



HAL
open science

Transfert de gènes dans les cellules souches pluripotentes induites : application à la thérapie génique de l'hyperoxalurie primitive de type 1

Julie Estève

► **To cite this version:**

Julie Estève. Transfert de gènes dans les cellules souches pluripotentes induites : application à la thérapie génique de l'hyperoxalurie primitive de type 1. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT : 2018BORD0280 . tel-02181157

HAL Id: tel-02181157

<https://theses.hal.science/tel-02181157v1>

Submitted on 12 Jul 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.

THESE

PRESENTEE POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX

Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité Génétique

Par Julie ESTEVE

Née le 25/04/1991 à L'Isle d'Espagnac (16)

Transfert de gènes dans les cellules souches
pluripotentes induites : application à la thérapie génique
de l'hyperoxalurie primitive de type 1

Sous la direction du Dr. Emmanuel RICHARD

Soutenue le 3 Décembre 2018 à Bordeaux

Membres du jury

Pr. Hubert DE VERNEUIL, PU-PH, Bordeaux	Président
Dr. Jean-Marc LEMAITRE, Directeur de Recherche, Montpellier	Rapporteur
Dr. Tuan Huy NGUYEN, Chargé de Recherche, Nantes	Rapporteur
Pr. Guylène PAGE, PU, Poitiers	Examinatrice
Dr. Jean-Marc BLOUIN, MCU-PH, Bordeaux	Examineur
Dr. Emmanuel RICHARD, MCU-PH, Bordeaux	Directeur de thèse

Titre :

Transfert de gènes dans les cellules souches pluripotentes induites : application à la thérapie génique de l'hyperoxalurie primitive de type 1

Résumé :

L'hyperoxalurie primitive de type 1 (ou HP1) est une maladie héréditaire du métabolisme liée à un déficit en enzyme hépatocytaire AGT (alanine:glyoxylate aminotransférase), codée par le gène *AGXT*. Ce déficit entraîne, chez les patients atteints d'HP1, une excrétion hépatique accrue d'oxalate ; celui-ci est ensuite éliminé dans les urines où il se complexe avec le calcium pour former des néphrolithiases oxalo-calciques massives, pouvant conduire à une insuffisance rénale chronique. Le seul traitement curatif disponible pour cette pathologie est la greffe allogénique combinée hépatorénale, actuellement limitée par la disponibilité des donneurs de greffons, une morbi-mortalité significative et la nécessité d'un traitement immunosuppresseur au long cours.

L'objectif du projet de recherche est de développer une thérapie génique de l'HP1 par greffe de cellules hépatiques autologues génétiquement corrigées. La faible disponibilité et la difficulté d'amplification *in vitro* des hépatocytes adultes nous a conduit à explorer la piste des cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) pour produire des cellules hépatiques humaines utilisables en médecine régénérative.

Nous avons dérivé et caractérisé des lignées de cellules iPSCs à partir de fibroblastes de patients atteints d'HP1, après expression transitoire des facteurs de reprogrammation par des vecteurs Sendai. Nous avons développé deux stratégies de thérapie génique additive par insertion d'un minigène codant une séquence optimisée de l'ADNc *AGXT* au moyen (1) d'un vecteur lentiviral à expression hépato-spécifique et (2) d'un processus de recombinaison homologue au locus *AAVS1* facilité par le système de clivage ciblé de l'ADN « CRISPR/Cas9 ». Enfin, nous avons mis en évidence l'expression de la cassette thérapeutique après différenciation hépatocytaire des iPSCs génétiquement corrigées. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives de médecine régénérative pour l'HP1 par transplantation de cellules hépatocytaires autologues génétiquement corrigées dérivées d'iPSCs de patients.

Mots clés : cellule souche pluripotente induite ; hyperoxalurie ; thérapie génique ; CRISPR/Cas9 ; vecteur lentiviral ; différenciation hépatique

Unité de recherche :

Inserm U1035 « Biothérapie des maladies génétiques inflammatoires et cancers »
146, rue Léo Saignat FR-33000 Bordeaux · Bât. TP zone sud, 4ème étage

Title:

Gene transfer in induced pluripotent stem cells for gene therapy
of primary hyperoxaluria type 1

Abstract:

Primary hyperoxaluria type 1 (or PH1) is an inherited metabolic disorder related to the deficiency of the hepatic AGT enzyme (alanine:glyoxylate aminotransferase), which is encoded by the *AGXT* gene. In PH1 patients, this deficiency leads to oxalate overexcretion by liver, followed by urine filtration and complexation with calcium to form massive calcium-oxalate nephrolithiasis potentially leading to chronic renal failure. The only available curative treatment is combined hepatorenal allogeneic engraftment, which is currently limited by the availability of transplant donors, significant morbidity and mortality, and the need for long-term immunosuppressive treatment.

The aim of our research project is to develop gene therapy for PH1, consisting in engraftment of genetically corrected autologous liver cells. Considering that adult hepatocytes are hardly available and expandable *in vitro*, we chose to explore the use of induced pluripotent stem cells (iPSCs) to produce human liver cells for application in regenerative medicine.

We derived and characterized iPSC lines from PH1 patient fibroblasts after transient expression of reprogramming factors delivered by Sendai virus vectors. We developed two additive gene therapy strategies by inserting a minigene encoding an optimized *AGXT* cDNA sequence using (1) a lentiviral vector designed for liver-specific expression and (2) homologous recombination process at the *AAVS1* locus favoured by the targeted DNA cutting system "CRISPR/Cas9". Finally, we highlighted therapeutic cassette expression after hepatic differentiation of genetically corrected iPSCs. These results pave the way for regenerative medicine for PH1 by transplantation of genetically modified autologous hepatocyte-like cells derived from patient-specific iPSCs.

Keywords: induced pluripotent stem cell ; hyperoxaluria ; gene therapy ; CRISPR/Cas9 ; lentiviral vector ; hepatic differentiation

Research unit:

Inserm U1035 « Biothérapie des maladies génétiques inflammatoires et cancers »
146, rue Léo Saignat FR-33000 Bordeaux · Bât. TP zone sud, 4ème étage

Remerciements

Je remercie Messieurs les Professeurs Alain TAIEB et Hubert DE VERNEUIL pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Hubert DE VERNEUIL pour me faire l'honneur de présider mon jury de thèse. Merci pour votre enthousiasme communicatif vis-à-vis des projets scientifiques, qu'ils soient expérimentaux ou qu'ils consistent en l'organisation de congrès !

Je remercie Messieurs les Docteurs Jean-Marc LEMAITRE et Tuan Huy NGUYEN pour avoir accepté de juger mon travail de thèse en qualité de rapporteurs.

Je remercie également Madame le Professeur Guylène PAGE pour avoir accepté de juger ce travail en qualité d'examinatrice. Une dernière étape d'évaluation (je l'espère !) après ma thèse d'exercice et mes examens de pharmacie ! Merci pour la bienveillance et le soutien dont vous avez fait preuve tout au long de mes études.

Je remercie mon directeur de thèse, Monsieur Emmanuel RICHARD, pour m'avoir donné la chance d'intégrer son équipe il y a maintenant 5 ans, au cours d'un tout premier stage qui a finalement évolué vers cette thèse. Merci pour la confiance considérable que tu m'as accordée tout au long de mon parcours, ainsi que pour ton ouverture d'esprit et ton soutien quant à mes envies de poursuite de carrière en-dehors des sentiers du monde académique.

Et merci à toi, Monsieur Jean-Marc BLOUIN, pour toute l'aide que tu m'as apportée pendant ces années, pour ta confiance et le temps que tu as accordé à toutes mes questions. Merci pour ta patience, pour toutes les heures passées à me supporter au P2, et pour toutes les situations de crise que tu as dû et su gérer ! Et merci pour ton sourire, pour tes vanes (même si tu sais combien elles ont pu me faire râler...) et tes répliques de la Cité de la Peur. En bref, merci pour tout, tu as été un super mentor.

Merci également à toi Mag, pour ta bonne humeur communicative qui m'a toujours aidée à retrouver le sourire, même quand mon état nécessitait l'emploi ultime du buzzer ! Merci pour ton écoute attentive, tes conseils et ta disponibilité. Et merci pour toutes tes petites attentions, tes sollicitations et ta fiabilité dans le relai des infos (parfois professionnelles) concernant le labo !!!

Merci à toute l'équipe de la vectoro', Véro, Alice, Jennifer et Quentin, pour m'avoir, au même titre que Jean-Marc, longtemps supportée au P2 ! Merci pour vos conseils, votre aide, vos sourires et toutes vos bêtises (Véro, je sais que c'était toi le Mycoplasme Masqué...) ! Et toi Quentin, j'espère que tu profites du calme du P2 à présent qu'il n'y a plus de chamaillerie dans ton dos pendant que tu travailles !

Merci aux Isa, pour tous vos conseils et vos rires que j'ai souvent entendus raisonner en manip' et depuis mon bureau, merci pour les MEFs, les Western Blots et l'aide en cytométrie ! Et merci pour le soutien en rando à celle qui se reconnaîtra !

Merci à François, Aurélie et Sandrine pour vos conseils, pour les moments passés en congrès et pour une épreuve de poteaux de Koh-Lanta que je n'oublierai pas !

Merci à Philippe pour toutes nos discussions au labo ou autour d'une bière, pour ton sourire et ton humour qui sont toujours les bienvenus !! Merci à Jérôme pour tes histoires désopilantes et le Charente(s) Power, et merci à Mumu et Cath, pour votre bonne humeur et vos conseils, pour ton rire inimitable Mumu, et pour ta tourte inimitable Cath ! Merci également à Valérie pour tes conseils, ta gentillesse et ton regard d'experte sur la sphère CRISPR !

Merci à mes partenaires de bureau Grégoire, Flo, Alex et Julian (que serait notre fauteuil sans toi ?), ainsi qu'à tous les autres étudiants Clément, Solène, Prisci, Pauline, Nesrine, Matthieu, Florence, Christina, Elo, Emma et j'en oublie, merci pour toutes les soirées, les conseils et les debriefings ; j'espère que la fête à Neuneu continuera longtemps, et n'oubliez pas qu'on est Champions du Monde !! Et une pensée spéciale pour Manon, qui a subi l'apprentissage de la culture stérile sous ma direction !

Thank you Pedrito, for shining my days at lab, and for the wonderful trip (and amazing pintxos) in Bilbao! Thank you for every funny language misunderstanding, for your Spanish cooking and your very personal French language outlook, summarized in three sentences: Oh là là... Qu'est-ce que c'est ? C'est la vie ! Please stay crazy, you're just perfect like that!

Merci aux filles du secrétariat et de la gestion, dont en premier lieu Katia et Isa, pour l'animation du bout du couloir dont j'ai pu profiter toutes ces années. Merci aussi pour votre disponibilité et votre réactivité dans les commandes, qui m'ont sortie de quelques situations délicates !

Merci à Francine et à Anthony pour vos sourires, vos attentions et une tarte à l'abricot légendaire, ainsi que pour la disponibilité du matériel de labo, que vous avez gentiment mis à ma disposition à un rythme parfois effréné ! Et merci à toute l'équipe de l'entretien du laboratoire en général, pour votre amabilité et la propreté des locaux.

En bref, un énorme MERCI (au moins aussi grand que votre bienveillance !) à toute l'équipe de l'U1035 pour votre accueil, vos sourires, votre bonne humeur, toutes les

sorties randos et apéros qui m'ont à deux reprises rappelée au labo pour avoir la chance de vivre ces aventures à vos côtés !

Merci à toute la bande de rigolos, j'ai nommés Kam, Mimi(Ile), Vincent, Thomas, P-E, Fanny, Diane, Gaspard, Chloé et Olivia pour tous nos moments partagés aux quatre coins de la France (mais surtout au PLB !), pour les soirées, les jeux, les déménagements, les (quelques) sorties sportives, les crémaillères, les premiers de l'an, et toutes nos discussions... Vous êtes là depuis longtemps, et avez répondu présents tout au long cette thèse, je vous en remercie. Maintenant, apéro !!!

Merci à Emma, Maud et Gaël, pour maintenir le lien depuis 4 ans, vous qui savez braver la grisaille parisienne pour venir profiter du soleil bordelais (quand il veut bien se montrer, hein, Emma ?) ! Et merci à Marie, Antoine et Ana, pour votre amitié sans faille malgré la distance.

Merci à mes copains d'asso, Pauline, Fabien, Julien², pour toutes les heures consacrées à organiser la JED et Pint of Science, pour tout le temps passé à râler aussi ! Ces projets parallèles étaient vraiment une bouffée d'air, et j'ai adoré les mettre en œuvre avec vous.

Merci à ma famille, pour votre soutien dans les périodes de joie comme dans les difficultés, tout au long de ces études interminables ! Merci pour tous les moments de décompression en Charente et en Bretagne, merci pour votre compréhension et votre adaptabilité, notamment lors de la rédaction de cette thèse. Finalement, ça y est, l'école est finie : timing parfait pour nous, bro', on passe à autre chose !

Et merci à toi Laurent, dernier membre (et non des moindres) de ma petite bande de rigolos. Merci d'être à mes côtés depuis 6 ans, toi qui as su m'épauler dans toutes mes transitions de parcours, et m'as apporté un soutien précieux dans la réalisation de ces étapes. De nouvelles perspectives s'ouvrent à présent à nous (on ne va pas se mentir : une maison, deux enfants et un chien !), et j'ai hâte de les aborder avec toi !

