affected by the absence of LDLR. Interestingly, however, the viral load and the infectious titre were both significantly decreased, albeit not abolished, in FH-iHeps compared to control iHeps, and restored to normal levels in corr-FH-iHeps (Fig. 6C). Collectively, the data are consistent with the LDLR playing a role in the HCV infection cycle at the progeny virus production step.

## Discussion

Few FH homozygotes with a total loss of receptor function survive past age 30(1). We report here the first FH-iPSC and FH-iHep models of a FH patient with homozygous null mutation. Current protocols to generate hepatocyte-like cells generally use undefined components in the differentiation process(29). Recently, improvement in function and organization of hESC-derived hepatocytes was reported when cells were cultured on a mixture of laminins instead of matrigel(29). We designed a novel differentiation approach to generate diseased hepatocytes in conditions based on factors and small molecules close to GMP mainly to improve the maturation of hepatoblasts. Our process resulted in metabolically functional hepatocytes with enhanced hepatocyte organization, polarization and canalicular excretion, suggesting a mature feature of stem cell-derived hepatocytes *in vitro*.

Lentiviral or episomal vectors bearing the LDLR cDNA or the wild-type LDLR sequence respectively have previously been used to restore LDLR endocytosis in FH-iPSC-derived hepatocytes(9, 42). We demonstrate that the strategy based on the insertion of a correcting cassette into the *AAVS1* locus via CRISPR/Cas9 can be used to efficiently restore LDLR phenotype and function. Targeting such a locus rather than the *LDLR* one will allow correcting FH patients' specific cell lines with distinct mutations using the same therapeutic cassette, as there are more than 1400 mutations known on the *LDLR* gene. We also show that *APOA2* hepatic-specific promoter driving expression of the LDLR can be regulated by a statin, statins being the most used drugs to lower cholesterol.

We chose the *AAVS1* locus because gene targeting at this site, using different nucleases, showed robust transgene expression in pluripotent stem cells and differentiated progeny(43). However, hepatic transgene expression in the *AAVS1* context had not yet been established. Indeed, integration into the *AAVS1* locus by means of an FLPe recombinase-mediated cassette exchange of various transgenes under the control of *AFP* enhancer-promoter and *A1AT* promoter resulted in inhibition of transgene expression in transgenic cell lines. This inhibition exerted by the *AAVS1* locus was found both in undifferentiated hESC and in differentiating hepatocytes(44). In our construct, 900 bp of specific *APOA2* regulatory sequences drive the expression of LDLR. They were chosen because they are specifically expressed in hepatocytes *in vitro* and *in vivo* after transplantation of autologous hepatocytes transduced with *APOA2*-GFP lentivectors into cynomolgus macaca livers(45).

Moreover, *APOA2* promoter like *LDLR* promoter, is regulated by different drugs such as fibrates(38). Thus, provided that the promoter driving transgene expression contains adequate regulatory sequences, the *AAVS1* locus can be considered for robust and regulated transgene expression in liver. Our study appears to be the first to report the use of this system for genetic correction of a metabolic liver disease with regulated expression of correcting sequences, both of which being critical for translating the iPSC technology into novel therapies for many monogenic untreatable disorders. Concerning FH treatment, it is noteworthy that as low as 3.5–5% of hepatic LDLR activity should be sufficient to render homozygous patients accessible to drug treatment.

Dyslipidemia is a central causative factor of atherosclerosis, and reducing plasma levels of LDL-c remains the cornerstone of primary and secondary prevention of cardiovascular diseases. Therefore, development of appropriate cell models to study cholesterol homeostasis, as well as the action of statins and other pharmaceuticals, is important for cardiovascular health/disease prevention(46). Lastly, in an elegant study, LDLR knockout iPSCs were generated from normal iPSCs targeted by zinc-finger nucleases. After differentiation into hepatocytes, these cells were transplanted into the liver of *Ldlr-/-, Rag2-/-, Il2rg-/-* mice to develop an *in vivo* model for drug testing(47). To address the pathophysiology of FH, we studied the regulation by statins of three genes, *SREBP2*, *HMGCR*, and *PCSK9*, encoding proteins which are major regulators of cholesterol level in hepatocytes, affecting *LDLR* expression level. Statins are routed primarily to the liver where they bind and inhibit HMGCR, the rate-limiting enzyme in cholesterol biosynthesis, resulting in its decrease in hepatocytes. Consequently, expression of the *LDLR* gene, and LDL uptake are enhanced via SREBP2 activation(1). However increased SREBP2 activation associated with statin treatment has a major adverse effect: it increases the expression of *HMGCR*, which thus opposes the competitive inhibition of the statin on cholesterol biosynthesis(48). In our three cell models, as expected, *PCSK9* and *HMGCR* but not *SREBP2*, were upregulated at the transcriptional level by pravastatin, which also enhanced expression of *PCSK9* and of *LDLR* –except in FH-iHeps- upon activation of SREBP2. This was also correlated to an increase in Dil-LDL internalization.

FH-patient-specific iPSCs will also be important tools to create autologous controls to elucidate the functional contribution of LDLR mutations to variations that affect cholesterol metabolism, and to assess drugs for hypolipidemic functions, which block

enzymes at other stages of the cholesterol biosynthetic pathway than statins(48). Indeed most drugs that lower serum LDL-c work on the liver through upregulation of *LDLR* transcription (statins) or stability of the LDLR protein by means of PCSK9 inhibitors, such drugs being ineffective in homozygous patients. The need to identify new drugs for treatment of homozygous FH has recently been elegantly highlighted(49). In this report, a screen of a library of existing drugs on a double heterozygote FH patient revealed that cardiac glycosides could reduce the production of APOB-100.

The use of pluripotent stem cell-derived hepatocytes as an HCV culture model has so far been limited by the low titres of infectious virus produced, most likely attributable to their immature phenotype compared with PHHs(16).

Production of infectious virus necessitates high levels of HCV genome replication but involves additional requirements such as components of the VLDL biogenesis pathway thought to be hijacked by HCV for the formation of lipo-viro-particles(23). Carpentier et al. noted that their iPSC-derived hepatocyte-like cells secreted APOB-100 (one molecule of which is present in each VLDL) at lower levels than PHHs and also produced low titres of HCV particles ( $10^2$  ffu/mL) despite significant levels of HCV replication(16). By contrast, our iHeps secreted APOB-100-containing lipoproteins (iHeps:  $2.44 \pm 0.26$  log microg/dL; PHHs:  $2.51 \pm 0.14$  log microg/dL;  $P=0.30$ ) and produced infectious HCV particles at levels that were both similar to those found in our robust HCV culture system in PHHs(15). The degree of polarization reached by our iHeps might also contribute to infectious virus production, as recently reported(50). Thus, we have developed a robust iPSC-based HCV culture system. FH-iHeps and corr-FH-iHeps further provide a proof of concept that this model can be used to study the influence of host genetics on HCV infection and to produce genetically modified hepatocytes that could, for instance, be rendered resistant to viral infection in the context of regenerative medicine. The LDLR has been reported to play a role in the HCV infection cycle, although it may be dispensable and redundant with that of SRBI and of the VLDL receptor(20-22, 24). Although this role is generally attributed to the hepatocellular attachment of the lipo-viro-particle via its lipoprotein moiety leading to virus entry(20, 21, 24), Albecka et al. demonstrated that the LDLR-mediated internalization of HCV does not necessarily lead to a productive entry and further revealed an indirect role of the LDLR in HCV genome replication *per se* via its physiological function in the hepatocellular lipid

metabolism(22). However, these conflicting data were obtained using Huh-7 sublines(21, 22, 24). Our finding that FH-iHeps supported the complete HCV life cycle despite a complete absence of *LDLR* gene expression confirms that the LDLR is not necessarily required for HCV infection. Nevertheless, the significantly decreased viral load and infectious titre compared to those of both their control and corrected counterparts, despite similar intracellular levels of negative-strand HCV RNA, revealed a novel role of LDLR in late steps of the HCV infection cycle, i.e., assembly or secretion of progeny virus. As the morphogenesis of HCV particles is tightly linked to the lipid metabolism of the producing cell(15, 23), the mechanism underlying the role of LDLR in this process is most likely indirect through the repercussion of lipoprotein uptake on the intracellular lipid content. The availability of FH-iHeps and corr-FH-iHeps provides a valuable model to gain deeper insight into the hepatocellular lipid metabolism and the host requirements for HCV morphogenesis, still the least understood step of the HCV infection cycle.

In summary, we provide an FH-modelling platform for other FH patients, which can be extrapolated to other metabolic diseases in order to investigate and rescue functions of inherited liver diseases. It also lays the foundation for the development and preclinical assessment of cholesterol-lowering drugs and antiviral therapeutics against human hepatotropic pathogens.

**Acknowledgements**

PCSK9 antibodies were kindly provided by Dr. Thomas A. Lagace (Ottawa, Canada). The authors also thank Prof. Gérard Tachdjian and Dr. Lucie Tosca for karyotype analyses and Noushin Dianat, Sarah Awan-Toor, Antonietta Messina and Nassima Benzoubir for helpful discussions. The authors are grateful to Sylvie Goulinet-Mainot and Josep Escrivà for their excellent technical support and to Alexis Moravic for his skillful contribution to virological analyses. They also acknowledge Claire Poiron, Malika Gantier and Jean-Marie Heslan from the GenoCellEdit platform of the SFR Bonamy for providing the tools for genome editing and genome analysis.

**Potential conflict of interest: Nothing to report**

## References

1. Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:431-438.
2. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, Ginsberg HN, Masana L, Descamps OS, Wiklund O, et al. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J* 2013;34:3478-3490a.
3. Lefort B, Saheb S, Bruckert E, Giraud C, Hequet O, Hankard R. Impact of LDL apheresis on aortic root atheroma in children with homozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2015;239:158-162.
4. Cuchel M, Bruckert E, Ginsberg HN, Raal FJ, Santos RD, Hegele RA, Kuivenhoven JA, et al. Homozygous familial hypercholesterolaemia: new insights and guidance for clinicians to improve detection and clinical management. A position paper from the Consensus Panel on Familial Hypercholesterolaemia of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J* 2014;35:2146-2157.
5. Pareja E, Gomez-Lechon MJ, Tolosa L. Alternative Cell Sources to Adult Hepatocytes for Hepatic Cell Therapy. *Methods Mol Biol* 2017;1506:17-42.
6. **Ghodsizadeh A, Taei A**, Totonchi M, Seifinejad A, Gourabi H, Pournasr B, Aghdami N, et al. Generation of liver disease-specific induced pluripotent stem cells along with efficient differentiation to functional hepatocyte-like cells. *Stem Cell Rev* 2010;6:622-632.
7. Hannoun Z, Steichen C, Dianat N, Weber A, Dubart-Kupperschmitt A. The potential of induced pluripotent stem cell derived hepatocytes. *J Hepatol* 2016;65:182-199.
8. Cayo MA, Cai J, DeLaForest A, Noto FK, Nagaoka M, Clark BS, Coltery RF, et al. JD induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes faithfully recapitulate the pathophysiology of familial hypercholesterolemia. *Hepatology* 2012;56:2163-2171.
9. Fattahi F, Asgari S, Pournasr B, Seifinejad A, Totonchi M, Taei A, Aghdami N, et al. Disease-corrected hepatocyte-like cells from familial hypercholesterolemia-induced pluripotent stem cells. *Mol Biotechnol* 2013;54:863-873.
10. Rashid ST, Corbineau S, Hannan N, Marciniak SJ, Miranda E, Alexander G, Huang-Doran I, et al. Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. *J Clin Invest* 2010;120:3127-3136.
11. Pankowicz FP, Jarrett KE, Lagor WR, Bissig KD. CRISPR/Cas9: at the cutting edge of hepatology. *Gut* 2017.
12. Jarrett KE, Lee CM, Yeh YH, Hsu RH, Gupta R, Zhang M, Rodriguez PJ, et al. Somatic genome editing with CRISPR/Cas9 generates and corrects a metabolic disease. *Sci Rep* 2017;7:44624.
13. Sadelain M, Papapetrou EP, Bushman FD. Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome. *Nat Rev Cancer* 2011;12:51-58.
14. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005;11:791-796.
15. Podevin P, Carpentier A, Pene V, Aoudjehane L, Carriere M, Zaidi S, Hernandez C, et al. Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes. *Gastroenterology* 2010;139:1355-1364.
16. Carpentier A, Tesfaye A, Chu V, Nimgaonkar I, Zhang F, Lee SB, Thorgeirsson SS, et al. Engrafted human stem cell-derived hepatocytes establish an infectious HCV murine model. *J Clin Invest* 2014;124:4953-4964.

17. Roelandt P, Obeid S, Paeshuyse J, Vanhove J, Van Lommel A, Nahmias Y, Nevens F, et al. Human pluripotent stem cell-derived hepatocytes support complete replication of hepatitis C virus. *J Hepatol* 2012;57:246-251.
18. **Schwartz RE, Trehan K**, Andrus L, Sheahan TP, Ploss A, Duncan SA, Rice CM, et al. Modeling hepatitis C virus infection using human induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:2544-2548.
19. Wu X, Robotham JM, Lee E, Dalton S, Kneteman NM, Gilbert DM, Tang H. Productive hepatitis C virus infection of stem cell-derived hepatocytes reveals a critical transition to viral permissiveness during differentiation. *PLoS Pathog* 2012;8:e1002617.
20. **Molina S, Castet V**, Fournier-Wirth C, Pichard-Garcia L, Avner R, Harats D, Roitelman J, et al. The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *J Hepatol* 2007;46:411-419.
21. Owen DM, Huang H, Ye J, Gale M, Jr. Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor. *Virology* 2009;394:99-108.
22. Albecka A, Belouzard S, Op de Beeck A, Descamps V, Goueslain L, Bertrand-Michel J, Terce F, et al. Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatology* 2012;55:998-1007.
23. Felmler DJ, Hafirassou ML, Lefevre M, Baumert TF, Schuster C. Hepatitis C virus, cholesterol and lipoproteins--impact for the viral life cycle and pathogenesis of liver disease. *Viruses* 2013;5:1292-1324.
24. **Yamamoto S, Fukuhara T**, Ono C, Uemura K, Kawachi Y, Shiokawa M, Mori H, et al. Lipoprotein Receptors Redundantly Participate in Entry of Hepatitis C Virus. *PLoS Pathog* 2016;12:e1005610.
25. Steichen C, Luce E, Maluenda J, Tosca L, Moreno-Gimeno I, Desterke C, Dianat N, et al. Messenger RNA- versus retrovirus-based induced pluripotent stem cell reprogramming strategies: analysis of genomic integrity. *Stem Cells Transl Med* 2014;3:686-691.
26. Beilstein F, Lemasson M, Pene V, Rainteau D, Demignot S, Rosenberg AR. Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 is downregulated by hepatitis C virus: impact on production of lipo-viro-particles. *Gut* 2016.
27. Finkelshtein D, Werman A, Novick D, Barak S, Rubinstein M. LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:7306-7311.
28. **Baxter M, Withey S, Harrison S**, Segeritz CP, Zhang F, Atkinson-Dell R, Rowe C, et al. Phenotypic and functional analyses show stem cell-derived hepatocyte-like cells better mimic fetal rather than adult hepatocytes. *J Hepatol* 2015;62:581-589.
29. Cameron K, Tan R, Schmidt-Heck W, Campos G, Lyall MJ, Wang Y, Lucendo-Villarin B, et al. Recombinant Laminins Drive the Differentiation and Self-Organization of hESC-Derived Hepatocytes. *Stem Cell Reports* 2015;5:1250-1262.
30. Tolosa L, Caron J, Hannoun Z, Antoni M, Lopez S, Burks D, Castell JV, et al. Transplantation of hESC-derived hepatocytes protects mice from liver injury. *Stem Cell Res Ther* 2015;6:246.
31. Touboul T, Chen S, To CC, Mora-Castilla S, Sabatini K, Tukey RH, Laurent LC. Stage-specific regulation of the WNT/beta-catenin pathway enhances differentiation of hESCs into hepatocytes. *J Hepatol* 2016;64:1315-1326.
32. Naujok O, Diekmann U, Lenzen S. The generation of definitive endoderm from human embryonic stem cells is initially independent from activin A but requires canonical Wnt-signaling. *Stem Cell Rev* 2014;10:480-493.

33. Clotman F, Jacquemin P, Plumb-Rudewiez N, Pierreux CE, Van der Smissen P, Dietz HC, Courtoy PJ, et al. Control of liver cell fate decision by a gradient of TGF beta signaling modulated by Onecut transcription factors. *Genes Dev* 2005;19:1849-1854.
34. Sampaziotis F, de Brito MC, Geti I, Bertero A, Hannan NR, Vallier L. Directed differentiation of human induced pluripotent stem cells into functional cholangiocyte-like cells. *Nat Protoc* 2017;12:814-827.
35. Qin J, Chang M, Wang S, Liu Z, Zhu W, Wang Y, Yan F, et al. Connexin 32-mediated cell-cell communication is essential for hepatic differentiation from human embryonic stem cells. *Sci Rep* 2016;6:37388.
36. Twisk J, Gillian-Daniel DL, Tebon A, Wang L, Barrett PH, Attie AD. The role of the LDL receptor in apolipoprotein B secretion. *J Clin Invest* 2000;105:521-532.
37. Chambaz J, Cardot P, Pastier D, Zannis VI, Cladaras C. Promoter elements and factors required for hepatic transcription of the human ApoA-II gene. *J Biol Chem* 1991;266:11676-11685.
38. Kan HY, Pissios P, Chambaz J, Zannis VI. DNA binding specificity and transactivation properties of SREBP-2 bound to multiple sites on the human apoA-II promoter. *Nucleic Acids Res* 1999;27:1104-1117.
39. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 2003;34:154-156.
40. Lagace TA. PCSK9 and LDLR degradation: regulatory mechanisms in circulation and in cells. *Curr Opin Lipidol* 2014;25:387-393.
41. Costet P, Cariou B, Lambert G, Lalanne F, Lardeux B, Jarnoux AL, Grefhorst A, et al. Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c. *J Biol Chem* 2006;281:6211-6218.
42. **Ramakrishnan VM, Yang JY**, Tien KT, McKinley TR, Bocard BR, Maijub JG, Burchell PO, et al. Restoration of Physiologically Responsive Low-Density Lipoprotein Receptor-Mediated Endocytosis in Genetically Deficient Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci Rep* 2015;5:13231.
43. Smith JR, Maguire S, Davis LA, Alexander M, Yang F, Chandran S, French-Constant C, et al. Robust, persistent transgene expression in human embryonic stem cells is achieved with AAVS1-targeted integration. *Stem Cells* 2008;26:496-504.
44. Ordovas L, Boon R, Pistoni M, Chen Y, Wolfs E, Guo W, Sambathkumar R, et al. Efficient Recombinase-Mediated Cassette Exchange in hPSCs to Study the Hepatocyte Lineage Reveals AAVS1 Locus-Mediated Transgene Inhibition. *Stem Cell Reports* 2015;5:918-931.
45. Dagher I, Nguyen TH, Groyer-Picard MT, Lainas P, Mainot S, Guettier C, Pariente D, et al. Efficient hepatocyte engraftment and long-term transgene expression after reversible portal embolization in nonhuman primates. *Hepatology* 2009;49:950-959.
46. Latimer J, Batty JA, Neely RD, Kunadian V. PCSK9 inhibitors in the prevention of cardiovascular disease. *J Thromb Thrombolysis* 2016;42:405-419.
47. Yang J, Wang Y, Zhou T, Wong LY, Tian XY, Hong X, Lai WH, et al. Generation of Human Liver Chimeric Mice with Hepatocytes from Familial Hypercholesterolemia Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* 2017;8:605-618.
48. Charlton-Menys V, Durrington PN. Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. *Exp Physiol* 2008;93:27-42.
49. Cayo MA, Mallanna SK, Di Furio F, Jing R, Tolliver LB, Bures M, Urick A, et al. A Drug Screen using Human iPSC-Derived Hepatocyte-like Cells Reveals Cardiac

Glycosides as a Potential Treatment for Hypercholesterolemia. *Cell Stem Cell* 2017;20:478-489 e475.

50. Belouzard S, Danneels A, Feneant L, Seron K, Rouille Y, Dubuisson J. Entry and release of hepatitis C virus in polarized human hepatocytes. *J Virol* 2017.

**FIGURES (attached file)****Figure 1**

Modelling Familial Hypercholesterolemia (FH) with disease-specific human induced pluripotent stem cells (iPSCs) and correlation between genotype and phenotype. (A) Reprogramming of fibroblasts (upper panel) from a patient with FH towards iPSCs (lower panel). Scale bars: 50µm. (B,C) Representative immunostaining (B) and FACS analyses (C) for indicated stem cell markers in FH-iPSCs. Scale bars: 50µm. Black lines indicate isotype control antibody and red lines, positive cells. (D) DNA sequencing chromatograms depicting the mutated nucleotide g.10891 C>T (c.97C>T, p.Q12X) (arrowhead) in the Low Density Lipoprotein Receptor (*LDLR*) exon 2 in FH-patient's fibroblasts and iPSCs by contrast to normal human fibroblasts. (E) Absence of LDLR protein was confirmed in FH-iPSCs by western blot analysis. (F) Representative confocal pictures of Dil-LDL internalization in normal and FH-fibroblasts and in normal and FH-iPSCs. Nuclei were counterstained with DAPI. Abbreviations: OCT, Octamer-Binding Transcription Factor 4; SSEA, Stage-specific embryonic antigen.

**Figure 2**

Differentiation of control- and FH-iPSCs into hepatocytes. (A) Schematic outline of the developed protocol. Growth factors, small molecules and timing are indicated. (B) Representative FACS analyses for the definitive endoderm (DE) marker CXCR4 at day 5 of differentiation and for the hepatoblast marker EPCAM at day 10 of differentiation showing homogenous populations of DE and progenitor cells respectively in control and FH-cells. Black lines indicate isotype control antibody and red lines, positive cells. (C) Representative RT-PCR analyses for expression of hepatocytic markers in control- and FH-iPSCs and in control- and FH-iHeps. (D) Representative morphologies and immunostainings of the indicated markers at day 25 of differentiation on hepatocytes derived from control or FH-iPSCs. Scale bars: 50 µm. (E) Usual top view and z-stack reconstruction of immunostaining of gap junction protein connexin 32 (CX32) in FH-iHeps showing punctuated signal at the cell membranes at sites of cell-cell contact. Nuclei were counterstained with DAPI. (F) Quantification of APOB-100 secretion in FH-iHeps compared to control iHeps. Data are presented as mean ± SD, n=3 experiments. Statistical significance was determined by Student's test, \**P*<0.05. Abbreviations: A1AT, α-1 antitrypsin; ALB, albumin; ASGR, asialoglycoprotein receptor; BMP, bone morphogenetic protein; CD, cluster of differentiation; CLDN1, claudin1; CXCR, chemokine (C-X-C motif) receptor; CYP3A4, cytochrome P450 3A4; Dex, dexamethasone; EPCAM, epithelial cell adhesion molecule; F9, clotting factor IX gene; EGF, epithelial growth factor; FGF, fibroblast growth factor; HGF, hepatocyte growth factor; HNF, hepatocyte nuclear factor; OSM, oncostatin M; SRB1, scavenger receptor class B member 1, TAT: tyrosine aminotransferase; UGT1A1, UDP-glycosyltransferase 1 polypeptide A1, ZO, zona occludens.

**Figure 3**

CRISPR/Cas9-mediated insertion of LDLR expression cassette at the *AAVS1* genomic site. (A) Design of the LDLR expression cassette in the *AAVS1* SA-2A-puro-pA donor plasmid that contains right and left sequences homologous to the flanking sequences of the *AAVS1* double strand break (DSB) site induced by CRISPR/Cas9. The expression cassette also contains Woodchuck hepatitis virus Posttranslational

Regulatory Element (WPRES) sequence to improve protein expression by facilitating mRNA nuclear export. (B) Junction PCR analyses showing correct integration of the cassette in 15/16 FH-iPSC clones. (C) PCR analysis corresponding to *AAVS1* targeted locus, showing absence of integration of the correcting cassette in one of the alleles. Abbreviations: *AAVS1*, adeno-associated virus integration site 1, *APOA2*, apolipoprotein A2; DSB, double strand break; pA, polyadenylation tail; Puro(R), puromycin resistance gene; SA, splice acceptor site; WPRES, woodchuck posttranslational regulatory element .

#### Figure 4

Functionality and phenotypic rescue of hepatocytes generated from corr-FH-iHeps. (A) Uptake and excretion of Indocyanin Green (ICG). After 1h of incubation, the uptake of ICG was visible in a high percentage of cells. Most of these cells had excreted ICG as early as 4 hours after its withdrawal from the medium. (B) Representative images of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFA) excretion at the biliary poles of corr-FH-iHeps. All images were taken at x10 magnification, z-stacks of xy sections of the cells were acquired with an epifluorescence microscope and analyzed with ImageJ software. The data presented are representative of three independent experiments. Arrowheads indicate bile canaliculi. (C) CYP activity levels of CYP2D6, CYP3A4, CYP2A6 in corr-FH-iHeps (black bars) was determined 24 hours after incubation with specific substrates compared to control iHeps (white bars). (D) Ureagenesis was assessed in control iHeps (white bar) and corr-FH-iHeps (black bar) by measuring the formation of urea from  $\text{NH}_4^+$  24 hours after incubation of the cells with  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and by comparison to human hepatocytes (grey bar). (E) Western blot analysis of proteins extracted from control- and corr-FH-iPSCs showing the specificity of *APOA2* regulatory sequences. (F) Representative confocal images of Dil-LDL internalization in FH-iHeps, corr-FH-iHeps and control iHeps. Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bars: 100  $\mu\text{m}$  Internalized Dil-LDL level was measured by FACS analysis in these three cell lines. Results are expressed as mean fluorescence intensity (MFI) relative to FH-iHeps, n=3 experiments. Statistical significance was determined by Student's test, \*P<0.05, \*\*P<0.01. Abbreviations: DCFA, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; ICG, indocyanin green.

#### Figure 5

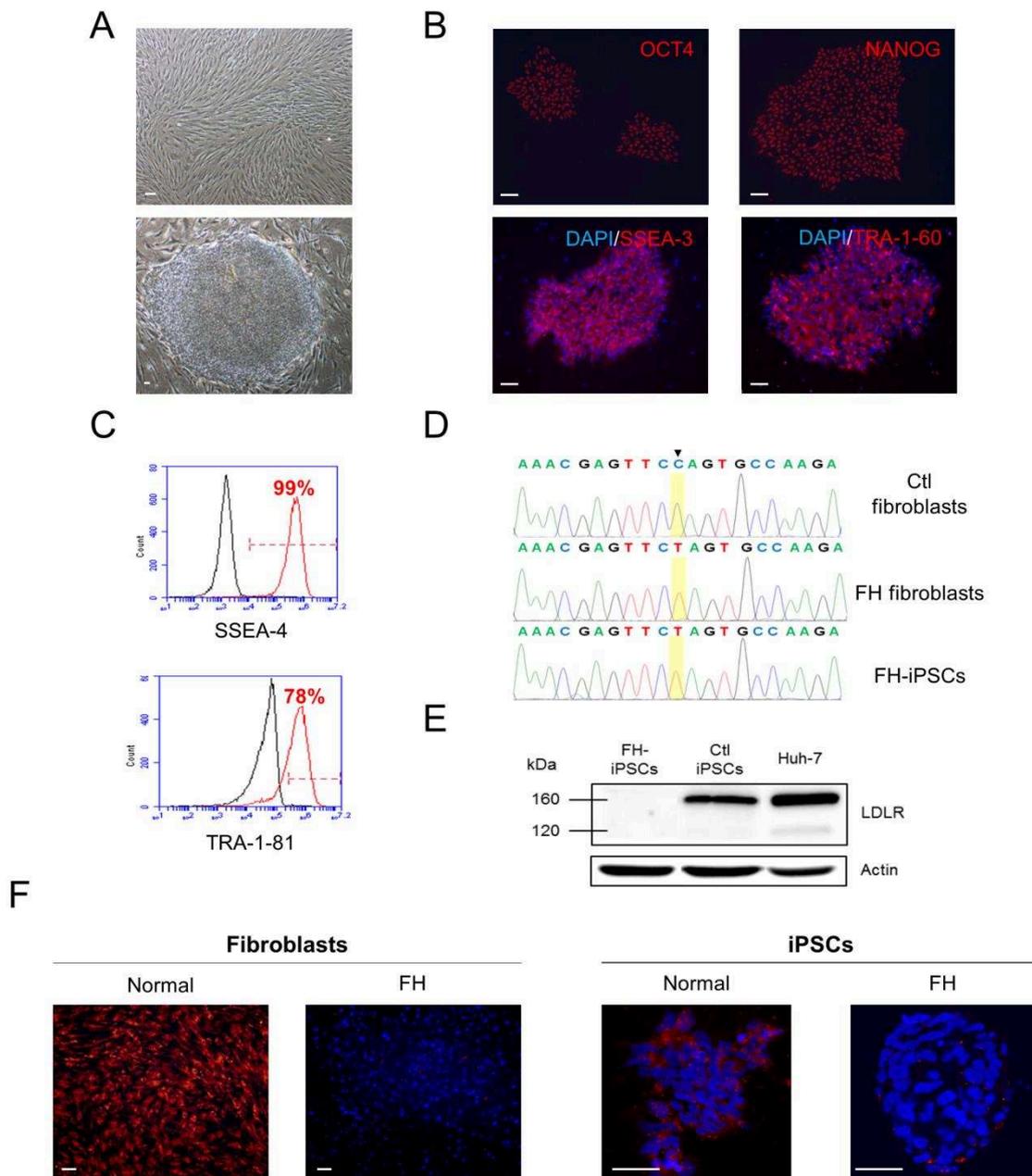
Effect of pravastatin on the regulation of target genes involved in cholesterol metabolism. (A) Relative mRNA expression levels of *SREBP2*, *HMGCR*, *PCSK9* determined by qRT-PCR. Expression of *SREBP2* transcription factor is unchanged while *HMGCR* and *PCSK9* expression is increased 24h after induction with 10  $\mu\text{M}$  of pravastatin. Gene expression levels were measured in biological triplicates and normalized against *RPL13a*, *TBP*, *RPLO* and *h-PBGD*. Results are expressed relatively to untreated samples (white bars) as mean  $\pm$  SD (n=3). Statistical significance was determined by Student's test, \*P<0.05, \*\*\*P<0.001. (B,C) Western blot analyses of the expression of LDLR and PCSK9 treated or not with pravastatin for 24h and 48 hours. The LDLR and PCSK9 bands were quantified with the ImageJ software with normalization by signals of  $\beta$ -actin. Results are expressed relatively to untreated samples as mean  $\pm$  SD (n=3). Statistical significance was determined by Student's test, \*P<0.05, \*\*P<0.01. (D) Representative confocal images of Dil-LDL internalization in control-, FH-iHeps and corr-FH-iHeps without (upper panel) or with pravastatin treatment for 24h (lower panel). Nuclei were counterstained with DAPI. Internalized Dil-LDL level was measured by FACS analysis in these three cell types

with or without pravastatin treatment and is expressed as mean fluorescence intensity (MFI) relative to untreated samples. Scale bars: 100µm. (E) Immunofluorescence stainings for SREBP2 with or without pravastatin treatment in FH-iHeps and in corr-FH-Heps showing SREBP2 translocation into the nuclei after pravastatin treatment. Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bars: 50 µm. Abbreviations: HMGCR, Hydroxymethylglutaryl-Coenzyme A reductase; PCSK9, Proprotein Convertase Subtilisin Kinase 9; SREBP2, Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2.