Sommaire

Figures et tableaux	13
Abréviations	17
INTRODUCTION	21
Chapitre 1 : Les hyperoxaluries primitives	23
I- Physiopathologie des hyperoxaluries primitives	25
II- L'hyperoxalurie primitive de type 2 (PH2 ; <i>Mendelian Inheritance in Man</i> ou MIM 260000).....	28
III- L'hyperoxalurie primitive de type 3 (PH3 ; MIM 613616).....	29
IV- L'hyperoxalurie primitive de type 1 (PH1 ; MIM 259900).....	30
A. Epidémiologie	30
B. Manifestations cliniques	30
C. Bases génétiques et moléculaires.....	31
D. Diagnostic.....	38
E. Traitements	42
i. Mesures conservatives.....	42
ii. Traitement urologique.....	44
iii. Dialyse	44
iv. Transplantation	45
a. Transplantation rénale.....	45
b. Transplantation hépatique	46
c. Protection du greffon rénal après transplantation.....	48
v. Thérapies alternatives.....	49
a. Thérapie cellulaire	50
1. Présentation, succès et limites de la thérapie cellulaire hépatocytaire	50
2. Application à la PH1	53
3. Sources alternatives de cellules	54
b. Thérapie génique.....	55
1. Stratégie d'administration des produits de thérapie génique.....	57
1.1. Mode d'administration des acides nucléiques.....	57
1.2. Vectorisation des acides nucléiques.....	58
1.2.1. Approches intégratives non ciblées	59

1.2.1.1. Vecteurs oncorétroviraux	60
1.2.1.2. Vecteurs lentiviraux	64
1.2.2. Approches non intégratives	66
1.2.2.1. Vecteurs adénoviraux	66
1.2.2.2. Vecteurs viraux associés aux adénovirus.....	68
2. Application de la thérapie génique au traitement de la PH1	70
2.1. Restauration de l'expression du gène <i>AGXT</i> par thérapie génique additive	70
2.2. Réduction du substrat par interférence à ARN.....	71
2.3. Inhibition de la lactate déshydrogénase hépatique par interférence à ARN	74
c. Thérapie enzymatique substitutive.....	76
d. Modulation du repliement protéique.....	77
e. Enzymes de dégradation de l'oxalate.....	79
Chapitre 2 : Développement d'une stratégie de médecine régénérative pour le traitement de l'hyperoxalurie primitive de type 1	83
I- Obtention et différenciation des cellules souches pluripotentes induites.....	85
A. Reprogrammation de cellules somatiques différenciées en cellules souches pluripotentes induites.....	85
i. Emergence du concept de reprogrammation des cellules somatiques.....	85
ii. Génération et culture des cellules souches pluripotentes induites humaines.....	87
a. Méthodes de reprogrammation des iPSCs	91
1. Les facteurs de reprogrammation	91
2. Les modes d'administration des facteurs de reprogrammation.....	94
2.1. Systèmes intégratifs.....	95
2.1.1. Approches virales.....	95
2.1.2. Approches non virales	96
2.2. Systèmes non intégratifs.....	96
2.2.1. Approches virales.....	96
2.2.2. Approches non virales	98
b. Culture des iPSCs.....	100
1. Culture des iPSCs en colonies.....	100
2. Culture unicellulaire	102
iii. Applications de la technologie iPSC	102
B. Différenciation des cellules souches pluripotentes induites en « hépatocytes-like ».....	103
i. Protocole de différenciation hépatocytaire.....	103
ii. Applications des hépatocytes-like dérivés des iPSCs humaines.....	106
a. Criblage pharmacologique	107

1. Etudes métaboliques et de toxicité.....	107
2. Etudes de l'efficacité des drogues.....	109
b. Aide à la compréhension des mécanismes physiopathologiques.....	109
c. Source renouvelable de cellules pour la médecine régénérative.....	110
1. Transplantation allogénique.....	110
2. Transplantation autologue.....	111
II- Approches de modification ciblée du génome cellulaire.....	113
A. Les mécanismes de réparation de l'ADN.....	113
B. Systèmes de clivage ciblé de l'ADN.....	115
C. Le système CRISPR/Cas9.....	116
i. Présentation de la technologie et de ses adaptations.....	116
a. Développement d'un ARN guide chimérique.....	118
b. Modification de l'activité de la Cas9.....	118
ii. Applications du système CRISPR/Cas9.....	120
a. Inactivation et délétion géniques.....	121
b. Intégration de séquences.....	123
1. Intégration ciblée de séquences additionnelles.....	123
2. Modifications ponctuelles de nucléotides.....	124
RESULTATS.....	127
Présentation générale.....	129
Résultats 1 (Article 1).....	133
Résultats 2 (Article 2).....	169
Résultats 3.....	191
I- Evaluation de l'efficacité de ciblage des ARN guides.....	191
II- Expériences de correction ponctuelle de la mutation c.731T>C.....	194
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	201
I- Génération des cellules souches pluripotentes induites.....	203
II- Modification du génome cellulaire.....	205
A. Optimisation et vérification de la spécificité du clivage médié par le système CRISPR/Cas9.....	206
B. Amélioration de l'efficacité du processus de recombinaison.....	206
III- Production d'hépatocytes-like fonctionnels.....	207
A. Modulation des voies de signalisation cellulaire.....	208
B. Culture des cellules en trois dimensions.....	208
C. Evaluation de la correction phénotypique des cellules thérapeutiques.....	211
IV- Greffe des hépatocytes-like chez les patients.....	211

A. Amélioration de l'efficacité de la prise de greffe	212
B. Optimisation du repeuplement du foie receveur	213
REFERENCES	215
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES ET FORMATIONS	241

Figures et tableaux

Figure 1. Métabolisme du glyoxylate dans les hépatocytes humains, indiquant les déficits enzymatiques responsables des trois types d'hyperoxalurie primitive connus (I, II et III).

Figure 2. Manifestations oxalo-calciques chez un patient souffrant de PH1.

Figure 3. Oxalose systémique dans la PH1.

Figure 4. Représentation schématique de la réaction catalysée par l'alanine:glyoxylate aminotransférase.

Figure 5. Structure chimique et cristallographique du PLP et des résidus avec lesquels il interagit.

Figure 6. Cartographie des substitutions pathologiques affectant l'enzyme AGT, découvertes chez des patients atteints de PH1.

Figure 7. Représentation schématique des effets moléculaires et cellulaires des principales substitutions d'acides aminés décrites au sein de l'AGT.

Figure 8. Algorithme décisionnel pour le diagnostic des hyperoxaluries primitives.

Figure 9. Analyse des cristaux oxalo-calciques.

Figure 10. Stratégies thérapeutiques alternatives pour l'hyperoxalurie primitive de type 1.

Figure 11. Structure des lobules hépatiques et circulation lobulaire.

Figure 12. Modalités d'administration des produits de thérapie génique.

Figure 13. Emploi des vecteurs dans les essais cliniques de thérapie génique.

Figure 14. Représentation schématique du génome oncorétroviral.

Figure 15. Représentation schématique d'un exemple de vecteur oncorétroviral et de ses modifications, permettant d'améliorer sa sécurité.

Figure 16. Représentation schématique du génome lentiviral et de sa vectorisation.

Figure 17. Différentes générations de vecteurs adaptés du génome de l'adénovirus.

Figure 18. Vectorisation des AAV.

Figure 19. Fonctionnement de la technologie des ARN interférents.

Figure 20. Cycle de Cori.

Figure 21. Représentation schématique des principales étapes du repliement de l'AGT, native ou mutée.

Figure 22. Principales étapes du métabolisme de l'oxalate vers le formate et le 3-phosphoglycérate chez *Oxalobacter formigenes*.

Figure 23. Modification du devenir des cellules au sein du paysage épigénétique de Waddington.

Figure 24. Stratégie de criblage des facteurs de reprogrammation candidats.

Figure 25. Caractérisation des iPSCs humaines.

Figure 26. Vectorisation du virus Sendai.

Figure 27. Graphique comparatif de l'efficacité et de la sécurité des méthodes d'administration des facteurs de reprogrammation actuellement disponibles.

Figure 28. Evolution de la culture des cellules souches pluripotentes induites.

Figure 29. Cellules souches pluripotentes induites dérivées de fibroblastes humains et cultivées selon une procédure unicellulaire.

Figure 30. Différenciation hépatocytaire des iPSCs.

Figure 31. Applications potentielles des hépatocytes-*like* dérivés de cellules souches pluripotentes induites.

Figure 32. Représentation schématique des mécanismes de réparation des cassures de l'ADN.

Figure 33. Fonctionnement du système CRISPR/Cas de type II de *Streptococcus pyogenes*.

Figure 34. Programmation de la Cas9 par un ARN guide chimérique.

Figure 35. Transformation des nucléases Cas9 en nickases, *via* la mutation D10A.

Figure 36. Approches de modification de l'expression génique par la technologie CRISPR/Cas9.

Figure 37. Schéma récapitulatif des projets menés pendant cette thèse.

Figure 38. Représentation schématique du fonctionnement du système rapporteur destiné à l'évaluation de l'efficacité de ciblage des ARN guides sur l'exon 7 du gène *AGXT*.

Figure 39. Représentation schématique de la structure du plasmide de transfert lentiviral p16 exprimant la cassette de fusion E7AGXTeGFP.

Figure 40. Analyse de la fluorescence des cellules HEK293T par cytométrie en flux.

Figure 41. Représentation schématique du fonctionnement du système rapporteur destiné à l'évaluation de l'efficacité de la recombinaison homologue au niveau de l'exon 7 du gène *AGXT*.

Figure 42. Représentation schématique de la structure des plasmides de transfert employés dans les expériences de correction ponctuelle.

Figure 43. Séquence E7AGXTSTOP représentée en parallèle des matrices polynucléotidiques simple brin de recombinaison homologue.

Figure 44. Analyse de la fluorescence des cellules HEK293T par cytométrie en flux.

Figure 45. Evolution des propriétés physiques des systèmes de culture d'iPSCs.

Figure 46. Evolution des systèmes de culture employés pour la différenciation hépatocytaire des iPSCs.

Figure 47. Génération d'organoïdes hépatiques fonctionnels à partir d'iPSCs humaines.

Tableau 1. Valeurs de référence des taux d'excrétion d'oxalate, de glycolate et de L-glycérate en fonction de l'âge des patients.

Tableau 2. Suggestion de procédures de transplantation chez les patients souffrant de PH1.

Tableau 3. Résumé des essais cliniques de thérapie cellulaire hépatocytaire réalisés dans le cadre du traitement d'anomalies congénitales du métabolisme et attestant d'un bénéfice clinique.

Tableau 4. Essais cliniques de thérapie génique réalisés à l'aide de vecteurs viraux dans le cadre du traitement de pathologies hépatiques monogéniques.

Tableau 5. Evaluation du potentiel d'induction de la reprogrammation chez différents facteurs.

Tableau 6. Séquences des ARN guides ciblant l'exon 7 du gène *AGXT*.

Abréviations

AAV : Adeno-Associated Virus
AAVS1 : AAV integration Site 1
Ad : Adenovirus
ADN (DNA) : Acide DésoxyriboNucléique (DesoxyriboNucleic Acid)
ADNc (cDNA) : ADN complémentaire (complementary DNA)
aFP : alpha-FoetoProtéine
AGO : Argonaute
AGT : Alanine:Glyoxylate Aminotransférase
AGT-Ma : haplotype majeur de l'AGT
AGT-Mi : haplotype mineur de l'AGT
AOA : acide aminooxyacétique
ARN (RNA) : Acide RiboNucléique (RiboNucleic Acid)
ARNi : ARN interférent
ARNm : ARN messenger
AspAT : Aspartate AminoTransférase
bFGF : basic Fibroblast Growth Factor
BMP4 : Bone Morphogenetic Protein 4
CHO-GO : cellules Ovariennes de Hamster Chinois surexprimant la Glycolate Oxydase
copGFP : copepodaGFP
CPP : Cell-Penetrating Peptide
CRISPR/Cas : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-associated system
crRNA : CRISPR RNA
CYP : CYtochrome P450
DAO : D-Aminoacide Oxydase
DFG : Débit de Filtration Glomérulaire
DsiRNA : Dicer-substrate small interfering RNA
EalbAAT : promoteur de l' α 1-AntiTrypsine associé aux séquences régulatrices de l'Enhancer de l'albumine humaine
EF1 α : Elongation Factor 1 α
Foxa2 : Forkhead box A2
GalNAc : N-acétylgalactosamine
eGFP : enhanced Green Fluorescent Protein
GO : Glycolate Oxydase
GRHPR : Glyoxylate Reductase-HydroxyPyruvate Reductase

HDAd : Helper-Dependant Adenovirus
HDR : Homology-Directed Repair
HEK : Human Embryonic Kidney
HGF : Hepatocyte Growth Factor
HLC : Hepatocyte-Like Cell
HNF4 α : Hepatocyte Nuclear Factor 4-alpha
HOGA : 4-Hydroxy-2-OxoGlutarate Aldolase
HP (PH) : Hyperoxalurie Primitive (Primary Hyperoxaluria)
Hsc70 : Heat shock cognate 70
Hsp60 : Heat shock protein 60
HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cell
HYPDH : HYdroxyProline DésHydrogénase
IDLV : Integrase-Defective Lentiviral Vector
iPSC : induced Pluripotent Stem Cell
ITR : Inverted Terminal Repeat
KLF4 (Kruppel-like factor 4)
LDH : Lactate DésHydrogénase
LDL : Low Density Lipoprotein
LTR : Long Terminal Repeat
LV : Lentivirus
MEF : fibroblaste embryonnaire murin
MIM : Mendelian Inheritance in Man
miRNA : micro RNA
MN : Meganuclease
MSC : Mesenchymal Stem Cell
NHEJ : Non-Homologous End-Joining
O. formigenes : *Oxalobacter formigenes*
Oct3/4 : Octamer-binding transcription factor 4
OSKM : Oct3/4, Sox2, KLF4 et c-Myc
PAM : Protospacer Adjacent Motif
PCR : Polymerase Chain Reaction
PGK : PhosphoGlycérate Kinase
PLP : Pyridoxal 5'-Phosphate
PTS1 : Peroxisomal Targeting Sequence type 1
PXR : nuclear Pregnane X Receptor
RNAi : RNA interference
RNase : RiboNucléase
SA : Splice Acceptor
scAAV : self-complementary AAV
SD : Splice Donor

SeV : Sendai Virus
shRNA : short hairpin RNA
siRNA : small interfering RNA
Sox2 : SRY [Sex determining Region of Y]-box 2)
Sox17 : SRY [Sex determining Region of Y]-box 17
TALEN : Transcription Activator-Like Effector Nuclease
TIM : Translocase of Inner Membrane
TNF α : Tumor Necrosis Factor α
TOM : Translocase of Outer Membrane
tracrRNA : transactivating CRISPR RNA
TTRp : TransThyRetin promoter
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VIH : Virus de l'Immunodéficiency Humaine
ZFN : Zinc Finger Nuclease
1P5CDH : Δ^1 -Pyrroline-5-Carboxylate DésHydrogénase

INTRODUCTION

Chapitre 1 :

Les hyperoxaluries primitives

Les hyperoxaluries primitives (ou *Primary Hyperoxalurias, PHs*) ont été décrites pour la première fois par Lepoutre en 1925¹. Elles constituent un groupe de pathologies héréditaires de transmission autosomique récessive impliquant un dysfonctionnement du métabolisme du glyoxylate et une surproduction d'oxalate par le foie²⁻⁴.

Les formes primitives endogènes d'hyperoxaluries sont à distinguer des formes secondaires, consécutives à une exposition (souvent alimentaire) à d'importantes quantités d'oxalate ou de ses précurseurs, ou à une augmentation pathologique de l'absorption de l'oxalate dans le tractus intestinal⁴. Ces formes secondaires, plus communes que les hyperoxaluries congénitales, présentent pour la plupart un tableau clinique moins sévère et un meilleur pronostic.

I- Physiopathologie des hyperoxaluries primitives

Le glyoxylate est un céto-acide à deux carbones très réactif, issu du métabolisme intermédiaire des acides aminés, dont les principaux précurseurs sont la glycine, l'hydroxyproline et le glycolate chez les êtres humains. Lorsque le glyoxylate se trouve en excès dans le cytosol, il est rapidement métabolisé par la lactate déshydrogénase (LDH) pour être converti en oxalate, un produit terminal du métabolisme chez les mammifères. L'oxalate est majoritairement éliminé dans les urines où il tend à précipiter avec le calcium pour former des cristaux, potentiellement responsables de dommages envers les tissus environnants⁵.

Dans les hépatocytes (cellules métaboliques du foie) humains, où la LDH est très abondante, différents mécanismes de détoxification du glyoxylate sont mis en œuvre afin de limiter la production d'oxalate (Figure 1). Au sein du cytosol, l'enzyme glyoxylate reductase-hydroxypyruvate reductase (GRHPR) entre en compétition de substrat avec la LDH et procède à la réduction du glyoxylate en glycolate, une molécule très soluble. Une réaction analogue se déroule dans la mitochondrie, suite au métabolisme de l'hydroxyproline dérivée de la dégradation du collagène matriciel⁶ : après transformation de l'hydroxy-2-oxoglutarate en pyruvate et glyoxylate par l'enzyme 4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase (HOGA), le glyoxylate mitochondrial est réduit en glycolate par la GRHPR. Enfin, l'abondance de l'enzyme alanine:glyoxylate aminotransférase (AGT) dans le peroxysome hépatocytaire offre à cet organe un rôle central dans la conversion finale du glyoxylate. Après transformation du glycolate en glyoxylate par l'enzyme glycolate oxydase (GO), l'AGT est capable de catalyser la conversion du glyoxylate et de l'alanine en pyruvate et glycine. L'AGT peut tolérer de grandes concentrations de glyoxylate sans subir d'inhibition de substrat⁷, ce qui érige le peroxysome en bouclier contre l'accumulation du glyoxylate et la production d'oxalate dans le cytoplasme environnant.

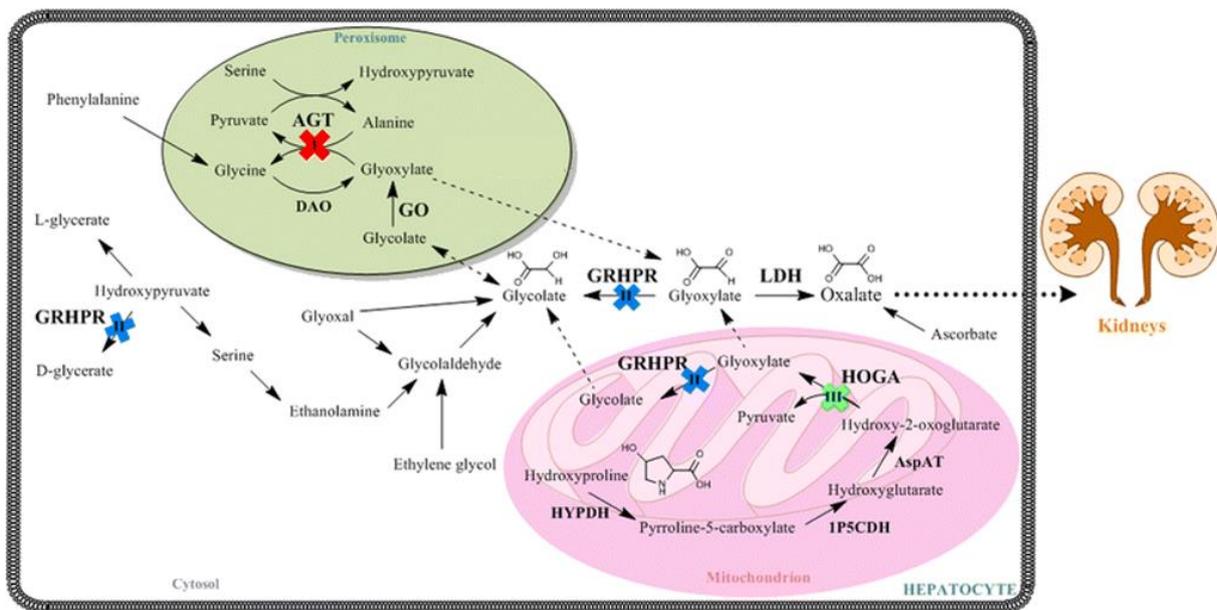


Figure 1. Métabolisme du glyoxylate dans les hépatocytes humains, indiquant les déficits enzymatiques responsables des trois types d'hyperoxalurie primitive connus (I, II et III) (d'après Martin-Higuera *et al.*, 2017)⁸. Les flèches en pointillés indiquent une diffusion des composés entre les différents compartiments cellulaires. La membrane du peroxysome est perméable au glycolate, au glyoxylate et à d'autres solutés hydrophiles de faible taille, principalement grâce à la présence de la protéine-canal PXMP2⁹. AGT, alanine:glyoxylate aminotransférase ; AspAT, aspartate aminotransférase ; DAO, D-aminoacide oxydase ; GO, glycolate oxydase ; GRHPR, glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase ; HOGA, 4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase 1 ; HYPDH, hydroxyproline déshydrogénase ; LDH, lactate déshydrogénase ; IP5CDH, Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase.

Les hyperoxaluries primitives surviennent dès lors que l'un des mécanismes de détoxification du glyoxylate est rompu, suite au déficit fonctionnel d'une enzyme clé : l'oxalate issu de la conversion du glyoxylate par la LDH s'accumule et, ne pouvant être métabolisé par les mammifères, il est éliminé dans les urines par filtration glomérulaire et sécrétion tubulaire⁵. L'oxalate en excès se complexe alors avec le calcium pour former des cristaux responsables d'une détérioration croissante du tissu rénal, se manifestant par des urolithiases (cristaux d'oxalate de calcium dans le tractus urinaire) et une néphrocalcinose (dépôt d'oxalate de calcium dans le parenchyme rénal) (Figure 2). Cette dernière induit une inflammation interstitielle et une fibrose qui entraînent une perte progressive de la fonction rénale, jusqu'à atteindre le stade de l'insuffisance rénale terminale dans les cas les plus sévères (débit de filtration glomérulaire ou DFG < 15 mL/min pour 1,73 m², contre 120 mL/min/1,73 m² chez les individus sains, où 1,73 m² est la surface corporelle standard d'un adulte). A ce stade, l'oxalate n'étant plus filtré, son accumulation dans l'organisme résulte en une oxalose systémique (dispersion de l'oxalate dans l'ensemble de l'organisme) qui conduit à des

complications osseuses, cardiaques, rétiniennes et cutanées pouvant aboutir au décès des patients¹⁰.

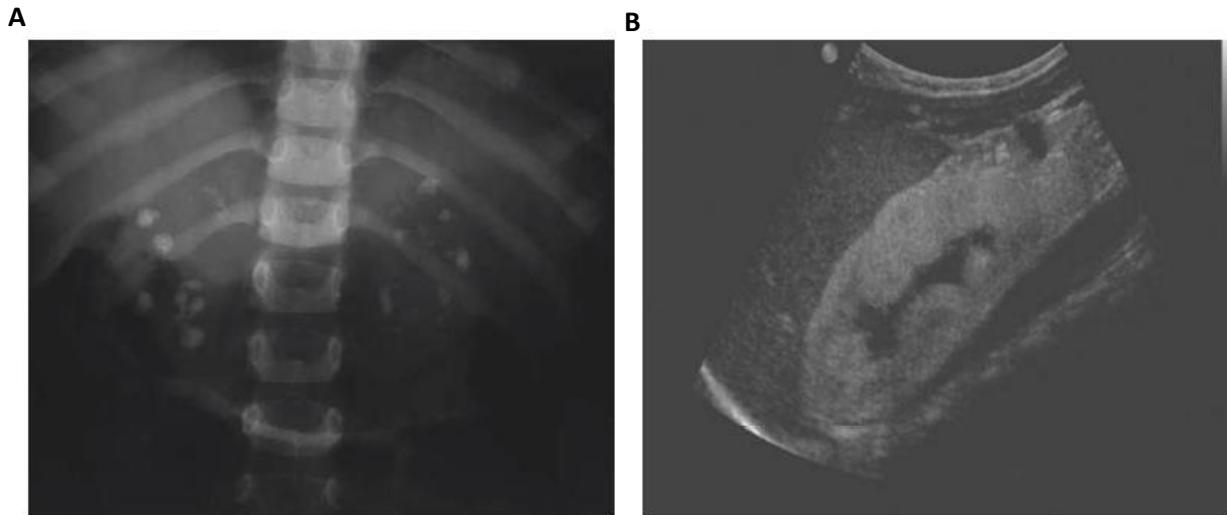


Figure 2. Manifestations oxalo-calciques chez un patient souffrant de PH1 (d'après Harambat *et al.*, 2011)¹¹. (A) Radiographie de l'abdomen indiquant la formation d'urolithiases. (B) Echographie rénale attestant de la présence d'une néphrocalcinose. L'aspect « blanc » du rein à l'échographie est caractéristique de ce phénomène.

A ce jour, trois formes génétiques d'hyperoxaluries primitives ont été identifiées, désignées par les types 1 (PH1), 2 (PH2) et 3 (PH3). Ces formes diffèrent par le type de déficit enzymatique responsable de leur survenue, correspondant respectivement à une perte de fonction de l'enzyme AGT, GRHPR et HOGA, mais également par la sévérité de leur tableau clinique et de leur pronostic. La PH2 et la PH3 seront rapidement évoquées, puis nous traiterons essentiellement de l'hyperoxalurie primitive de type 1, en réalisant dans certains cas opportuns un parallèle entre les différents types d'hyperoxalurie.

II- L'hyperoxalurie primitive de type 2 (PH2 ; *Mendelian Inheritance in Man* ou MIM 260000)

L'hyperoxalurie primitive de type 2, ou PH2, représente environ 10% des cas d'hyperoxalurie primitive. Elle est causée par un déficit en GRHPR, une protéine de 328 acides aminés qui forme des homodimères d'environ 73kD. La GRHPR présente une distribution ubiquitaire au sein des tissus, mais elle est en majorité exprimée dans le foie^{12,13}. Son gène de structure *GRHPR*, constitué de 9 exons, est situé au locus 9q12⁵. Actuellement, 28 mutations du gène *GRHPR* ont été recensées (dont la plupart correspond à de petites insertions ou délétions), résultant en une perte de l'expression ou de l'activité catalytique de la protéine GRHPR.