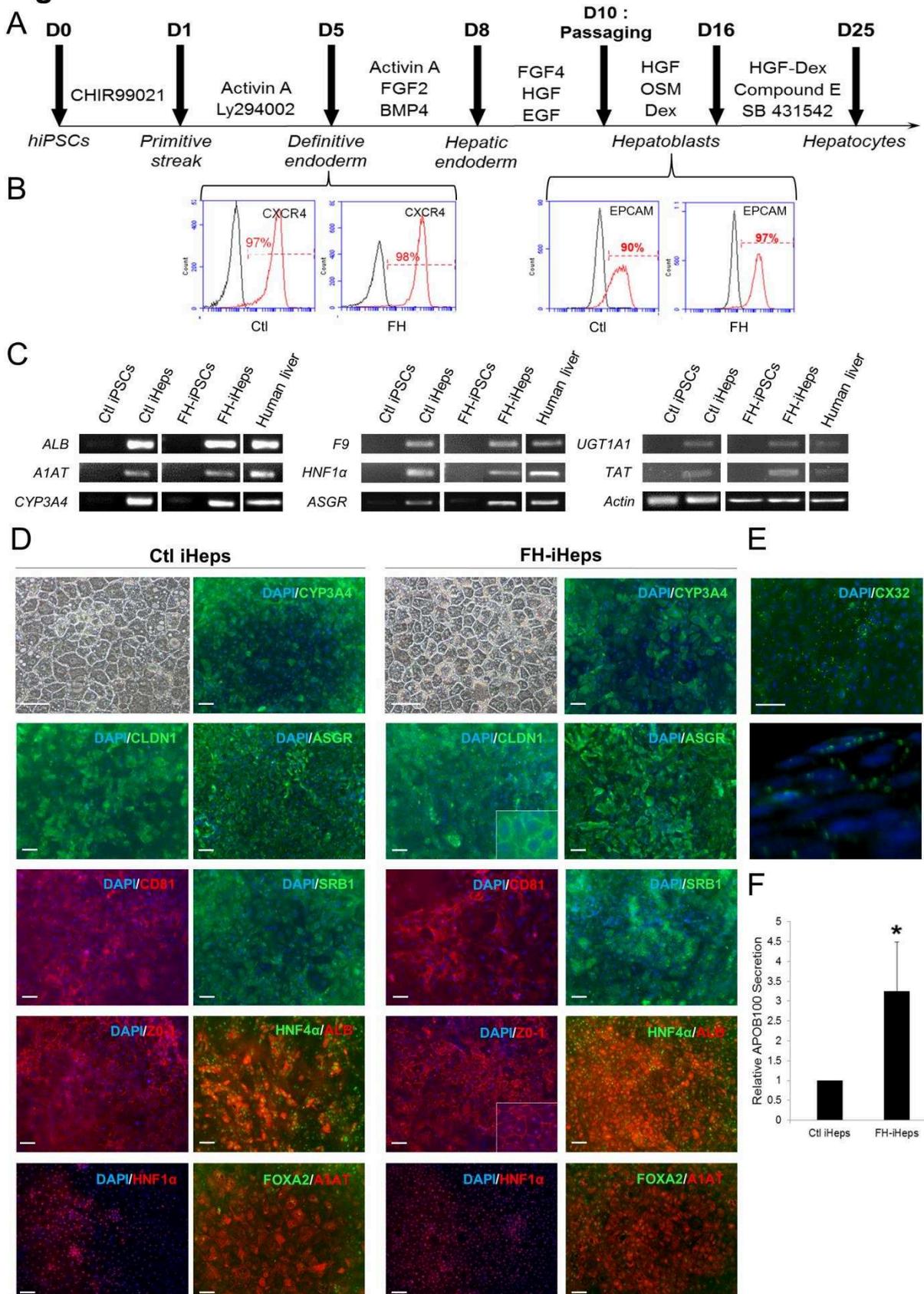
### Figure 6

iHeps support the complete HCV infection cycle at levels comparable to PHHs but viral production is decreased in FH-iHeps. iHeps at day 18 of the differentiation protocol or PHHs were inoculated with JFH1-HCV at an MOI of 2. Cells were lysed at day 1 post-inoculation for quantification of negative-strand HCV RNA (replication), and culture supernatants were collected at day 3 post-inoculation for quantification of HCV RNA by a commercial standardized assay (viral load) and titration of infectivity by focus-formation assay (infectious titre). (A) Comparison of control iHeps to PHHs. (B) Comparison for HCV genome replication of control iHeps, FH-iHeps and corr-FH-iHeps. Cells were cultured in the presence of 500 nM of the HCV polymerase inhibitor sofosbuvir (replication inhibitor) or dimethylsulfoxide as carrier control (DMSO vehicle). (C) Comparison for production of total and infectious viruses of control iHeps, FH-iHeps and corr-FH-iHeps. Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n=4 to 7 experiments). Statistical significance was determined by Student's test, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

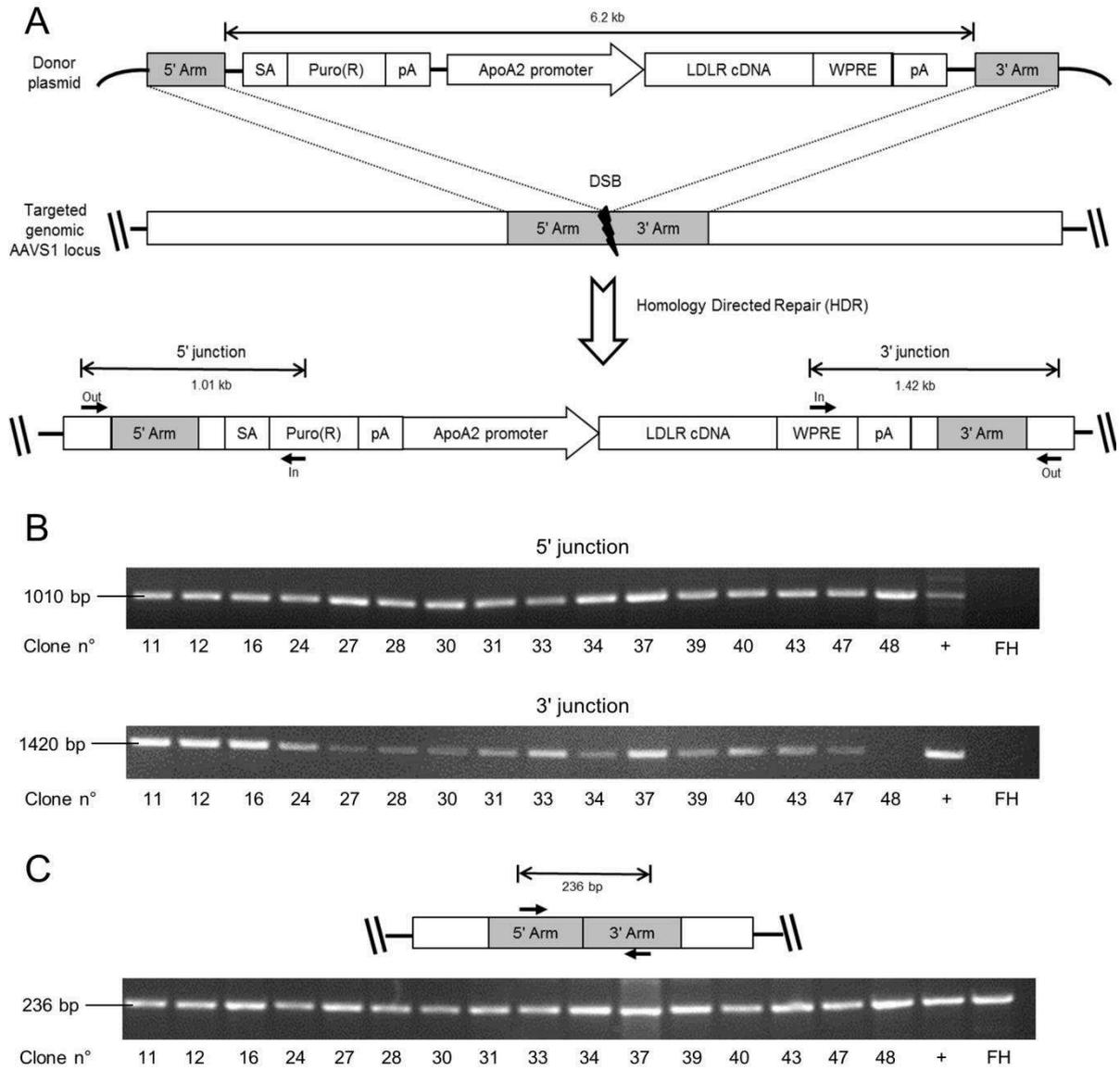
Figure 1



**Figure 2**



**Figure 3**



**Figure 4**

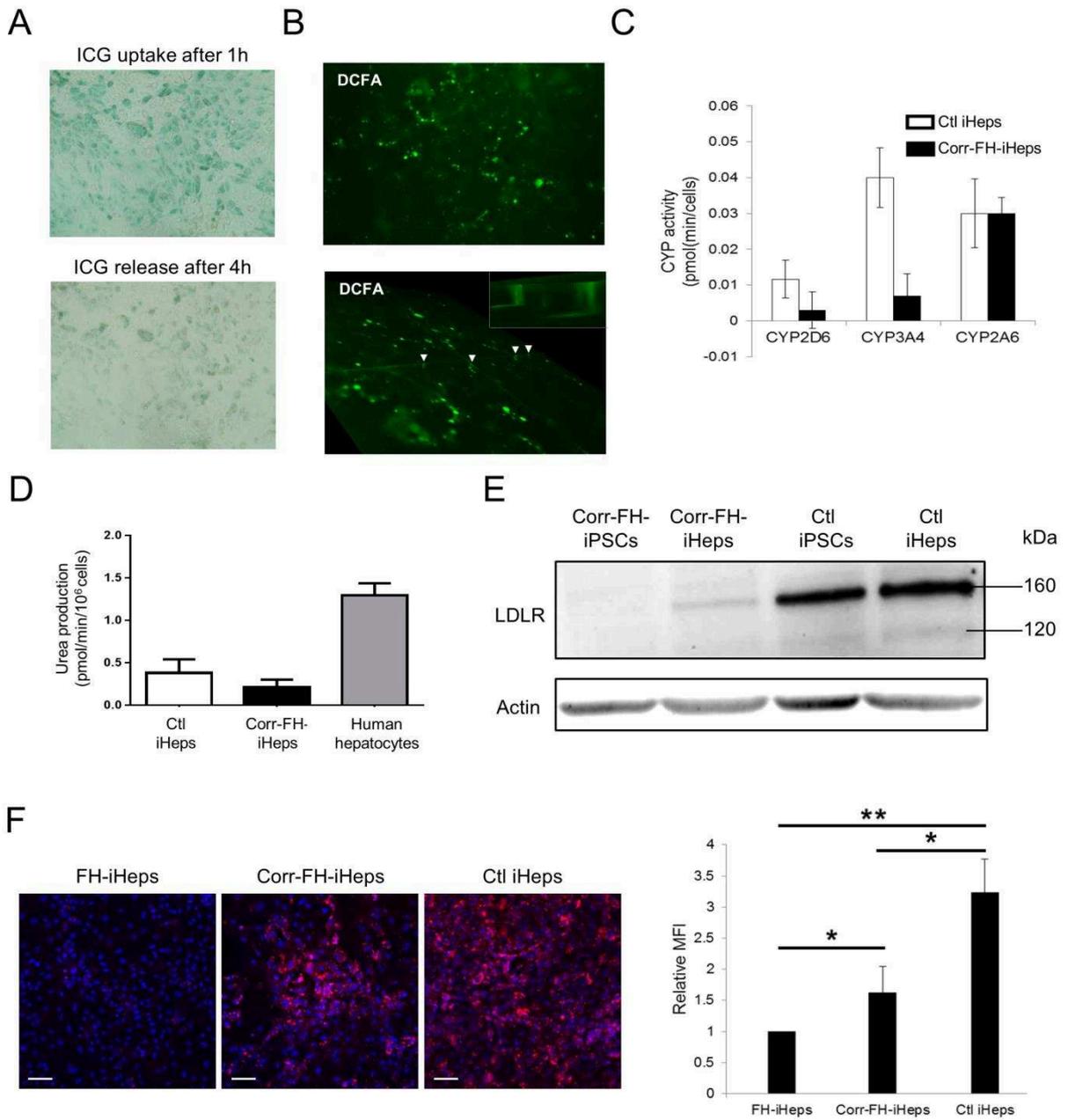


Figure 5

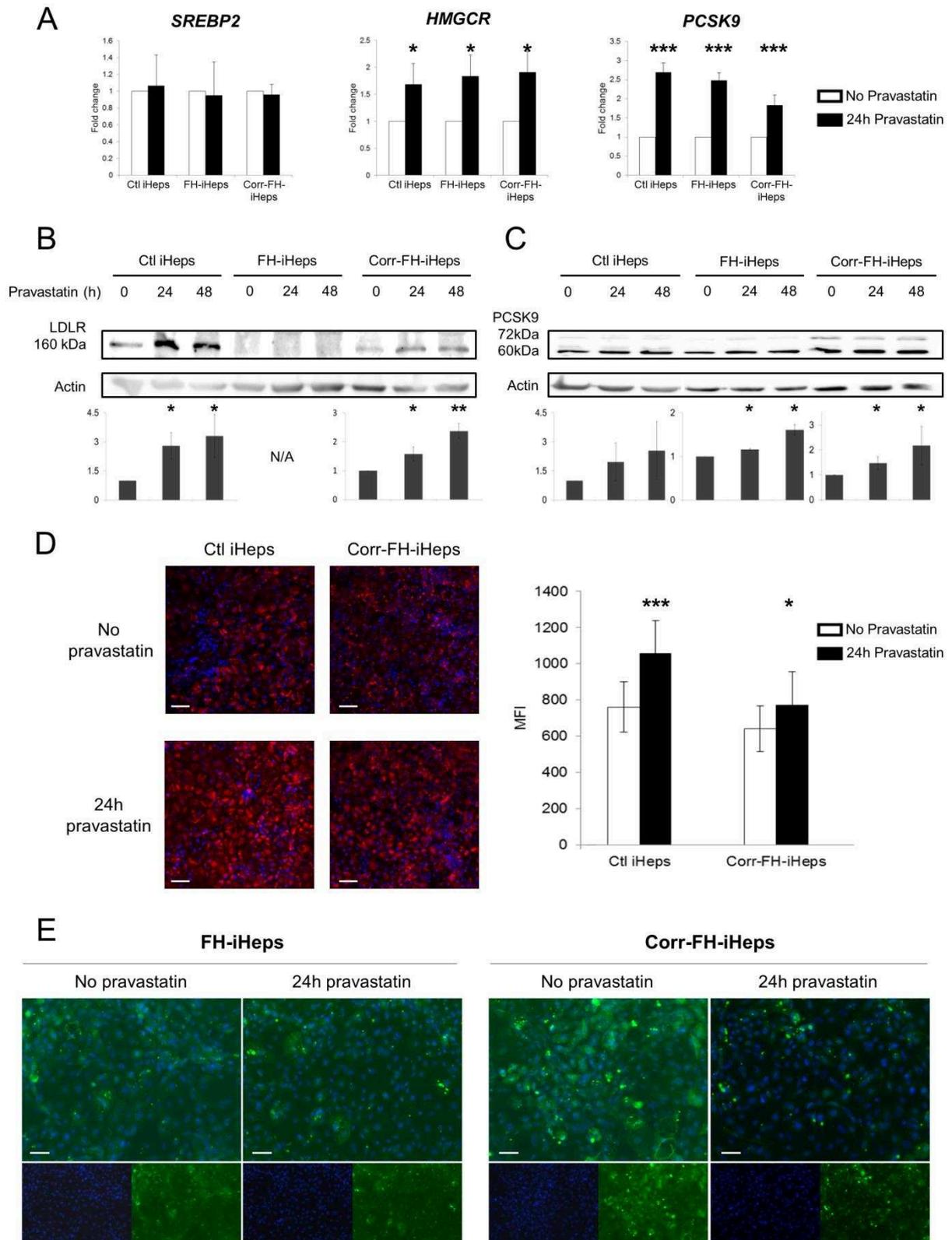
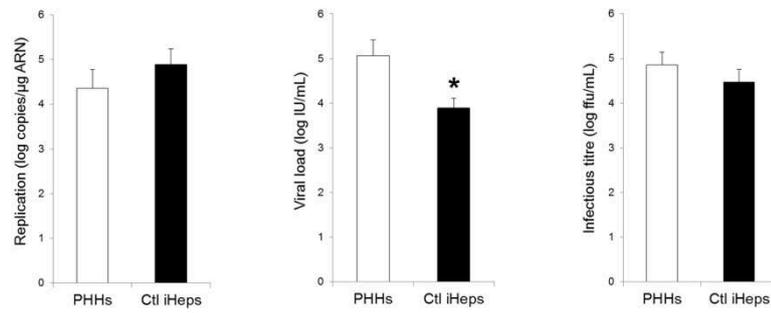
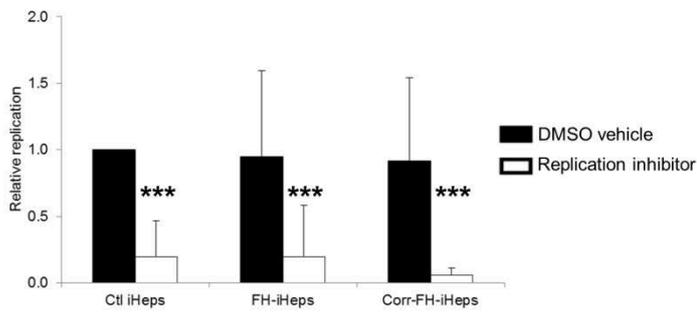


Figure 6

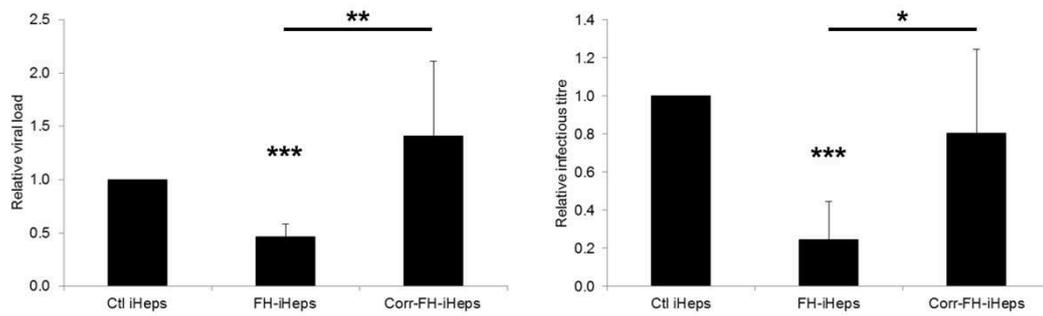
A



B



C



## Supplemental information

### Table of contents:

- Supplementary Material and Methods
- Supplementary Figures
- Supplementary Figure Legends
- Supplementary Literature
- Supplementary Tables

## Supplementary Material and Methods

### Ethics statement

This study was performed in agreement with the French and European regulations. Appropriate ethical approval and written informed consent was obtained from FH patient. No patient's information is available in the laboratory, apart from their sex and age. Ethical approval was obtained from INSERM clinical research committee and legal instances (Comité de protection des personnes).

### Generation of human iPSCs (hiPSCs) from a hypercholesterolemic patient's fibroblasts

Eight mm skin punch biopsy was obtained from a volunteering hypercholesterolemic (FH) patient homozygous for the g.10891 C>T (c.97C->T, p.Q12X) mutation leading to the absence of LDLR expression. Fibroblasts were derived from the donated tissue using standardized in house protocols and expanded in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 1% non-essential amino acids (NEAA), 1 % L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin (all from Gibco) and 10% fetal bovine serum (PAA). Cells were passaged in 100 mm culture dishes (Corning, Corning Life Sciences, Dutscher) and were split 1:3 once they reached confluency.

FH-iPSCs were generated, amplified and cryopreserved at passage 5 by Phenocell SAS (Evry, France) using non-integrative episomes(1) and their standard feeder-free routine.

### Culture of human iPSCs

hiPSCs were thawed onto irradiated mouse embryonic fibroblasts (MEF) feeder cells (Globalstem) at  $3.5 \times 10^5$  cells per 6 mm culture dish and cultured in hiPSC medium (DMEM, 20% knockout serum replacement (KOSR) (Gibco), 1% Penicillin/Streptomycin, 1% NEAA, 1 % L-Glutamine, 100  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol (Sigma), 10 ng/mL FGF2 (PeproTech)) in a 5% CO<sub>2</sub> / 5% O<sub>2</sub> incubator and medium was changed daily. Cells were then mechanically picked once a week and passaging onto new MEF-coated culture dishes. After 2 or 3 passages, colonies were mechanically picked and transferred onto Geltrex-coated culture dishes (Gibco) and cultured in StemMACS™ iPS-Brew XF medium (Miltenyi Biotec) changed every 2 days. Cells were mechanically passaged onto new Geltrex-coated dishes for further expansion of hiPSCs. To start a differentiation protocol, cells were dissociated into single cells by Cell Dissociation Buffer (CDB) (0.1 mg/ml EDTA, 0.5 mg/ml BSA in phosphate-buffered saline (PBS) 1X) for 5 min at 37°C and were seeded in StemMACS™ iPS-Brew XF (40 000 cells per cm<sup>2</sup>) supplemented with 10  $\mu$ M Rock inhibitor onto Geltrex-coated plates.

### Hepatocyte differentiation of FH-iPSCs

*In vitro* differentiation of FH-iPSCs into FH-iHeps was performed, as for the control hiPSCs, using previously described protocols with modifications. Briefly, one day

before the passage of hiPSCs for differentiation, 12-well plates (Corning) were coated with 0.1% porcine gelatin (Sigma) for one hour at room temperature, then with coating medium (DMEM, 10% Fetal bovine serum (FBS, Hyclone), 1% non-essential amino acids, 1% penicillin/streptomycin and 1% L-glutamine), and incubated for 24 h at 37°C. The following day, feeder-free hiPSCs were seeded as single cells on the coated plates in StemMACS™ iPS-Brew XF medium. Three days after, to initiate the differentiation into definitive endoderm, maintenance medium was replaced by RPMI (Gibco) and B27 serum-free supplement (Life technologies), 1% non-essential amino acids, 1% penicillin/streptomycin and 1% L-glutamine and supplemented with 5 µM of CHIR99021 (Miltenyi Biotec) for one day followed by treatment with the same medium containing 100 ng/ml of Activin A (CellGenix) and 10 µM of LY294002 (VWR) for 4 days. For hepatic specification, 20 ng/ml FGF2 (CellGenix), 10 ng/ml BMP4 (R&D systems) and 50 ng/ml Activin A were added during 3 days. Then, to obtain hepatoblasts, RPMI without methionine (Gibco) was supplemented with 30 ng/ml FGF4 (R&D systems), 20 ng/ml HGF (Peprotech), 10 ng/ml EGF (Peprotech) for two days. At day 10, cells were passaged with CDB and seeded onto 12-wells plates coated with 10 µg/mL fibronectin (Sigma) and 30 µg/mL of calf skin collagen type I (Sigma). Cells were then cultured in HPM medium (William's E/Ham F12 1:1, 1% penicillin/streptomycin and 1% L-glutamine,  $10^{-5}$  M linoleic acid-Albumin (Sigma),  $5 \cdot 10^{-8}$  M 3,3',5-Triiodo-L-thyronine (Sigma), 0.07 IU Insulin (Actrapid® - Vidal),  $6 \cdot 10^{-4}$  M vitamin C (Sigma),  $6 \cdot 10^{-4}$  M human apo-transferrin (Sigma), 1mM sodium pyruvate (Gibco), 0,5 nM selenic acid (Sigma)) supplemented with 20 ng/mL HGF, 10 ng/mL oncostatin M (OSM, Peprotech) and 100 nM of dexamethasone (Sigma) for five days. For final maturation, OSM is removed and the medium is changed every 2 days.

### **Transduction of hiPSCs with GFP expressing lentiviral vectors pseudotyped with protein G**

The *EF1α*-green fluorescent protein (GFP) lentivectors was constructed and produced by Vectalys (Toulouse, France). hiPSCs were dissociated as single cells using CDB and seeded in StemMACS™ iPS-Brew XF at 100 000 cells per well of 12-well plates onto Geltrex. The day after, cells were transduced with the *EF1α*-GFP lentivector at different MOI (0.1, 1, 5, 10) for 3 hours. The cells were then washed 3 times with PBS and fresh StemMACS™ iPS-Brew XF medium was added and changed every 2 days. Five days after transduction, cells were dissociated using CDB and GFP expression was analyzed by flow cytometry.

### **Dil-LDL uptake**

Cells were incubated with 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine-perchlorate (Dil)-LDL (Bioquote Limited) at 2.5 µg/mL for 2 hours. Then, cells were washed 3 times with cold PBS 1X, counterstained with DAPI and mounted in Fluoromount medium. Photographs were taken using TCS SP5 confocal microscope (Leica Microsystems).

For flow cytometry analyses, cells were dissociated for 5 minutes with Accutase (Fisher), harvested, centrifuged and pellets were suspended in coating medium. Cells were detected in PE Channel using LSR Fortessa flow cytometer (BD).

### **Assessment of differentiated hepatocyte functionality**

The indocyanin green (ICG) uptake test was assayed by incubating differentiated cells in medium supplemented with 0.5 mg/mL ICG for 60 minutes at 37°C. Cells were then washed 3 times with PBS and fresh medium is added. ICG release was evaluated 4 hours later.

Oil Red O staining was assayed by incubating fixed cells with 60% isopropanol (Sigma) for 5 minutes and then with 60% Oil Red O (Sigma). Cells were then washed 5 times with distilled water and counterstained with hematoxylin (Sigma) for 2 minutes before mounting and analysis.

PAS staining was assayed by incubating fixed cells with 1% Periodic Acid Solution (Sigma) for 5 minutes. Cells were then washed 4 times with distilled water, incubated with Schiff's reagent (Sigma) for 15 minutes, washed 3 more times and counterstained with hematoxylin for 2 minutes before mounting and analysis.

Formation of bile canaliculi was assayed by incubating differentiated cells in medium containing 2  $\mu$ M of DCFA for 30 minutes. Cells were then washed with cold PBS and DCFA efflux from hepatocytes into canaliculi structures was analyzed by microscopy.

Ureogenesis was assessed in the supernatants of thawed cells by measuring the formation of urea from  $\text{NH}_4^+$ , according to Donato et al(2). Amounts of albumin secreted into the medium were determined by the human albumin ELISA Quantitation kit (Bethyl; [http:// www.bethyl.com](http://www.bethyl.com)) following manufacturer's instructions.

Cytochrome P450 activities were measured by incubating differentiated cells with a cocktail of substrates for three individual P450 enzymes: 5  $\mu$ M coumarin (CYP2A6), 5  $\mu$ M midazolam (CYP3A4) and 10  $\mu$ M bufuralol (CYP2D6). After 24 hours of incubation at 37 °C, cell supernatants were recovered and stored at -80 °C until analysis. Formation of the corresponding metabolites was quantified by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC/MS; Waters) as previously described(3). Levels of APOB100 secreted into the medium were quantified by using the total human ApoB ELISA assay from ALerCHEK, as previously described(4).

### **Targeted integration**

The insertion, mediated by CRISPR/Cas9, of the "PuroR-normal human LDLR cDNA" expression cassette into *AAVS1* locus of hiPSCs was performed by nucleofection (Amaxa Nucleofectro, Lonza) of 3 plasmids, harboring respectively the sgRNA *AAVS1* targeting sequence (GGGGCCACTAGGGACAGGAT), the spCas9 endonuclease(5) and a donor cassette containing hAPOA2 promoter driving hLDLR expression cloned into pZDonor-*AAVS1* puromycin vector (Sigma-Aldrich). Cells were then incubated with increasing doses of puromycin (from 0.5  $\mu$ g/mL to 2  $\mu$ g/mL) and resistant clones were isolated and further expanded for analysis and cryopreservation. Correct insertion of the expression cassette was determined by PCR and Sanger sequencing with primers spanning the 5' and 3' homology arms,

respectively (Supplementary Table S1).

### **HCV infection**

A high-titre stock of JFH1-HCV(6) was produced in Huh-7.5.1 cells as described previously(7). This viral stock was used to inoculate iHeps at day 18 of the differentiation protocol in 12-well plates at an MOI of 2 ffu per cell. The culture medium was replaced with the inoculum diluted in the smallest volume of fresh medium sufficient for covering the cells. After a 6-hour incubation at 37°C, the inoculum was removed, and cells were washed 3 times with PBS, then cultured in fresh medium for the indicated times post-inoculation. Where indicated, 500 nM of the HCV polymerase inhibitor sofosbuvir, or dimethylsulfoxide as carrier control, were added to the medium. For the purpose of comparison, PHHs purchased from Biopredic (Rennes, France) were inoculated as described previously(7) with the same virus stock at the same MOI.

### **Karyotyping analyses**

Chromosome analyses were carried out by standard karyotyping on cultured cells, with standard procedures (RHG and GTG banding). For mitotic preparations, cells were cultured in StemMACS™ iPS-Brew XF supplemented with 0.02 mg/ml colchicine (Eurobio) for up to 2 h. The cells were harvested and incubated with a warm hypotonic solution of 0.075 M KCl for 20 min, then cells fixed several times in cold Carnoy's fixative (methanol/acetic acid, 3:1).

### **DNA Sequencing**

Genomic DNA was extracted using GeneJET Genomic DNA purification kit (ThermoFisher) according manufacturer's instructions and amplicons of interest (Supplementary Table S1). were purified using GeneJET Gel extraction kit (Fermentas). DNA sequencing was performed by CochIn Institute sequencing platform (Eurofins, France). Chromatograms were treated and analyzed by SeqScanner2 software.

### **RNA extraction, RT-PCR and quantitative RT-PCR (qRT-PCR).**

Total cell RNA was extracted using RNeasy Mini kit (Qiagen) following the manufacturer's recommendations. The amount of isolated RNA was determined using UV-visible Nanodrop Lite (ThermoFisher). For RT-PCR, cDNAs were obtained by Superscript First-Strand Synthesis System (Invitrogen) and simple PCR assays were performed using Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) according to the manufacturers' instructions. For qRT-PCR, cDNAs were reverse transcribed by QuantiTect kit (Qiagen) and processed by real-time PCR over 40 cycles using Maxima SYBR Green/ROX qPCR master mix (ThermoFisher) and an ABI-7000 real-time PCR system and ABI 7000 software (Applied Biosystems). All samples were amplified in triplicates and changes in gene expression were analyzed using the  $\Delta\Delta C_t$  method by normalizing against RPL13a or TBP, RPLO and h-PBGD. Primer details are shown in Supplementary Table S2.

### **Immunocytochemistry**

Cells were fixed with 4% Paraformaldehyde (Euromedex) for 15 min at room temperature, then permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 20 min and blocked in 3 % bovine serum albumin (BSA)-PBS for 30 min at room temperature. Primary antibodies were diluted in PBS, 1% BSA and incubated overnight at 4°C. Secondary antibodies were diluted in PBS, 1% BSA and incubated for 1 hour at room temperature. Cell nuclei were counterstained with DAPI and cells were mounted in Fluoromount medium (Sigma) (See primary and secondary antibodies' dilutions in Supplementary Table S3). For membrane proteins staining, fixed cells were blocked in PFS buffer (0,025% saponin (Fisher), 0,02% sodium azide (Sigma), 0,7% fish gelatin (Sigma) in PBS) for 30 minutes at 37°C. Primary antibodies were diluted in PFS and incubated overnight at 4°C. Secondary antibodies and DAPI were diluted into PFS and were incubated at 37°C for 1 h and 5 min, respectively. Photographs were captured with a Leica HMR microscope (Leica Microsystems) or EVOS FL Auto Cell Imaging System (Life Technologies) and treated with ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

### **Flow cytometry**

Cells were dissociated with CDB and suspended in PBS, 3% BSA. They were then incubated with conjugated antibodies or with control isotypes for 30 min at 4°C in the dark. Cells were then washed with PBS, centrifuged and suspended in PBS, 1% BSA for analysis. Cells were detected with an Accuri C6 flow cytometer (BD biosciences). Dead cells were eliminated with 7-Amino Actinomycin D (7-AAD) staining (Beckman coulter). FACS antibodies and their dilutions are listed in Supplementary Table S3.

### **Western blot analysis**

Total proteins were extracted using RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton 100X, 1% sodium deoxycholate (all from Sigma) in water) with the addition of protease inhibitor cocktail (Roche). Thirty µg of total protein extracts were electrophoresed on an 8% acrylamide-SDS gel then transferred to a PVDF membrane (GE healthcare). The membrane was then blocked with PBS supplemented with 5% (w/v) dry milk and 0.1% Tween-20, washed with PBS containing 0.1% Tween-20 (PBST) and then incubated with primary antibodies diluted in PBS-milk-0.1% Tween-20 at 4°C overnight. After washing in PBST, the membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies at room temperature for 1 h. Clarity Western ECL Substrate kit (Biorad) was used for the revelation and pictures were captured using a Fusion Solo Camera and Fusion software. Protein expression was quantified using ImageJ software with β-actin as a control for protein amount. Dilutions of primary and secondary antibodies are described in Supplementary Table S3.

**Virological analyses**

All analyses were performed at day 3 post-inoculation except for assessment of HCV genome replication, which was done at day 1 post-inoculation, i.e., under conditions of a single infection cycle. Indeed, at later time points multiple rounds of infection are expected to cause a bias in the assessment of viral genome replication per se if production of viral particles is affected(4).

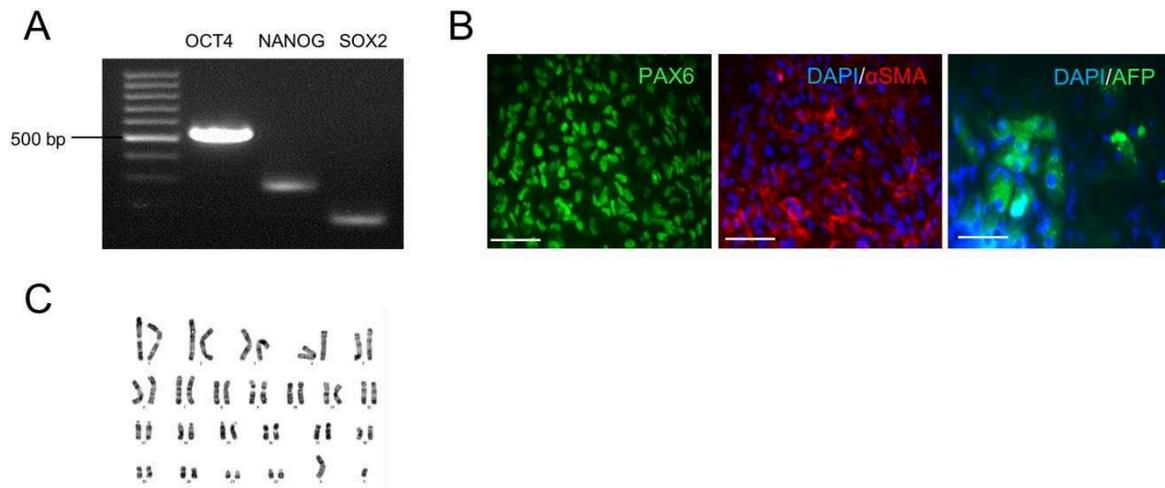
To assess HCV genome replication, intracellular amounts of negative-strand HCV RNA were quantified by a strand-specific qRT-PCR technique described previously(8).

To assess production of total HCV particles, HCV RNA levels in filtered culture supernatants were quantified by qRT-PCR using the m2000sp and m2000rt instruments and RealTime HCV kit (Abbott Diagnostics), a commercial standardized assay used for viral load quantification in clinical practice(9), as previously described(7).

To assess production of infectious HCV particles, infectious titres in filtered culture supernatants were determined by focus-formation assay, a classic titration assay based on inoculation of naive Huh-7.5.1 cells followed by detection of foci of infected cells by immunofluorescence, as described previously(7, 10).

## Supplementary Figures

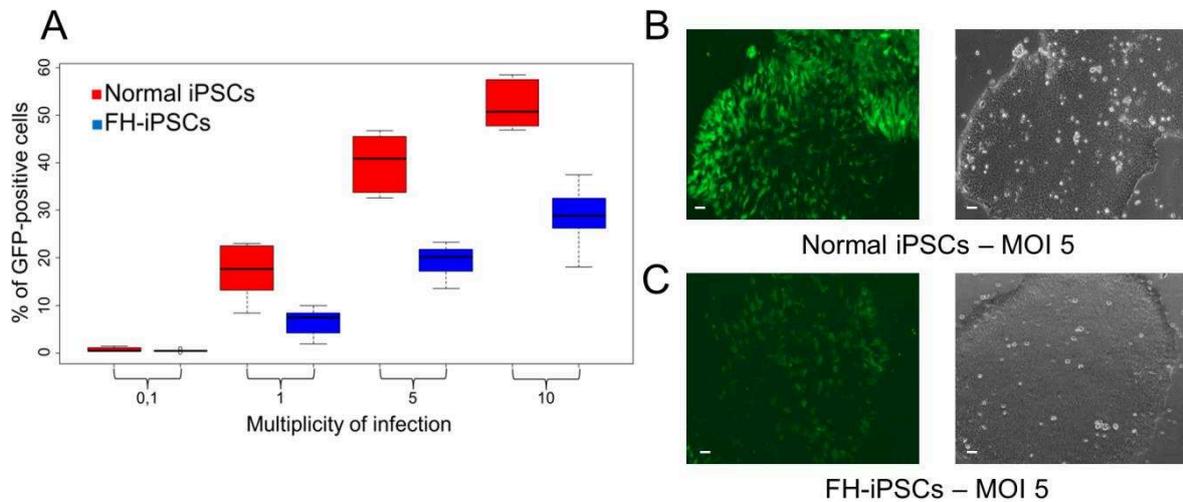
### Figure S1



**Fig. S1 Characterization of FH-iPSCs (related to Fig. 1).**

(A) Representative RT-PCR for indicated stem cell markers in FH-iPSCs. (B) FH-iPSCs generated embryoid bodies expressing specific proteins of derivatives from the 3 embryonic germ layers: PAX6 (ectoderm),  $\alpha$ SMA (mesoderm) and AFP (endoderm). (C) Karyotype analysis showed no genetic abnormalities induced by the reprogramming process. Abbreviations: AFP,  $\alpha$ -fetoprotein; OCT4, octamer-binding transcription factor; PAX, paired box; SMA, smooth muscle actin; SOX, sex determining region Y-box;

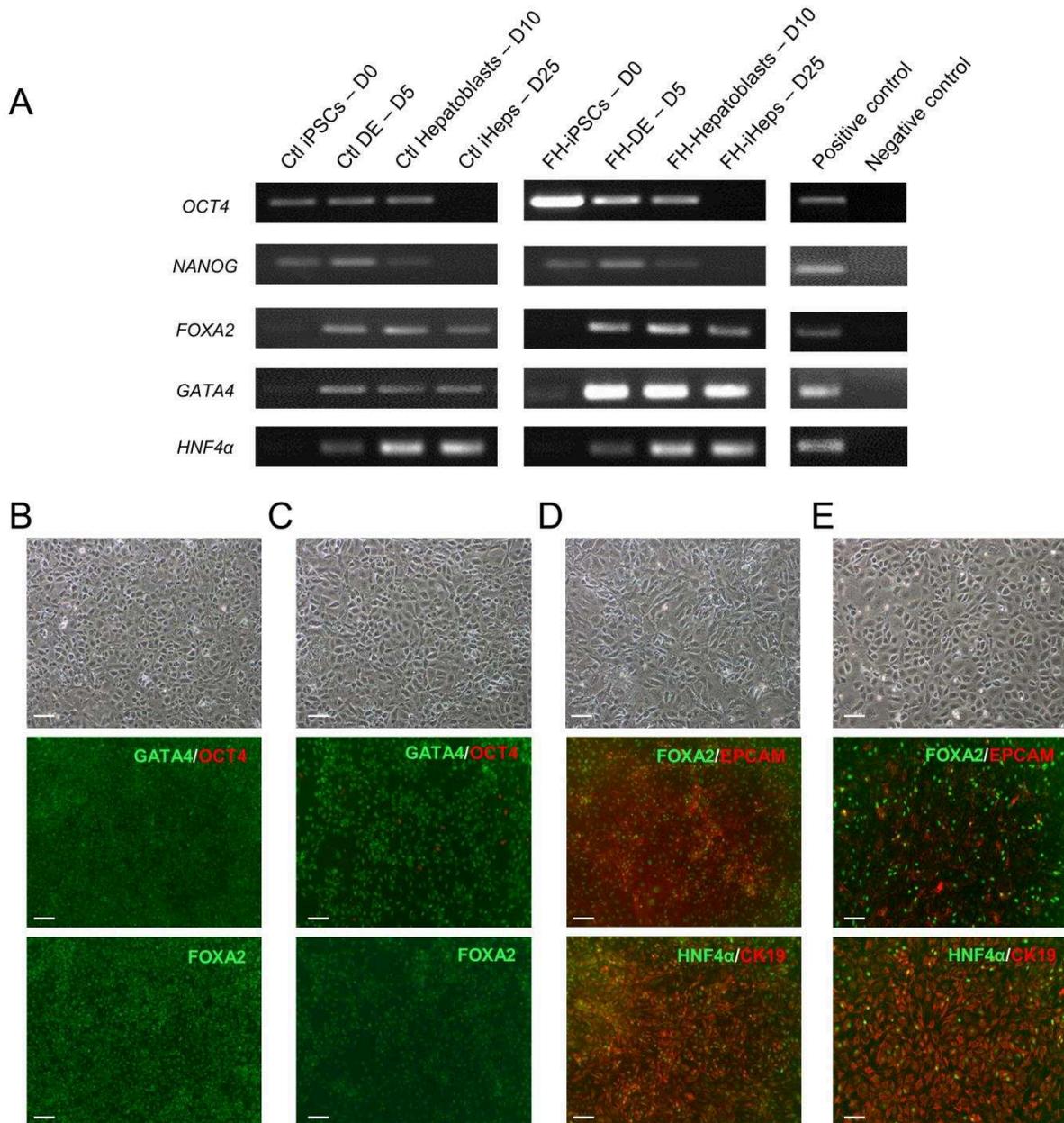
**Figure S2**



**Fig. S2 Role of LDLR in VSV-G pseudotyped lentivector entry.**

(A) Transduction efficiency of GFP-expressing lentivectors pseudotyped with VSV-G at different MOI in normal and FH-iPSCs analyzed by flow cytometry. (B,C) Representative brightfield and fluorescence pictures of control- (B) and FH-iPSCs (C) transduced with GFP-lentivectors pseudotyped with VSV-G at MOI 5. Transduction efficiency is decreased by 50% in FH-iPSCs by contrast to control iPSCs. The residual transduction in absence of LDLR suggests alternative virus entry routes. Abbreviations : GFP, green fluorescent protein; VSV, vesicular stomatitis virus.

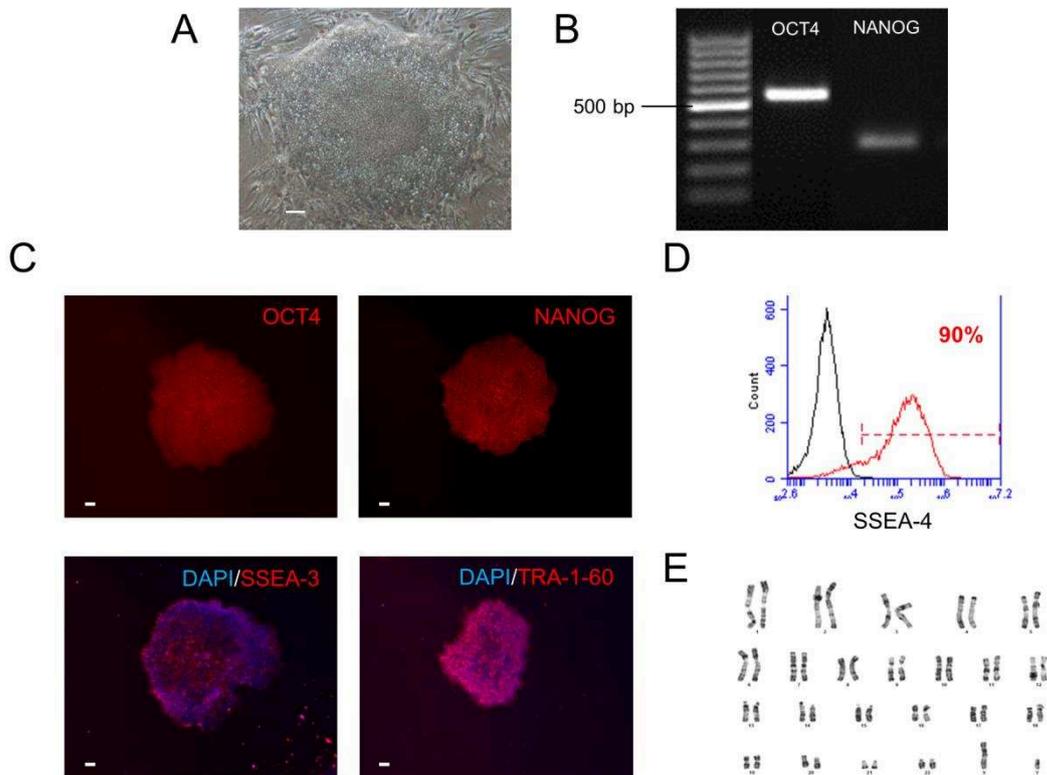
**Figure S3**



**Fig. S3 Differentiation of FH- and control-iPSCs towards definitive endoderm (DE) and hepatoblasts.**

(A) Representative RT-PCR analyses at days 0 (hiPSCs), 5 (DE), 10 (hepatoblasts) and 25 (iHeps) for expression of stem cells and hepatocytic markers in control- and FH-cells. hESCs were used as positive control for OCT4 and NANOG, and human fetal liver for FOXA2, GATA4 and HNF4α. hiPSCs: human induced pluripotent stem cells, hESCs: human embryonic stem cells. (B,C) Representative morphologies and immunostainings for the DE markers GATA4 and FOXA2 in DE-cells derived from control iPSCs (B) and from FH-iPSCs (C). (D,E) Representative morphologies and immunostainings for the hepatoblast markers HNF4α, CK19 and EPCAM in hepatoblasts derived from control iPSCs (D) and from FH-iPSCs (E). Scale bars: 50 μm. Abbreviations: CK, cytokeratin; EPCAM, epithelial cell adhesion marker; FOX, forkhead box protein, HNF, hepatocyte nuclear factor; OCT, octamer-binding transcription factor

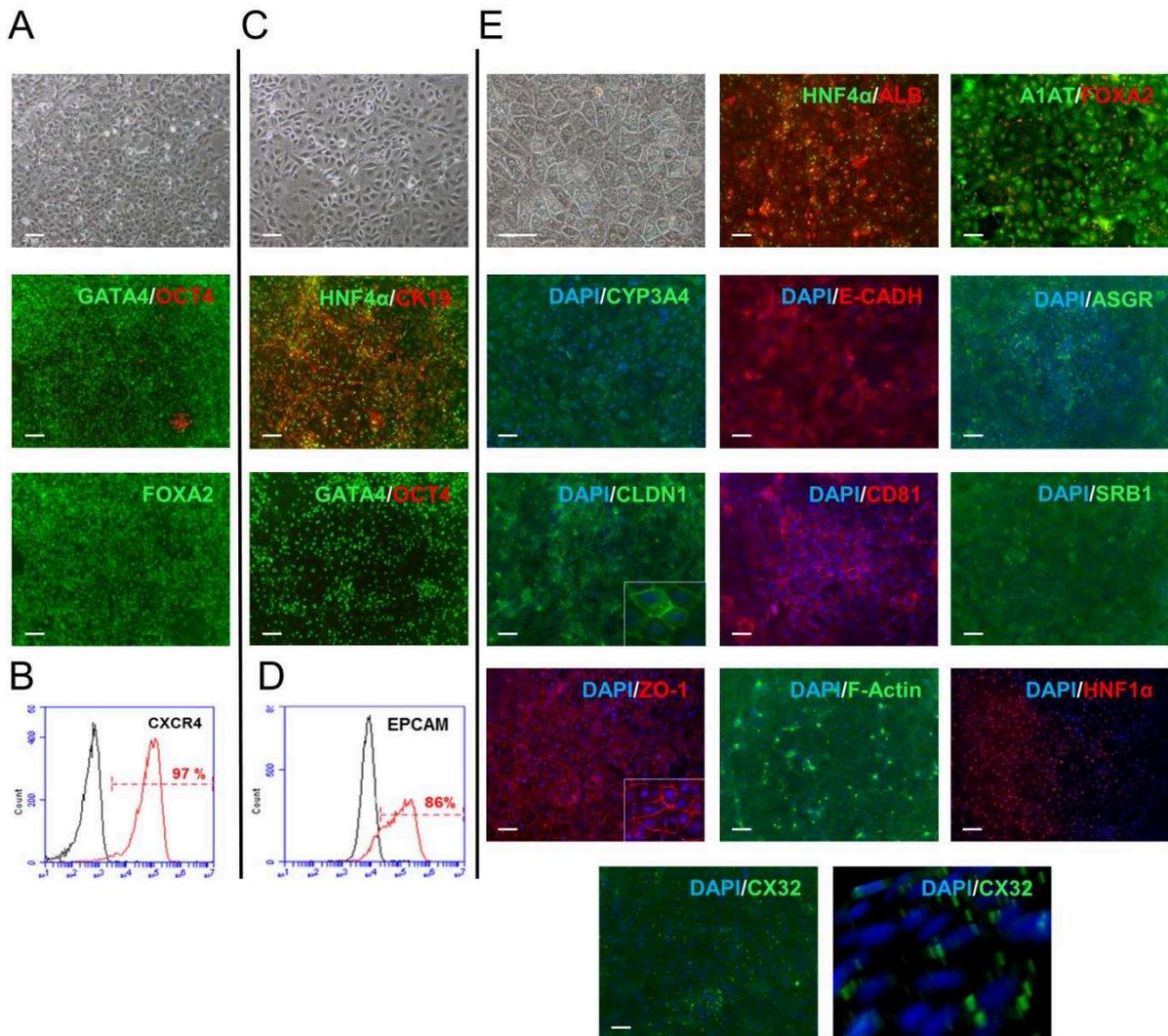
**Figure S4**



**Fig. S4 Characterization of corr-FH-iPSCs.**

(A) Corr-FH-iPSCs display the typical iPSC-like morphology. (B-D) Representative RT-PCR (B), immunostaining (C) and FACS analyses (D) for indicated stem cell markers. Scale bars: 100 $\mu$ m. Black line indicate isotype control antibody and red line, positive cells. (E) Karyotype analysis showed no genetic abnormalities induced by the correction process. Abbreviations: OCT, octamer-binding transcription factor; SSEA, Stage-specific embryonic antigen.

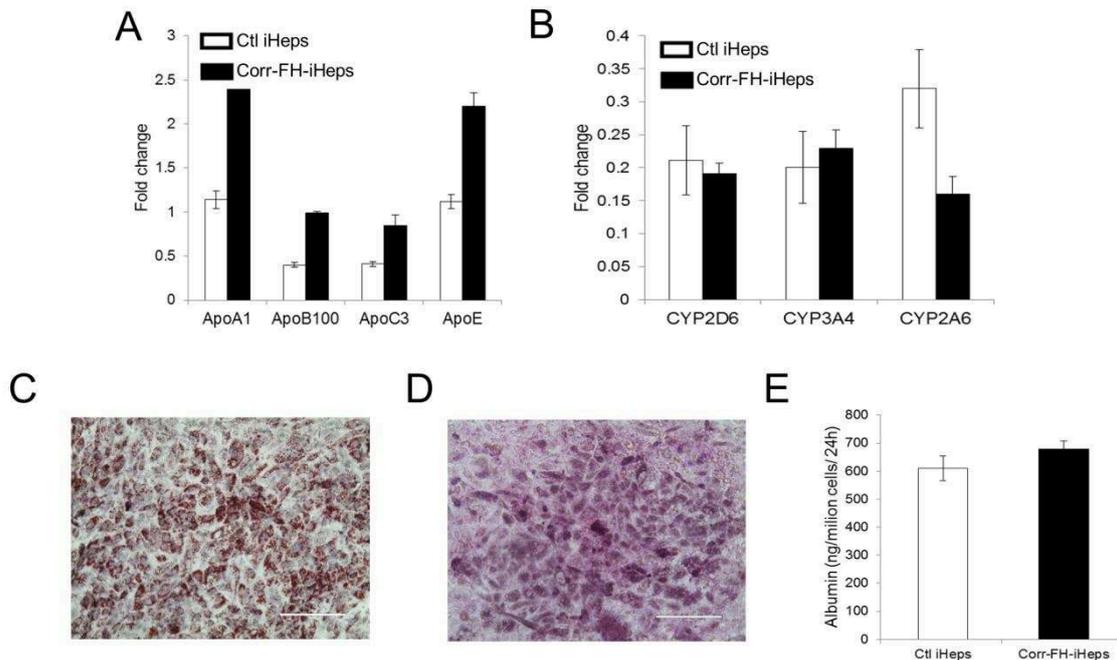
**Figure S5**



**Fig. S5 Differentiation of corr-FH-iPSCs into hepatocytes.**

(A) Representative morphology and immunostainings for the DE markers GATA4 and FOXA2 in DE-cells derived from corr-FH-iPSCs. DE: definitive endoderm. (B) Representative FACS analysis for the DE marker CXCR4 at day 5 of differentiation. Black line indicates isotype control antibody and red line, positive cells. (C) Representative morphology and immunostaining for the hepatoblast markers HNF4 $\alpha$ , CK19 in hepatoblasts derived from corr-FH-iPSCs. (D) Representative FACS analysis for the hepatoblast marker EPCAM at day 10 of differentiation. Black line indicates isotype control antibody and red line, positive cells. (E) Representative morphology and immunostainings of the indicated markers at day 25 of differentiation on hepatocytes derived from corr-FH-iPSCs. Scale bars: 50  $\mu$ m. Abbreviations: A1AT,  $\alpha$ -1 antitrypsin; ALB, albumin; ASGR, asialoglycoprotein receptor; CD, cluster of differentiation; CK, cytokeratin; CLDN1, claudin1; CX, connexin; CXCR, chemokine (C-X-C motif) receptor; CYP3A4, cytochrome P450 3A4; E-CADH, E-cadherin; EPCAM, epithelial cell adhesion molecule; FOX, forkhead box protein; HNF, hepatocyte nuclear factor; OCT, octamer-binding transcription factor; SRB1, scavenger receptor class B member 1, ZO, zona occludens.

**Figure S6**



**Fig. S6 Functionality of corr-FH-iHeps.**

(A) Quantitative RT-PCR analysis of 3 major CYPs, CYP2D6, CYP3A4, CYP2A6 at day 25 of differentiation in control iHeps (white bars) and corr-FH-iHeps (black bars). Data are represented as the percentage of expression in HepG2 hepatocytic cell line. (B) Relative expression levels of mRNA encoding *APOA1*, *APOB*, *APOC3* and *APOE* determined by qRT-PCR. (C) Oil red staining showing the ability of cells to store lipids. (D) Periodic Acid Schiff staining showing the ability of cells to store glycogen. (E) Albumin secretion by control- and corr-FH-iHeps was determined by ELISA test.

## Supplementary Literature

1. Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nature methods*. 2011;8(5):409-12.
2. Donato MT, Lahoz A, Montero S, Bonora A, Pareja E, Mir J, et al. Functional assessment of the quality of human hepatocyte preparations for cell transplantation. *Cell transplantation*. 2008;17(10-11):1211-9.
3. Gomez-Lechon MJ, Lahoz A, Castell JV, Donato MT. Evaluation of cytochrome P450 activities in human hepatocytes in vitro. *Methods in molecular biology*. 2012;806:87-97.
4. Beilstein F, Lemasson M, Pene V, Rainteau D, Demignot S, Rosenberg AR. Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 is downregulated by hepatitis C virus: impact on production of lipo-viro-particles. *Gut*. 2016.
5. **Mali P, Yang L**, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013;339(6121):823-6.
6. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature medicine*. 2005;11(7):791-6.
7. Podevin P, Carpentier A, Pene V, Aoudjehane L, Carriere M, Zaidi S, et al. Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes. *Gastroenterology*. 2010;139(4):1355-64.
8. Carriere M, Pene V, Breiman A, Conti F, Chouzenoux S, Meurs E, et al. A novel, sensitive, and specific RT-PCR technique for quantitation of hepatitis C virus replication. *Journal of medical virology*. 2007;79(2):155-60.
9. Laperche S, Bouchardeau F, Thibault V, Pozzetto B, Vallet S, Rosenberg AR, et al. Multicenter trials need to use the same assay for hepatitis C virus viral load determination. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(11):3788-90.
10. Pene V, Hernandez C, Vauloup-Fellous C, Garaud-Aunis J, Rosenberg AR. Sequential processing of hepatitis C virus core protein by host cell signal peptidase and signal peptide peptidase: a reassessment. *Journal of viral hepatitis*. 2009;16(10):705-15.

## Supplementary Tables

Supplementary Table 1. Primers for *LDLR* Sanger sequencing and targeted insertion used in this study

Primers used to screen FH mutation			
Gene	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')	Annealing Temp. (°C)
<i>LDLR</i> (exon 2)	TTTCCAGCTACGACACAGCAGGT	AGAACTGAGCAATCAAGCGGTTGA	55.8
Primers used for targeted integration of <i>LDLR</i> cassette			
Gene	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')	Annealing Temp. (°C)
5' junction	CTGCCGTCTCTCCTGAGT (5' arm)	GTGGGCTTGTA CTCCGGTCAT (Puro(R))	62
3' junction	GTCAGCTCCTTTCCGGGACT (WPRE)	GGAACGGGGCTCAGTCTG (3' arm)	62
<i>AAVS1</i> targeted site by CRISPR/CAS9	GCCCTATGTCCACTTCAGGA	ACAGGAGGTGGGGGTTAGAC	62

**Supplementary Table 2. RT-PCR and RT-qPCR primers used in this study**

<b>Primers used for RT-PCR</b>			
<b>Gene</b>	<b>Forward (5' - 3')</b>	<b>Reverse (5' - 3')</b>	<b>Annealing Temp. (°C)</b>
<i>OCT4</i>	GTGGAGGAAGCTGACAACAA	CAGGTTTTCTTTCCCTACGCT	54
<i>NANOG</i>	AGCTACAGCATGATGCAGGA	GGTCATGGAGTTGTA CTGCA	54
<i>SOX2</i>	TCCAACATCCTGAACCTCAG	GACTGGATGTTCTGGGTCTG	55
<i>ALBUMIN</i>	CCTTTGGCACAATGAAGTGGGTAACC	CAGCAGTCAGCCATTACCATAGG	58
<i>A1AT</i>	CCAACAGCACCAATATCCATCTTC	GTCTCTTCCTCGGTGTCTTGG	60
<i>CYP3A4</i>	CAGAACTTCTCCTTCAAACCTTGT	CAATGCATGTACAGAATCCCCGGT	60
<i>F9</i>	GTCCTGTGAACCAGCAGTGCC	TTGTCAGCAATGCAAATAGGT	58
<i>HNF1α</i>	AGACTTCACGCCACCCATCCTC	TTCTCCGCCCTTCTTGGTTG	60
<i>ASGR</i>	TAGGAGCCAAGCTGGAGAAA	ACCTGCAGGCAGAAGTCATC	56
<i>TAT</i>	CCCATCCATCGGCTTCCTATCCAG	CAGCCAACGCCCCATAACAGAGAT	65
<i>UGT1A1</i>	ATGACCCGTGCCTTTATCAC	TCTTGGATTTGTGGGCTTTC	58
<i>ACTIN</i>	GCACTCTCCAGCCTTCCTTCC	CTGCTGTCACCTTCACCGTTCC	60
<i>FOXA2</i>	GCGACCCCAAGACCTACAG	GGTTCTGCCGGTAGAAGGG	60
<i>GATA4</i>	CTAGACCGTGGGTTTTGCAT	TGGGTAAAGTGCCCCTGTAG	56
<i>HNF4α</i>	CGGGTGTCCATACGCATCCTTG	GACCCTCCAGCAGCATCTCCT	60

<b>Primers used for RT-qPCR</b>			
<b>Gene</b>	<b>Forward (5' - 3')</b>	<b>Reverse (5' - 3')</b>	<b>Annealing Temp. (°C)</b>
<i>CYP2D62</i>	AAGTACAGGGCTTCCGCATCC	GGGCTCACCAGGAAAGCAA	60
<i>CYP3A4</i>	AGAAAGTCGCCTCGAAGATACAC	CAGAGCTTTGTGGGCTCAGTT	56
<i>CYP2A6</i>	GCCCGCAGAGTCAAAAAGGA	CCCCTTCTCATT CAGGAAGTGCT	57
<i>SREBP2</i>	CTCCATTGACTCTGAGCCAGGA	GAATCCGTGAGCGGTCTACCAT	60
<i>HMGCR</i>	CACGATGCATAGCCATCCTG	GTGCTTGCTCTGGAAAGGTC	64
<i>RLDL</i>	TACAAGTGGGTCTGCGATGG	TGAAGTCCCCGGATTTGCAG	60
<i>PCSK9</i>	TGTATGGTCAGCACACTCGG	TAGACACCCTACCCCCAAA	62
<i>APOA1</i>	AGGCTCGGCATTTCTGGCAG	CGCTGTCCCAGTTGTCAAGG	59
<i>APOB</i>	AGCGTTCACCGATCTCCATCTG	TCAGATTCCCGGACC CTCAACT	59
<i>APOC3</i>	GTTACATGAAGCACGCCACC	CTCGCAGGATGGATAGGCAG	59
<i>APOE</i>	TGGGTCGCTTTTGGGATTAC	AGTTGTTCTCCAGTTC CGA	59

**Supplementary Table 3. Primary and secondary antibodies used in this study**

<b>Antibodies used for Immunofluorescence</b>				
<b>Cat. No</b>	<b>Company</b>	<b>Antibody</b>	<b>Species</b>	<b>Dilution</b>
SC-5279	Santa Cruz Biotechnology	OCT4	Mouse	1/200
AF1997	R&D	NANOG	Goat	1/100
MAB4303	Millipore	SSEA-3	Mouse	1/200
MAB4360	Millipore	TRA-1-60	Mouse	1/200
SC-1237	Santa Cruz Biotechnology	GATA4	Goat	1/200
SC-6554	Santa Cruz Biotechnology	FOXA2	Goat	1/200
SC-8987	Santa Cruz Biotechnology	HNF4 $\alpha$	Rabbit	1/200
M0888	Dako	CK19	Mouse	1/200
ABC171	AbCys	EpCAM	Mouse	1/100
SC-8399	Santa Cruz Biotechnology	AFP	Mouse	1/200
A6084	Sigma	ALB	Mouse	1/100
SC-27639	Santa Cruz Biotechnology	CYP3A4	Goat	1/100
A0012	Dako	A1AT	Rabbit	1/400
187362	Life Technologies	CLDN1	Rabbit	1/200
555675	BD Pharmingen	CD81	Mouse	1/200
NB400-131	Novus Biologicals	SRB1	Goat	1/200
NBP1-85047	Novus Biologicals	ZO-1	Rabbit	1/400
AB42488	Abcam	ASGR	Rabbit	1/100
SC-7258	Santa Cruz Biotechnology	Connexin 32	Goat	1/100
M3612	Dako	E-cadherin	Mouse	1/100
AB28482	Abcam	SREBP2	Rabbit	1/100
A12379	Molecular Probes	F-Actin	Mouse	1/200
AB5790	Abcam	PAX6	Rabbit	1/200
AB78078	Abcam	TUJ1	Mouse	1/100
AB5694	Abcam	$\alpha$ SMA	Rabbit	1/100
A11055 - A11057	Molecular Probes	Anti-goat	Donkey	1/1000
A32306 - A10042	Molecular Probes	Anti-rabbit	Donkey	1/1000
A21202 - A10037	Molecular Probes	Anti-mouse	Donkey	1/1000

<b>Antibodies used for Western Blot</b>				
<b>Cat. No</b>	<b>Company</b>	<b>Antibody</b>	<b>Species</b>	<b>Dilution</b>
AB52818	Abcam	LDLR	Rabbit	1/500
AB8227	Abcam	Actin	Rabbit	1/3000
NA934V	Thermo Fisher	Anti-Rabbit HRP	Donkey	1/10000

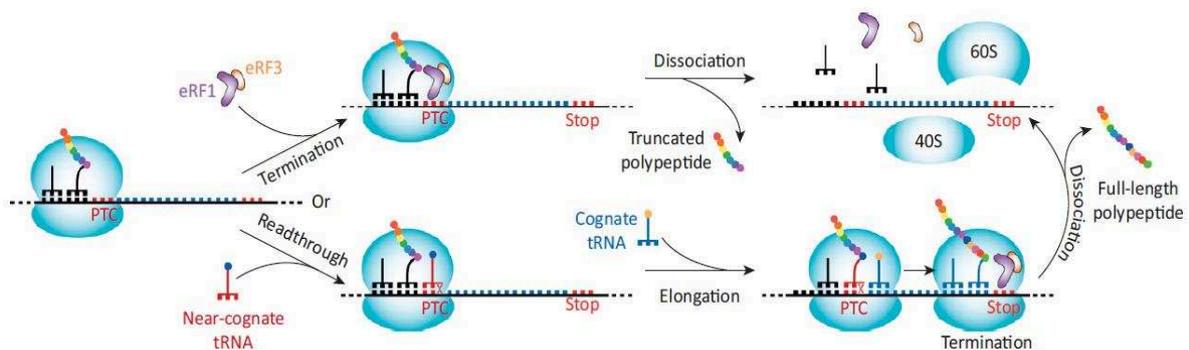
  

<b>Antibodies used for Flow Cytometry</b>				
<b>Cat. No</b>	<b>Company</b>	<b>Antibody</b>	<b>Species</b>	<b>Dilution</b>
12-8843-42	eBioscience	SSEA-4	Mouse	1/25
12-8883-82	eBioscience	TRA-1-81	Mouse	1/25
130-109-844	Miltenyi Biotec	CXCR4	Mouse	1/25
130-080-301	Miltenyi Biotec	EPCAM	Mouse	1/20
12-4742-42	eBioscience	Mouse IgG3-PE	Mouse	1/25

12-5890-82	eBioscience	Mouse IgM-PE	Mouse	1/25
130-091-836	Miltenyi Biotec	Mouse IgG2a-APC	Mouse	1/25
A07795	Beckman Coulter	Mouse IgG1-FITC	Mouse	1/20

## Discussion de l'article 2

Le modèle développé dans cet article est également intéressant pour étudier les molécules qui permettent d'augmenter le phénomène de translecture des codons STOP. En effet, la terminaison de la traduction n'est pas efficace à 100% et dépend de la compétition entre la reconnaissance d'un codon STOP soit par un facteur de terminaison soit par un ARN de transfert dont la complémentarité de séquence est proche de celle du codon STOP (deux bases sur trois). Ce dernier processus s'appelle la translecture et permet au ribosome d'insérer un acide aminé à la place du codon STOP et de continuer la traduction jusqu'au prochain codon STOP (**Figure 47**). De manière physiologique, tous les codons STOP, naturels ou prématurés, sont sujets à la translecture à des niveaux faibles et variables, dépendant à la fois de la séquence du codon STOP (dans l'ordre de sensibilité à la translecture : UGA > UAG > UAA) mais également du nucléotide situé juste après ce codon (C > U > A > G). Plusieurs molécules comme les antibiotiques aminoglycosides (notamment la gentamicine) ou le PTC124, également appelé Ataluren, peuvent favoriser ce mécanisme. Le potentiel de cette approche a été démontré pour la première fois *in vivo* chez des souris modèles de la dystrophie musculaire de Duchenne, maladie neuromusculaire liée à une mutation dans le gène codant pour la dystrophine et caractérisée par une atrophie et une faiblesse musculaires progressives dues à une dégénérescence des muscles squelettiques, lisses et cardiaques. Après injection sous-cutanée de gentamicine dans les souris, l'expression de la dystrophine a été restaurée dans leurs muscles squelettiques à des niveaux atteignant 10 à 20% de ceux trouvés dans une souris normale<sup>493</sup>. Depuis, des essais cliniques avec ces deux molécules ont été initiés portant notamment sur les dystrophies et la mucoviscidose. Les premiers ont été arrêtés faute d'efficacité mais pour la mucoviscidose, ils ont montré une restauration de l'expression de la protéine complète dans certains patients caractérisée par une meilleure capacité respiratoire<sup>494,495</sup>.