Chez les patients atteints de PH2, le déficit en GRHPR conduit à une augmentation de l'excrétion urinaire d'oxalate et de L-glycérate (issu de la conversion cytoplasmique de l'hydroxypyruvate, et dénué de conséquence pathologique)¹¹, cependant les taux d'oxalate urinaire mesurés sont moins élevés que ceux des patients souffrant de PH1, et la progression de la PH2 vers une insuffisance rénale terminale se produit seulement dans une minorité de cas (environ 20%)¹⁴.

III- L'hyperoxalurie primitive de type 3 (PH3 ; MIM 613616)

L'hyperoxalurie primitive de type PH3, ou PH3, représente environ 10% des cas d'hyperoxalurie primitive. Elle résulte d'un déficit en enzyme HOGA, une protéine composée de 327 acides aminés formant des dimères d'environ 72kD et des tétramères d'environ 144kD. Son gène de structure *HOGA1*, constitué de 7 exons, est situé au locus 10q24.2⁵. La découverte de l'implication du gène *HOGA1* en tant que cause d'hyperoxalurie primitive étant récente, la présence de mutations dans le gène *HOGA1* est investiguée dans toutes les formes d'hyperoxalurie « non-PH1/PH2 », et la PH3 pourrait ainsi présenter une prévalence plus importante que la PH2. Pour le moment, les analyses génétiques ont abouti à l'identification de 19 mutations différentes du gène *HOGA1*¹⁵.

Le mécanisme physiopathologique de la PH3 n'est pas encore déterminé avec certitude, mais plusieurs études réalisées *in vitro* indiquent que l'accumulation de 4-hydroxy-2-oxoglutarate liée au déficit de l'enzyme HOGA entraînerait une inhibition de l'activité de l'enzyme GRHPR et provoquerait ainsi une réduction de la conversion du glyoxylate en glycolate^{16,17}. L'élévation du taux d'oxalate urinaire est hétérogène chez les patients atteints de PH3, mais dans l'ensemble, l'évolution de la pathologie est plus progressive que dans les deux autres formes d'hyperoxalurie primitive (seul un cas d'évolution vers une insuffisance rénale terminale a été répertorié à ce jour)^{5,15}.

IV- L'hyperoxalurie primitive de type 1 (PH1 ; MIM 259900)

A. Epidémiologie

La prévalence réelle des hyperoxaluries primitives est inconnue. La prévalence de la PH1, qui représente environ 80% des cas de patients atteints d'hyperoxalurie primitive, est estimée entre 1 et 3 cas par million au sein de la population mondiale, et son taux d'incidence est approximativement de 1 cas pour 120 000 naissances vivantes par an en Europe^{18,19}. La PH1 représente 1 à 2% des cas d'insuffisance rénale terminale pédiatrique d'après les registres de l'Europe, des Etats-Unis et du Japon²⁰, mais cette prévalence est plus élevée dans les pays où le mariage consanguin est usuel (environ 10% dans certaines nations d'Afrique du Nord et du Moyen-Orient)²¹⁻²³. Une prévalence importante peut également être observée chez des populations historiquement isolées telles que celle des Iles Canaries, consécutivement à un effet fondateur de ces populations²⁴.

B. Manifestations cliniques

Bien que les altérations métaboliques à l'origine des hyperoxaluries primitives soient congénitales, l'âge auquel les symptômes se déclarent ainsi que leur sévérité peuvent varier considérablement d'un patient à l'autre, depuis une forme similaire à des calculs rénaux idiopathiques retrouvés chez l'adulte, jusqu'à une oxalose infantile sévère^{2,15,25}. Les premiers symptômes apparaissent typiquement au cours des 10 premières années de vie, les signes les plus communs correspondant à une hématurie, des douleurs abdominales, la production de calculs et des infections répétées du tractus urinaire^{4,25,26}.

Dans les formes infantiles les plus sévères, les patients présentent très tôt les symptômes d'une insuffisance rénale, qui correspondent typiquement à un retard de croissance, une anémie et une acidose. Dans les cas les plus modérés, à l'inverse, la PH1 est souvent identifiée tardivement, les symptômes se limitant à des calculs rénaux idiopathiques jusqu'à ce qu'une dégradation rénale importante (néphrocalcinose) apparaisse²⁷.

L'inflammation interstitielle progressive et la fibrose consécutives au dépôt de cristaux d'oxalate dans le parenchyme rénal, ainsi que les urolithiases et les infections récurrentes du tractus urinaire conduisent à terme à une insuffisance rénale terminale et à une oxalose systémique (Figure 3). Le squelette, qui présente une importante capacité de stockage d'oxalate (15 à 910 μmol par gramme de tissu osseux)²⁸, est particulièrement impacté, les patients souffrant d'intenses douleurs osseuses, de fractures spontanées et d'anémie résistante à l'érythropoïétine^{29,30}. Des dépôts d'oxalate de calcium peuvent également survenir au sein de la rétine, entraînant des

troubles de la vision. En outre, une calcification vasculaire est régulièrement observée, entraînant ischémie et gangrène distale, ainsi que des neuropathies, des anomalies de la conduction cardiaque et des nodules cutanés liés aux atteintes du système nerveux central, du myocarde et de la peau^{2,4,31,32}.

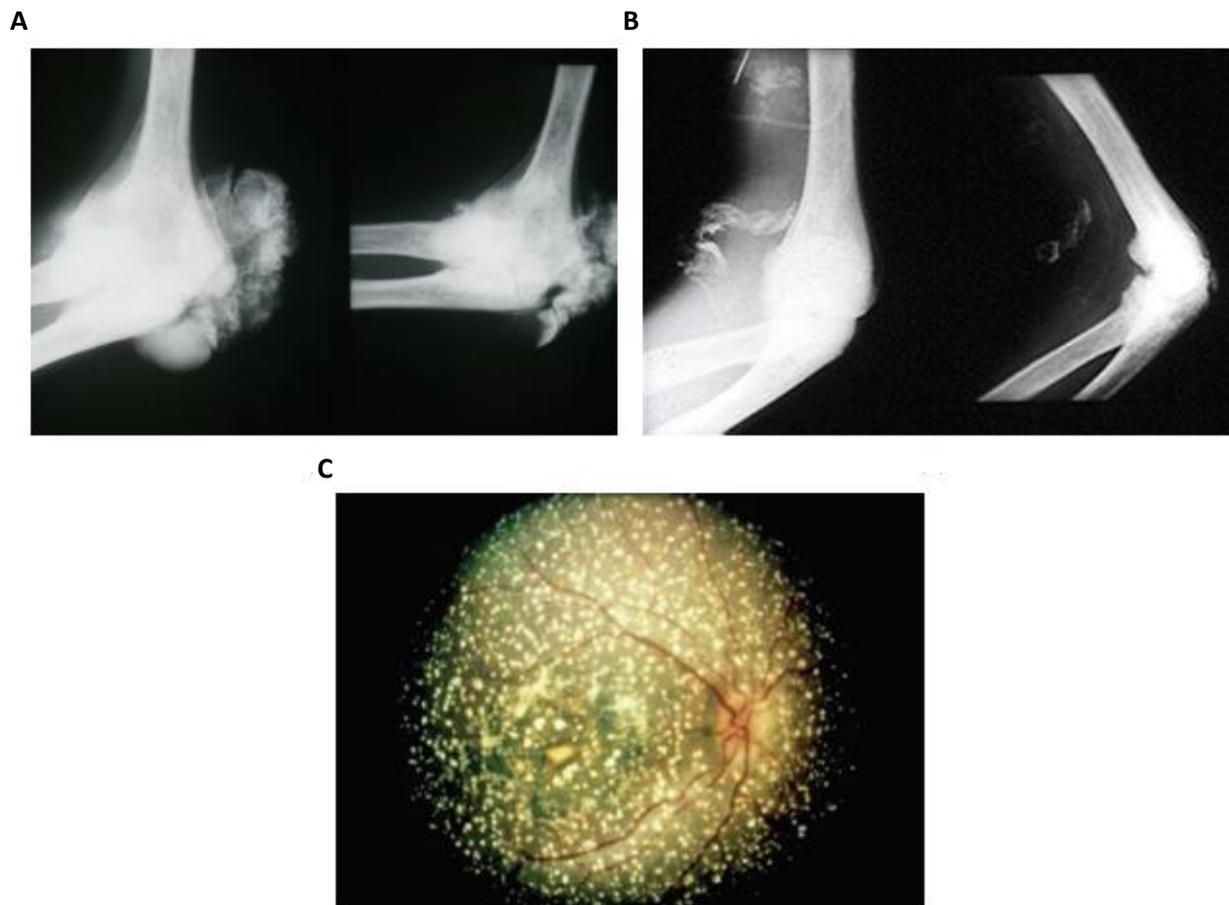


Figure 3. Oxalose systémique dans la PH1 (d'après Harambat *et al.*, 2011)¹¹. Dépôts radiodenses de cristaux d'oxalate de calcium dans les os et les articulations (A), les vaisseaux sanguins (B) et la rétine (C).

C. Bases génétiques et moléculaires

La PH1 résulte d'un déficit en AGT, une enzyme hépato-spécifique localisée dans le peroxyosome des hépatocytes humains^{33,34}, où elle catalyse une transamination entre la L-alanine et le glyoxylate pour produire du pyruvate et de la glycine (Figure 4) en présence de pyridoxal 5'-phosphate (PLP), son cofacteur⁷.

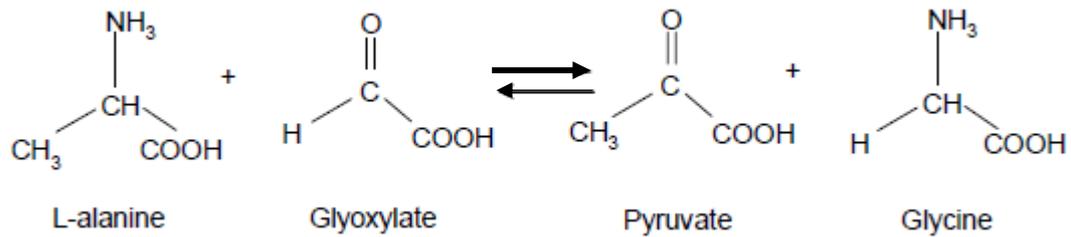


Figure 4. Représentation schématique de la réaction catalysée par l’alanine:glyoxylate aminotransférase (d’après Oppici *et al.*, 2015)³⁵. Bien que la réaction soit réversible, sa constante d’équilibre est égale à environ 9400 dans le sens direct qui correspond à la conversion du glyoxylate en glycine³⁶ ; elle peut donc être considérée comme totale dans ce sens.

L’AGT est une protéine composée de 392 acides aminés, de masse relative 43 kD ; elle appartient à la famille « *Fold Type I family of PLP-enzymes* » et fonctionne en homodimère, dont chaque sous-unité contient un site de liaison au PLP. Ce dernier exerce un rôle de groupement prosthétique nécessaire à l’activité catalytique de l’enzyme, ainsi qu’une fonction de chaperon moléculaire (molécules impliquées dans le repliement des protéines) en favorisant la dimérisation de l’AGT^{37,38}.

Chaque monomère protéique peut être subdivisé en un large domaine N-terminal (résidus 1 à 282) composé de l’interface de dimérisation et de la plus grande partie du site actif, associé à un domaine C-terminal plus court (résidus 283 à 392) qui contient la totalité des informations nécessaires au ciblage du peroxyosome, dont la séquence de ciblage PTS1 (*Peroxisomal Targeting Sequence type 1*)^{35,39,40}. Les 20 premiers résidus qui composent le domaine N-terminal d’un monomère forment un bras qui enveloppe la surface du domaine N-terminal de la sous-unité opposée⁴¹. Le PLP, quant à lui, est lié covalamment au résidu Lysine en position 209 de l’AGT en formant une base de Schiff (imine issue de la réaction entre les fonctions aldéhyde du PLP et amine primaire de la lysine), et est stabilisé par interaction avec des résidus des sites actifs appartenant aux deux sous-unités³⁶ (Figure 5).