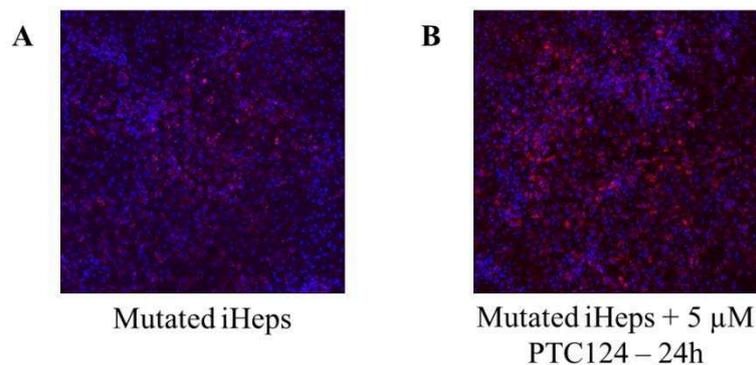


**Figure 47.** Principe de la translecture de codons STOP<sup>496</sup>

Pendant la traduction, lorsque le ribosome rencontre un codon STOP (ici, prématuré) se met en place un mécanisme de compétition entre la reconnaissance de ce codon par un facteur de terminaison, résultant en l'arrêt de la traduction et une protéine tronquée, ou par un ARN de transfert proche, résultant en la continuation de la traduction et une protéine complète, possiblement fonctionnelle.

Nous nous sommes intéressés à ces deux molécules afin de tester la possibilité de restaurer une partie de l'expression et de la fonctionnalité du RLDL. Aux doses utilisées dans la littérature (de l'ordre de 10 mg/mL), la gentamicine s'est révélée toxique pour nos

hépatocytes dérivés d'hiPSC *in vitro* (iHeps) et à plus faible dose, inefficace pour induire la translecture. *A contrario*, l'incubation des iHeps avec 5 $\mu$ M de PTC124 pendant 24 heures a donné des premiers résultats encourageants en termes d'internalisation du Dil-LDL (**Figure 48**). Néanmoins, ils n'ont pu pour le moment être reproduits de manière aussi significative. Ceci peut être dû à plusieurs facteurs comme un doublet dose/temps d'incubation non optimal, une faible sensibilité de la mutation à la translecture (le codon STOP de ce patient est un UAG directement suivi d'un nucléotide U) ou encore la restauration de l'expression du RLDL mais pas de sa fonctionnalité du fait de l'incorporation d'un acide aminé qui a entraîné un mauvais repliement de la protéine. De plus, les lots de Dil-LDL ne sont pas constants en termes de qualité et ont introduit des problèmes de répétabilité. En effet, nos iHeps mutés n'internalisent pas le Dil-LDL (le bruit de fond d'internalisation étant dû à l'internalisation passive non médiée par le RLDL) et la faible internalisation post-traitement ne signifiait donc pas nécessairement que celui-ci n'avait pas fonctionné et pouvait être dû au lot de Dil-LDL de très faible intensité de fluorescence que nous possédions au moment de ces expériences. Pour approfondir ce sujet, il conviendrait désormais de réaliser des courbes de dose-réponse en fonction du temps d'incubation en analysant par cytométrie en flux l'intensité de fluorescence du Dil-LDL avant ou après traitement. L'ajout de statines dans le milieu de culture afin d'augmenter la transcription du gène codant pour le RLDL pourrait aussi être une approche envisageable pour augmenter le taux de translecture et la restauration d'une protéine fonctionnelle.



**Figure 48.** Restauration de la fonctionnalité du RLDL par le PTC124

(A) Les iHeps issus du patient hypercholestérolémique internalisent très peu de Dil-LDL

(B) Traités avec 5 $\mu$ M de PTC124 pendant 24h, ils internalisent plus de Dil-LDL, suggérant une restauration de la fonctionnalité

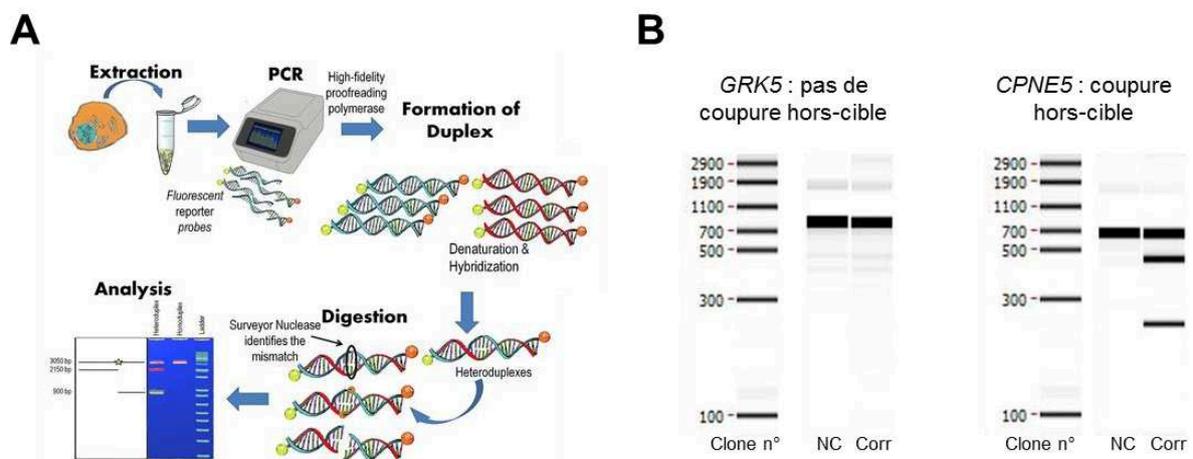
Outre la modélisation *in vitro* de l'hypercholestérolémie familiale, nous nous sommes également intéressés à apporter la preuve de concept de la faisabilité de la correction génétique par les CRISPR/Cas9 dans le cadre d'une maladie métabolique hépatique. Comme il existe plus de 1400 mutations recensées du *RLDL*, nous avons décidé d'adopter une stratégie de correction qui ne cible pas directement le site de la mutation dans le gène du *RLDL*. Nous lui avons plutôt préféré un site d'insertion extérieur, le site préférentiel d'insertion des virus associés aux adénovirus, ou site *AAVSI*, situé sur le chromosome 19. Ce dernier est considéré comme un site "safe harbor", transcriptionnellement actif. De plus, l'interruption du gène normalement situé sur ce locus, qui code pour la phosphatase 1 regulatory subunit 12C (PPP1R12C), de fonction inconnue, n'entraîne aucune anomalie

phénotypique décelable ni de problèmes de différenciation dans le cas d'un ciblage réalisé dans les CSP<sup>497</sup>. Néanmoins, il semble préférable de ne modifier qu'un seul allèle afin de maintenir une partie de l'expression de cette protéine. La stratégie de correction développée ici revêt un caractère universel dans le sens où elle peut s'appliquer quelle que soit la mutation présente sur le gène du *RLDL*. En effet, est insérée au locus *AAVSI* une séquence comportant la totalité de l'ADN complémentaire du *RLDL* ce qui évite ainsi de définir et construire une séquence corrigeant uniquement la mutation du patient en question qui aurait été insérée par recombinaison homologue au site de la mutation. En changeant la séquence de l'ADN complémentaire inséré par celle d'un autre gène, cette stratégie peut également s'appliquer à d'autres maladies. Son application à l'hémophilie B avec une cassette thérapeutique codant pour le facteur IX de la coagulation donne d'ailleurs des résultats tout aussi satisfaisants au laboratoire (Luce et al., en préparation).

Nous avons vu en introduction que les CRISPR pouvaient couper le génome à des loci différents de celui normalement ciblé et ainsi entraîner des mutations hors-cible non désirées. Pour vérifier la présence de coupures hors-cible dans notre modèle, nous avons utilisé un logiciel de prédiction (tefor.org) des séquences susceptibles d'avoir été coupées par l'endonucléase Cas9 en fonction de la séquence de notre ARN guide (GGGGCCACTAGGGACAGGAT) puis avons réalisé des PCR autour des quatre loci ayant la probabilité de coupures hors-cible la plus forte. Les produits de PCR ont par la suite été déshybridés puis à nouveau hybridés de manière très lente afin de former des hétéroduplex en cas de mésappariements de certaines paires de bases. Enfin, ils ont été digérés avec l'endonucléase TE 7-1, qui a une forte spécificité de reconnaissance et de coupure des hétéroduplex, avant leur migration sur gel (**Figure 49A**). Si une seule bande est obtenue à la taille attendue, c'est qu'il n'y a pas eu de coupures qui sont normalement suivies d'une réparation par NHEJ entraînant des indels et donc un mésappariement lors de la ré-hybridation. En revanche, la détection de plusieurs bandes, dont deux dont la somme des tailles correspond à celle de la bande normalement attendue, montre qu'il y a eu formation d'un hétéroduplex consécutif à une coupure hors-cible. Aucune n'a été mise en évidence pour trois des quatre loci tandis qu'une a été détectée dans un intron du gène Copine V (*CPNE5*) (**Figure 49B**). Après séquençage, une délétion de 8 nucléotides dans le premier allèle et de 10 dans le second ont pu être mises en évidence au niveau du site de coupure. Ce gène code pour une protéine non exprimée dans le foie mais dans les progéniteurs neuraux et les neurones<sup>498</sup>. Ainsi, cette coupure hors-cible ne devrait pas interférer de quelque manière que ce soit lors de la différenciation de nos hiPSC en hépatocytes.

Après avoir démontré la restauration de l'expression et de la fonctionnalité du *RLDL* dans les iHeps corrigés par la recombinaison homologue médiée par la technologie des CRISPR, nous avons pu montrer que ces cellules répondaient au traitement hypocholestérolémiant classique, les statines, notamment en augmentant la transcription des gènes liés au métabolisme du cholestérol. En effet, le promoteur de l'apolipoprotéine A2 contenu dans notre cassette thérapeutique contient, tout comme les promoteurs naturels du *RLDL* ou de *PCSK9*, une séquence de régulation Sterol Regulatory Element (SRE), sur laquelle se fixe la protéine SREBP2 (elle-même activée par les statines), qui permettent

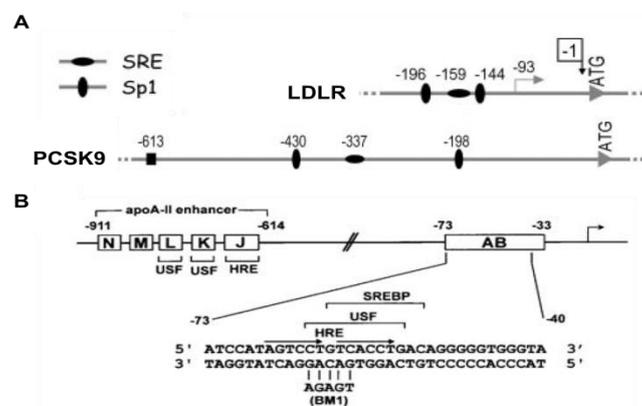
d'augmenter l'expression du gène situé en aval de ces séquences (**Figure 50**) soit, dans notre cas, l'ADNc du RLDL. Le promoteur de l'*APOA2* a été choisi ici car il s'agit d'un promoteur spécifique des hépatocytes dont les séquences régulatrices ont été bien caractérisées *in vitro* et *in vivo* (et sont proches du démarrage de transcription) au contraire du promoteur du *RLDL* qui n'était pas encore cloné lors de l'initiation des travaux portant sur l'hypercholestérolémie familiale au sein du laboratoire. Après traitement par la pravastatine, nous avons mis en évidence l'augmentation de l'expression de PCSK9 qui n'est toutefois pas suffisante pour induire une diminution de l'expression du RLDL, elle aussi augmentée par le traitement. De plus, nous montrons une augmentation de la sécrétion d'ApoB-100 dans les iHeps non corrigés en comparaison des iHeps normaux. Ceci est en accord avec de précédentes études *in vivo* et *in vitro* montrant que les hépatocytes de souris *rldl*<sup>-/-</sup> sécrétaient plus d'ApoB que les hépatocytes murins normaux<sup>499</sup>.



**Figure 49.** Détection des coupures hors-cible

(A) Principe de la technique ([https://en.wikipedia.org/wiki/Surveyor\\_nuclease\\_assay](https://en.wikipedia.org/wiki/Surveyor_nuclease_assay)). Après digestion, les fragments d'intérêts sont amplifiés par PCR puis dénaturés avant d'être ré-hybridés de manière lente permettant la formation d'hétéroduplex en cas de mésappariements. Les produits de PCR sont alors digérés par l'endonucléase TE 7-1 avant migration sur gel.

(B) Sur les 4 sites analysés, 3 n'ont pas montré de coupures hors-cible comme *GRK5* (panel de gauche) alors qu'il y a eu coupure dans le le premier intron du gène *CPNE5*. NC : hiPSC non corrigées ; Corr : hiPSC corrigées

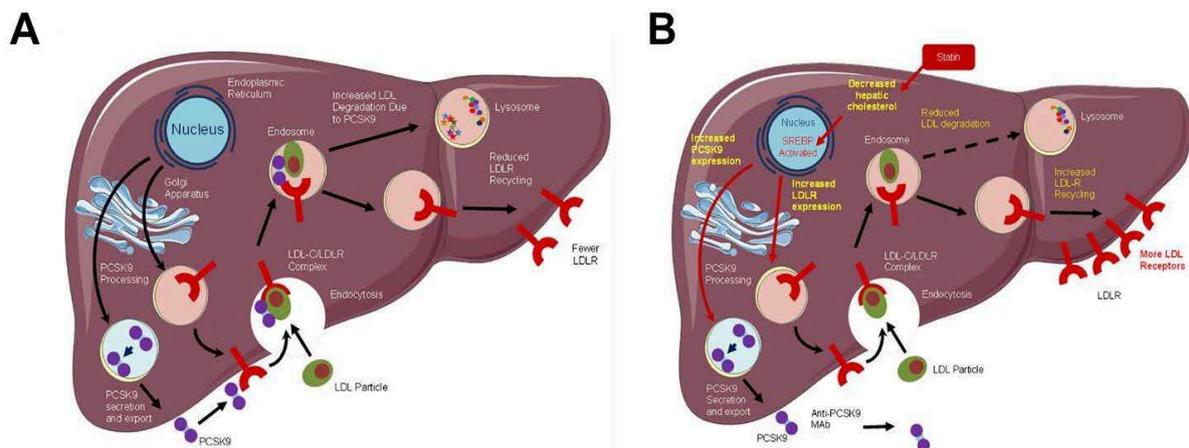


**Figure 50.** Les promoteurs des gènes *RLDL*, *PCSK9* et *ApoA2* contiennent chacun une séquence régulatrice sensible à SREBP2 (SRE)

(A) Schéma des promoteurs des gènes *RLDL* et *PCSK9*<sup>500</sup>

(B) Schéma du promoteur du gènes *ApoA2*<sup>501</sup>

Ce modèle peut dès lors être utilisé pour des tests de criblage pharmaceutique afin de tester d'autres molécules induisant les mêmes effets hypocholestérolémiants que les statines, dans le but d'accentuer encore plus la réduction du cholestérol obtenue par la ré-expression du RLDL dans les iHeps corrigés. Au cours de ces dernières années, l'inhibition de PCSK9 a émergé comme une stratégie thérapeutique prometteuse pour réduire de manière significative les taux de LDL-c chez les patients hypercholestérolémiques. Combinée aux statines, l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-PCSK9 pourrait alors permettre d'obtenir un nombre de RLDL plus important à la membrane des hépatocytes génétiquement corrigés (**Figure 51**) et une meilleure clairance du cholestérol circulant.



**Figure 51.** Effet de la combinaison statines/anticorps monoclonaux anti-PCSK9 sur le RLDL<sup>502</sup>

(A) PCSK9 empêche le recyclage du RLDL diminuant ainsi le nombre de récepteurs présents à la membrane des hépatocytes.

(B) Sous l'effet des statines, les expressions de PCSK9 et du RLDL sont augmentées. Avec l'ajout d'un anticorps monoclonal anti-PCSK9, l'effet de dégradation du RLDL par PCSK9 n'est plus possible ce qui conduit *in fine* à plus de récepteurs à la membrane et à une diminution du taux de LDL-c.

Finalement, dans un troisième volet en collaboration avec le groupe d'Arielle Rosenberg à l'hôpital Cochin, nous avons utilisé ce modèle cellulaire pour étudier le rôle toujours controversé du RLDL dans l'infection hépatique par le VHC. Premièrement, nous montrons que, pour la première fois *in vitro*, les hépatocytes différenciés à partir d'hiPSC normaux suivant notre approche et infectés par des particules HCVcc sont suffisamment matures pour supporter la totalité du cycle viral et produire des particules infectieuses à des taux similaires à celles produites en hépatocytes primaires, les HCVpc. Ensuite, nos résultats tendent à montrer que le RLDL n'aurait pas un rôle dans l'entrée ou la réplication virale mais plutôt dans l'étape de morphogénèse virale. Une hypothèse privilégiée pour expliquer ce phénomène est que l'absence de RLDL entraînerait une modification de la composition lipidique intracellulaire qui empêcherait les particules de VHC de se former correctement au sein des gouttelettes lipidiques et diminuerait ainsi leur infectiosité.

# Discussion

---

## *Les hiPSC rendent-elles les hESC obsolètes ?*

L'optimisme suscité par la génération des premières lignées d'hESC à la fin des années 1990 comme potentielle source illimitée de cellules différenciées pour le développement de nouvelles thérapeutiques et de nouveaux médicaments ainsi que pour la thérapie cellulaire a conduit à des progrès considérables dans le domaine de la biologie des cellules souches ces vingt dernières années. Néanmoins, la controverse éthique sur la destruction d'un embryon, bien que non destiné à un projet parental, qui permet la génération d'une lignée d'hESC a conduit à l'interdiction de l'utilisation de ces cellules dans certains pays et à une réglementation extrêmement stricte dans d'autres. En 2008, des stratégies basées sur l'isolement d'un blastomère au 3<sup>ème</sup> jour de développement, comme lors d'un diagnostic génétique préimplantatoire (DPI), ont alors permis la dérivation d'hESC sans pour autant détruire l'embryon<sup>503</sup>. Cependant, la génération peu de temps auparavant des cellules souches pluripotentes induites<sup>149,150</sup> et le changement de législation du NIH (National Health Institute) stipulant qu'entre autres propriétés, les hESC étaient des cellules dérivées de la masse interne du blastocyste (et ainsi non des blastomères qui constituent un stade pré-blastocyste), n'a pas permis à cette technique de se répandre alors même qu'elle lève le frein éthique majeur de la génération des hESC.

Il existe dans la littérature scientifique plus de revues discutant de la possibilité d'utiliser des hESC porteuses d'une mutation spécifique et obtenues par DPI que d'articles de recherches portant sur ces modèles<sup>504</sup>. Du fait des considérations éthiques et de la législation mentionnées ci-dessus ainsi que du faible spectre de maladies qui donne lieu à un DPI, il n'est ainsi pas surprenant que les hiPSC se soient imposées dans ce domaine. La possibilité désormais réelle de reprogrammer sans intégration dans le génome des cellules somatiques obtenues de manière non invasive (prise de sang ou analyse d'urine) d'un patient porteur d'une mutation spécifique pour étudier *in vitro* la pathogénèse d'une maladie spécifique représente en effet un attrait considérable des hiPSC. Elles permettent également d'étudier les relations génotype/phénotype dans des cas où elles ne sont pas clairement élucidées comme pour la maladie de Wilson par exemple. Cette maladie génétique hépatique est liée à une accumulation de cuivre dans les hépatocytes du fait d'une mutation sur le gène codant pour une protéine transmembranaire de type ATPase, ATP7B, qui intervient dans le transport cellulaire du cuivre et permet de réguler sa concentration et son excrétion dans la bile. Dans cette pathologie, une même mutation entraîne des phénotypes différents selon les patients (qui peuvent être d'ordre hépatique, neurologique ou psychologique) suggérant l'implication d'autres gènes mutés. Ainsi, la génération d'hiPSC à partir de patients porteurs de la même mutation mais de patrimoines génétiques différents pourrait dans un premier temps permettre de comprendre quels sont les mécanismes et voies de signalisation mis en jeu dans le transport cuivrique et par la suite, élucider ceux qui diffèrent selon les lignées pour mettre en lumière

d'autres mutations, dans un gène codant pour une protéine adaptatrice en amont ou en aval d'ATP7B ou dans des ARN non codants par exemple.

L'une des grandes finalités de l'utilisation des cellules souches pluripotentes est la médecine régénérative. Pour cela, il est nécessaire de disposer dès le départ de CSP qui ont été générées en respectant les bonnes pratiques de fabrication. Il existe désormais pour cela des banques de lignées hESC de grade clinique<sup>505</sup> mais elles n'ont jamais été utilisées pour des essais cliniques car, malgré le travail et les sommes engagés, elles n'ont pas rencontré le même enthousiasme que les premières lignées dérivées par l'équipe de James Thompson, qui n'étaient pourtant pas de grade clinique à l'origine mais ont été adaptées à ces conditions plus tardivement dans le processus de culture. Ici encore, la création au Japon et en Europe (EBiSC – European Bank for induced pluripotent Stem Cells) de banques d'hiPSC de grade clinique semble intéresser plus fortement l'ensemble de la communauté scientifique des cellules souches. Ces banques contiennent en effet des lignées homozygotes pour différents haplotypes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH ou en anglais, HLA pour human leukocyte antigen). Celles-ci permettraient de réduire drastiquement les coûts d'une médecine personnalisée considérée aujourd'hui comme une médecine de luxe en limitant le nombre de lignées à dériver. En effet, la transplantation de ces cellules dans des patients hétérozygotes pour ces haplotypes réduit le risque de rejet immunitaire par rapport à une greffe hétérologue<sup>506</sup>. Le Japon ayant une population ethnique très homogène, il est considéré que seuls 50 haplotypes homozygotes suffiraient pour traiter plus de 90% de la population. En Grande-Bretagne, où la population est bien plus diversifiée, il est nécessaire de disposer d'environ seulement 150 haplotypes homozygotes du CMH afin de traiter 93% de la population<sup>507</sup>. Ainsi, en générant un nombre suffisant mais relativement peu élevé de lignées hiPSC bien caractérisées (en comparaison de la population totale du globe) plutôt que des lignées pour chaque patient, il est théoriquement possible de traiter la quasi-totalité des individus tout en faisant baisser le coût de revient de cette technologie.

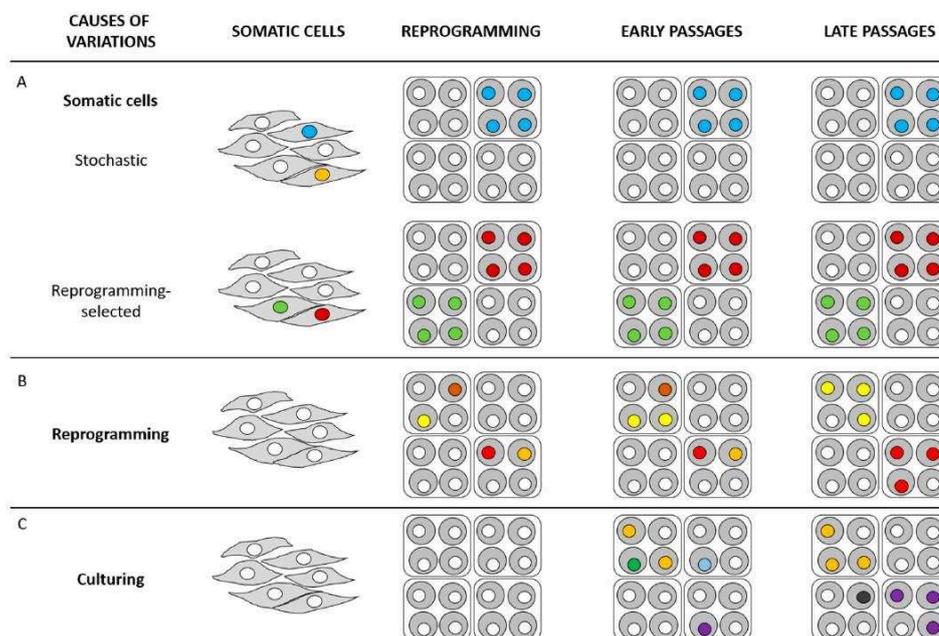
Pour autant, les problèmes d'immunogénicité ne sont pas totalement résolus. En effet, des études sur des modèles murins montrent que la réponse immunitaire diffère suivant le type cellulaire en lequel sont différenciées les iPSC<sup>508,509</sup> ; les cellules épithéliales pigmentaires rétinienne étant par exemple non immunogènes au contraire des cellules musculaires lisses, qui le sont bien plus du fait de l'expression anormale d'antigènes immunogènes dans ces dernières<sup>509</sup>. De même, la transplantation de cardiomyocytes dérivés d'iPSC d'un macaque avec un haplotype CMH homozygote dans des receveurs aux haplotypes hétérozygotes n'a pas pu être réalisée sans l'ajout d'immunosuppresseurs du fait d'une réponse immunitaire au greffon trop importante<sup>506</sup>. Si ces problèmes de rejets immunitaires venaient à se confirmer lors d'essais cliniques chez l'Homme, nous pourrions alors nous demander quel est l'intérêt d'utiliser pour la transplantation cellulaire une lignée d'hiPSC, qui a subi différents stress lors du processus de reprogrammation, plutôt qu'une lignée d'hESC qui possède *a priori* un génome et un épigénome plus stable.

En effet, la plus grande barrière limitant encore pour l'instant l'utilisation des hiPSC dans les essais cliniques réside dans la présence d'anomalies génétiques retrouvées dans ces

cellules après le processus de reprogrammation et qui peuvent en perturber l'intégrité génomique. Il existe par exemple une différence dans le nombre moyen de variations du nombre de copies (CNV – Copy Number Variations), deux fois plus important dans les lignées d'hiPSC que dans les lignées d'hESC<sup>510</sup>. Ces CNV, qui peuvent provenir d'une sous-population de la population reprogrammée (et donc avoir été acquise lors de la différenciation de la cellule reprogrammée en cellule somatique) ou avoir été acquises pendant la reprogrammation (**Figure 52A-B**), peuvent être délétères selon la région dupliquée (oncogènes) ou délétée (gènes suppresseurs de tumeurs). De même, la présence de mutations ponctuelles, parfois dans des régions codantes, a été rapportée dans les hiPSC avec les mêmes hypothèses que pour les CNV quant à leur origine<sup>511</sup>. Par ailleurs, les hiPSC semblent maintenir une certaine mémoire épigénétique de la cellule à partir de laquelle elles ont été reprogrammées. Celle-ci est associée à un certain état de méthylation de l'ADN et d'expression des gènes. Certains gènes comme Tripartite Motif Containing 4 (*TRIM4*) et Chromosome 9 Open Reading Frame 64 (*C9orf64*), apparemment nécessaires à la reprogrammation (leur KO réduit significativement le nombre de colonies générées), ne sont jamais éteints dans les hiPSC alors qu'ils le sont dans les hESC<sup>512</sup>. D'autres méthylations aberrantes et aléatoires ont également lieu. Ces dernières, tout comme les CNV, finissent par disparaître au fur et à mesure des passages et le méthylome des hiPSC devient ainsi de plus en plus similaire à celui des hESC ce qui implique que les hiPSC perdent finalement les caractéristiques des cellules dont elles sont issues<sup>513</sup>. Néanmoins, comme pour les hESC, d'autres CNV et mutations ponctuelles apparaissent spontanément lors de la culture cellulaire au fur et à mesure des différents passages (**Figure 52C**). Aussi sommes-nous en droit de nous demander si, au-delà des potentiels problèmes d'immunogénicité, il vaut la peine d'utiliser en clinique des hiPSC plutôt que des hESC alors même qu'elles vont demander des caractérisations plus poussées pour s'assurer qu'il n'y a aucun problème d'ordre génomique ou épigénomique et un temps de stabilisation plus long après dérivation qui peut entraîner l'apparition de nouvelles mutations.