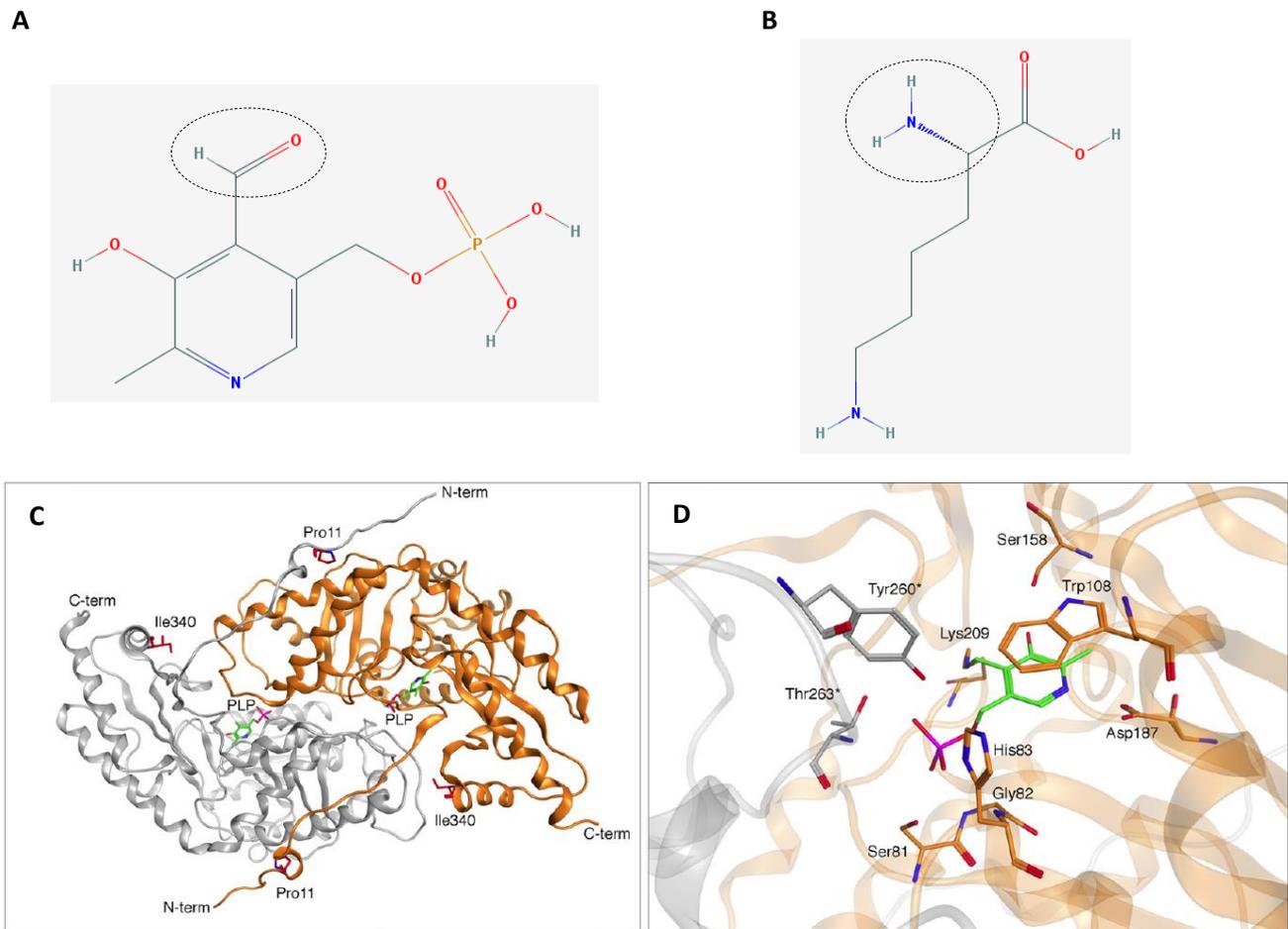


Figure 5. Structure chimique et cristallographique du PLP et des résidus avec lesquels il interagit (d'après Oppici *et al.*, 2015 ; Pubchem Lysine, consulté le 09.08.2018 et Pubchem Pyridoxal phosphate anhydrous, consulté le 09.08.2018)^{35,42,43}. (A) et (B), structures chimiques du PLP et de la lysine, respectivement. Les fonctions encerclées correspondent respectivement à un aldéhyde et à une amine primaire. (C) Diagramme de Ribbon représentant la structure d'un dimère de l'enzyme AGT ; chaque monomère est indiqué dans une couleur différente (gris et orange). Les résidus Pro11 and Ile340 (qui seront détaillés dans le paragraphe suivant) sont représentés par des bâtonnets rouges, tandis que les deux molécules de PLP sont colorées en vert. (D) Détail du site actif de l'AGT. Le PLP est représenté en vert. Les résidus interagissant directement avec le coenzyme et appartenant à une même sous-unité sont colorés en orange pour l'une, et en gris pour la seconde sous-unité. Les atomes d'azote, oxygène et phosphore sont indiqués en bleu, rouge et violet, respectivement.

Le gène *AGXT* codant pour l'AGT humaine est situé au locus 2q37.3 ; il comprend 11 exons s'étendant sur environ 10kb⁴⁴. Ce gène est polymorphe : deux haplotypes principaux ont été décrits au sein des populations humaines, appelés allèles « majeur » et « mineur ». L'allèle mineur diffère du majeur par une duplication de 74 pb dans l'intron 1, des répétitions en tandem dans l'intron 4, et par deux mutations dans la séquence codante, c.32C>T et c.1020A>G, générant les variants faux-sens p.Pro11Leu et p.Ile340Met, respectivement^{45,46} (Figure 6). L'haplotype mineur est présent chez environ 50% des patients souffrant de PH1, tandis que sa fréquence s'étend de 2% au

sein de la population japonaise à 20% chez la population caucasienne⁴⁶⁻⁴⁸. La protéine AGT codée par l'allèle mineur (AGT-Mi) se caractérise par une diminution significative (30 à 50%) de l'efficacité catalytique de la réaction de transamination qu'elle effectue par rapport à celle réalisée par la protéine codée par l'allèle majeur (AGT-Ma)^{49,50}, et elle présente également une stabilité thermodynamique et cinétique réduite⁵⁰⁻⁵². Au niveau cellulaire, environ 5% de l'AGT-Mi produite est dirigée vers la mitochondrie, car la substitution p.Pro11Leu génère une séquence d'adressage mitochondrial⁴⁵, qui reste cependant de faible efficacité.

La présence de l'haplotype mineur seul n'est associée à aucun phénotype pathologique. Cependant, les effets néfastes de cet haplotype sur la protéine AGT correspondante, et notamment ceux de la substitution Pro11Leu, ont une influence importante sur la pathogenèse de la PH1. En effet, un nombre important de mutants pathogènes de la protéine AGT, incluant les deux variants les plus communs p.Gly170Arg et p.Ile244Thr, induisent un phénotype morbide uniquement s'ils co-ségrègent avec l'allèle mineur (mutations situées en *cis*, sur le même allèle)^{25,49,53}. Les bases moléculaires de ce phénomène ne sont pas déterminées pour tous les variants de l'AGT, mais les données disponibles à ce jour indiquent que les effets des changements structuraux associés à la substitution p.Pro11Leu exacerbent souvent ceux des substitutions pathogènes. A titre d'exemple, il a été montré que l'activité catalytique du variant p.Ile244Thr de l'AGT équivaut à 50% de celle de l'AGT non mutée en présence du résidu Pro11, et qu'elle chute à moins de 5% lorsque le résidu Leu11 est exprimé, tandis qu'en parallèle sa propension à l'agrégation augmente⁴⁹. De même, les variants p.Gly41Arg, p.Phe152Ile et p.Arg233Cys présentent une résistance à la dégradation protéolytique significativement inférieure lorsqu'ils co-ségrègent avec l'allèle mineur^{54,55}.

Dans l'ensemble, plus de 150 mutations du gène AGXT ont été identifiées et associées à la PH1^{25,53} : outre les insertions et délétions, qui représentent environ 25% des mutations recensées, la vaste majorité correspond à des mutations ponctuelles, y compris faux-sens, non-sens et mutations des sites d'épissage. On compte notamment 79 mutations faux-sens conduisant à la substitution d'un seul acide aminé, réparties sur l'intégralité de la structure de la protéine et concernant pour la plupart des résidus hautement conservés, supposés cruciaux pour la structure et/ou la fonction de l'enzyme AGT (Figure 6).

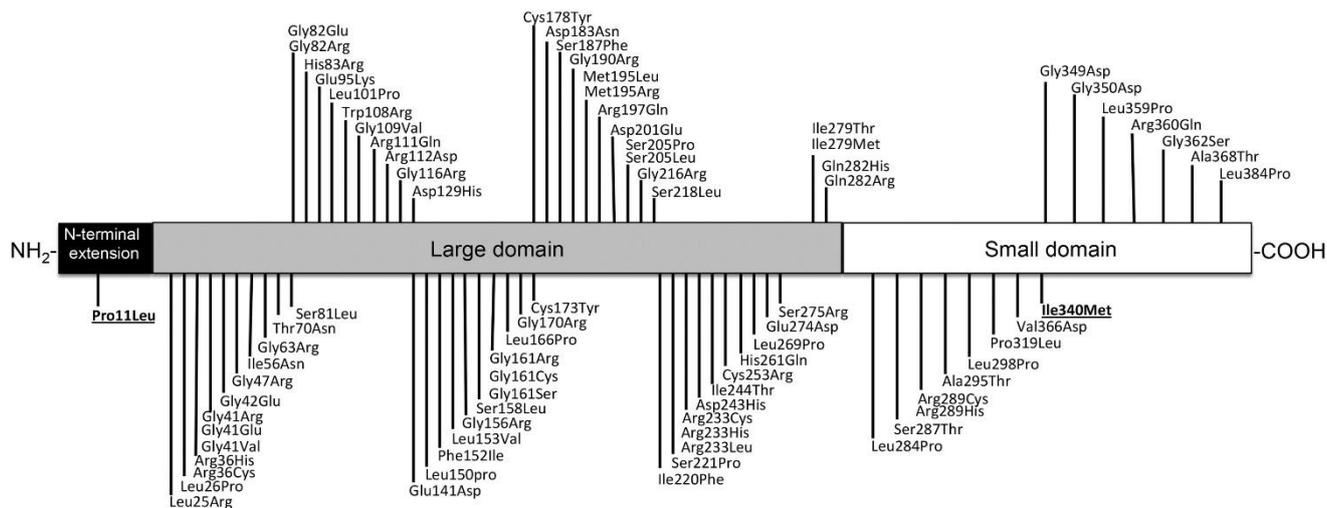


Figure 6. Cartographie des substitutions pathologiques affectant l'enzyme AGT, découvertes chez des patients atteints de PH1 (d'après Oppici *et al.*, 2015)³⁵. Les modifications des acides aminés indiquées sont disposées selon la répartition des résidus correspondants au sein des monomères de la protéine AGT. Les variants écrits en gras et soulignés correspondent aux substitutions caractéristiques de l'allèle mineur du gène *AGXT*.

Différentes études réalisées sur la pathogenèse moléculaire des mutations faux-sens ont révélé une importante variété d'effets mutationnels, au niveau moléculaire et cellulaire (dont certains ont été évoqués plus haut), ayant pour conséquence un déficit de l'AGT par modification de sa conformation et/ou de sa fonction^{35,36} (Figure 7).

Une réduction de l'activité catalytique de l'AGT (liée à une diminution de la vitesse de réaction et/ou à une diminution de l'affinité pour le substrat), ainsi qu'une altération de la liaison au cofacteur correspondent aux principaux effets fonctionnels observés chez les variants. Ils sont typiquement causés par des mutations survenant au sein de résidus interagissant directement avec le PLP ou localisés à proximité du site actif de l'AGT (tels que Ser81, Gly82, His83, Trp108, Phe152, Ser158, Asp183 et Ser218^{7,51,56-58}), bien qu'un changement conformationnel altérant le site actif puisse être généré suite à la mutation de résidus localisés loin de ce site tels que Ser187, Ile244 et Gly350, comme l'ont démontré des études cristallographiques et biochimiques⁵⁸⁻⁶⁰.

Néanmoins, dans la majorité des cas, les variants entraînant un changement de conformation de l'AGT s'accompagnent d'une altération mineure de son activité catalytique. Les effets de ces variants sont diverses ; ils peuvent par exemple causer une réduction de la stabilité protéique aux stresses thermique et chimique conduisant à une augmentation de la propension à l'agrégation, comme c'est le cas pour les variants p.Gly41Arg et p.Gly41Val⁶¹. Le repliement de la protéine peut également être perturbé, conduisant à une diminution de sa demi-vie (variant p.Ala112Asp⁵⁴) ou à une agrégation intracellulaire importante favorisée par des interactions avec des chaperons moléculaires de la famille Hsp60, Hsc70 et Hsp90 (variant

p.Ile244Thr^{59,62,63}). Une même mutation peut causer des effets multiples, comme c'est le cas pour les variants du résidu Gly161, qui présentent une expression sévèrement diminuée liée à une réduction de la demi-vie de la protéine associée et à une forte agrégation cytosolique⁶⁴. Enfin, un autre effet structural, sans commune mesure parmi les autres pathologies génétiques humaines, correspond à une erreur d'adressage de la protéine AGT qui est dirigée vers la mitochondrie où elle n'est pas fonctionnelle. Cet effet est dû à des mutations présentes obligatoirement en synergie avec l'allèle mineur, parmi lesquelles figurent les variants p.Gly170Arg, p.Ile244Thr, p.Phe152Ile et p.Gly41Arg^{62,65}. Ces variants, en perturbant le repliement de la protéine AGT, mettent en évidence la séquence d'adressage mitochondrial créée par la substitution Pro11Leu, ce qui facilite l'interaction de l'AGT avec le complexe TOM (*Translocase of Outer Membrane*) et ainsi l'adressage mitochondrial de la protéine mutée.

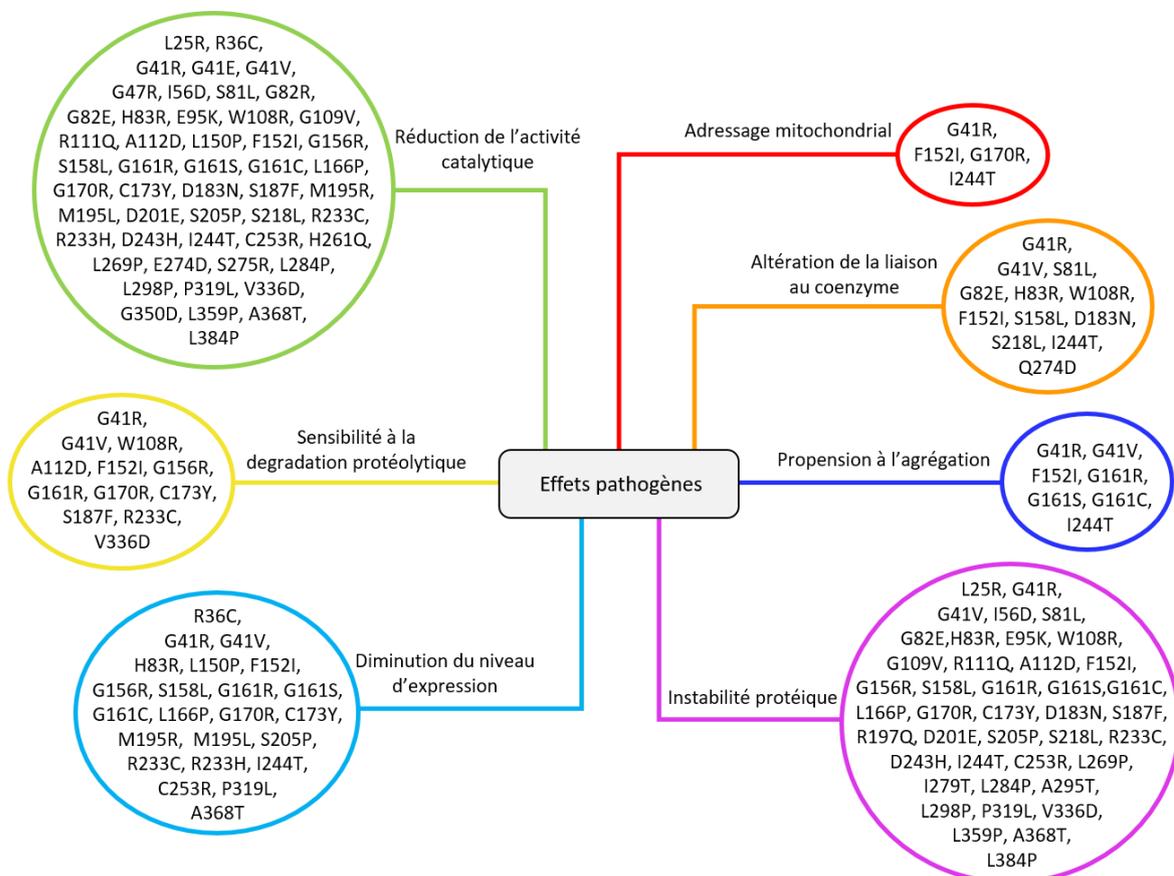


Figure 7. Représentation schématique des effets moléculaires et cellulaires des principales substitutions d'acides aminés décrites au sein de l'AGT (d'après Oppici *et al.*, 2015)³⁵.

Malgré les difficultés liées à la faible incidence de la PH1, pour laquelle le nombre de patients porteurs d'une même mutation est limité, il semble de plus en plus crucial à la communauté scientifique d'établir une corrélation entre le génotype et le phénotype des patients, dans l'objectif d'évaluer l'influence des mutations sur les symptômes et la gravité de la pathologie, et ainsi de mieux adapter le traitement et le

suivi des patients. Deux registres ont été créés en ce sens, dénommés « *International Registry for Primary Hyperoxaluria* » et « *European OxalEurope Consortium* » (à l'initiative des Etats-Unis et de l'Europe, respectivement), afin de répertorier l'ensemble des patients hyperoxaluriques et faciliter leur suivi ainsi que la création de cohortes pour la réalisation d'études cliniques et épidémiologiques^{25,66}.

Différentes études cliniques ont ainsi pu déterminer que le variant p.Gly170Arg était associé à un phénotype peu sévère de PH1, caractérisé par une excrétion urinaire d'oxalate peu élevée, une excellente réponse à la pyridoxine (voir paragraphe dédié) et une évolution vers l'insuffisance rénale terminale plus lente que la plupart des autres variants^{15,25,67,68}. Une issue favorable de la pathologie a également été constatée au sein de groupes de patients porteurs des variants p.Arg36Cys et p.Phe152Ile²⁵.

En revanche, pour de nombreux autres génotypes étudiés, les résultats ont montré que de telles corrélations sont difficiles à déterminer. Une étude publiée en 2004 a montré que des patients présentant un génotype homozygote pour la mutation non-sens c.33_34insC, qui résulte en une protéine AGT tronquée presque dénuée d'activité catalytique, pouvaient déclarer la pathologie très tôt dans l'enfance (avant leur 10^e année de vie), tandis que d'autres ne présentaient les premiers symptômes qu'à partir de 40 ans⁶⁹. Une observation similaire a été réalisée au sein d'une même fratrie, dont 5 membres porteurs de la mutation c.33_34insC à l'état homozygote ont déclaré une forme de PH1 infantile létale dans les premiers mois de vie, tandis que leur grand frère, âgé de 20 ans lors de l'étude et présentant le même génotype, était totalement asymptomatique⁷⁰. En outre, chez la population génétiquement isolée des Iles Canaries où plus de 90% des cas de PH1 sont dus à la mutation p.Ile244Thr, portée le plus souvent de façon homozygote, il n'existe pas de phénotype distinct apparent²⁴.

Bien que les causes exactes de telles variabilités phénotypiques ne soient pas encore identifiées, plusieurs facteurs génétiques et environnementaux sont mis en avant pour expliquer ces phénomènes. Tout d'abord, le glyoxylate apparaissant comme le précurseur primaire de l'oxalate, les différences cliniques observées pourraient résulter de l'activité d'autres enzymes utilisant le glyoxylate comme substrat, telles que la glyoxylate réductase et la glutamate:glyoxylate aminotransférase qui pourraient compenser l'absence de l'AGT. Le régime de chaque patient est également à considérer, en termes d'hydratation et d'ingestion d'aliments riches en oxalate ou ses précurseurs. Enfin, l'intervention de facteurs limitant la solubilité de l'oxalate de calcium, et de mécanismes de régulation du génome (épigénétique, modificateurs de gènes) ne sont pas à exclure⁷⁰.

D. Diagnostic

A cause de la rareté de la pathologie, les cliniciens ne rencontrent que peu de patients (voire aucun) atteints d'hyperoxalurie primitive au cours de leur exercice professionnel. A cela s'ajoute la présentation clinique hétérogène d'une atteinte du système urinaire peu caractéristique, le tout ayant pour conséquence une absence ou un retard de diagnostic de l'hyperoxalurie primitive, et une sous-estimation de l'incidence de ce type de pathologie. Pourtant, un diagnostic précoce de la PH1, nécessaire à la mise en place de solutions thérapeutiques adaptées, est crucial pour préserver la fonction rénale des patients. D'après les cliniciens, les hyperoxaluries primitives devraient être investiguées chez tous les patients présentant une néphrocalcinose et des calculs rénaux répétés, après avoir écarté les causes les plus fréquentes de ces manifestations. Elles devraient également être envisagées dans toutes les formes familiales de calculs et dommages rénaux de cause inconnue^{2,31,71}.

Un algorithme décisionnel a été publié par Edvardsson *et al.* en 2013⁷¹ pour guider le diagnostic des différentes formes d'hyperoxalurie primitive (Figure 8). Les analyses évoquées seront ensuite détaillées individuellement.

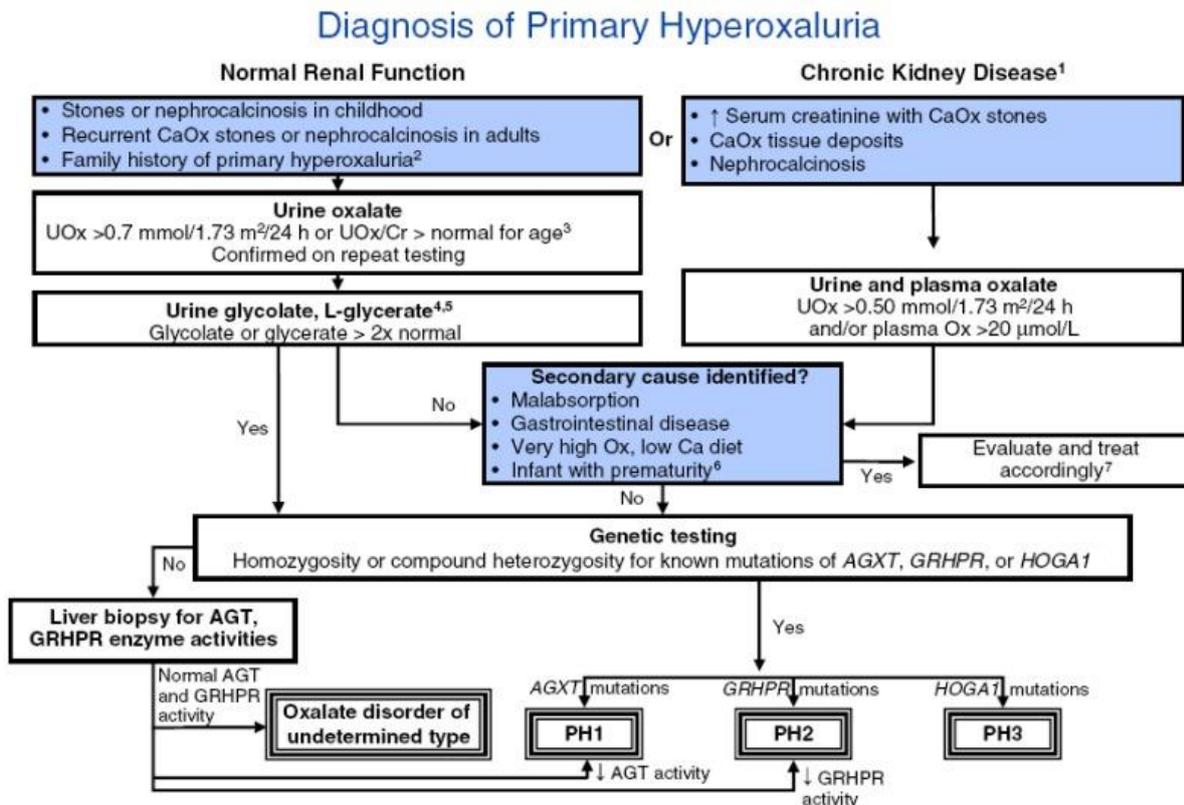


Figure 8. Algorithme décisionnel pour le diagnostic des hyperoxaluries primitives (d'après Edvardsson *et al.*, 2013)⁷¹.

1. La pathologie rénale chronique est définie par un DFG inférieur à 50mL/min/1,73m², ou une concentration sérique en créatinine supérieure ou égale au double de sa valeur normale pour un âge

déterminé.

2. Cet algorithme ne s'adresse pas au diagnostic prénatal.

3. Les valeurs des ratios urinaires oxalate/créatinine (UOx/Cr) varient avec l'âge. Les valeurs de référence doivent être consultées avant toute interprétation

4. Les mesures des taux d'oxalate urinaire et plasmatique, et de glycolate urinaire devraient être réalisées avant toute administration de pyridoxine ou autres suppléments vitaminiques.

5. Une augmentation du taux de glycolate et de L-glycérate urinaire est évocatrice, mais non diagnostique de la PH1 et de la PH2, respectivement.

6. Les ratios urinaires UOx/Cr sont plus élevés chez les nourrissons prématurés que chez ceux nés à terme, en particulier lorsque les prématurés reçoivent une nutrition parentérale contenant des acides aminés.

7. Lorsqu'un régime très riche en oxalate ou carencé en calcium est suspecté en tant que cause de l'hyperoxalurie, le régime devrait être corrigé avant de réaliser une nouvelle mesure du taux d'oxalate urinaire, pour vérification.

Abréviations : CaOx, calcium-oxalate ; UOx, taux d'oxalate urinaire ; UOx/Cr, ratio urinaire oxalate/créatinine.

Analyse de l'urine

Une élévation du taux d'excrétion urinaire d'oxalate $> 0,5 \text{ mmol}/1,73 \text{ m}^2/24\text{h}$, soit typiquement $> 45 \text{ mg}/24\text{h}$, est caractéristique des hyperoxaluries primitives^{5,10}. Chez les patients atteints de PH1, la surproduction d'oxalate par le foie est telle que des taux d'excrétion urinaire $> 1 \text{ mmol}/1,73 \text{ m}^2/24\text{h}$ sont atteints, tandis que des taux plus faibles sont retrouvés chez les patients souffrant de PH2 et PH3. Chez les enfants, où il est plus difficile de réaliser une collecte d'urine sur 24h, le calcul du ratio oxalate/créatinine peut être utile pour estimer l'excrétion d'oxalate sur des échantillons d'urine prélevés au hasard dans la journée. Une augmentation de l'excrétion urinaire du glycolate peut également être détectée chez environ 2/3 des patients atteints de PH1 ; la mesure d'un taux urinaire normal de glycolate ne constitue donc pas un critère d'exclusion du diagnostic de la PH1. Des valeurs de référence ont été établies pour les taux d'excrétion urinaire d'oxalate, de glycolate et de L-glycérate, en fonction de l'âge des individus (Tableau 1).