Pour conclure sur cette partie, nous pouvons dire qu'en à peine quelques années, les hESC sont passées du statut d'outil de recherche indispensable au "gold standard" de comparaison pour prouver que les hiPSC sont au moins d'une utilité égale dans de nombreuses applications, comme le criblage pharmaco- et toxicologique, la bio-ingénierie ou encore les modélisations de maladie, domaine où elles semblent les plus appropriées. Toutefois, avec l'essor des technologies d'édition du génome, il est désormais tout à fait possible de définir et construire des séquences à façon et à bas coût afin d'introduire de façon ciblée une mutation dans le génome d'une lignée hESC et ainsi générer de nouvelles lignées modélisant un large éventail de maladies génétiques<sup>514,515</sup>. Cette technologie permet de réaliser des économies financières d'une part, le système CRISPR/Cas étant très peu onéreux par rapport à la génération d'une nouvelle lignée d'hiPSC, et logistique d'autre part, cette dernière demandant une certaine expertise et un temps non négligeable pour la caractérisation des clones générés. Elle permet également de bénéficier d'un état de méthylation optimal (rarement atteint pour le moment dans les hiPSC) et d'éviter l'accumulation des mutations que l'on retrouve dans les hiPSC (et ainsi de s'absoudre des différences de patrimoine génétique)

qui peuvent modifier les propriétés moléculaires et fonctionnelles de ces cellules<sup>516</sup> et amener à une interprétation erronée des résultats, notamment lors de criblages toxicologiques.



**Figure 52.** Origine de la variabilité génétique observée dans les hiPSC<sup>517</sup>

(A) La mutation est déjà présente dans la population cellulaire de départ. Si le processus de reprogrammation est stochastique (panel du haut) alors n'importe quelle cellule peut être reprogrammée (cas de la cellule avec la mutation "bleue"). Si la mutation confère un avantage pour le processus de reprogrammation (panel du bas avec les mutations "verte" et "rouge") alors la reprogrammation aura préférentiellement lieu dans ces cellules.

(B) La mutation apparaît spontanément lors de la reprogrammation. Si elle confère un avantage pour l'auto-renouvellement et/ou la prolifération (mutations "rouge" et "jaune") alors elle sera conservée. A l'inverse, les mutations délétères pour la survie cellulaire (mutation "orange") seront contre-sélectionnées lors de la culture.

(C) Les mutations apparaissent pendant la culture cellulaire. De la même façon que pour (B), elles sont conservées (mutations "violette" et "orange") ou contre-sélectionnées (mutations "bleue" et "verte") selon qu'elles confèrent un avantage ou non.

Dans le cadre de l'utilisation clinique de ces cellules, il est évident que toutes les normes établies pour les essais cliniques avec les hESC doivent également être appliquées aux hiPSC. Là encore, les interrogations sur l'intégrité génomique obligent à réaliser des tests supplémentaires (analyse des méthylations de l'ADN notamment) pour les essais réalisés avec les hiPSC. Ainsi, il ne faut pas enterrer trop vite les hESC qui ont déjà commencé à prouver leur efficacité dans plusieurs modèles (cellules pigmentaires rétiniennes, cardiomyocytes) alors même que le premier essai clinique avec des hiPSC a été stoppé du fait de doutes sur l'intégrité génomique des cellules et du risque de tumorigénicité associé. Toutefois, il semble que les problèmes évoqués soient majoritairement liés aux techniques de reprogrammation employées et l'amélioration continue de l'efficacité et de la robustesse de ce processus, déjà amorcée par les processus non intégratifs<sup>518</sup> ou l'ajout d'anti-oxydant<sup>167</sup> et qui diminuent le nombre de mutations et/ou de CNV, pourrait bien à terme permettre une reprogrammation complète avec une remise à zéro parfaite de l'épigénome et la non induction de nouvelles CNV ou mutations. De ce fait, il n'est pas impossible qu'avec le temps, les hESC soient de moins en moins utilisées dans les laboratoires de recherche.

Outre la qualité des CSP, nous avons pu voir qu'il est également important de s'assurer de la qualité de la population cellulaire différenciée à partir de celles-ci pour pouvoir envisager des applications thérapeutiques.

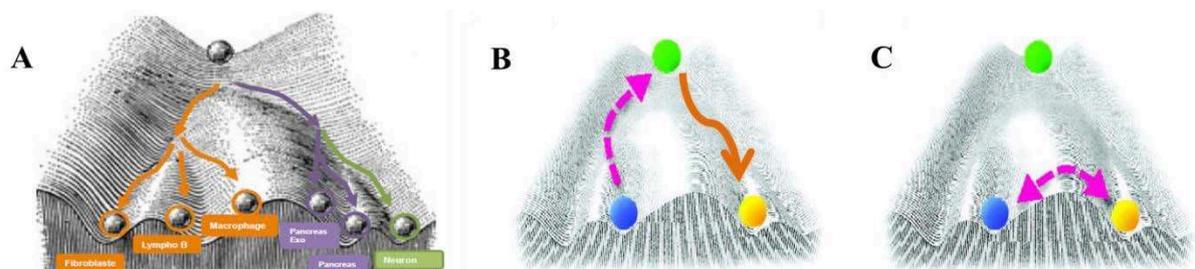
### *Obtenir des hépatocytes pour traiter l'hypercholestérolémie familiale*

Nous avons déjà évoqué que les différentes lignées de cellules souches pluripotentes ne possédaient pas toutes le même potentiel de différenciation en fonction du lignage désiré. Ceci pourrait s'expliquer par la mémoire épigénétique et essentiellement par les différences de patrimoine génétique dans le cas des hiPSC<sup>216</sup>. Ainsi, dans le cas des hépatocytes différenciés à partir de cellules souches pluripotentes et dans la perspective de leur transplantation pour traiter l'hypercholestérolémie familiale (en utilisant *a priori* plutôt des hiPSC génétiquement corrigées pour limiter au maximum le rejet immunitaire), il est absolument nécessaire de sélectionner le meilleur clone possible avant un essai clinique pour en maximiser les chances de réussite.

Par ailleurs, l'innocuité de ces cellules n'est pas totalement assurée. En effet, les réseaux de gènes impliqués dans l'induction et la maintenance de la pluripotence et ceux impliqués dans le développement de cancers se chevauchent partiellement, les cellules pluripotentes et cancéreuses ayant des caractéristiques communes en termes de métabolisme glycolytique, capacité proliférative et multipotence<sup>519</sup>. Il a par ailleurs été montré que l'injection de 10 000 cellules hESC dans un modèle murin de transplantation xénogénique a suffi à générer un tératome<sup>520</sup>. Même si cette tumeur est bénigne et est utilisée pour affirmer le caractère pluripotent d'une lignée, cette donnée suggère que la population cellulaire à transplanter doit être exempte de toute cellule indifférenciée pour éviter tout risque de développement tumoral. Dans ce contexte, outre les techniques de purification basées sur des milieux de sélection vues en introduction<sup>227,228</sup>, d'autres approches comme le tri cellulaire par cytométrie en flux, le tri avec des billes magnétiques fonctionnalisées avec des anticorps reconnaissant des antigènes spécifiques des cellules pluripotentes comme la claudine 6<sup>521</sup> par exemple ou encore l'élimination de ces cellules à l'aide d'anticorps cytotoxiques peuvent alors être envisagées<sup>522</sup>.

Pour contourner les problèmes mentionnés ci-dessus, le développement d'une nouvelle stratégie basée sur la transdifférenciation a émergé depuis une dizaine d'années. Dans les années 1950, Conrad Waddington émet le concept du paysage épigénétique qui stipule que lors du développement embryonnaire, les cellules souches sont capables de se différencier en tous les lignages existants et que leur destinée dépend des interactions entre les gènes et le microenvironnement qui entraînent des méthylations de l'ADN et des modifications des histones modifiant ainsi l'expression du génome. Il utilise pour illustrer son concept la métaphore d'une bille surplombant une montagne faite de différentes vallées. Le roulement de la bille dans l'une de ces vallées correspond à la différenciation de la cellule vers un lignage terminal. Avant d'atteindre ce stade, plusieurs changements de voies peuvent apparaître et associés à ces changements, l'activation d'un gène ou non peut modifier le chemin choisi (**Figure 53A**). Pour lui, la différenciation est irréversible. Or, nous savons depuis les

expériences de clonage sur les animaux et la reprogrammation que ce processus peut être réversible et qu'il est possible de revenir à un état souche que nous pouvons par la suite différencier à nouveau dans un autre lignage (**Figure 53B**). Il existe cependant une troisième voie, la transdifférenciation ou reprogrammation directe, qui consiste à reprogrammer directement une cellule somatique dans un autre lignage sans passer par l'état de pluripotence (**Figure 53C**).



**Figure 53.** Diagrammes de Waddington illustrant la différenciation, la reprogrammation et la transdifférenciation (adapté de <sup>523</sup>)

(A) Développement normal d'une cellule. Elle va "rouler le long de la colline" en acquérant différentes spécificités la faisant passer de l'état pluripotent (en haut) à l'état différencié (en bas)

(B) Reprogrammation. La cellule différenciée (en bleu) retourne à l'état pluripotent (en vert) d'où elle peut se différencier dans un autre lignage (orange)

(C) Transdifférenciation. La cellule différenciée (en bleu) est directement reprogrammée en une autre cellule somatique (en orange). L'état pluripotent (en vert) est alors court-circuité

Nous avons déjà évoqué en introduction la possibilité de transdifférencier en hépatocytes les cellules stromales mésenchymateuses et les cellules épithéliales amniotiques, qui ont quelques caractéristiques communes avec les cellules souches pluripotentes (comme la multipotence et l'expression de certains marqueurs spécifiques) mais il est également possible de transdifférencier d'autre type cellulaire comme les fibroblastes qui n'ont aucun point commun avec les hépatocytes. Après des travaux princeps chez la souris, la transdifférenciation a été rapportée chez l'Homme en 2014 par la transduction lentivirale de *FOXA3*, *HNF1 $\alpha$*  et *HNF4 $\alpha$* . Bien que les cellules transdifférenciées soient amplifiables *in vitro*, ce qui sous-entend un phénotype proche des hépatoblastes, elles présentent des caractéristiques d'hépatocytes matures, notamment une activité des cytochromes P450, et allongent la durée de vie des souris *fah*<sup>-/-</sup> une fois transplantées dans les foies de celles-ci sans qu'un phénomène de fusion avec les hépatocytes résidents ne puisse être mis en cause<sup>524</sup>. Des résultats similaires sont obtenus avec la transduction lentivirale de six facteurs (*HNF1 $\alpha$* , *HNF4 $\alpha$* , *HNF6*, Activating Transcription Factor 5 (*ATF5*), *PROX1* et *C/EBP $\alpha$* ), les hépatocytes générés ayant une activité cytochrome équivalente à celle d'hépatocytes primaires fraîchement isolés<sup>525</sup>. Cette approche fonctionne également avec des méthodes non intégratives comme la transfection d'ARNm<sup>526</sup>, permettant de s'absoudre de la transduction lentivirale potentiellement oncogénique et ainsi d'envisager des applications en médecine régénérative.

Plus récemment, deux études *in vivo* chez la souris rapportent la possibilité de reprogrammer *in situ* en hépatocytes les myofibroblastes, cellules responsables, lors

d'atteintes hépatiques, du dépôt de collagène qui, lorsqu'il est accumulé en trop grande quantité, provoque une fibrose hépatique. Après avoir généré *in vitro* des hépatocytes à partir de myofibroblastes murins transduits par un vecteur lentiviral exprimant *foxa3*, *gata4*, *hnf1a* et *hnf4a*, les auteurs ont injecté dans des souris modélisant la fibrose un vecteur adénoviral porteur de ces quatre facteurs de transcriptions et modifié pour se lier à un récepteur spécifique présent sur les myofibroblastes. Par le traçage de lignage cellulaire, les auteurs ont montré la transdifférenciation d'une partie de ces derniers en hépatocytes aux fonctionnalités équivalentes à celles des hépatocytes résidents et une amélioration de la fibrose dans les animaux principalement due à la diminution du nombre de myofibroblastes plutôt qu'à des capacités anti-fibrotiques des hépatocytes néo-générés<sup>527</sup>. Ces résultats ont également été obtenus après transduction des myofibroblastes murins par six AAV6 (qui possède un tropisme pour les fibroblastes) portant les gènes *foxa1*, *foxa2*, *foxa3*, *gata4*, *hnf1a* et *hnf4a*<sup>528</sup>. Là encore, le taux de transdifférenciation est peu élevé, la transduction par un vecteur AAV semblant alors plus appropriée pour augmenter ce dernier à condition de pouvoir y emballer la totalité des gènes et le promoteur associé ce qui n'est pas possible actuellement car ce vecteur ne peut contenir que cinq kilobases au maximum<sup>407</sup>.

Bien qu'attrayante, cette technologie accuse toutefois quelques limitations en comparaison des hiPSC. Premièrement, la population de cellules reprogrammées dans ce cadre est une mosaïque de cellules, à la mémoire épigénétique plus forte car elle n'a pas été effacée par le passage à l'état pluripotent. Ceci peut entraîner des différences notables entre les hépatocytes générés, notamment en termes de fonctionnalité. Au contraire, les lignées de cellules souches pluripotentes étant clonales, elles permettent d'assurer, après choix de la meilleure lignée à différencier, la meilleure fonctionnalité possible ainsi qu'un contrôle de la qualité génétique et épigénétique en vue d'une utilisation clinique. Ensuite, les fibroblastes sont sujets au phénomène de sénescence ce qui, conjugué à leur probable incapacité de proliférer une fois différenciés en hépatocytes, empêche la production de masse de ces cellules dans des bioréacteurs. Enfin, pour obtenir un nombre important d'hépatocytes, il faut partir d'un nombre conséquent de fibroblastes et celui-ci n'est pas illimité du fait de la sénescence. Les problèmes inhérents à la différenciation et à la tumorigénicité des hiPSC représentent surtout des freins techniques qui semblent pouvoir être levés d'ici les prochaines années ce qui rendrait alors probablement anecdotique la transdifférenciation des fibroblastes.

Il existe néanmoins une alternative intéressante qui se situe à l'interface entre les deux entités que sont la reprogrammation et la transdifférenciation. Dans cette étude, des fibroblastes humains ont été transduits par un vecteur lentiviral codant pour les gènes *OCT4*, *SOX2* et *KLf4* puis ont été ensemencés dans un milieu permettant la différenciation en endoderme définitif cinq jours après la transduction. De cette façon, les auteurs ont court-circuité le stade pluripotent pour générer directement des cellules progénitrices multipotentes endodermiques (ou iMPC-EPC pour induced multipotent progenitor cells-endoderm progenitor cells)<sup>529</sup>. Ces dernières sont amplifiables *in vitro*, cryoconservables et différenciables en hépatocytes fonctionnels (sécrétion d'albumine et activité des cytochromes P450) qui repeuplent le foie de souris FRG après transplantation et continuent leur maturation *in vivo*. Même sans tri préalable, l'injection de ces cellules ne provoque pas de tératomes

probablement du fait qu'elles ne sont jamais passées par l'état pluripotent. En améliorant notamment les conditions de reprogrammation (élimination du vecteur intégratif), ces cellules pourraient dans l'avenir représenter un avantage certain par rapport aux cellules souches pluripotentes et aux cellules transdifférenciées dans le cadre de la transplantation cellulaire.

Plusieurs problèmes restent néanmoins encore à résoudre pour arriver à transplanter efficacement des cellules chez un patient atteint d'hypercholestérolémie familiale. Même si les cellules différenciées possèdent des structures subcellulaires caractéristiques des hépatocytes et qu'elles expriment un certain niveau de fonctionnalité (sécrétion d'albumine, d'urée ou de facteurs de coagulation ; expression et activité des enzymes de détoxification ; transport d'acides biliaires ; métabolisme des lipides), elles ne s'intègrent pas de façon efficace puis ne peuvent proliférer dans le parenchyme des foies receveurs excepté dans certaines conditions où l'homéostasie du foie est perturbée comme l'ont montré des modèles animaux tels que la souris *fah*<sup>-/-</sup> ou uPA, inapplicables dans un contexte clinique. Nous pouvons nous demander si les hépatocytes différenciés à partir de cellules souches pluripotentes constituent le meilleur stade pour la transplantation cellulaire. En effet, les hépatocytes fœtaux comme les nouveaux-nés greffent plus efficacement que les hépatocytes adultes<sup>530,531</sup>. Il n'est alors pas exclu que le stade hépatoblastique permette lui aussi une meilleure prise de greffe - les hépatoblastes, deux à trois fois plus petits que les hépatocytes, pouvant théoriquement s'infiltrer plus facilement entre les cellules sinusoidales endothéliales - elle-même suivie d'un plus grand repeuplement du foie, la capacité proliférative de ces cellules étant bien plus importante que celle des hépatocytes matures endogènes. Il n'existe pas d'études comparant dans les mêmes conditions les capacités de greffe et de repeuplement d'hépatoblastes et d'hépatocytes différenciés à partir de CSP. Néanmoins, la transplantation d'hépatoblastes dérivés d'hESC a déjà été réalisée dans des souris *fah*<sup>-/-</sup> et permet un repeuplement d'environ 25% du foie<sup>532</sup>, ce qui suggère que cette approche est tout à fait envisageable, d'autant plus qu'il est désormais admis que ces cellules terminent leur différenciation *in vivo* grâce à un microenvironnement hépatique adéquat.

De plus, nous avons montré dans le premier article présenté dans ce manuscrit que les hépatoblastes différenciés à partir de cellules souches pluripotentes supportaient le processus de cryoconservation. Récemment, la culture de ces cellules sur laminine 111 a permis la purification de cette population (par l'élimination sélective des cellules non hépatoblastiques qui n'adhèrent pas sur la laminine 111) ainsi que son amplification *in vitro* pendant trois mois sans perte de l'intégrité phénotypique ou de la capacité de différenciation en hépatocytes ou cholangiocytes<sup>533</sup>. Il a également été rapporté que l'ajout d'oncostatine M augmentait significativement la prise de greffe d'hépatoblastes fœtaux humains (jusqu'à 100 fois) dans les souris FRG<sup>534</sup>. Ainsi, il semble tout à fait possible d'amplifier puis de stocker les hiPSC à ce stade de différenciation ce qui, conjugué avec les compatibilités haplotypiques, permettrait de réduire de quelques semaines le délai avant une transplantation. Ceci peut alors représenter une alternative crédible à la transplantation d'hépatocytes pour la thérapie cellulaire en levant certaines barrières techniques nécessaires à un processus d'industrialisation à grande échelle et de production de masse. En parallèle, les techniques chirurgicales pré-transplantations permettant la génération d'un "vide physiologique" dans le foie devraient permettre d'augmenter au maximum la prise de greffe et la prolifération des cellules greffées et ainsi

assurer le remplacement des cellules résidentes par celles possédant un avantage sélectif, c'est-à-dire dans notre cas, la capacité de métaboliser le cholestérol.

Dans le cas particulier du patient hypercholestérolémique présenté dans le deuxième article du manuscrit, une autre question doit être posée. En effet, la mutation non sens présente sur le gène *RLDL* entraîne une absence totale de protéines au contraire de la plupart des autres mutations qui mènent à une protéine traduite mais non fonctionnelle. Alors que la correction génétique réalisée au sein des hiPSC dérivées de ce patient a permis l'expression du *RLDL* déficient, il est maintenant nécessaire de vérifier, dans l'éventualité d'une transplantation d'hépatocytes corrigés chez ce patient, si son système immunitaire ne reconnaît pas ce récepteur comme un épitope du non soi et induit alors l'élimination des hépatocytes corrigés, ce qui serait l'exact opposé de l'effet thérapeutique normalement attendu.

### *L'édition du génome : Sommes-nous aux portes du transhumanisme ?*

En 1957, Julian Huxley, biologiste britannique et frère de l'écrivain Aldous Huxley, utilise pour la première fois le terme de transhumanisme qu'il définit comme le contrôle de la sélection naturelle par la biologie. Ce terme est donc dès son origine associé à un projet eugéniste visant à la création d'un Homme amélioré par la communion de deux grands courants, la "cyborgisation" (union de l'Homme et de la machine) et la "bionisation" (modification du génome pour augmenter certaines compétences ou en ajouter de nouvelles). Dans cette deuxième mouvance, les progrès effectués ces dernières années en génie génétique avec la génération des hiPSC (vues comme la solution au problème du vieillissement) et les techniques d'édition du génome, notamment les CRISPR/Cas, ont un rôle important à jouer pour les transhumanistes.

En effet, l'enthousiasme généré par leur découverte s'est rapidement accompagné de publications montrant tout le potentiel et les dangers de cette technologie. Dans l'agro-industrie, s'il est par exemple possible de changer la couleur des fleurs<sup>535</sup> dans un but ornemental, d'autres applications suscitent bien plus le débat. L'université de Pennsylvanie a mis au point un champignon de Paris qui reste blanc quand on le coupe en inactivant le gène codant pour l'enzyme responsable du brunissement par les CRISPR/Cas, permettant ainsi d'augmenter sa durée de vie et le gaspillage alimentaire. Quelques mois plus tard, les autorités sanitaires étatsuniennes ont estimé que ce champignon ne pouvait être considéré comme un OGM car il n'y avait pas eu d'ajout de gènes étrangers dans son génome et ont donc validé sa mise sur le marché. De notre côté de l'Atlantique, le débat est plus houleux. Suite à la décision du Haut Conseil des Biotechnologies allant dans le sens de l'administration américaine, plusieurs de ses membres qui considéraient que ces végétaux étaient clairement des OGM ont choisi de démissionner. Très récemment, les CRISPR/Cas ont été utilisés dans le but d'améliorer les rendements des cultures agricoles. Pour cela, avec la tomate comme exemple, les auteurs de cette étude ont inactivé plusieurs régions régulatrices situées dans des promoteurs de gènes ce qui a permis d'augmenter à la fois la taille des fruits obtenus, l'inflorescence (disposition des fleurs sur la tige) et l'architecture globale de la plante<sup>536</sup>. Pour

eux, cette approche permet de contourner les stratégies classiques de croisement, coûteuses en temps et en effort, en sélectionnant directement les variantes les plus souhaitables. Néanmoins, contrairement aux OGM actuels, la trace de la modification génétique avec ces nouvelles méthodes n'est pas décelable, ce qui la rend quasiment impossible à tracer. Il semble ainsi absolument nécessaire dans ce cas, comme dans le précédent, d'être certain de la sûreté de cette méthode destinée *in fine* à l'alimentation humaine ce qui est difficile en pratique car les effets délétères ne peuvent apparaître que dans de nombreuses années ou après des expositions répétées.

Les CRISPR/Cas pourraient également influencer sur l'évolution des espèces. Dans le cadre de la lutte contre le paludisme, transmis par une espèce de moustique, l'anophèle et responsable de 450 000 morts par an, des chercheurs français ont inactivé un gène dans certains individus de cette population leur conférant alors une résistance à la maladie. L'idée à terme serait d'introduire ces anophèles modifiés dans la nature et attendre qu'ils se reproduisent ce qui rendrait la totalité de la population résistante. Un autre scénario est également envisagé par une équipe londonienne qui a généré des moustiques femelles stériles en inactivant trois gènes via les CRISPR/Cas<sup>537</sup>. En les réintroduisant dans la nature, la totalité de l'espèce aurait ainsi disparu en quelques générations. Cependant, il est nécessaire de s'interroger sur ces stratégies de forçage génétique (modification de l'ADN transmissible à la descendance), qui pourraient également s'appliquer à la tique vectrice de la maladie de Lyme et qui altèrent de manière définitive l'identité d'une espèce et pourrait alors conduire à des dérèglements considérables des écosystèmes. D'autres projets suscitent des interrogations quant à leur utilité comme celui de George Church, de l'université d'Harvard, qui espère pouvoir ressusciter un mammouth laineux d'ici à la fin de la prochaine décennie en récupérant de l'ADN à partir d'un spécimen congelé puis en le combinant via les CRISPR/Cas avec celui d'un éléphant d'Asie. Cependant, si cette espèce a disparu il y a plus de 4000 ans, c'est parce qu'elle était devenue inadaptée à son environnement et l'intérêt de la ramener à la vie est donc plus que faible si c'est uniquement pour l'entreposer dans des zoos.

Dans le cadre de la thérapie génique, pour laquelle elle a été pensée à l'origine, cette approche d'édition du génome par les CRISPR a déjà été entreprise avec succès dans des modèles murins de la myopathie de Duchenne<sup>538</sup> ou de la tyrosinémie<sup>482</sup>. L'idée de corriger génétiquement une cellule somatique directement *in vivo* ou *ex vivo* sur des hiPSC par la suite différenciées puis transplantées chez le patient dont elles sont originaires semble faire consensus dans l'ensemble de la communauté scientifique et médicale ainsi que dans l'opinion publique. En effet, d'après un sondage Ifop datant de l'an dernier, 76% des Français se déclarent favorables à l'utilisation des CRISPR-Cas9 sur des adultes ou des enfants souffrant d'une maladie d'origine génétique dans le cadre d'une thérapie génique pour soigner ou améliorer leur qualité de vie. Si elle venait à porter ses fruits lors d'essais cliniques chez l'Homme et à se répandre, la principale interrogation concernerait alors les coûts et l'accès à cette technologie. Elle risquerait en effet d'entraîner une médecine à deux vitesses où les personnes les plus aisées pourraient se soigner contre une multitude de maladies dont certaines potentiellement mortelles alors que les personnes plus pauvres n'y auraient pas accès ce qui serait dommageable. De plus, cette idée sous-entend le fait qu'il n'y pas de transmission

à la descendance possible : lorsque la personne traitée par cette thérapie va mourir, elle mourra avec ses corrections génétiques. Mais une fois de plus, de récentes études en la matière suscitent la controverse

En effet, certains voient déjà plus loin et souhaitent la modification du génome des cellules germinales afin que les caractéristiques soient éditées de manière permanente et définitive dans le génome et qu'elles puissent être transmises à la descendance. La première étape dans cette voie a été franchie en 2015 quand une équipe chinoise a modifié le gène responsable de la  $\beta$ -thalassémie sur des embryons humains obtenus par fécondation *in vitro*<sup>539</sup>. Après avoir vérifié que ces derniers avaient bien été édités, ils ont été détruits. Cet article a d'abord provoqué un tollé dans le reste du monde mais finalement, pour éviter de rester à la traîne sur ces questions, certains pays occidentaux, comme le Royaume-Uni, ont approuvé la modification génétique sur les embryons humains dès septembre 2015. L'Académie américaine des sciences (NAS) a quant à elle estimé en 2015 "qu'il était irresponsable d'utiliser cette technologie pour la modification de l'embryon à des fins thérapeutiques tant que les problèmes de sûreté et d'efficacité soulevés dans l'article n'étaient pas résolus". En effet, l'équipe de recherche chinoise a indiqué avoir eu de grandes difficultés pour éditer ces embryons à cause notamment de l'apparition de nombreuses mutations hors-cible et d'une mosaïque des cellules (certaines éditées et d'autres non) au sein d'un même embryon. Elle a d'ailleurs elle-même précisé que des applications médicales étaient inenvisageables tant que la technique n'était pas améliorée. Néanmoins, début 2017, la NAS et l'Académie américaine de médecine ont estimé "que les avancées réalisées depuis deux ans ouvraient des possibilités réalistes qui méritaient de sérieuses considérations".

C'est ainsi qu'en août de cette année une équipe américaine dirigée par Shoukrat Mitalipov a rapporté l'édition du gène *MYBCP3*, responsable de la cardiomyopathie hypertrophique, dans des embryons humains obtenus par FIV<sup>540</sup>. En co-injectant dans un oocyte le sperme porteur de la mutation avec le système CRISPR/Cas plutôt qu'en injectant les CRISPR/Cas dans le zygote fécondé, ils obtiennent une édition de la totalité des cellules de l'embryon et donc aucun mosaïcisme. De plus, les auteurs ne détectent ni coupures ni mutations hors-cible avec cette stratégie et affichent un taux de succès considérable. Point important pour expliquer cela, l'équipe a estimé qu'elle avait découvert un nouveau mécanisme de réparation de l'ADN dans les embryons car c'est l'ADN de l'ovule qui semble utilisé comme base pour réparer l'ADN muté (qui provient du sperme) et non une séquence exogène. Néanmoins, peu de temps après la parution de cette publication, plusieurs généticiens et spécialistes des cellules souches ont émis des doutes quant aux résultats publiés. Ces derniers estiment en effet que l'équipe de Mitalipov n'apportent pas la preuve de l'édition génomique en tant que telle car ils ont rapporté l'absence de détection de l'allèle mutant qui pourrait tout aussi bien s'expliquer par la suppression de cette partie de l'ADN induite par la cassure double brin suivie d'une délétion. De plus, pour eux, le mécanisme décrit dans l'article pour expliquer la recombinaison homologe n'a pas de sens car à ce stade, il existe une grande distance entre les pronuclei maternel et paternel. L'équipe de Mitalipov dénonce "des explications alternatives de leurs résultats basées sur de la pure spéculation" et a prévu de répondre dans les prochains mois. Tout ceci montre bien à quel point ce sujet est

d'une importance capitale et la nécessité de n'aller ni trop vite ni trop loin et de s'assurer que toutes les preuves d'efficacité et surtout de sûreté sont avérées sous peine de déclencher un processus irrémédiable qui pourrait bien avoir des conséquences désastreuses.

En effet, qu'en est-il si cette technique, peu chère et assez facile à mettre en œuvre au sein de n'importe quel laboratoire, tombait entre des mains moins bien intentionnées ? Cette technologie est une aubaine pour les théoriciens de l'eugénisme et du transhumanisme car elle pourrait servir à modifier des phénotypes comme la couleur des yeux ou des cheveux, l'augmentation de la masse musculaire pour la création de super-soldats dans l'armée (déjà réalisée chez le chien<sup>541</sup>) ou encore pourquoi pas l'intelligence même si ce sera bien plus difficile à mettre en place car cette dernière est multigénique, multifactorielle et d'une complexité inouïe. Il est également tout à fait envisageable d'importer dans l'anatomie humaine de nouvelles compétences, qui proviennent d'autres espèces, comme l'écholocation des chauves-souris par exemple, ce qui ferait entrer l'Homme dans l'ère du "post-humanisme" du fait de la création d'une nouvelle espèce. Même si cela ressemble encore pour le moment à de la science-fiction, les progrès techniques sont tellement rapides et les gains potentiels en jeu tellement importants qu'il est nécessaire d'avoir toutes ces problématiques à l'esprit dès maintenant pour pouvoir prendre le temps de légiférer de manière réfléchie afin d'encadrer au maximum ces pratiques. De plus, cette législation doit absolument être discutée puis réalisée à l'échelle internationale pour éviter toute dérive au sein de pays qui aurait une législation plus laxiste que les autres.

La technique CRISPR/Cas, si elle venait à se vulgariser, pourrait aussi être détournée à des fins criminelles. Il devient désormais tout à fait imaginable de transformer génétiquement des bactéries ou des virus neutres en micro-organismes hautement pathogènes. Après la réalisation par un doctorant d'un virus qui, une fois inhalé par les souris, provoque des mutations mortelles dans leurs poumons, Jennifer Doudna, co-découvreuse de la technologie, a exprimé ses craintes de voir de plus en plus de personnes réaliser des expériences avec les CRISPR/Cas sans vraiment se rendre compte de leurs dangers. Il aurait en effet suffi d'une minuscule erreur de conception pour que ce virus fonctionne également chez l'Homme. Aux Etats-Unis, la menace est prise très au sérieux. L'ancien directeur du renseignement national américain, James Clapper, a été le premier à tirer le signal d'alarme, en février 2016, classant les CRISPR/Cas dans la catégorie des armes de destruction massive potentielles, à surveiller de très près au même titre que les armes chimiques syriennes ou le programme nucléaire nord-coréen.

Les techniques d'édition du génome, et notamment les CRISPR/Cas, représentent tout de même un espoir extraordinaire pour de nombreux patients atteints aujourd'hui de maladies génétiques incurables. Mais nous avons vu que le champ des possibles est très large avec cette technologie dont il est nécessaire de surveiller et d'encadrer toutes les nouveautés s'y rapportant. Dernier exemple en date, une start-up étatsunienne vient de lever 127 millions de dollars après avoir affirmé pouvoir éditer les gènes sans avoir recours aux CRISPR/Cas (donc sans nécessité de couper l'ADN) mais en utilisant des virus porteurs de séquences proches de la séquence cible ce qui induirait une permutation entre les deux séquences

(<https://www.homologymedicines.com/gene-editing>). Bien qu'empreinte de scepticisme à l'heure actuelle, si cette information devait se confirmer dans le futur, cette technique, qui évite l'utilisation de nucléases, deviendrait la manière la plus simple et la plus sûre (et accessoirement la plus dangereuse si elle est détournée) d'éditer le génome humain.