Units	Normal values		
	Oxalate	Glycolate	L-Glycerate
mmol/1.73 m ² per day	<0.5	<0.5	
μmol/l			<5
mmol/mol creatinine			
0–6 months	<325–360	<363–425	14–205
7–24 months	<132–174	<245–293	14–205
2–5 years	<98–101	<191–229	14–205
5–14 years	<70–82	<166–186	23–138
>16 years	<40	<99–125	<138

Tableau 1. Valeurs de référence des taux d'excrétion d'oxalate, de glycolate et de L-glycérate en fonction de l'âge des patients (d'après Harambat *et al.*, 2011)¹¹. Un taux urinaire de L-glycérate supérieur à la normale est indicatif de l'hyperoxalurie primitive de type 2.

Mesure de l'oxalate plasmatique

L'excrétion urinaire d'oxalate peut être faible chez les patients dont le DFG est diminué : l'oxalate non filtré est retenu dans les reins puis dispersé dans les autres organes. Dans ce cas, le diagnostic peut être renforcé par une mesure du taux d'oxalate plasmatique, dont une valeur > 50 μmol/L est très évocatrice de la PH1^{2,72}.

Analyse des cristaux

La cristallurie et la spectroscopie infrarouge présentent un intérêt majeur pour l'identification et l'analyse quantitative des cristaux et des calculs (whewellites de sous-type Ic) (Figure 9), qui sont presque exclusivement constitués d'oxalate de calcium monohydraté¹¹. Une échographie et une biopsie rénales peuvent également être indicatives, révélant la présence d'une néphrocalcinose et de granulomes macrophagiques entourant les dépôts d'oxalate de calcium⁷³. Dans les cas les plus sévères, la détection de granulomes osseux et de cristaux d'oxalate de calcium répartis dans la rétine peuvent permettre d'établir un diagnostic définitif.

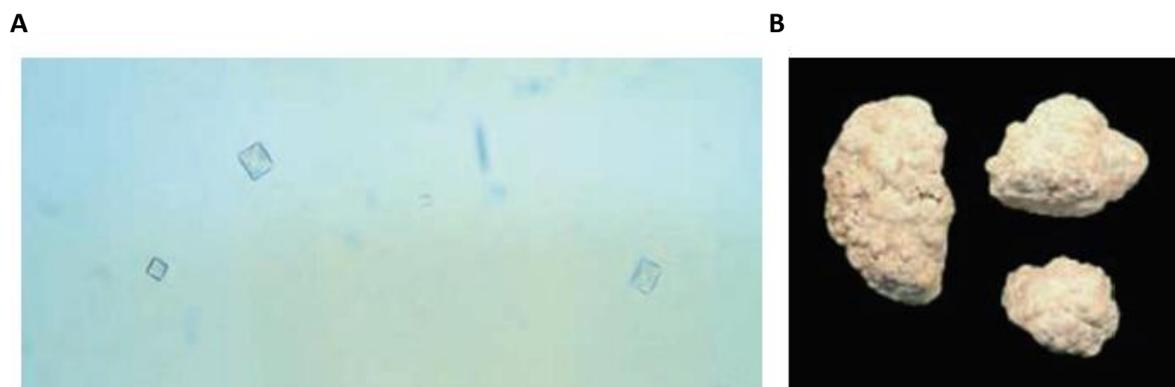


Figure 9. Analyse des cristaux oxalo-calciques (d'après Harambat *et al.*, 2011)¹¹. (A) Examen microscopique de l'urine montrant des cristaux d'oxalate de calcium monohydratés. (B) Le sous-type Ic de whewellite, de couleur claire, est caractéristique des hyperoxaluries primitives.

Mesure de l'activité enzymatique

La mesure de l'activité catalytique de l'AGT à partir d'un échantillon de biopsie hépatique a longtemps été considérée comme le diagnostic de référence de la PH1. Elle se caractérise en effet par une sensibilité >95%⁷⁴ bien que la détection de faux négatifs soit envisageable, notamment dans le cas de protéines AGT présentant une activité intrinsèque significative mais qui s'avèrent non fonctionnelles *in vivo* à cause d'un adressage erroné vers la mitochondrie⁴⁷. Une partie de la biopsie de foie peut alors être utilisée au cours d'analyses d'immunohistochimie, afin de vérifier la localisation subcellulaire de la protéine AGT.

Analyse génétique

Actuellement, une approche alternative moins invasive que la biopsie hépatique, consistant en un séquençage du génome des patients, est en développement constant et supplante la biopsie en tant que diagnostic de référence. Cette approche permet de détecter les éventuels polymorphismes et mutations des gènes responsables de la survenue des hyperoxaluries primitives (AGXT pour la PH1, GRHPR pour la PH2 et HOGA1 pour la PH3) chez les cas cliniques suspectés. Elle est également utilisée pour le diagnostic prénatal de ces pathologies, ainsi que chez les membres de la famille d'un patient diagnostiqué. Chez les patients pour lesquels cette analyse ne permet pas d'identifier la mutation causale (environ 11% des cas suspectés d'hyperoxalurie primitive, d'après une étude de 2015¹⁵), la mesure de l'activité enzymatique à partir d'une biopsie hépatique est requise pour poser le diagnostic définitif, en pouvant toutefois être complétée par un séquençage étendu du génome pour tenter d'identifier le variant génique morbide.

E. Traitements

i. Mesures conservatives

L'objectif de ces mesures est de diminuer l'excrétion et d'augmenter la solubilité urinaire de l'oxalate, afin de maintenir la concentration plasmatique et urinaire des complexes oxalo-calciques en-dessous du seuil de sursaturation ($30 \mu\text{mol/L}$) au-delà duquel les complexes précipitent. Les mesures conservatives doivent être initiées le plus tôt possible et maintenues tant que la fonction rénale persiste. Une fois le stade de l'insuffisance rénale terminale atteint, seule la supplémentation en pyridoxine doit être poursuivie, si le patient est répondeur¹¹.

Ces mesures s'appliquent à l'ensemble des hyperoxaluries primitives, avec pour seule exception la pyridoxine qui est spécifique à la PH1.

Hyperdiurèse

Les effets bénéfiques de l'hyperdiurèse sur la diminution de la formation de cristaux et calculs d'oxalate de calcium ont été prouvés par une étude épidémiologique prospective⁷⁵. La quantité d'eau recommandée est $> 2\text{L/m}^2$ par jour (jusqu'à 3L/m^2 par jour), répartie sur 24h. Chez les nourrissons et les jeunes enfants, l'utilisation d'une sonde gastrique peut être nécessaire pour y parvenir. Une attention particulière doit être donnée aux situations de pertes de fluide (diarrhée, vomissement, fièvre) ou d'alimentation orale limitée (chirurgie) ; la mise en place d'une hydratation par voie intraveineuse doit alors être envisagée pour maintenir un débit urinaire important.

Régime alimentaire

La restriction de l'ingestion d'oxalate présente un intérêt limité pour les patients, car sa principale origine est endogène. En outre, l'absorption intestinale de l'oxalate est plus faible chez les patients hyperoxaluriques que chez les sujets sains⁷⁶. Néanmoins, par précaution, certains experts recommandent d'éviter l'ingestion d'aliments riches en oxalate (tels que la betterave, les épinards, la rhubarbe et le cacao) ; de plus, une étude clinique pilote a récemment montré des effets bénéfiques de ce régime sur l'excrétion urinaire d'oxalate chez certains patients⁷⁷. L'ingestion de calcium doit quant à elle être maintenue à un taux normal : le calcium présente en effet la faculté de se complexer à l'oxalate dans l'intestin et de limiter son absorption, ce qui a été corroboré par des études indiquant qu'une restriction alimentaire en calcium résultait en une augmentation de l'absorption intestinale de l'oxalate^{78,79}. Des apports excessifs en vitamines C (précurseur de l'oxalate) et D (favorisant l'absorption du calcium dans l'intestin et pouvant provoquer une hypercalcémie et une hypercalciurie) doivent en revanche être évités.

Inhibition de la cristallisation

L'alcalinisation des urines avec du citrate de potassium ou de sodium permet de réduire leur saturation en complexes oxalo-calciques et ainsi la précipitation de ces derniers, par formation compétitive de complexes de citrate de calcium⁸⁰. La dose journalière de citrate de potassium ou de sodium recommandée est de 100 à 150mg/kg par jour. L'administration de thiazides (diurétiques), en combinaison avec le citrate de potassium, peut faciliter l'inhibition de la formation des cristaux en réduisant la calciurie par augmentation du volume urinaire⁸¹. Le magnésium peut également être utilisé pour inhiber la formation d'agrégats oxalo-calciques, grâce à son importante affinité de liaison pour l'oxalate ; de plus, le magnésium présente la faculté de diminuer l'absorption de l'oxalate lorsqu'il est administré au cours du repas⁸². La dose journalière de magnésium recommandée⁸³ correspond à 500 mg/m².

Supplémentation en pyridoxine

Le cofacteur de l'enzyme AGT est le pyridoxal 5'-phosphate, qui appartient à la catégorie des vitamines B6. Plusieurs études ont démontré que l'administration de chlorhydrate de pyridoxine, un précurseur du PLP, est associée à une diminution significative de l'excrétion urinaire d'oxalate chez 30 à 40% des patients⁸⁴⁻⁸⁶, bien que le mécanisme moléculaire sous-jacent ne soit pas totalement élucidé. L'administration de pyridoxine constitue à ce jour le seul traitement pharmacologique disponible pour les patients atteints de PH1³⁶. La positivité de la réponse à la pyridoxine est définie comme une diminution d'au moins 30% de l'excrétion urinaire d'oxalate après une période test minimale de 3 mois à la dose maximum supportée par le patient¹⁰ ; la dose de départ recommandée correspond à 5 mg/kg par jour et peut être augmentée jusqu'à 10 mg/kg par jour. Certains experts recommandent qu'une évaluation de la réponse à la pyridoxine soit réalisée chez tous les patients atteints de PH1, et que les répondeurs soient traités (y compris les femmes enceintes et ceux ayant recours à l'hémodialyse) jusqu'à ce qu'une greffe hépatique curative soit effectuée¹¹.

De nombreuses études de corrélation entre le génotype des patients et leur réponse à la pyridoxine ont été menées, afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de la molécule, et de prédire la réponse des patients diagnostiqués ultérieurement pour progresser vers une médecine personnalisée. Plusieurs d'entre elles ont montré que les patients porteurs des mutations p.Gly170Arg et p.Phe152Ile (chacune associée à l'allèle AGXT mineur) sont d'excellents répondeurs à la pyridoxine^{68,87,88}. De plus, dans le cas du variant p.Gly170Arg, il a été observé que la réponse des patients homozygotes était plus importante que celle des patients hétérozygotes pour la mutation, suggérant un possible effet de dosage génique⁸⁷. D'autres études, réalisées *in vitro* (modèle cellulaire CHO-GO, cellules ovariennes de hamster chinois surexprimant la glycolate oxydase) et *in silico* ont permis de confirmer les observations faites sur les variants p.Gly170Arg et p.Phe152Ile, et de mettre en

évidence la sensibilité à la pyridoxine d'autres variants de l'AGT (p.Arg36His, p.Gly42Glu, p.Ile56Asn, p.Gly63Arg –associés à l'allèle majeur- et p.Ile244Thr –associé à l'allèle mineur-), présentant une expression cellulaire et une activité catalytique supérieures, ainsi qu'un meilleur adressage vers le peroxysome en présence de la molécule^{36,89}. Ces résultats suggèrent que la pyridoxine exerce ses effets en revêtant les rôles de groupe prosthétique (en augmentant l'activité catalytique de l'AGT) et de chaperon chimique (en favorisant l'expression et l'adressage au peroxysome de la protéine), bien que ces observations doivent être démontrées au niveau mécanistique.