## *Conclusion et perspectives*

---

Concernant la première étude présentée dans ce manuscrit, nous avons pu mettre en évidence le repeuplement du foie de souris par des hépatocytes différenciées à partir de cellules hESC et ainsi montrer le potentiel de ces dernières dans le cadre de la thérapie cellulaire de l'insuffisance hépatique aiguë induite par le paracétamol. Pour bien s'assurer de la sécurité de l'approche développée, il aurait toutefois fallu sacrifier les animaux à des temps plus tardifs (3 et 6 mois) afin de vérifier l'absence de tumeurs qui auraient pu se développer en cas de greffe de cellules résiduelles indifférenciées. Une fois ceci acquis, il sera important de valider cette étude dans de plus gros modèles animaux, comme les primates non humains avant de passer aux essais cliniques pour le traitement d'hépatites chroniques ou fulminantes chez l'Homme avec cette lignée. Il devient également intéressant de combiner en co-culture les hépatocytes, les cholangiocytes et aussi les cellules endothéliales différenciés à partir de ces VAL9 dans des organoïdes tridimensionnels à la manière de Takebe et collaborateurs pour développer par exemple un foie bioartificiel externe qui pourrait servir de relai pendant l'attente d'une greffe de foie total ou d'un nombre suffisant d'hépatocytes différenciés à transplanter.

Concernant la deuxième étude présentée dans ce manuscrit, nous disposons au laboratoire de deux autres lignées d'hiPSC dérivées de patients atteints d'hypercholestérolémie familiale. Le premier porte une mutation faux sens homozygote située dans le domaine homologue du précurseur du récepteur à l'EGF (p.A519T) qui bloque la séparation du RLDL de son ligand dans le lysosome empêchant ainsi son recyclage (mutation de classe 5). Le second est un double hétérozygote avec une mutation faux sens dans le domaine de liaison au ligand (p.D283Y – mutation de classe 3) qui diminue de fait l'affinité du récepteur pour le LDL et une autre mutation *a priori* neutre dans le domaine d'O-glycosylation (p.T705I). Après différenciation en hépatocytes et en association avec le clone présenté dans ce manuscrit, ces trois lignées pourraient être utilisées afin de décortiquer plus en détail l'implication du RLDL dans la morphogénèse virale afin de pouvoir développer des thérapeutiques ciblées en fonction du type de mutations. En effet, il a déjà été montré que les réponses aux traitements antiviraux pouvaient varier en fonction des polymorphismes<sup>542,543</sup>. Dans la même idée, ces trois lignées peuvent être utiles pour étudier précisément les effets des différentes mutations sur le métabolisme lipidique et notamment celui du cholestérol pour, dans une approche de criblage à haut débit, permettre la découverte de thérapeutiques plus ciblées en fonction de la classe de mutation du RLDL.

Dans cet article, nous avons également été en mesure de démontrer pour la première fois l'efficacité de notre stratégie d'édition du génome pour une maladie génétique hépatique qui se base sur l'insertion d'une cassette thérapeutique au locus *AAVSI*. A l'échelle du laboratoire, cette stratégie nécessite de passer beaucoup de temps en salle de culture cellulaire mais, à l'échelle industrielle, elle est facilement automatisable. Dans l'optique d'une utilisation clinique, il sera toutefois préférable d'exciser le système de sélection basé sur la résistance à la

puromycine pour éviter la persistance d'un gène bactérien dans le génome humain. Il sera de plus préférable d'utiliser à l'avenir les nouveaux systèmes basés sur les nickases et les sgRNA tronqués qui ne coupent qu'un seul brin d'ADN et augmentent ainsi considérablement la spécificité du système<sup>462,464</sup>. Il semble désormais également important de transplanter nos hépatocytes différenciés à partir des hiPSC génétiquement corrigés dans un modèle murin d'hypercholestérolémie familiale afin de vérifier la restauration du phénotype (diminution du taux de LDL-c dans le sérum et disparition des plaques d'athérosclérose). Ceci permettrait d'établir un modèle préclinique de la maladie avant d'envisager de plus gros animaux, comme le lapin, le singe ou le porc puis à terme, les essais cliniques chez l'Homme.

Nous avons pu montrer dans cet article que les hépatocytes différenciés à partir des hiPSC normales (sans mutation sur le RLDL) et infectés par des particules HCVcc étaient capables de produire des particules virales infectieuses à un niveau équivalent à celui produit par des hépatocytes humains primaires infectés avec les mêmes particules. Les particules virales produites dans ces dernières, les HCVpc, sont celles qui sont le plus proche des virions retrouvés *in vivo* chez les patients<sup>194</sup>. Ce nouveau modèle cellulaire pourrait ainsi permettre de produire des particules virales plus proches voire équivalentes aux HCVpc que les particules classiquement utilisées aujourd'hui dans les laboratoires de recherche, les HCVcc, qui sont issues de la lignée d'hépatocarcinome Huh-7 dont le faible niveau de différenciation et certaines fonctionnalités déficientes, comme le métabolisme des lipoprotéines de très basse densité, empêchent la formation d'une véritable lipoviriparticule. Avec notre modèle, il devient ainsi possible pour la première fois de produire ces particules à une échelle plus importante afin d'étudier avec elles les interactions du virus avec son hôte naturel soit en réinfectant des hépatocytes humains primaires soit des hépatocytes différenciés à partir d'hiPSC pour notamment développer de nouvelles thérapies antivirales.

Enfin, en collaboration avec l'équipe de Deborah Burks (Centro de Investigación Principe Felipe - Valence), ce modèle va désormais servir à étudier la résistance à l'insuline dans le cas de dyslipidémies au cours de maladies chroniques hépatiques.

# Bibliographie

---

1. Stenvall, A., Larsson, E., Strand, S.-E. & Jönsson, B.-A. A small-scale anatomical dosimetry model of the liver. *Phys. Med. Biol.* **59**, 3353–3371 (2014).
2. Blouin, A., Bolender, R. P. & Weibel, E. R. Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J. Cell Biol.* **72**, 441–455 (1977).
3. Strazzabosco, M., Spirlí, C. & Okolicsanyi, L. Pathophysiology of the intrahepatic biliary epithelium. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **15**, 244–253 (2000).
4. Marzioni, M. *et al.* Functional Heterogeneity of Cholangiocytes. *Semin. Liver Dis.* **22**, 227–240 (2002).
5. Smedsrød, B. *et al.* Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells. *Gut* **35**, 1509–1516 (1994).
6. Blaner, W. S. *et al.* HEPATIC STELLATE CELL LIPID DROPLETS: A SPECIALIZED LIPID DROPLET FOR RETINOID STORAGE. *Biochim. Biophys. Acta* **1791**, 467 (2009).
7. Wisse, E. *et al.* On the function of pit cells, the liver-specific natural killer cells. *Semin. Liver Dis.* **17**, 265–286 (1997).
8. Gordillo, M., Evans, T. & Gouon-Evans, V. Orchestrating liver development. *Dev. Camb. Engl.* **142**, 2094–2108 (2015).
9. Si-Tayeb, K., Lemaigre, F. P. & Duncan, S. A. Organogenesis and Development of the Liver. *Dev. Cell* **18**, 175–189 (2010).
10. Grapin-Botton, A. Antero-posterior patterning of the vertebrate digestive tract: 40 years after Nicole Le Douarin's PhD thesis. *Int. J. Dev. Biol.* **49**, 335–347 (2003).
11. Tremblay, K. D. & Zaret, K. S. Distinct populations of endoderm cells converge to generate the embryonic liver bud and ventral foregut tissues. *Dev. Biol.* **280**, 87–99 (2005).
12. McLin, V. A., Rankin, S. A. & Zorn, A. M. Repression of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development. *Development* **134**, 2207–2217 (2007).
13. Dessimoz, J., Opoka, R., Kordich, J. J., Grapin-Botton, A. & Wells, J. M. FGF signaling is necessary for establishing gut tube domains along the anterior–posterior axis in vivo. *Mech. Dev.* **123**, 42–55 (2006).
14. Jung, J., Zheng, M., Goldfarb, M. & Zaret, K. S. Initiation of Mammalian Liver Development from Endoderm by Fibroblast Growth Factors. *Science* **284**, 1998–2003 (1999).
15. Serls, A. E., Doherty, S., Parvatiyar, P., Wells, J. M. & Deutsch, G. H. Different thresholds of fibroblast growth factors pattern the ventral foregut into liver and lung. *Development* **132**, 35–47 (2005).
16. Rossi, J. M., Dunn, N. R., Hogan, B. L. M. & Zaret, K. S. Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev.* **15**, 1998–2009 (2001).
17. Gualdi, R. *et al.* Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control. *Genes Dev.* **10**, 1670–1682 (1996).
18. Bossard, P. & Zaret, K. S. GATA transcription factors as potentiators of gut endoderm differentiation. *Development* **125**, 4909–4917 (1998).
19. Zorn, A. M. Liver development. in *StemBook* (Harvard Stem Cell Institute, 2008).
20. Lemaigre, F. P. Mechanisms of Liver Development: Concepts for Understanding Liver Disorders and Design of Novel Therapies. *Gastroenterology* **137**, 62–79 (2009).
21. Bort, R., Signore, M., Tremblay, K., Barbera, J. P. M. & Zaret, K. S. Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development. *Dev. Biol.* **290**, 44–56 (2006).
22. Margagliotti, S. *et al.* Role of metalloproteinases at the onset of liver development. *Dev. Growth Differ.* **50**, 331–338 (2008).

23. Ijpenberg, A. *et al.* Wt1 and retinoic acid signaling are essential for stellate cell development and liver morphogenesis. *Dev. Biol.* **312**, 157–170 (2007).
24. Doi, T. S. *et al.* Absence of tumor necrosis factor rescues RelA-deficient mice from embryonic lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 2994–2999 (1999).
25. Gérard, C., Tys, J. & Lemaigre, F. P. Gene regulatory networks in differentiation and direct reprogramming of hepatic cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* **66**, 43–50 (2017).
26. Kyrmizi, I. *et al.* Plasticity and expanding complexity of the hepatic transcription factor network during liver development. *Genes Dev.* **20**, 2293–2305 (2006).
27. Eeckhoutte, J., Formstecher, P. & Laine, B. Hepatocyte nuclear factor 4alpha enhances the hepatocyte nuclear factor 1alpha-mediated activation of transcription. *Nucleic Acids Res.* **32**, 2586–2593 (2004).
28. Kamiya, A. *et al.* Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *EMBO J.* **18**, 2127–2136 (1999).
29. Enomoto, H. *et al.* Hepatoma-derived growth factor is highly expressed in developing liver and promotes fetal hepatocyte proliferation. *Hepatology* **36**, 1519–1527 (2002).
30. Perincheri, S., Dingle, R. W. C., Peterson, M. L. & Spear, B. T. Hereditary persistence of  $\alpha$ -fetoprotein and H19 expression in liver of BALB/cJ mice is due to a retrovirus insertion in the *Zhx2* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 396–401 (2005).
31. Xie, Z. *et al.* Zinc finger protein ZBTB20 is a key repressor of alpha-fetoprotein gene transcription in liver. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 10859–10864 (2008).
32. Antoniou, A. *et al.* Intrahepatic bile ducts develop according to a new mode of tubulogenesis regulated by the transcription factor SOX9. *Gastroenterology* **136**, 2325–2333 (2009).
33. Lemaigre, F. P. Molecular mechanisms of biliary development. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **97**, 103–126 (2010).
34. Tanimizu, N., Miyajima, A. & Mostov, K. E. Liver progenitor cells fold up a cell monolayer into a double-layered structure during tubular morphogenesis. *Mol. Biol. Cell* **20**, 2486–2494 (2009).
35. Clotman, F. *et al.* Control of liver cell fate decision by a gradient of TGF $\beta$  signaling modulated by Onecut transcription factors. *Genes Dev.* **19**, 1849–1854 (2005).
36. Takayama, K. *et al.* CCAAT/enhancer binding protein-mediated regulation of TGF $\beta$  receptor 2 expression determines the hepatoblast fate decision. *Development* **141**, 91–100 (2014).
37. Tanimizu, N. & Miyajima, A. Notch signaling controls hepatoblast differentiation by altering the expression of liver-enriched transcription factors. *J. Cell Sci.* **117**, 3165–3174 (2004).
38. Benhamouche, S. *et al.* Apc Tumor Suppressor Gene Is the “Zonation-Keeper” of Mouse Liver. *Dev. Cell* **10**, 759–770 (2006).
39. Godoy, P. *et al.* Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch. Toxicol.* **87**, 1315–1530 (2013).
40. Torre, C., Perret, C. & Colnot, S. Molecular determinants of liver zonation. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **97**, 127–150 (2010).
41. Frank, C. *et al.* The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet Lond. Engl.* **355**, 887–891 (2000).
42. Shepard, C. W., Finelli, L. & Alter, M. J. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect. Dis.* **5**, 558–567 (2005).
43. Lohmann, V. & Bartenschlager, R. On the history of hepatitis C virus cell culture systems. *J. Med. Chem.* **57**, 1627–1642 (2014).
44. Moradpour, D. & Penin, F. Hepatitis C virus proteins: from structure to function. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **369**, 113–142 (2013).
45. Lerat, H. *et al.* Specific detection of hepatitis C virus minus strand RNA in hematopoietic cells. *J. Clin. Invest.* **97**, 845–851 (1996).
46. Pumeekochchai, W. *et al.* Hepatitis C virus particles of different density in the blood of chronically infected immunocompetent and immunodeficient patients: Implications for virus clearance by antibody. *J. Med. Virol.* **68**, 335–342 (2002).
47. André, P. *et al.* Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing

- particles. *J. Virol.* **76**, 6919–6928 (2002).
48. Pereira, A. A. & Jacobson, I. M. New and experimental therapies for HCV. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **6**, 403–411 (2009).
  49. Shi, Q., Jiang, J. & Luo, G. Syndecan-1 serves as the major receptor for attachment of hepatitis C virus to the surfaces of hepatocytes. *J. Virol.* **87**, 6866–6875 (2013).
  50. Lefèvre, M., Felmlee, D. J., Parnot, M., Baumert, T. F. & Schuster, C. Syndecan 4 is involved in mediating HCV entry through interaction with lipoviral particle-associated apolipoprotein E. *PLoS One* **9**, e95550 (2014).
  51. Jiang, J. *et al.* Hepatitis C virus attachment mediated by apolipoprotein E binding to cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* **86**, 7256–7267 (2012).
  52. Dao Thi, V. L. *et al.* Characterization of hepatitis C virus particle subpopulations reveals multiple usage of the scavenger receptor BI for entry steps. *J. Biol. Chem.* **287**, 31242–31257 (2012).
  53. Pileri, P. *et al.* Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* **282**, 938–941 (1998).
  54. Farquhar, M. J. *et al.* Hepatitis C virus induces CD81 and claudin-1 endocytosis. *J. Virol.* **86**, 4305–4316 (2012).
  55. Benedicto, I. *et al.* The tight junction-associated protein occludin is required for a postbinding step in hepatitis C virus entry and infection. *J. Virol.* **83**, 8012–8020 (2009).
  56. Sainz, B. *et al.* Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat. Med.* **18**, 281–285 (2012).
  57. Egger, D. *et al.* Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J. Virol.* **76**, 5974–5984 (2002).
  58. Targett-Adams, P., Boulant, S., Douglas, M. W. & McLauchlan, J. Lipid metabolism and HCV infection. *Viruses* **2**, 1195–1217 (2010).
  59. McLauchlan, J. Lipid droplets and hepatitis C virus infection. *Biochim. Biophys. Acta* **1791**, 552–559 (2009).
  60. Miyanari, Y. *et al.* The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1089–1097 (2007).
  61. Abdelwahab, K. S. & Ahmed Said, Z. N. Status of hepatitis C virus vaccination: Recent update. *World J. Gastroenterol.* **22**, 862–873 (2016).
  62. Fried, M. W. *et al.* Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* **347**, 975–982 (2002).
  63. AASLD/IDSA HCV Guidance Panel. Hepatitis C guidance: AASLD-IDSA recommendations for testing, managing, and treating adults infected with hepatitis C virus. *Hepatology* **62**, 932–954 (2015).
  64. Starzl, T. E. *et al.* Orthotopic homotransplantation of the human liver. *Ann. Surg.* **168**, 392–415 (1968).
  65. Bhatia, S. N., Underhill, G. H., Zaret, K. S. & Fox, I. J. Cell and tissue engineering for liver disease. *Sci. Transl. Med.* **6**, 245sr2 (2014).
  66. Gramignoli, R. *et al.* Development and Application of Purified Tissue Dissociation Enzyme Mixtures for Human Hepatocyte Isolation. *Cell Transplant.* **21**, 1245–1260 (2012).
  67. Stéphane, X. *et al.* Sustained Engraftment and Tissue Enzyme Activity After Liver Cell Transplantation for Argininosuccinate Lyase Deficiency. *Gastroenterology* **130**, 1317–1323 (2006).
  68. Fox, I. J. *et al.* Treatment of the Crigler–Najjar Syndrome Type I with Hepatocyte Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **338**, 1422–1427 (1998).
  69. Ambrosino, G. *et al.* Isolated Hepatocyte Transplantation for Crigler–Najjar Syndrome Type 1. *Cell Transplant.* **14**, 151–157 (2005).
  70. Dhawan, A. *et al.* Hepatocyte Transplantation for Inherited Factor VII Deficien... : Transplantation. *Transplantation* **78**, 1812–1814 (2004).
  71. Meirelles, L. da S., Chagastelles, P. C. & Nardi, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* **119**, 2204–2213 (2006).
  72. Zhang, Y., Xu, L., Wang, S., Cai, C. & Yan, L. Concise Review: Differentiation of Human Adult Stem Cells Into Hepatocyte-like Cells In vitro. *Int. J. Stem Cells* **7**, 49–54 (2014).

73. El-Kehdy, H. *et al.* Hepatocytic Differentiation Potential of Human Fetal Liver Mesenchymal Stem Cells: In Vitro and In Vivo Evaluation. *Stem Cells Int.* **2016**, (2016).
74. Schwartz, R. E. *et al.* Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J. Clin. Invest.* **109**, 1291–1302 (2002).
75. Kuo, T. K. *et al.* Stem Cell Therapy for Liver Disease: Parameters Governing the Success of Using Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Gastroenterology* **134**, 2111–2121.e3 (2008).
76. Sharma, A. D. *et al.* Human Cord Blood Stem Cells Generate Human Cytokeratin 18-Negative Hepatocyte-Like Cells in Injured Mouse Liver. *Am. J. Pathol.* **167**, 555–564 (2005).
77. Banas, A. *et al.* IFATS Collection: In Vivo Therapeutic Potential of Human Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells After Transplantation into Mice with Liver Injury. *STEM CELLS* **26**, 2705–2712 (2008).
78. Lin, H. *et al.* Implications of the immunoregulatory functions of mesenchymal stem cells in the treatment of human liver diseases. *Cell. Mol. Immunol.* **8**, 19–22 (2011).
79. Fausto, N. & Campbell, J. S. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech. Dev.* **120**, 117–130 (2003).
80. Theise, N. D. *et al.* The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology. Baltim. Md* **30**, 1425–1433 (1999).
81. Schmelzer, E. *et al.* Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J. Exp. Med.* **204**, 1973–1987 (2007).
82. Turner, R. A. *et al.* Successful transplantation of human hepatic stem cells with restricted localization to liver using hyaluronan grafts. *Hepatology. Baltim. Md* **57**, 775–784 (2013).
83. Cardinale, V. *et al.* Transplantation of human fetal biliary tree stem/progenitor cells into two patients with advanced liver cirrhosis. *BMC Gastroenterol.* **14**, 204 (2014).
84. Miki, T., Marongiu, F., Dorko, K., Ellis, E. C. S. & Strom, S. C. Isolation of Amniotic Epithelial Stem Cells. in *Current Protocols in Stem Cell Biology* (John Wiley & Sons, Inc., 2007). doi:10.1002/9780470151808.sc01e03s12
85. Miki, T., Lehmann, T., Cai, H., Stolz, D. B. & Strom, S. C. Stem Cell Characteristics of Amniotic Epithelial Cells. *STEM CELLS* **23**, 1549–1559 (2005).
86. Marongiu, F. *et al.* Hepatic differentiation of amniotic epithelial cells. *Hepatology* **53**, 1719–1729 (2011).
87. Rodriguez, N. S. *et al.* Liver-Directed Human Amniotic Epithelial Cell Transplantation Improves Systemic Disease Phenotype in Hurler Syndrome Mouse Model. *Stem Cells Transl. Med.* **6**, 1583–1594 (2017).
88. Stéphane, X. *et al.* Cryopreservation of human hepatocytes alters the mitochondrial respiratory chain complex 1. *Cell Transplant.* **16**, 409–419 (2007).
89. Donato, M. T. *et al.* Functional assessment of the quality of human hepatocyte preparations for cell transplantation. *Cell Transplant.* **17**, 1211–1219 (2008).
90. Bonora-Centelles, A. *et al.* Functional characterization of hepatocytes for cell transplantation: customized cell preparation for each receptor. *Cell Transplant.* **19**, 21–28 (2010).
91. Gagandeep, S. *et al.* Transplanted hepatocytes engraft, survive, and proliferate in the liver of rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *J. Pathol.* **191**, 78–85 (2000).
92. Tolosa, L. *et al.* Transplantation of hESC-derived hepatocytes protects mice from liver injury. *Stem Cell Res. Ther.* **6**, (2015).
93. Guha, C. *et al.* Amelioration of radiation-induced liver damage in partially hepatectomized rats by hepatocyte transplantation. *Cancer Res.* **59**, 5871–5874 (1999).
94. Grompe, M. *et al.* Loss of fumarylacetoacetate hydrolase is responsible for the neonatal hepatic dysfunction phenotype of lethal albino mice. *Genes Dev.* **7**, 2298–2307 (1993).
95. Sandgren, E. P. *et al.* Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. *Cell* **66**, 245–256 (1991).
96. De Vree, J. M. *et al.* Correction of liver disease by hepatocyte transplantation in a mouse model of progressive familial intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* **119**, 1720–1730 (2000).
97. Overturf, K. *et al.* Ex vivo hepatic gene therapy of a mouse model of Hereditary Tyrosinemia Type I. *Hum. Gene Ther.* **9**, 295–304 (1998).
98. Smit, J. J. *et al.* Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a

- complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* **75**, 451–462 (1993).
99. Ding, J. *et al.* Spontaneous hepatic repopulation in transgenic mice expressing mutant human  $\alpha$ 1-antitrypsin by wild-type donor hepatocytes. *J. Clin. Invest.* **121**, 1930–1934 (2011).
  100. Higgins, G. M. & Anderson, R. M. Experimental pathology of liver: restoration of liver in white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* **12**, 186–202 (1931).
  101. Grisham, J. W. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H3. *Cancer Res.* **22**, 842–849 (1962).
  102. Lorand, I. *et al.* Portal branch ligation induces efficient retrovirus-mediated gene delivery in rat liver. *J. Gene Med.* **6**, 507–513 (2004).
  103. Vons, C. *et al.* Transplantation of hepatocytes in nonhuman primates: a preclinical model for the treatment of hepatic metabolic diseases. *Transplantation* **72**, 811–818 (2001).
  104. Krupski, G. *et al.* [Formation of portal venous collaterals after ligation of the portal vein for induction of liver regeneration]. *ROFO. Fortschr. Geb. Rontgenstr. Nuklearmed.* **174**, 1281–1284 (2002).
  105. Denys, A. L. *et al.* 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.* **173**, 633–635 (1999).
  106. Madoff, D. C., Hicks, M. E., Abdalla, E. K., Morris, J. S. & Vauthey, J.-N. 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* **227**, 251–260 (2003).
  107. Park, S. Y. *et al.* Embolization of percutaneous transhepatic portal venous access tract with N-butyl cyanoacrylate. *Br. J. Radiol.* **87**, (2014).
  108. Dagher, I. *et al.* Efficient hepatocyte engraftment in a nonhuman primate model after partial portal vein embolization. *Transplantation* **82**, 1067–1073 (2006).
  109. Dagher, I. *et al.* Efficient hepatocyte engraftment and long-term transgene expression after reversible portal embolization in nonhuman primates. *Hepatology. Baltim. Md* **49**, 950–959 (2009).
  110. Jalan, R., Sen, S. & Williams, R. PROSPECTS FOR EXTRACORPOREAL LIVER SUPPORT. *Gut* **53**, 890–898 (2004).
  111. Stange, J. *et al.* A New Procedure for the Removal of Protein Bound Drugs and T... : ASAIO Journal. *ASAIO J.* **39**, (1993).
  112. Falkenhagen, D. *et al.* Fractionated Plasma Separation and Adsorption System: A Novel System for Blood Purification to Remove Albumin Bound Substances. *Artif. Organs* **23**, 81–86 (1999).
  113. Saliba, F. *et al.* 220 PREDICTIVE FACTORS OF TRANSPLANT FREE SURVIVAL IN PATIENTS WITH FULMINANT AND SUBFULMINANT HEPATIC FAILURE: RESULTS FROM A RANDOMIZED CONTROLLED MULTICENTER TRIAL. *J. Hepatol.* **50**, S89–S90 (2009).
  114. Evenepoel, P. *et al.* Detoxifying Capacity and Kinetics of Prometheus® – A New Extracorporeal System for the Treatment of Liver Failure. *Blood Purif.* **23**, 349–358 (2005).
  115. Khuroo, M. S., Khuroo, M. S. & Farahat, K. L. C. Molecular adsorbent recirculating system for acute and acute-on-chronic liver failure: A meta-analysis. *Liver Transpl.* **10**, 1099–1106 (2004).
  116. Kribben, A. *et al.* Effects of Fractionated Plasma Separation and Adsorption on Survival in Patients With Acute-on-Chronic Liver Failure. *Gastroenterology* **142**, 782–789.e3 (2012).
  117. Allen, J. W., Hassanein, T. & Bhatia, S. N. Advances in bioartificial liver devices. *Hepatology* **34**, 447–455 (2001).
  118. Rozga, J. *et al.* Development of a hybrid bioartificial liver. *Ann. Surg.* **217**, 502–511 (1993).
  119. Ellis, A. J. *et al.* Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. *Hepatology* **24**, 1446–1451 (1996).
  120. Langer, R. & Vacanti, J. P. Tissue engineering. *Science* **260**, 920–926 (1993).
  121. Marler, J. J., Upton, J., Langer, R. & Vacanti, J. P. Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **33**, 165–182 (1998).
  122. Mooney, D. J. *et al.* Biodegradable sponges for hepatocyte transplantation. *J. Biomed. Mater. Res.* **29**, 959–965 (1995).
  123. Mooney, D. J. *et al.* Long-term engraftment of hepatocytes transplanted on biodegradable

- polymer sponges. *J. Biomed. Mater. Res.* **37**, 413–420 (1997).
124. Kaufmann, P. M. *et al.* Long-term hepatocyte transplantation using three-dimensional matrices. *Transplant. Proc.* **31**, 1928–1929 (1999).
  125. Uygun, B. E. *et al.* Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat. Med.* **16**, 814–820 (2010).
  126. Baptista, P. M. *et al.* The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology* **53**, 604–617 (2011).
  127. Mazza, G. *et al.* Decellularized human liver as a natural 3D-scaffold for liver bioengineering and transplantation. *Sci. Rep.* **5**, 13079 (2015).
  128. Wang, X. *et al.* Generation of three-dimensional hepatocyte/gelatin structures with rapid prototyping system. *Tissue Eng.* **12**, 83–90 (2006).
  129. Bhise, N. S. *et al.* A liver-on-a-chip platform with bioprinted hepatic spheroids. *Biofabrication* **8**, 014101 (2016).
  130. Thomson, J. A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145–1147 (1998).
  131. Heins, N. *et al.* Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **22**, 367–376 (2004).
  132. Hayflick, L. The cell biology of human aging. *N. Engl. J. Med.* **295**, 1302–1308 (1976).
  133. Zeng, S. *et al.* Telomerase-mediated telomere elongation from human blastocysts to embryonic stem cells. *J. Cell Sci.* **127**, 752–762 (2014).
  134. Sherr, C. J. Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Dev.* **12**, 2984–2991 (1998).
  135. Brandenberger, R. *et al.* MPSS profiling of human embryonic stem cells. *BMC Dev. Biol.* **4**, 10 (2004).
  136. Hyslop, L. A., Armstrong, L., Stojkovic, M. & Lako, M. Human embryonic stem cells: biology and clinical implications. *Expert Rev. Mol. Med.* **7**, 1–21 (2005).
  137. Young, R. A. Control of the embryonic stem cell state. *Cell* **144**, 940–954 (2011).
  138. Vallier, L. *et al.* Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression. *Dev. Camb. Engl.* **136**, 1339–1349 (2009).
  139. Singh, A. M. *et al.* Signaling network crosstalk in human pluripotent cells: a Smad2/3-regulated switch that controls the balance between self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell* **10**, 312–326 (2012).
  140. Melcer, S. *et al.* Histone modifications and lamin A regulate chromatin protein dynamics in early embryonic stem cell differentiation. *Nat. Commun.* **3**, 910 (2012).
  141. Moussaieff, A. *et al.* Glycolysis-mediated changes in acetyl-CoA and histone acetylation control the early differentiation of embryonic stem cells. *Cell Metab.* **21**, 392–402 (2015).
  142. Kaji, K. *et al.* The NuRD component Mbd3 is required for pluripotency of embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* **8**, 285–292 (2006).
  143. Wang, G. *et al.* Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 934–942 (2005).
  144. Hannan, N. R. F., Segeritz, C.-P., Touboul, T. & Vallier, L. Production of hepatocyte-like cells from human pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* **8**, 430–437 (2013).
  145. Fu, X. *et al.* Autologous feeder cells from embryoid body outgrowth support the long-term growth of human embryonic stem cells more effectively than those from direct differentiation. *Tissue Eng. Part C Methods* **16**, 719–733 (2010).
  146. Nakagawa, M. *et al.* A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. *Sci. Rep.* **4**, 3594 (2014).
  147. Braam, S. R. *et al.* Recombinant vitronectin is a functionally defined substrate that supports human embryonic stem cell self-renewal via  $\alpha 5 \beta 1$  integrin. *Stem Cells Dayt. Ohio* **26**, 2257–2265 (2008).
  148. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
  149. Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861–872 (2007).

150. Yu, J. *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917–1920 (2007).
151. Brouwer, M., Zhou, H. & Kasri, N. N. Choices for Induction of Pluripotency: Recent Developments in Human Induced Pluripotent Stem Cell Reprogramming Strategies. *Stem Cell Rev.* **12**, 54 (2016).
152. Steichen, C. *et al.* An atypical human induced pluripotent stem cell line with a complex, stable, and balanced genomic rearrangement including a large de novo 1q uniparental disomy. *Stem Cells Transl. Med.* **4**, 224–229 (2015).
153. Toivonen, S. *et al.* Comparative Analysis of Targeted Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells (hiPSCs) and Human Embryonic Stem Cells Reveals Variability Associated With Incomplete Transgene Silencing in Retrovirally Derived hiPSC Lines. *Stem Cells Transl. Med.* **2**, 83 (2013).
154. Somers, A. *et al.* Generation of transgene-free lung disease-specific human iPS cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells Dayt. Ohio* **28**, 1728 (2010).
155. Woltjen, K. *et al.* piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* **458**, 766 (2009).
156. Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K. & Hasegawa, M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **85**, 348–362 (2009).
157. Ban, H. *et al.* Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 14234–14239 (2011).
158. Yu, J. *et al.* Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* **324**, 797–801 (2009).
159. Warren, L. *et al.* Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells using synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* **7**, 618 (2010).
160. Schlaeger, T. M. *et al.* A comparison of non-integrating reprogramming methods. *Nat. Biotechnol.* **33**, 58 (2015).
161. Subramanyam, D. *et al.* Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* **29**, 443 (2011).
162. Miyoshi, N. *et al.* Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell* **8**, 633–638 (2011).
163. Kim, D. *et al.* Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Direct Delivery of Reprogramming Proteins. *Cell Stem Cell* **4**, 472 (2009).
164. Aasen, T. *et al.* Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1276–1284 (2008).
165. Hansel, M. C. *et al.* Increased reprogramming of human fetal hepatocytes compared with adult hepatocytes in feeder-free conditions. *Cell Transplant.* **23**, 27–38 (2014).
166. Yoshida, Y., Takahashi, K., Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **5**, 237–241 (2009).
167. Esteban, M. A. *et al.* Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **6**, 71–79 (2010).
168. Park, I.-H. *et al.* Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* **451**, 141–146 (2008).
169. Chou, B.-K. *et al.* Efficient human iPS cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures. *Cell Res.* **21**, 518–529 (2011).
170. Huangfu, D. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1269–1275 (2008).
171. Hou, P. *et al.* Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science* **341**, 651–654 (2013).
172. Choi, J. *et al.* A comparison of genetically matched cell lines reveals the equivalence of human iPSCs and ESCs. *Nat. Biotechnol.* **33**, 1173–1181 (2015).
173. Kim, K. *et al.* Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* **29**, 1117–1119 (2011).

174. Urbach, A., Bar-Nur, O., Daley, G. Q. & Benvenisty, N. Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **6**, 407–411 (2010).
175. Liu, G.-H. *et al.* Modelling Fanconi anemia pathogenesis and therapeutics using integration-free patient-derived iPSCs. *Nat. Commun.* **5**, 4330 (2014).
176. Mallo, M., Wellik, D. M. & Deschamps, J. Hox genes and regional patterning of the vertebrate body plan. *Dev. Biol.* **344**, 7–15 (2010).
177. Lango Allen, H. *et al.* GATA6 haploinsufficiency causes pancreatic agenesis in humans. *Nat. Genet.* **44**, 20–22 (2011).
178. Dvash, T. *et al.* Temporal gene expression during differentiation of human embryonic stem cells and embryoid bodies. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **19**, 2875–2883 (2004).
179. Vallier, L. *et al.* Early cell fate decisions of human embryonic stem cells and mouse epiblast stem cells are controlled by the same signalling pathways. *PLoS One* **4**, e6082 (2009).
180. Urbach, A. & Benvenisty, N. Studying early lethality of 45,XO (Turner’s syndrome) embryos using human embryonic stem cells. *PLoS One* **4**, e4175 (2009).
181. Mateizel, I. *et al.* Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **21**, 503–511 (2006).
182. Urbach, A., Schuldiner, M. & Benvenisty, N. Modeling for Lesch-Nyhan disease by gene targeting in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **22**, 635–641 (2004).
183. Park, I.-H. *et al.* Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* **134**, 877–886 (2008).
184. Moretti, A. *et al.* Patient-Specific Induced Pluripotent Stem-Cell Models for Long-QT Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **363**, 1397–1409 (2010).
185. Rashid, S. T. *et al.* Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. *J. Clin. Invest.* **120**, 3127–3136 (2010).
186. Tafaleng, E. N. *et al.* Induced pluripotent stem cells model personalized variations in liver disease resulting from  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency. *Hepatology. Baltim. Md* **62**, 147–157 (2015).
187. Zhang, S. *et al.* Rescue of ATP7B function in hepatocyte-like cells from Wilson’s disease induced pluripotent stem cells using gene therapy or the chaperone drug curcumin. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 3176–3187 (2011).
188. Yi, F. *et al.* Establishment of hepatic and neural differentiation platforms of Wilson’s disease specific induced pluripotent stem cells. *Protein Cell* **3**, 855–863 (2012).
189. Cayo, M. A. *et al.* JD induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes faithfully recapitulate the pathophysiology of familial hypercholesterolemia. *Hepatology. Baltim. Md* **56**, 2163–2171 (2012).
190. Fattahi, F. *et al.* Disease-corrected hepatocyte-like cells from familial hypercholesterolemia-induced pluripotent stem cells. *Mol. Biotechnol.* **54**, 863–873 (2013).
191. Tagawa, M. *et al.* Infection of human hepatocyte cell lines with hepatitis C virus in vitro. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **10**, 523–527 (1995).
192. Blight, K. J., McKeating, J. A. & Rice, C. M. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* **76**, 13001–13014 (2002).
193. Wakita, T. *et al.* Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* **11**, 791–796 (2005).
194. Podevin, P. *et al.* Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes. *Gastroenterology* **139**, 1355–1364 (2010).
195. Belouzard, S. *et al.* Entry and release of hepatitis C virus in polarized human hepatocytes. *J. Virol.* (2017). doi:10.1128/JVI.00478-17
196. Roelandt, P. *et al.* Human pluripotent stem cell-derived hepatocytes support complete replication of hepatitis C virus. *J. Hepatol.* **57**, 246–251 (2012).
197. Schwartz, R. E. *et al.* Modeling hepatitis C virus infection using human induced pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 2544–2548 (2012).
198. Carpentier, A. *et al.* Engrafted human stem cell-derived hepatocytes establish an infectious HCV murine model. *J. Clin. Invest.* **124**, 4953–4964 (2014).
199. Braam, S. R. *et al.* Prediction of drug-induced cardiotoxicity using human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Res.* **4**, 107–116 (2010).

200. Holmgren, G. *et al.* Long-term chronic toxicity testing using human pluripotent stem cell-derived hepatocytes. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **42**, 1401–1406 (2014).
201. Choi, S. M. *et al.* Efficient drug screening and gene correction for treating liver disease using patient-specific stem cells. *Hepatology. Baltim. Md* **57**, 2458–2468 (2013).
202. Cayo, M. A. *et al.* A Drug Screen using Human iPSC-Derived Hepatocyte-like Cells Reveals Cardiac Glycosides as a Potential Treatment for Hypercholesterolemia. *Cell Stem Cell* **20**, 478–489.e5 (2017).
203. Chong, J. J. H. *et al.* Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Regenerate Non-Human Primate Hearts. *Nature* **510**, 273–277 (2014).
204. Safety Study of GRNOPC1 in Spinal Cord Injury - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01217008?term=Geron&rank=8>. (Accessed: 21st May 2017)
205. Keirstead, H. S. *et al.* Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **25**, 4694–4705 (2005).
206. Schwartz, S. D. *et al.* Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt’s macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet Lond. Engl.* **385**, 509–516 (2015).
207. Schulz, T. C. *et al.* A scalable system for production of functional pancreatic progenitors from human embryonic stem cells. *PLoS One* **7**, e37004 (2012).
208. Menasché, P. *et al.* Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report. *Eur. Heart J.* **36**, 2011–2017 (2015).
209. Okamoto, S. & Takahashi, M. Induction of retinal pigment epithelial cells from monkey iPSCs. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 8785–8790 (2011).
210. Garber, K. RIKEN suspends first clinical trial involving induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* **33**, 890–891 (2015).
211. Asgari, S. *et al.* Differentiation and transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells. *Stem Cell Rev.* **9**, 493–504 (2013).
212. Yamada, T. *et al.* In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. *Stem Cells Dayt. Ohio* **20**, 146–154 (2002).
213. D’Amour, K. A. *et al.* Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1534–1541 (2005).
214. Touboul, T. *et al.* Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions that recapitulate liver development. *Hepatology. Baltim. Md* **51**, 1754–1765 (2010).
215. Naujok, O., Diekmann, U. & Lenzen, S. The generation of definitive endoderm from human embryonic stem cells is initially independent from activin A but requires canonical Wnt-signaling. *Stem Cell Rev.* **10**, 480–493 (2014).
216. Ortmann, D. & Vallier, L. Variability of human pluripotent stem cell lines. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **46**, 179–185 (2017).
217. Duncan, S. A. *et al.* Expression of transcription factor HNF-4 in the extraembryonic endoderm, gut, and nephrogenic tissue of the developing mouse embryo: HNF-4 is a marker for primary endoderm in the implanting blastocyst. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 7598–7602 (1994).
218. Si-Tayeb, K. *et al.* Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology. Baltim. Md* **51**, 297–305 (2010).
219. Song, Z. *et al.* Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. *Cell Res.* **19**, 1233–1242 (2009).
220. Hannan, N. R. F. *et al.* Generation of multipotent foregut stem cells from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep.* **1**, 293–306 (2013).
221. Kamiya, A., Kinoshita, T. & Miyajima, A. Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS Lett.* **492**, 90–94 (2001).
222. Touboul, T. *et al.* Stage-specific regulation of the WNT/ $\beta$ -catenin pathway enhances differentiation of hESCs into hepatocytes. *J. Hepatology.* **64**, 1315–1326 (2016).
223. Siller, R., Greenhough, S., Naumovska, E. & Sullivan, G. J. Small-Molecule-Driven Hepatocyte

- Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rep.* **4**, 939–952 (2015).
224. Hengstler, J. G. *et al.* Generation of human hepatocytes by stem cell technology: definition of the hepatocyte. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **1**, 61–74 (2005).
225. Baxter, M. *et al.* Phenotypic and functional analyses show stem cell-derived hepatocyte-like cells better mimic fetal rather than adult hepatocytes. *J. Hepatol.* **62**, 581–589 (2015).
226. Lucendo-Villarin, B., Rashidi, H., Cameron, K. & Hay, D. C. Pluripotent stem cell derived hepatocytes: using materials to define cellular differentiation and tissue engineering. *J. Mater. Chem. B Mater. Biol. Med.* **4**, 3433–3442 (2016).
227. Tsuyama, T., Shiraki, N. & Kume, S. Definitive Endoderm Differentiation of Human Embryonic Stem Cells Combined with Selective Elimination of Undifferentiated Cells by Methionine Deprivation. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1307**, 205–212 (2016).
228. Tomizawa, M. *et al.* Improved Survival and Initiation of Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells to Hepatocyte-Like Cells upon Culture in William’s E Medium followed by Hepatocyte Differentiation Inducer Treatment. *PLoS ONE* **11**, (2016).
229. Tomizawa, M. *et al.* Hepatocyte selection medium eliminating induced pluripotent stem cells among primary human hepatocytes. *World J. Methodol.* **5**, 108–114 (2015).
230. Cameron, K. *et al.* Recombinant Laminins Drive the Differentiation and Self-Organization of hESC-Derived Hepatocytes. *Stem Cell Rep.* **5**, 1250–1262 (2015).
231. Kanninen, L. K. *et al.* Laminin-511 and laminin-521-based matrices for efficient hepatic specification of human pluripotent stem cells. *Biomaterials* **103**, 86–100 (2016).
232. Nagaoka, M., Kobayashi, M., Kawai, C., Mallanna, S. K. & Duncan, S. A. Design of a Vitronectin-Based Recombinant Protein as a Defined Substrate for Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Hepatocyte-Like Cells. *PloS One* **10**, e0136350 (2015).
233. Gieseck, R. L. *et al.* Maturation of induced pluripotent stem cell derived hepatocytes by 3D-culture. *PloS One* **9**, e86372 (2014).
234. Kim, J. H. *et al.* Enhanced Metabolizing Activity of Human ES Cell-Derived Hepatocytes Using a 3D Culture System with Repeated Exposures to Xenobiotics. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **147**, 190–206 (2015).
235. Subramanian, K. *et al.* Spheroid culture for enhanced differentiation of human embryonic stem cells to hepatocyte-like cells. *Stem Cells Dev.* **23**, 124–131 (2014).
236. Ogawa, S. *et al.* Three-dimensional culture and cAMP signaling promote the maturation of human pluripotent stem cell-derived hepatocytes. *Dev. Camb. Engl.* **140**, 3285–3296 (2013).
237. Ren, S. *et al.* Bioartificial Liver Device Based on Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatocytes. *J. Stem Cell Res. Ther.* **5**, (2015).
238. Nagamoto, Y. *et al.* The promotion of hepatic maturation of human pluripotent stem cells in 3D co-culture using type I collagen and Swiss 3T3 cell sheets. *Biomaterials* **33**, 4526–4534 (2012).
239. Javed, M. S., Yaqoob, N., Iwamuro, M., Kobayashi, N. & Fujiwara, T. Generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem (iPS) cells by co-culturing embryoid body cells with liver non-parenchymal cell line TWNT-1. *J. Coll. Physicians Surg.--Pak. JCPSP* **24**, 91–96 (2014).
240. Takebe, T. *et al.* Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* **499**, 481–484 (2013).
241. Guan, Y. *et al.* Human hepatic organoids for the analysis of human genetic diseases. *JCI Insight* **2**, (2017).
242. Nordestgaard, B. G. *et al.* Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur. Heart J.* **34**, 3478–3490a (2013).
243. Pajak, A. *et al.* Prevalence of familial hypercholesterolemia: a meta-analysis of six large, observational, population-based studies in Poland. *Arch. Med. Sci. AMS* **12**, 687–696 (2016).
244. Nutrition classics. Archives of Internal Medicine, Volume 64, October 1939: Angina pectoris in hereditary xanthomatosis. By Carl Müller. *Nutr. Rev.* **45**, 113–115 (1987).
245. Khachadurian, A. K. THE INHERITANCE OF ESSENTIAL FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA. *Am. J. Med.* **37**, 402–407 (1964).
246. Goldstein, J. L. & Brown, M. S. Binding and degradation of low density lipoproteins by

- cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J. Biol. Chem.* **249**, 5153–5162 (1974).
247. Schneider, W. J., Beisiegel, U., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. Purification of the low density lipoprotein receptor, an acidic glycoprotein of 164,000 molecular weight. *J. Biol. Chem.* **257**, 2664–2673 (1982).
248. Yamamoto, T. *et al.* The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell* **39**, 27–38 (1984).
249. Südhof, T. C., Goldstein, J. L., Brown, M. S. & Russell, D. W. The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science* **228**, 815–822 (1985).
250. Innerarity, T. L. *et al.* Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 6919–6923 (1987).
251. Abifadel, M. *et al.* Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* **34**, 154–156 (2003).
252. Khachadurian, A. K. & Uthman, S. M. Experiences with the homozygous cases of familial hypercholesterolemia. A report of 52 patients. *Nutr. Metab.* **15**, 132–140 (1973).
253. Meng, X. *et al.* Corneal arcus and xanthomas in homozygous familial hypercholesterolemia: First report from China. *Indian J. Ophthalmol.* **61**, 770–771 (2013).
254. Goldstein, J. L., Hobbs, H. H. & Brown, M. S. Familial Hypercholesterolemia | The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease | OMMBID | McGraw-Hill Medical. (2001).
255. Grundy, S. M. Absorption and metabolism of dietary cholesterol. *Annu. Rev. Nutr.* **3**, 71–96 (1983).
256. Part 2-Cholesterol Isn't Cholesterol: Cholesterol, Lipoproteins, Triglycerides, Fats, Diet, Atherosclerosis, Stress, Inflammation, Metabolic Syndrome, Leptin Resistance And What It Means To Your Health. *Dr. Steven Teagarden* (2016).
257. Saland, J. M. & Ginsberg, H. N. Lipoprotein metabolism in chronic renal insufficiency. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* **22**, 1095–1112 (2007).
258. Iqbal, J. & Hussain, M. M. Intestinal lipid absorption. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **296**, E1183–1194 (2009).
259. Ikeda, I. *et al.* Cholesterol esterase accelerates intestinal cholesterol absorption. *Biochim. Biophys. Acta* **1571**, 34–44 (2002).
260. Betters, J. L. & Yu, L. NPC1L1 and cholesterol transport. *FEBS Lett.* **584**, 2740–2747 (2010).
261. Jamil, H. *et al.* Microsomal triglyceride transfer protein. Specificity of lipid binding and transport. *J. Biol. Chem.* **270**, 6549–6554 (1995).
262. Cooper, A. D. Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J. Lipid Res.* **38**, 2173–2192 (1997).
263. Olofsson, S. O., Stillemark-Billton, P. & Asp, L. Intracellular assembly of VLDL: two major steps in separate cell compartments. *Trends Cardiovasc. Med.* **10**, 338–345 (2000).
264. Barter, P. J. *et al.* Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 160–167 (2003).
265. Havel, R. J. The formation of LDL: mechanisms and regulation. *J. Lipid Res.* **25**, 1570–1576 (1984).
266. Ladu, M. J. *et al.* Lipoproteins in the central nervous system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **903**, 167–175 (2000).
267. Spady, D. K., Turley, S. D. & Dietschy, J. M. Receptor-independent low density lipoprotein transport in the rat in vivo. Quantitation, characterization, and metabolic consequences. *J. Clin. Invest.* **76**, 1113–1122 (1985).
268. Hegele, R. A. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 109–121 (2009).
269. Krieger, M. Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J. Clin. Invest.* **108**, 793–797 (2001).
270. Pugh, S. D. *et al.* Caveolin contributes to the modulation of basal and  $\beta$ -adrenoceptor stimulated function of the adult rat ventricular myocyte by simvastatin: a novel pleiotropic effect. *PLoS One* **9**, e106905 (2014).
271. Nohturfft, A., Yabe, D., Goldstein, J. L., Brown, M. S. & Espenshade, P. J. Regulated step in

- cholesterol feedback localized to budding of SCAP from ER membranes. *Cell* **102**, 315–323 (2000).
272. Vallett, S. M., Sanchez, H. B., Rosenfeld, J. M. & Osborne, T. F. A direct role for sterol regulatory element binding protein in activation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene. *J. Biol. Chem.* **271**, 12247–12253 (1996).
273. Smith, J. R., Osborne, T. F., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. Identification of nucleotides responsible for enhancer activity of sterol regulatory element in low density lipoprotein receptor gene. *J. Biol. Chem.* **265**, 2306–2310 (1990).
274. Sun, L.-P., Li, L., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. Insig required for sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins in vitro. *J. Biol. Chem.* **280**, 26483–26490 (2005).
275. Barbier, O., Trottier, J., Kaeding, J., Caron, P. & Verreault, M. Lipid-activated transcription factors control bile acid glucuronidation. *Mol. Cell. Biochem.* **326**, 3–8 (2009).
276. Repa, J. J. *et al.* Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* **289**, 1524–1529 (2000).
277. Repa, J. J. *et al.* Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J. Biol. Chem.* **277**, 18793–18800 (2002).
278. Wang, Y. *et al.* Regulation of cholesterologenesis by the oxysterol receptor, LXRA $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* **283**, 26332–26339 (2008).
279. Zelcer, N., Hong, C., Boyadjian, R. & Tontonoz, P. LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science* **325**, 100–104 (2009).
280. Spann, N. J. & Glass, C. K. Sterols and oxysterols in immune cell function. *Nat. Immunol.* **14**, 893–900 (2013).
281. Ma, D. *et al.* The Liver Clock Controls Cholesterol Homeostasis through Trib1 Protein-mediated Regulation of PCSK9/Low Density Lipoprotein Receptor (LDLR) Axis. *J. Biol. Chem.* **290**, 31003–31012 (2015).
282. Varret, M. & Rabès, J.-P. Missense Mutation in the LDLR Gene: A Wide Spectrum in the Severity of Familial Hypercholesterolemia. (2012). doi:10.5772/36432
283. Voet, D. *Principle of Biochemistry*. (2008).
284. Seidah, N. G. *et al.* The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 928–933 (2003).
285. Seidah, N. G. The proprotein convertases, 20 years later. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **768**, 23–57 (2011).
286. Strøm, T. B., Tveten, K. & Leren, T. P. PCSK9 acts as a chaperone for the LDL receptor in the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* **457**, 99–105 (2014).
287. Maxwell, K. N., Fisher, E. A. & Breslow, J. L. Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 2069–2074 (2005).
288. Poirier, S. *et al.* Dissection of the endogenous cellular pathways of PCSK9-induced low density lipoprotein receptor degradation: evidence for an intracellular route. *J. Biol. Chem.* **284**, 28856–28864 (2009).
289. Zhang, D.-W. *et al.* Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J. Biol. Chem.* **282**, 18602–18612 (2007).
290. Rashid, S. *et al.* Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 5374–5379 (2005).
291. Seidah, N. G. & Prat, A. The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 367–383 (2012).
292. Brown, M. S. & Goldstein, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **232**, 34–47 (1986).
293. Hobbs, H. H., Brown, M. S., Russell, D. W., Davignon, J. & Goldstein, J. L. Deletion in the gene for the low-density-lipoprotein receptor in a majority of French Canadians with familial hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.* **317**, 734–737 (1987).
294. Esser, V. & Russell, D. W. Transport-deficient mutations in the low density lipoprotein receptor.

- Alterations in the cysteine-rich and cysteine-poor regions of the protein block intracellular transport. *J. Biol. Chem.* **263**, 13276–13281 (1988).
295. Goldstein, J. L., Anderson, R. G. & Brown, M. S. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature* **279**, 679–685 (1979).
296. Aalto-Setälä, K., Helve, E., Kovanen, P. T. & Kontula, K. Finnish type of low density lipoprotein receptor gene mutation (FH-Helsinki) deletes exons encoding the carboxy-terminal part of the receptor and creates an internalization-defective phenotype. *J. Clin. Invest.* **84**, 499–505 (1989).
297. Davis, C. G. *et al.* Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature* **326**, 760–765 (1987).
298. Hobbs, H. H., Russell, D. W., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu. Rev. Genet.* **24**, 133–170 (1990).
299. Guevara, J., Romo, J., McWhorter, T. & Guevara, N. V. Analogs of LDL Receptor Ligand Motifs in Dengue Envelope and Capsid Proteins as Potential Codes for Cell Entry. *J. Viruses* **2015**, (2015).
300. Valle, J. R., Salas-Benito, J., Soto-Acosta, R. & Angel, R. M. del. Dengue Virus Cellular Receptors and Tropism. *Curr. Trop. Med. Rep.* **1**, 36–43 (2014).
301. Soto-Acosta, R. *et al.* The increase in cholesterol levels at early stages after dengue virus infection correlates with an augment in LDL particle uptake and HMG-CoA reductase activity. *Virology* **442**, 132–147 (2013).
302. Lichty, B. D., Power, A. T., Stojdl, D. F. & Bell, J. C. Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. *Trends Mol. Med.* **10**, 210–216 (2004).
303. Mátrai, J., Chuah, M. K. L. & VandenDriessche, T. Recent advances in lentiviral vector development and applications. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **18**, 477–490 (2010).
304. Yi, Y., Noh, M. J. & Lee, K. H. Current advances in retroviral gene therapy. *Curr. Gene Ther.* **11**, 218–228 (2011).
305. Fischer, D. G., Tal, N., Novick, D., Barak, S. & Rubinstein, M. An antiviral soluble form of the LDL receptor induced by interferon. *Science* **262**, 250–253 (1993).
306. Finkelshtein, D., Werman, A., Novick, D., Barak, S. & Rubinstein, M. LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 7306–7311 (2013).
307. Amirache, F. *et al.* Mystery solved: VSV-G-LVs do not allow efficient gene transfer into unstimulated T cells, B cells, and HSCs because they lack the LDL receptor. *Blood* **123**, 1422–1424 (2014).
308. Merz, A. *et al.* Biochemical and morphological properties of hepatitis C virus particles and determination of their lipidome. *J. Biol. Chem.* **286**, 3018–3032 (2011).
309. Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B. & Zhang, Q. X. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 12766–12771 (1999).
310. Monazahian, M. *et al.* Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J. Med. Virol.* **57**, 223–229 (1999).
311. Molina, S. *et al.* The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus. *J. Hepatol.* **46**, 411–419 (2007).
312. Owen, D. M., Huang, H., Ye, J. & Gale, M. Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor. *Virology* **394**, 99–108 (2009).
313. Albecka, A. *et al.* Role of low-density lipoprotein receptor in the hepatitis C virus life cycle. *Hepatol. Baltim. Md* **55**, 998–1007 (2012).
314. Syed, G. H., Amako, Y. & Siddiqui, A. Hepatitis C virus hijacks host lipid metabolism. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **21**, 33–40 (2010).
315. Petit, J.-M. *et al.* Cell surface expression of LDL receptor in chronic hepatitis C: correlation with viral load. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **293**, E416–420 (2007).
316. Syed, G. H. *et al.* Hepatitis C virus stimulates low-density lipoprotein receptor expression to

- facilitate viral propagation. *J. Virol.* **88**, 2519–2529 (2014).
317. Wong-Staal, F., Syder, A. J. & McKelvy, J. F. Targeting HCV entry for development of therapeutics. *Viruses* **2**, 1718–1733 (2010).
  318. Popescu, C.-I. *et al.* Hepatitis C virus life cycle and lipid metabolism. *Biology* **3**, 892–921 (2014).
  319. Soria, L. F. *et al.* Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 587–591 (1989).
  320. Myant, N. B. Familial defective apolipoprotein B-100: a review, including some comparisons with familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* **104**, 1–18 (1993).
  321. Tai, D. Y., Pan, J. P. & Lee-Chen, G. J. Identification and haplotype analysis of apolipoprotein B-100 Arg3500-->Trp mutation in hyperlipidemic Chinese. *Clin. Chem.* **44**, 1659–1665 (1998).
  322. Sabbagh, A. S. *et al.* ApoB-100 R3500Q mutation in the Lebanese population: prevalence and historical review of the literature. *Mol. Biol. Rep.* **34**, 267–270 (2007).
  323. Schulz, R., Schlüter, K.-D. & Laufs, U. Molecular and cellular function of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9). *Basic Res. Cardiol.* **110**, 4 (2015).
  324. Cohen, J. C., Boerwinkle, E., Mosley, T. H. & Hobbs, H. H. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* **354**, 1264–1272 (2006).
  325. Amarenco, P. *et al.* High-dose atorvastatin after stroke or transient ischemic attack. *N. Engl. J. Med.* **355**, 549–559 (2006).
  326. Ridker, P. M., Pradhan, A., MacFadyen, J. G., Libby, P. & Glynn, R. J. Cardiovascular benefits and diabetes risks of statin therapy in primary prevention: an analysis from the JUPITER trial. *Lancet Lond. Engl.* **380**, 565–571 (2012).
  327. Abifadel, M. *et al.* Mutations and polymorphisms in the proprotein convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9) gene in cholesterol metabolism and disease. *Hum. Mutat.* **30**, 520–529 (2009).
  328. Morganroth, J., Levy, R. I., McMahon, A. E. & Gotto, A. M. Pseudohomozygous type II hyperlipoproteinemia. *J. Pediatr.* **85**, 639–643 (1974).
  329. Mishkel, M. A. Pseudohomozygous and pseudoheterozygous type II hyperlipoproteinemia. *Am. J. Dis. Child.* **1960** **130**, 991–993 (1976).
  330. Garcia, C. K. *et al.* Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science* **292**, 1394–1398 (2001).
  331. Gotthardt, M. *et al.* Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction. *J. Biol. Chem.* **275**, 25616–25624 (2000).
  332. Kondo, T. & Watanabe, Y. A heritable hyperlipemic rabbit. *Jikken Dobutsu* **24**, 89–94 (1975).
  333. Buja, L. M., Kita, T., Goldstein, J. L., Watanabe, Y. & Brown, M. S. Cellular pathology of progressive atherosclerosis in the WHHL rabbit. An animal model of familial hypercholesterolemia. *Arterioscler. Dallas Tex* **3**, 87–101 (1983).
  334. Atkinson, J. B., Hoover, R. L., Berry, K. K. & Swift, L. L. Cholesterol-fed heterozygous Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits: a new model for atherosclerosis. *Atherosclerosis* **78**, 123–136 (1989).
  335. Yamamoto, T., Bishop, R. W., Brown, M. S., Goldstein, J. L. & Russell, D. W. Deletion in cysteine-rich region of LDL receptor impedes transport to cell surface in WHHL rabbit. *Science* **232**, 1230–1237 (1986).
  336. Schneider, W. J., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. Kinetic defects in the processing of the low density lipoprotein receptor in fibroblasts from WHHL rabbits and a family with familial hypercholesterolemia. *Mol. Biol. Med.* **1**, 353–367 (1983).
  337. Goulinet-Mainot, S. *et al.* Improved Hepatocyte Engraftment After Portal Vein Occlusion in LDL Receptor-Deficient WHHL Rabbits and Lentiviral-Mediated Phenotypic Correction In Vitro. *Cell Med.* **4**, 85–98 (2012).
  338. Scanu, A. M. *et al.* Genetically determined hypercholesterolemia in a rhesus monkey family due to a deficiency of the LDL receptor. *J. Lipid Res.* **29**, 1671–1681 (1988).
  339. Hummel, M., Li, Z. G., Pfaffinger, D., Neven, L. & Scanu, A. M. Familial hypercholesterolemia in a rhesus monkey pedigree: molecular basis of low density lipoprotein receptor deficiency.

- Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 3122–3126 (1990).
340. Ishibashi, S. *et al.* Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J. Clin. Invest.* **92**, 883–893 (1993).
  341. Ishibashi, S., Goldstein, J. L., Brown, M. S., Herz, J. & Burns, D. K. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J. Clin. Invest.* **93**, 1885–1893 (1994).
  342. Sanan, D. A. *et al.* Low density lipoprotein receptor-negative mice expressing human apolipoprotein B-100 develop complex atherosclerotic lesions on a chow diet: no accentuation by apolipoprotein(a). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 4544–4549 (1998).
  343. Powell-Braxton, L. *et al.* A mouse model of human familial hypercholesterolemia: markedly elevated low density lipoprotein cholesterol levels and severe atherosclerosis on a low-fat chow diet. *Nat. Med.* **4**, 934–938 (1998).
  344. Greig, J. A. *et al.* Nonclinical Pharmacology/Toxicology Study of AAV8.TBG.mLDLR and AAV8.TBG.hLDLR in a Mouse Model of Homozygous Familial Hypercholesterolemia. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* **28**, 28–38 (2017).
  345. Bissig-Choisat, B. *et al.* Development and rescue of human familial hypercholesterolaemia in a xenograft mouse model. *Nat. Commun.* **6**, 7339 (2015).
  346. Bruckert, E. & Rosenbaum, D. Lowering LDL-cholesterol through diet: potential role in the statin era. *Curr. Opin. Lipidol.* **22**, 43–48 (2011).
  347. Demonty, I. *et al.* Continuous dose-response relationship of the LDL-cholesterol-lowering effect of phytosterol intake. *J. Nutr.* **139**, 271–284 (2009).
  348. Brown, L., Rosner, B., Willett, W. W. & Sacks, F. M. Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**, 30–42 (1999).
  349. Dattilo, A. M. & Kris-Etherton, P. M. Effects of weight reduction on blood lipids and lipoproteins: a meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* **56**, 320–328 (1992).
  350. Civeira, F. & International Panel on Management of Familial Hypercholesterolemia. Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* **173**, 55–68 (2004).
  351. Miltiados, G. *et al.* Genetic and environmental factors affecting the response to statin therapy in patients with molecularly defined familial hypercholesterolaemia. *Pharmacogenet. Genomics* **15**, 219–225 (2005).
  352. Charlton-Menys, V. & Durrington, P. N. Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. *Exp. Physiol.* **93**, 27–42 (2008).
  353. Jones, P. H. & Davidson, M. H. Reporting rate of rhabdomyolysis with fenofibrate + statin versus gemfibrozil + any statin. *Am. J. Cardiol.* **95**, 120–122 (2005).
  354. Soedamah-Muthu, S. S. *et al.* The effect of atorvastatin on serum lipids, lipoproteins and NMR spectroscopy defined lipoprotein subclasses in type 2 diabetic patients with ischaemic heart disease. *Atherosclerosis* **167**, 243–255 (2003).
  355. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* **285**, 2486–2497 (2001).
  356. Betteridge, D. J. *et al.* Treatment of familial hypercholesterolaemia. United Kingdom lipid clinics study of pravastatin and cholestyramine. *BMJ* **304**, 1335–1338 (1992).
  357. Jacobson, T. A., Armani, A., McKenney, J. M. & Guyton, J. R. Safety considerations with gastrointestinally active lipid-lowering drugs. *Am. J. Cardiol.* **99**, 47C–55C (2007).
  358. Altmann, S. W. *et al.* Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* **303**, 1201–1204 (2004).
  359. Pandor, A. *et al.* Ezetimibe monotherapy for cholesterol lowering in 2,722 people: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Intern. Med.* **265**, 568–580 (2009).
  360. Birjmohun, R. S., Hutten, B. A., Kastelein, J. J. P. & Stroes, E. S. G. Efficacy and safety of high-density lipoprotein cholesterol-increasing compounds: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Am. Coll. Cardiol.* **45**, 185–197 (2005).
  361. Altschul, R., Hoffer, A. & Stephen, J. D. Influence of nicotinic acid on serum cholesterol in man.

- Arch. Biochem. Biophys.* **54**, 558–559 (1955).
362. Cohen, J. *et al.* Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat. Genet.* **37**, 161–165 (2005).
363. Graham, M. J. *et al.* Antisense inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces serum LDL in hyperlipidemic mice. *J. Lipid Res.* **48**, 763–767 (2007).
364. Stein, E. A. *et al.* Effect of a monoclonal antibody to PCSK9, REGN727/SAR236553, to reduce low-density lipoprotein cholesterol in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia on stable statin dose with or without ezetimibe therapy: a phase 2 randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* **380**, 29–36 (2012).
365. Koren, M. J. *et al.* Efficacy, safety, and tolerability of a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 as monotherapy in patients with hypercholesterolaemia (MENDEL): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet Lond. Engl.* **380**, 1995–2006 (2012).
366. Dias, C. S. *et al.* Effects of AMG 145 on low-density lipoprotein cholesterol levels: results from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose phase 1 studies in healthy volunteers and hypercholesterolemic subjects on statins. *J. Am. Coll. Cardiol.* **60**, 1888–1898 (2012).
367. Sabatine, M. S. *et al.* Efficacy and safety of evolocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N. Engl. J. Med.* **372**, 1500–1509 (2015).
368. Robinson, J. G. *et al.* Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N. Engl. J. Med.* **372**, 1489–1499 (2015).
369. Stein, E. A. *et al.* Effect of the proprotein convertase subtilisin/kexin 9 monoclonal antibody, AMG 145, in homozygous familial hypercholesterolemia. *Circulation* **128**, 2113–2120 (2013).
370. Bilheimer, D. W. Portacaval shunt and liver transplantation in treatment of familial hypercholesterolemia. *Arterioscler. Dallas Tex* **9**, 1158–163 (1989).
371. Starzl, T. E. *et al.* Heart-liver transplantation in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Lancet Lond. Engl.* **1**, 1382–1383 (1984).
372. Ibrahim, M., El-Hamamsy, I., Barbir, M. & Yacoub, M. H. Translational lessons from a case of combined heart and liver transplantation for familial hypercholesterolemia 20 years post-operatively. *J Cardiovasc. Transl. Res.* **5**, 351–358 (2012).
373. Schmidt, H. H.-J. *et al.* Liver transplantation in a subject with familial hypercholesterolemia carrying the homozygous p.W577R LDL-receptor gene mutation. *Clin. Transplant.* **22**, 180–184 (2008).
374. Kakaei, F. *et al.* Liver transplantation for homozygous familial hypercholesterolemia: two case reports. *Transplant. Proc.* **41**, 2939–2941 (2009).
375. Zwiener, R. J., Uauy, R., Petruska, M. L. & Huet, B. A. Low-density lipoprotein apheresis as long-term treatment for children with homozygous familial hypercholesterolemia. *J. Pediatr.* **126**, 728–735 (1995).
376. Kroon, A. A., van't Hof, M. A., Demacker, P. N. & Stalenhoef, A. F. The rebound of lipoproteins after LDL-apheresis. Kinetics and estimation of mean lipoprotein levels. *Atherosclerosis* **152**, 519–526 (2000).
377. Boekholdt, S. M. *et al.* Plasma levels of cholesteryl ester transfer protein and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women: the prospective EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and nutrition)-Norfolk population study. *Circulation* **110**, 1418–1423 (2004).
378. Okamoto, H. *et al.* A cholesteryl ester transfer protein inhibitor attenuates atherosclerosis in rabbits. *Nature* **406**, 203–207 (2000).
379. Davidson, M. H. *et al.* The safety and immunogenicity of a CETP vaccine in healthy adults. *Atherosclerosis* **169**, 113–120 (2003).
380. Wetterau, J. R. *et al.* Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science* **258**, 999–1001 (1992).
381. Cuchel, M. *et al.* Efficacy and safety of a microsomal triglyceride transfer protein inhibitor in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a single-arm, open-label, phase 3 study. *Lancet Lond. Engl.* **381**, 40–46 (2013).

382. Raal, F. J. *et al.* Mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, for lowering of LDL cholesterol concentrations in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* **375**, 998–1006 (2010).
383. Stein, E. A. *et al.* Apolipoprotein B synthesis inhibition with mipomersen in heterozygous familial hypercholesterolemia: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial to assess efficacy and safety as add-on therapy in patients with coronary artery disease. *Circulation* **126**, 2283–2292 (2012).
384. Akdim, F. *et al.* Effect of mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, on low-density lipoprotein cholesterol in patients with familial hypercholesterolemia. *Am. J. Cardiol.* **105**, 1413–1419 (2010).
385. Ray, K. K. *et al.* Inclisiran in Patients at High Cardiovascular Risk with Elevated LDL Cholesterol. *N. Engl. J. Med.* **376**, 1430–1440 (2017).
386. Fedorov, Y. *et al.* Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *RNA N. Y. N* **12**, 1188–1196 (2006).
387. Momtazi, A. A., Banach, M., Pirro, M., Stein, E. A. & Sahebkar, A. MicroRNAs: New Therapeutic Targets for Familial Hypercholesterolemia? *Clin. Rev. Allergy Immunol.* (2017). doi:10.1007/s12016-017-8611-x
388. Wagschal, A. *et al.* Genome-wide identification of microRNAs regulating cholesterol and triglyceride homeostasis. *Nat. Med.* **21**, 1290–1297 (2015).
389. Bai, J. *et al.* A retrospective study of NENs and miR-224 promotes apoptosis of BON-1 cells by targeting PCSK9 inhibition. *Oncotarget* **8**, 6929–6939 (2017).
390. Xu, Y. *et al.* A metabolic stress-inducible miR-34a-HNF4a pathway regulates lipid and lipoprotein metabolism. *Nat. Commun.* **6**, 7466 (2015).
391. Badano, J. L. & Katsanis, N. Beyond Mendel: an evolving view of human genetic disease transmission. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 779–789 (2002).
392. Liu, F., Wen, B. & Kayser, M. Colorful DNA polymorphisms in humans. *Semin. Cell Dev. Biol.* **24**, 562–575 (2013).
393. Thomas, K. R. & Capecchi, M. R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* **51**, 503–512 (1987).
394. McManus, M. T. & Sharp, P. A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 737–747 (2002).
395. Krueger, U. *et al.* Insights into effective RNAi gained from large-scale siRNA validation screening. *Oligonucleotides* **17**, 237–250 (2007).
396. Jackson, A. L. *et al.* Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.* **21**, 635–637 (2003).
397. Pankowicz, F. P., Jarrett, K. E., Lagor, W. R. & Bissig, K.-D. CRISPR/Cas9: at the cutting edge of hepatology. *Gut* **66**, 1329–1340 (2017).
398. Johnson, R. D. & Jasin, M. Double-strand-break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 196–201 (2001).
399. Lieber, M. R., Ma, Y., Pannicke, U. & Schwarz, K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 712–720 (2003).
400. Boycott, K. M., Vanstone, M. R., Bulman, D. E. & MacKenzie, A. E. Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 681–691 (2013).
401. Elborn, J. S. Cystic fibrosis. *Lancet Lond. Engl.* **388**, 2519–2531 (2016).
402. Srivastava, A. Dose and response in haemophilia--optimization of factor replacement therapy. *Br. J. Haematol.* **127**, 12–25 (2004).
403. Cavazzana-Calvo, M. *et al.* Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **288**, 669–672 (2000).
404. Hacein-Bey-Abina, S. *et al.* LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **302**, 415–419 (2003).
405. Ellis, J. Silencing and variegation of gammaretrovirus and lentivirus vectors. *Hum. Gene Ther.* **16**, 1241–1246 (2005).
406. Wang, L. *et al.* AAV8-mediated hepatic gene transfer in infant rhesus monkeys (Macaca

- mulatta). *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **19**, 2012–2020 (2011).
407. Wu, Z., Yang, H. & Colosi, P. Effect of Genome Size on AAV Vector Packaging. *Mol. Ther.* **18**, 80–86 (2010).
408. Manno, C. S. *et al.* Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat. Med.* **12**, 342–347 (2006).
409. Chevalier, B. S. & Stoddard, B. L. Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility. *Nucleic Acids Res.* **29**, 3757–3774 (2001).
410. Jacquier, A. & Dujon, B. An intron-encoded protein is active in a gene conversion process that spreads an intron into a mitochondrial gene. *Cell* **41**, 383–394 (1985).
411. Gimble, F. S. Invasion of a multitude of genetic niches by mobile endonuclease genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **185**, 99–107 (2000).
412. Stoddard, B. L. Homing endonuclease structure and function. *Q. Rev. Biophys.* **38**, 49–95 (2005).
413. Dujon, B. *et al.* Mitochondrial genetics. XI. Mutations at the mitochondrial locus omega affecting the recombination of mitochondrial genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet. MGG* **143**, 131–165 (1976).
414. Dürrenberger, F. & Rochaix, J. D. Chloroplast ribosomal intron of *Chlamydomonas reinhardtii*: in vitro self-splicing, DNA endonuclease activity and in vivo mobility. *EMBO J.* **10**, 3495–3501 (1991).
415. Hafez, M. & Hausner, G. Homing endonucleases: DNA scissors on a mission. *Genome* **55**, 553–569 (2012).
416. Tupler, R., Perini, G. & Green, M. R. Expressing the human genome. *Nature* **409**, 832–833 (2001).
417. Lee, M. S., Gippert, G. P., Soman, K. V., Case, D. A. & Wright, P. E. Three-dimensional solution structure of a single zinc finger DNA-binding domain. *Science* **245**, 635–637 (1989).
418. Beerli, R. R., Segal, D. J., Dreier, B. & Barbas, C. F. Toward controlling gene expression at will: specific regulation of the *erbB-2/HER-2* promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 14628–14633 (1998).
419. Li, L., Wu, L. P. & Chandrasegaran, S. Functional domains in Fok I restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 4275–4279 (1992).
420. Kim, Y. G., Cha, J. & Chandrasegaran, S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 1156–1160 (1996).
421. Smith, J. *et al.* Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic Acids Res.* **28**, 3361–3369 (2000).
422. Kim, H. S., Bernitz, J. M., Lee, D.-F. & Lemischka, I. R. Genomic editing tools to model human diseases with isogenic pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.* **23**, 2673–2686 (2014).
423. Boch, J. *et al.* Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* **326**, 1509–1512 (2009).
424. Deng, D. *et al.* Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science* **335**, 720–723 (2012).
425. Zhang, F. *et al.* Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nat. Biotechnol.* **29**, 149–153 (2011).
426. Li, T. *et al.* Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* **39**, 6315–6325 (2011).
427. Lamb, B. M., Mercer, A. C. & Barbas, C. F. Directed evolution of the TALE N-terminal domain for recognition of all 5' bases. *Nucleic Acids Res.* **41**, 9779–9785 (2013).
428. Briggs, A. W. *et al.* Iterative capped assembly: rapid and scalable synthesis of repeat-module DNA such as TAL effectors from individual monomers. *Nucleic Acids Res.* **40**, e117 (2012).
429. Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. & Nakata, A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* **169**, 5429–5433 (1987).
430. Jansen, R., Embden, J. D. A. van, Gaastra, W. & Schouls, L. M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* **43**, 1565–1575 (2002).

431. Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A. & Ehrlich, S. D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiol. Read. Engl.* **151**, 2551–2561 (2005).
432. Duroux-Richard, I., Giovannangeli, C. & Apparailly, F. CRISPR-Cas9: A revolution in genome editing in rheumatic diseases. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* **84**, 1–4 (2017).
433. Barrangou, R. *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**, 1709–1712 (2007).
434. Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. & Almendros, C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiol. Read. Engl.* **155**, 733–740 (2009).
435. Niu, Y. *et al.* Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell* **156**, 836–843 (2014).
436. Mali, P. *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* **339**, 823–826 (2013).
437. Lee, P. C. *et al.* Restoring Ureagenesis in Hepatocytes by CRISPR/Cas9-mediated Genomic Addition to Arginase-deficient Induced Pluripotent Stem Cells. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **5**, e394 (2016).
438. Jinek, M. *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816–821 (2012).
439. Garneau, J. E. *et al.* The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* **468**, 67–71 (2010).
440. Porteus, M. H. Towards a new era in medicine: therapeutic genome editing. *Genome Biol.* **16**, 286 (2015).
441. Hsu, P. D., Lander, E. S. & Zhang, F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* **157**, 1262–1278 (2014).
442. Osborn, M. J., Belanto, J. J., Tolar, J. & Voytas, D. F. Gene editing and its application for hematological diseases. *Int. J. Hematol.* **104**, 18–28 (2016).
443. Rosen, L. E. *et al.* Homing endonuclease I-CreI derivatives with novel DNA target specificities. *Nucleic Acids Res.* **34**, 4791–4800 (2006).
444. Smith, J. *et al.* A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Res.* **34**, e149 (2006).
445. Ramirez, C. L. *et al.* Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nat. Methods* **5**, 374–375 (2008).
446. Cornu, T. I. *et al.* DNA-binding Specificity Is a Major Determinant of the Activity and Toxicity of Zinc-finger Nucleases. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **16**, 352–358 (2008).
447. Holkers, M. *et al.* Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells. *Nucleic Acids Res.* **41**, e63 (2013).
448. Kim, Y. *et al.* A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nat. Biotechnol.* **31**, 251–258 (2013).
449. Reyon, D. *et al.* FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat. Biotechnol.* **30**, 460–465 (2012).
450. Cong, L. *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**, 819–823 (2013).
451. Genovese, P. *et al.* Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells. *Nature* **510**, 235–240 (2014).
452. Gaj, T., Epstein, B. E. & Schaffer, D. V. Genome Engineering Using Adeno-associated Virus: Basic and Clinical Research Applications. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **24**, 458–464 (2016).
453. Li, H. *et al.* In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature* **475**, 217–221 (2011).
454. Friedland, A. E. *et al.* Characterization of Staphylococcus aureus Cas9: a smaller Cas9 for all-in-one adeno-associated virus delivery and paired nickase applications. *Genome Biol.* **16**, 257 (2015).
455. Pattanayak, V., Ramirez, C. L., Joung, J. K. & Liu, D. R. Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. *Nat. Methods* **8**, 765–770 (2011).

456. Mussolino, C. *et al.* A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Res.* **39**, 9283–9293 (2011).
457. Fu, Y. *et al.* High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat. Biotechnol.* **31**, 822–826 (2013).
458. Scalley-Kim, M., McConnell-Smith, A. & Stoddard, B. L. Coevolution of a homing endonuclease and its host target sequence. *J. Mol. Biol.* **372**, 1305–1319 (2007).
459. Szczepek, M. *et al.* Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* **25**, 786–793 (2007).
460. Bultmann, S. *et al.* Targeted transcriptional activation of silent oct4 pluripotency gene by combining designer TALEs and inhibition of epigenetic modifiers. *Nucleic Acids Res.* **40**, 5368–5377 (2012).
461. Mali, P. *et al.* CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat. Biotechnol.* **31**, 833–838 (2013).
462. Ran, F. A. *et al.* Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* **154**, 1380–1389 (2013).
463. Slaymaker, I. M. *et al.* Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science* **351**, 84–88 (2016).
464. Fu, Y., Sander, J. D., Reyon, D., Cascio, V. M. & Joung, J. K. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat. Biotechnol.* **32**, 279–284 (2014).
465. Grizot, S. *et al.* Efficient targeting of a SCID gene by an engineered single-chain homing endonuclease. *Nucleic Acids Res.* **37**, 5405–5419 (2009).
466. Chapdelaine, P., Pichavant, C., Rousseau, J., Pâques, F. & Tremblay, J. P. Meganucleases can restore the reading frame of a mutated dystrophin. *Gene Ther.* **17**, 846–858 (2010).
467. Anguela, X. M. *et al.* Robust ZFN-mediated genome editing in adult hemophilic mice. *Blood* **122**, 3283–3287 (2013).
468. Yusa, K. *et al.* Targeted gene correction of  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature* **478**, 391–394 (2011).
469. Weber, N. D. *et al.* AAV-mediated delivery of zinc finger nucleases targeting hepatitis B virus inhibits active replication. *PLoS One* **9**, e97579 (2014).
470. Ladner, S. K. *et al.* Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) in stably transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors of HBV replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 1715–1720 (1997).
471. Ding, Q. *et al.* A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell Stem Cell* **12**, 238–251 (2013).
472. Porro, F., Bockor, L., De Caneva, A., Bortolussi, G. & Muro, A. F. Generation of Ugt1-deficient murine liver cell lines using TALEN technology. *PLoS One* **9**, e104816 (2014).
473. Lu, J. *et al.* Knockout of the urate oxidase gene provides a stable mouse model of hyperuricemia associated with metabolic disorders. *Kidney Int.* (2017). doi:10.1016/j.kint.2017.04.031
474. Álvarez-Lario, B. & Macarrón-Vicente, J. Uric acid and evolution. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **49**, 2010–2015 (2010).
475. Swann, P. F. *et al.* Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. *Science* **273**, 1109–1111 (1996).
476. Liao, S., Tammaro, M. & Yan, H. Enriching CRISPR-Cas9 targeted cells by co-targeting the HPRT gene. *Nucleic Acids Res.* **43**, e134 (2015).
477. Sin, Y. Y., Price, P. R., Ballantyne, L. L. & Funk, C. D. Proof-of-Concept Gene Editing for the Murine Model of Inducible Arginase-1 Deficiency. *Sci. Rep.* **7**, 2585 (2017).
478. Liu, Y. *et al.* Lack of MTTP Activity in Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatocytes and Cardiomyocytes Abolishes apoB Secretion and Increases Cell Stress. *Cell Rep.* **19**, 1456–1466 (2017).
479. Price, A. A., Sampson, T. R., Ratner, H. K., Grakoui, A. & Weiss, D. S. Cas9-mediated targeting of viral RNA in eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 6164–6169 (2015).
480. Sampson, T. R., Saroj, S. D., Llewellyn, A. C., Tzeng, Y.-L. & Weiss, D. S. A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence. *Nature* **497**, 254–257 (2013).

481. Xue, W. *et al.* CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature* **514**, 380–384 (2014).
482. Yin, H. *et al.* Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat. Biotechnol.* **32**, 551–553 (2014).
483. Yin, H. *et al.* Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components in vivo. *Nat. Biotechnol.* **34**, 328–333 (2016).
484. Pankowicz, F. P. *et al.* Reprogramming metabolic pathways in vivo with CRISPR/Cas9 genome editing to treat hereditary tyrosinaemia. *Nat. Commun.* **7**, 12642 (2016).
485. Holme, E. & Lindstedt, S. Tyrosinaemia type I and NTBC (2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione). *J. Inherit. Metab. Dis.* **21**, 507–517 (1998).
486. Endo, F. *et al.* Complete rescue of lethal albino c14CoS mice by null mutation of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase and induction of apoptosis of hepatocytes in these mice by in vivo retrieval of the tyrosine catabolic pathway. *J. Biol. Chem.* **272**, 24426–24432 (1997).
487. Ding, Q. *et al.* Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. *Circ. Res.* **115**, 488–492 (2014).
488. Ran, F. A. *et al.* In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* **520**, 186–191 (2015).
489. Wang, X. *et al.* CRISPR-Cas9 Targeting of PCSK9 in Human Hepatocytes In Vivo-Brief Report. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **36**, 783–786 (2016).
490. Jarrett, K. E. *et al.* Somatic genome editing with CRISPR/Cas9 generates and corrects a metabolic disease. *Sci. Rep.* **7**, 44624 (2017).
491. Aguilar-Gallardo, C. *et al.* Derivation, characterization, differentiation, and registration of seven human embryonic stem cell lines (VAL-3, -4, -5, -6M, -7, -8, and -9) on human feeder. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **46**, 317–326 (2010).
492. Simpson, K. J. *et al.* The utilization of liver transplantation in the management of acute liver failure: comparison between acetaminophen and non-acetaminophen etiologies. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* **15**, 600–609 (2009).
493. Barton-Davis, E. R., Cordier, L., Shoturma, D. I., Leland, S. E. & Sweeney, H. L. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J. Clin. Invest.* **104**, 375–381 (1999).
494. Wilschanski, M. *et al.* Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *N. Engl. J. Med.* **349**, 1433–1441 (2003).
495. Kerem, E. *et al.* Ataluren for the treatment of nonsense-mutation cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Respir. Med.* **2**, 539–547 (2014).
496. Bidou, L., Allamand, V., Rousset, J.-P. & Namy, O. Sense from nonsense: therapies for premature stop codon diseases. *Trends Mol. Med.* **18**, 679–688 (2012).
497. Ramachandra, C. J. A. *et al.* Efficient recombinase-mediated cassette exchange at the AAVS1 locus in human embryonic stem cells using baculoviral vectors. *Nucleic Acids Res.* **39**, e107 (2011).
498. Ding, X. *et al.* Localization and cellular distribution of CPNE5 in embryonic mouse brain. *Brain Res.* **1224**, 20–28 (2008).
499. Twisk, J. *et al.* The role of the LDL receptor in apolipoprotein B secretion. *J. Clin. Invest.* **105**, 521–532 (2000).
500. Dubuc, G. *et al.* Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1454–1459 (2004).
501. Hatzivassiliou, E., Koukos, G., Ribeiro, A., Zannis, V. & Kardassis, D. Functional specificity of two hormone response elements present on the human apoA-II promoter that bind retinoid X receptor alpha/thyroid receptor beta heterodimers for retinoids and thyroids: synergistic interactions between thyroid receptor beta and upstream stimulatory factor 2a. *Biochem. J.* **376**, 423–431 (2003).
502. Latimer, J., Batty, J. A., Neely, R. D. G. & Kunadian, V. PCSK9 inhibitors in the prevention of cardiovascular disease. *J. Thromb. Thrombolysis* **42**, 405–419 (2016).

503. Chung, Y. *et al.* Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction. *Cell Stem Cell* **2**, 113–117 (2008).
504. Ilic, D. & Ogilvie, C. Concise Review: Human Embryonic Stem Cells-What Have We Done? What Are We Doing? Where Are We Going? *Stem Cells Dayt. Ohio* **35**, 17–25 (2017).
505. Canham, M. A. *et al.* The Molecular Karyotype of 25 Clinical-Grade Human Embryonic Stem Cell Lines. *Sci. Rep.* **5**, 17258 (2015).
506. Kawamura, T. *et al.* Cardiomyocytes Derived from MHC-Homozygous Induced Pluripotent Stem Cells Exhibit Reduced Allogeneic Immunogenicity in MHC-Matched Non-human Primates. *Stem Cell Rep.* **6**, 312–320 (2016).
507. Taylor, C. J., Peacock, S., Chaudhry, A. N., Bradley, J. A. & Bolton, E. M. Generating an iPSC bank for HLA-matched tissue transplantation based on known donor and recipient HLA types. *Cell Stem Cell* **11**, 147–152 (2012).
508. Wang, L. *et al.* Immunogenicity and functional evaluation of iPSC-derived organs for transplantation. *Cell Discov.* **1**, 15015 (2015).
509. Zhao, T. *et al.* Humanized Mice Reveal Differential Immunogenicity of Cells Derived from Autologous Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* **17**, 353–359 (2015).
510. Hussein, S. M. *et al.* Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* **471**, 58–62 (2011).
511. Gore, A. *et al.* Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* **471**, 63–67 (2011).
512. Ohi, Y. *et al.* Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPSCs. *Nat. Cell Biol.* **13**, 541–549 (2011).
513. Nishino, K. *et al.* DNA Methylation Dynamics in Human Induced Pluripotent Stem Cells over Time. *PLOS Genet.* **7**, e1002085 (2011).
514. Herring, A. *et al.* Generation of a TLE1 homozygous knockout human embryonic stem cell line using CRISPR-Cas9. *Stem Cell Res.* **17**, 430–432 (2016).
515. Kim, S.-J. *et al.* Generation of a Nrf2 homozygous knockout human embryonic stem cell line using CRISPR/Cas9. *Stem Cell Res.* **19**, 46–48 (2017).
516. Rouhani, F. *et al.* Genetic Background Drives Transcriptional Variation in Human Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS Genet.* **10**, (2014).
517. Turinetti, V., Orlando, L. & Giachino, C. Induced Pluripotent Stem Cells: Advances in the Quest for Genetic Stability during Reprogramming Process. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
518. Steichen, C. *et al.* Messenger RNA- versus retrovirus-based induced pluripotent stem cell reprogramming strategies: analysis of genomic integrity. *Stem Cells Transl. Med.* **3**, 686–691 (2014).
519. Lee, A. S., Tang, C., Rao, M. S., Weissman, I. L. & Wu, J. C. Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies. *Nat. Med.* **19**, 998–1004 (2013).
520. Lee, A. S. *et al.* Effects of cell number on teratoma formation by human embryonic stem cells. *Cell Cycle Georget. Tex* **8**, 2608–2612 (2009).
521. Ben-David, U., Nudel, N. & Benvenisty, N. Immunologic and chemical targeting of the tight-junction protein Claudin-6 eliminates tumorigenic human pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* **4**, 1992 (2013).
522. Choo, A. B. *et al.* Selection against undifferentiated human embryonic stem cells by a cytotoxic antibody recognizing podocalyxin-like protein-1. *Stem Cells Dayt. Ohio* **26**, 1454–1463 (2008).
523. Takahashi, K. Cellular reprogramming--lowering gravity on Waddington's epigenetic landscape. *J. Cell Sci.* **125**, 2553–2560 (2012).
524. Huang, P. *et al.* Direct reprogramming of human fibroblasts to functional and expandable hepatocytes. *Cell Stem Cell* **14**, 370–384 (2014).
525. Du, Y. *et al.* Human hepatocytes with drug metabolic function induced from fibroblasts by lineage reprogramming. *Cell Stem Cell* **14**, 394–403 (2014).
526. Simeonov, K. P. & Uppal, H. Direct reprogramming of human fibroblasts to hepatocyte-like cells by synthetic modified mRNAs. *PLoS One* **9**, e100134 (2014).
527. Song, G. *et al.* Direct Reprogramming of Hepatic Myofibroblasts into Hepatocytes In Vivo Attenuates Liver Fibrosis. *Cell Stem Cell* **18**, 797–808 (2016).

528. Rezvani, M. *et al.* In Vivo Hepatic Reprogramming of Myofibroblasts with AAV Vectors as a Therapeutic Strategy for Liver Fibrosis. *Cell Stem Cell* **18**, 809–816 (2016).
529. Zhu, S. *et al.* Mouse liver repopulation with hepatocytes generated from human fibroblasts. *Nature* **508**, 93–97 (2014).
530. Mahieu-Caputo, D. *et al.* In utero allotransplantation of fetal hepatocytes in primates. *Fetal Diagn. Ther.* **19**, 92–99 (2004).
531. Tolosa, L. *et al.* Human neonatal hepatocyte transplantation induces long-term rescue of unconjugated hyperbilirubinemia in the Gunn rat. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* **21**, 801–811 (2015).
532. Li, F. *et al.* Hepatoblast-like progenitor cells derived from embryonic stem cells can repopulate livers of mice. *Gastroenterology* **139**, 2158–2169.e8 (2010).
533. Takayama, K. *et al.* Long-term self-renewal of human ES/iPS-derived hepatoblast-like cells on human laminin 111-coated dishes. *Stem Cell Rep.* **1**, 322–335 (2013).
534. Billerbeck, E. *et al.* Humanized mice efficiently engrafted with fetal hepatoblasts and syngeneic immune cells develop human monocytes and NK cells. *J. Hepatol.* **65**, 334–343 (2016).
535. Watanabe, K. *et al.* CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the dihydroflavonol-4-reductase-B (DFR-B) locus in the Japanese morning glory Ipomoea (Pharbitis) nil. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
536. Rodríguez-Leal, D., Lemmon, Z. H., Man, J., Bartlett, M. E. & Lippman, Z. B. Engineering Quantitative Trait Variation for Crop Improvement by Genome Editing. *Cell* (2017). doi:10.1016/j.cell.2017.08.030
537. Hammond, A. *et al.* A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nat. Biotechnol.* **34**, 78–83 (2016).
538. Bengtsson, N. E. *et al.* Muscle-specific CRISPR/Cas9 dystrophin gene editing ameliorates pathophysiology in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
539. Liang, P. *et al.* CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell* **6**, 363–372 (2015).
540. Ma, H. *et al.* Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature* **548**, 413–419 (2017).
541. Zou, Q. *et al.* Generation of gene-target dogs using CRISPR/Cas9 system. *J. Mol. Cell Biol.* **7**, 580–583 (2015).
542. Mas Marques, A. *et al.* Low-density lipoprotein receptor variants are associated with spontaneous and treatment-induced recovery from hepatitis C virus infection. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **9**, 847–852 (2009).
543. Naga, M. *et al.* Low-density lipoprotein receptor genetic polymorphism in chronic hepatitis C virus Egyptian patients affects treatment response. *World J. Gastroenterol.* **21**, 11141–11151 (2015).

**Titre :** Hépatocytes différenciés à partir de cellules souches pluripotentes : un modèle d'études physiopathologiques et de thérapie génique et cellulaire – Application à l'hypercholestérolémie familiale de type IIA

**Mots clés :** Modélisation de maladies métaboliques hépatiques, métabolisme du cholestérol, édition du génome, virus de l'hépatite C

**Résumé :** La modélisation de maladies métaboliques hépatiques et les approches de thérapie cellulaire nécessitent de disposer d'une source fiable et illimitée d'hépatocytes. Grâce à leurs propriétés spécifiques, les cellules souches pluripotentes peuvent représenter une telle source. Nous avons tout d'abord mis au point une approche originale pour différencier une lignée de cellules souches embryonnaires humaines européenne, générée en conditions GMP-compatibles, en hépatocytes fonctionnels *in vitro* et *in vivo* après transplantation dans un modèle murin d'insuffisance hépatique aiguë. Nous avons ensuite utilisé les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) spécifiques d'un patient homozygote pour une mutation entraînant une absence de récepteur des lipoprotéines de basse densité (RLDL) afin de modéliser l'hypercholestérolémie familiale (HF) *in vitro*. Nous avons amélioré notre approche

pour différencier ces iPSC en hépatocytes plus matures et polarisés car les hépatocytes sont les seules cellules capables de dégrader le cholestérol via la bile. Nous avons montré que ce modèle reproduit la physiopathologie de l'HF et établit la preuve de concept de la correction génétique ciblée par la technologie CRISPR/Cas au locus *AAVSI* par la restauration de l'expression, inducible par les statines, et de la fonctionnalité du récepteur. Nous avons également mis en évidence que le RLDL ne semble pas impliqué dans l'entrée du virus de l'hépatite C (VHC) mais plutôt dans les étapes tardives de la morphogénèse virale. Ce modèle pourra désormais servir à l'étude physiopathologique de différents patients HF, au criblage de nouvelles drogues hypocholestérolémiantes et antivirales ainsi qu'à de nouvelles approches thérapeutiques.

**Title :** Hepatocytes differentiated from pluripotent stem cells: a model of physiopathological studies and gene/cell therapy – Application to type IIA familial hypercholesterolemia

**Keywords :** Metabolic liver diseases modeling, cholesterol metabolism, genome editing, hepatitis C virus

**Abstract :** Liver metabolic diseases modeling and cell therapy approaches require a reliable and well-characterized cell source. Due to their specific properties, pluripotent stem cells represent a credible alternative to primary human hepatocytes. Thus, we have defined a new approach to differentiate a European human embryonic stem cell line, generated in GMP-compatible conditions, into hepatocytes that are functional *in vitro* and *in vivo* after transplantation into a murine model of acute liver failure. We have then used induced pluripotent stem cells from a homozygous patient with a mutation leading to an absence of the low-density lipoproteins receptor (LDLR) to model familial hypercholesterolemia type IIA (FH) *in vitro*. As hepatocytes are the only cells able to metabolize cholesterol into bile acids,

we have improved our approach to differentiate these iPSC into hepatocytes displaying cell functional organization and polarization. We have shown that our model reproduced FH physiopathology and have also restored, by the genetic targeted correction at the *AAVSI* locus using CRISPR/Cas technology and subsequent hepatocyte differentiation, the LDLR expression – inducible by statins – and functionality. Moreover, we have demonstrated that the LDLR does not seem to be involved in hepatitis C virus entry or replication but rather in viral morphogenesis steps. This model will be useful to develop new cholesterol-lowering and antiviral drugs as well as new cell therapy options. Furthermore, it can be applied to similar studies for other liver metabolic disorders.