L'ensemble de ces mesures doit être accompagné d'un suivi de tolérance et d'efficacité, comprenant une évaluation de la formation des calculs et de la néphrocalcinose (par échographie et radiographie), des mesures régulières du pH et du volume urinaires ainsi que de la concentration urinaire en citrate et magnésium, et une évaluation de l'excrétion et de la saturation urinaires en oxalate¹¹. En résumé, un accompagnement important doit être mis en place dès que le diagnostic d'hyperoxalurie primitive est suspecté, pour entretenir une compliance optimale et ainsi favoriser le maintien de la fonction rénale⁹⁰.

ii. Traitement urologique

Il est recommandé d'éviter le recours à la chirurgie ouverte pour éliminer les lithiases oxalo-calciques, car elle entraîne des lésions rénales susceptibles d'altérer le DFG, et de lui préférer l'endoscopie endoluminale^{91,92}. L'utilisation de la lithotripsie extracorporelle, qui consiste à fragmenter les calculs par ondes de choc et ainsi à obtenir leur élimination par voies urinaires naturelles, peut être efficace chez certains patients, mais cette technique doit être utilisée avec précaution car elle peut entraîner des dommages sévères du parenchyme rénal en cas de choc dans une zone de néphrocalcinose⁹³.

iii. Dialyse

L'oxalate est une petite molécule (90 daltons) et peut donc être filtrée facilement, mais la quantité produite quotidiennement par le foie des patients atteints d'hyperoxalurie primitive (4 à 7 mmol/1,73 m²) est supérieure à la capacité d'extraction de la dialyse (1 à 4 mmol/1,73 m²), ce qui résulte en une accumulation de l'oxalate malgré la mise en place de cette procédure^{94,95}. La dialyse, sous forme péritonéale ou d'hémodialyse (utilisées seules ou en combinaison), ne constitue donc pas une thérapie de remplacement adéquate pour les patients ayant atteint le stade de l'insuffisance rénale terminale, mais elle peut être utilisée en préparation d'une greffe de foie et/ou de rein afin de réduire la charge corporelle en oxalate et éviter la

mobilisation et le dépôt de cristaux au sein des greffons, ainsi que pendant la période post-transplantation, en tant que relai de la fonction rénale avant que le transplant ait atteint son fonctionnement optimal⁹⁶. Enfin, la dialyse peut être envisagée chez les individus les plus âgés, pour qui la transplantation ne présente pas un ratio bénéfique/risque favorable, ou chez les patients n’ayant pas accès à la transplantation.

iv. Transplantation

Les procédures thérapeutiques précédemment décrites, bien qu’efficaces, se limitent à une action symptomatique. Un traitement définitif de la PH1 ne peut être réalisé qu’en rétablissant la voie métabolique de détoxification du glyoxylate. Dans la pratique courante, cette finalité est obtenue grâce à la transplantation hépatique, qui peut être associée à une transplantation rénale nécessaire à la restauration des fonctions des reins souvent endommagés par les dépôts oxalo-calciques.

Idéalement, la transplantation de foie et/ou de rein devrait être réalisée avant que le patient n’atteigne les stades de l’insuffisance rénale terminale et de l’oxalose systémique, afin d’assurer une efficacité optimale de la greffe.

Un rationnel pour la mise en place des procédures de transplantation est proposé dans le Tableau 2 ; l’ensemble de ces procédures sera détaillé dans les paragraphes suivants.

<i>Tx options</i>	<i>Simultaneous liver + kidney</i>	<i>Sequential liver–kidney</i>	<i>Isolated kidney</i>	<i>Isolated liver</i>
HD strategy	Peroperative ± postoperative according to POx and GFR	Standard HD following liver Tx aiming at POx < 20 µmol/L	Preoperative and peroperative	Sometimes peroperative
CKD Stage 3 (30 < GFR < 59)	No	No	No	Option in carefully selected patients
CKD Stage 4 (15 < GFR < 29)	Yes	Option	Option if B6 response but no evidence	No
CKD Stage 5 (GFR < 15)	Yes	Yes	Option if B6 response but no evidence	No
Infantile form (ESRD < 2 years)	Yes	Yes	No	No

Tableau 2. Suggestion de procédures de transplantation chez les patients souffrant de PH1 (d’après Cochat *et al.*, 2012)³¹. Abréviations : B6, vitamine B6 (pyridoxine) ; CKD, *chronic kidney disease* (insuffisance rénale chronique) ; ESRD, *end-stage renal disease* (insuffisance rénale terminale) ; GFR, *glomerular filtration rate* (débit de filtration glomérulaire) ; HD, hémodialyse ; POx, oxalate plasmatique ; Tx, transplantation.

a. Transplantation rénale

La transplantation rénale permet un drainage efficace de l’oxalate plasmatique⁹⁷. Cependant, puisque l’origine de la pathologie correspond à un défaut du métabolisme

hépatique, la surproduction d'oxalate et son dépôt consécutif dans les tissus se poursuivent avec la même intensité dans le cas d'une transplantation rénale isolée, ce qui conduit à un risque important d'endommagement du greffon et de rechute de la pathologie. De ce fait, la transplantation rénale isolée n'est plus recommandée chez les patients atteints de PH1, les rechutes fréquentes entraînant une faible survie du greffon et une mauvaise qualité de vie des patients⁹⁸. Une exception peut être envisagée chez les patients répondeurs à la pyridoxine, à condition que son administration soit maintenue après la greffe⁸⁸, mais les preuves cliniques de l'efficacité de cette combinaison sont encore rares. La greffe de rein isolée peut également être considérée comme une solution temporaire pour les patients issus de pays en voie de développement, avant de pouvoir conduire le patient vers un centre spécialisé en vue d'une greffe combinée hépatorénale.

Chez les patients atteints de PH2, la transplantation rénale isolée s'est montrée suffisante au contrôle de la pathologie chez de nombreux patients⁹⁸, ce qui s'explique notamment par la moindre sévérité des symptômes cliniques en comparaison de ceux de la PH1. Cependant, de récents cas d'échec de la transplantation rénale, caractérisés par une récurrence de cristaux oxalo-calciques urinaires et de néphrocalcinose^{13,99}, amènent à reconsidérer cette pratique, tandis qu'en parallèle la transplantation hépatorénale combinée semble bénéfique pour les patients atteints des phénotypes les plus sévères de PH2¹².

b. Transplantation hépatique

Transplantation hépatique isolée préventive

La transplantation hépatique isolée peut être envisagée chez des patients présentant un DFG > 30 mL/min/1,73 m², avant qu'une insuffisance rénale chronique ne se développe, si l'on estime que ce traitement suffira à suspendre le déclin de la fonction rénale. Une expérience menée à Hambourg chez 4 patients pédiatriques souffrant de PH1 (DFG situé entre 27 et 98 mL/min/1,73 m²) ayant reçu une transplantation hépatique préventive montre qu'après un suivi médian de 12 ans environ, 3 d'entre eux conservent une fonction rénale résiduelle significative¹⁰⁰. Un groupe britannique a également rapporté un maintien du DFG chez 2 enfants transplantés (DFG pré-transplantation égal à 81 mL/min/1,73 m² en moyenne), après un suivi de 5 ans¹⁰¹.

Si cette technique semble efficace, elle soulève cependant des controverses, notamment lorsqu'elle est pratiquée chez les patients présentant un DFG > 60 mL/min/1,73 m². Etant donnés les bons résultats obtenus avec les mesures conservatives et le développement de nouvelles solutions thérapeutiques, certains cliniciens estiment que la complexité et les risques encourus par la pratique d'une

transplantation hépatique isolée ne sont pas éthiquement justifiés, et ils préfèrent reporter la greffe jusqu'à ce qu'une transplantation hépatorénale soit requise^{11,31}.

Transplantation hépatorénale

L'efficacité de la greffe hépatorénale en tant que traitement curatif de la PH1 a été démontrée par de nombreuses études à travers le monde, justifiant son positionnement en traitement de première ligne. Une étude épidémiologique publiée en 2005 et menée sur une cohorte de 117 patients européens a notamment rapporté des résultats de survie des patients à 10 ans post-transplantation à hauteur de 69%¹⁰². Des résultats encore plus satisfaisants ont été mis en évidence lors d'une étude française publiée en 2014 et réalisée sur 54 patients, qui indique une survie à 10 ans des patients transplantés de 78%, et une survie du greffon rénal à 10 ans de 87% (contre 13% pour la greffe rénale seule)¹⁰³. Dans la pratique, il existe deux types de transplantation hépatorénale : combinée et séquentielle.

La transplantation combinée est une procédure au cours de laquelle les greffons hépatique (organe entier ou partiel) et rénal, provenant généralement d'un même donneur, sont transplantés simultanément lors d'une unique opération chirurgicale. Ce mode de transplantation est proposé à l'ensemble des patients dès lors que leur DFG est inférieur à 30 mL/min/1,73 m²³¹. Cette procédure présente l'avantage de limiter le pool antigénique apporté par un seul donneur, ce qui favorise le contrôle immunitaire de la greffe et limite le risque de rejet. Cependant, chez les patients présentant une charge corporelle oxalo-calcique élevée (PH1 infantile sévère ou patients ayant atteint le stade de l'insuffisance rénale terminale, en attente de greffe depuis longtemps), cette pratique n'est pas à privilégier : en effet, l'importante mobilisation d'oxalate issu du sang et des tissus qui suit l'opération peut surcharger le transplant rénal et provoquer une nouvelle accumulation de cristaux oxalo-calciques, mettant en péril le succès de la greffe^{104,105}. Chez ces patients, le meilleur choix thérapeutique est alors de procéder à une greffe hépatorénale séquentielle.

La transplantation séquentielle consiste en une transplantation hépatique isolée suivie par une phase de dialyse permettant de réduire la charge corporelle en oxalate, avant de procéder à une greffe rénale¹¹. La transplantation d'un organe unique est moins complexe que celle d'organes multiples, ce qui limite les complications post-opératoires, mais en contrepartie, l'utilisation d'organes issus de deux donneurs différents (situation la plus fréquente) expose le patient à un risque plus important de rejet de greffe que le recours à un donneur unique.

Quel que soit le type de procédure évoqué, la plupart des publications traitant de cas de patients hyperoxaluriques transplantés rapporte l'utilisation d'organes prélevés sur des corps cadavériques. Cependant, des études de plus en plus nombreuses attestent d'excellents résultats obtenus après transplantation de foie et/ou

de rein issus de donneurs vivants^{104,106}. Il est néanmoins important de noter que la pertinence du recours à un parent hétérozygote pour un variant morbide du gène *AGXT* en tant que donneur n'est pas déterminée¹⁰⁷. Bien que typiquement caractérisés par une excrétion urinaire normale d'oxalate et une absence de dépôts oxalo-calciques, les individus hétérozygotes peuvent présenter une activité enzymatique de l'AGT réduite, dont les conséquences sur un receveur sensibilisé ne sont pas documentées.

c. Protection du greffon rénal après transplantation

Lorsqu'une procédure de transplantation implique un greffon rénal (seul ou en association avec un transplant hépatique), il est indispensable de protéger le greffon contre une surcharge en oxalate pendant la période post-opératoire. Le recours à une hyperdiurèse associée à l'utilisation d'inhibiteurs de cristallisation correspond à l'approche la plus importante³¹. Un suivi régulier de la concentration plasmatique en oxalate, de la cristallurie et de la saturation urinaire en oxalate de calcium doit également être mis en place. Le bénéfice d'une hémodialyse quotidienne post-transplantation est quant à lui débattu, et certains experts recommandent de le limiter aux patients présentant une oxalose systémique importante. En effet, l'hémodialyse entraîne une diminution rapide de la concentration en oxalate plasmatique, ce qui réduit l'exposition oxalique du greffon, mais elle peut également provoquer une sursaturation urinaire des complexes oxalo-calciques par réduction du volume de l'urine¹¹. Néanmoins, l'hémodialyse doit obligatoirement être mise en place chez les patients présentant une nécrose tubulaire aiguë ou un retard dans la prise de fonction de leur greffon rénal.

Nous avons vu que les procédures de transplantation s'accompagnent d'une réelle efficacité thérapeutique chez les patients souffrant de PH1. Cependant, ces pratiques sont limitées par (i) une faible disponibilité de greffons présentant une compatibilité tissulaire avec le receveur (déterminée par le système ABO), (ii) des complications post-opératoires significatives pouvant conduire à l'échec de la greffe et nuire à la qualité de vie du patient (voire entraîner son décès), et (iii) la nécessité d'un traitement immunosuppresseur au long cours, qui n'est toutefois pas garant d'une absence de rejet du greffon conduisant à la perte du bénéfice thérapeutique de la procédure, et qui peut être lui-même source de complications morbides.

Dans l'objectif de s'affranchir de ces limitations, de nouvelles thérapies cellulaires et moléculaires alternatives se sont développées au cours de ces dernières années, basées sur les connaissances des mécanismes physiopathologiques de la PH1. Elles seront détaillées dans le chapitre suivant.

v. Thérapies alternatives

Avant de s'intéresser aux différentes solutions thérapeutiques en développement, il faut considérer que les hyperoxaluries primitives constituent un défi important à cause de la particularité de leur mécanisme physiopathologique. Bien que les gènes *AGXT*, *GRHPR* et *HOGA1* correspondent typiquement à des gènes de structure d'enzyme dont les mutations résultent en une perte de fonction de la protéine correspondante, les hyperoxaluries primitives sont consécutives à une augmentation de la production d'oxalate par le foie, plutôt que le résultat de la diminution de la synthèse d'un produit cellulaire donné. Ces pathologies constituent donc un exemple d'erreur innée du métabolisme où chaque cellule impliquée dans le processus pathologique doit être considérée comme autonome, ce qui signifie que la correction du mécanisme morbide doit être effective au sein d'un grand nombre d'hépatocytes. La quantité exacte de cellules à corriger n'a pas encore été déterminée chez l'être humain, mais elle a été estimée entre 40% et 80% chez un modèle murin de PH1 (décrit plus loin)^{108,109}. Les thérapies alternatives proposées doivent donc idéalement cibler les hépatocytes avec une grande efficacité pour espérer restaurer un phénotype métabolique sain à l'échelle de l'organisme.

L'ensemble des solutions thérapeutiques évoquées dans cette partie est résumé dans la figure 10. La plupart de ces thérapies ne se situe encore qu'au stade de développement *in vitro* ou *in vivo* au sein de modèles animaux, mais certaines d'entre elles commencent en revanche à faire preuve d'une efficacité satisfaisante en clinique.

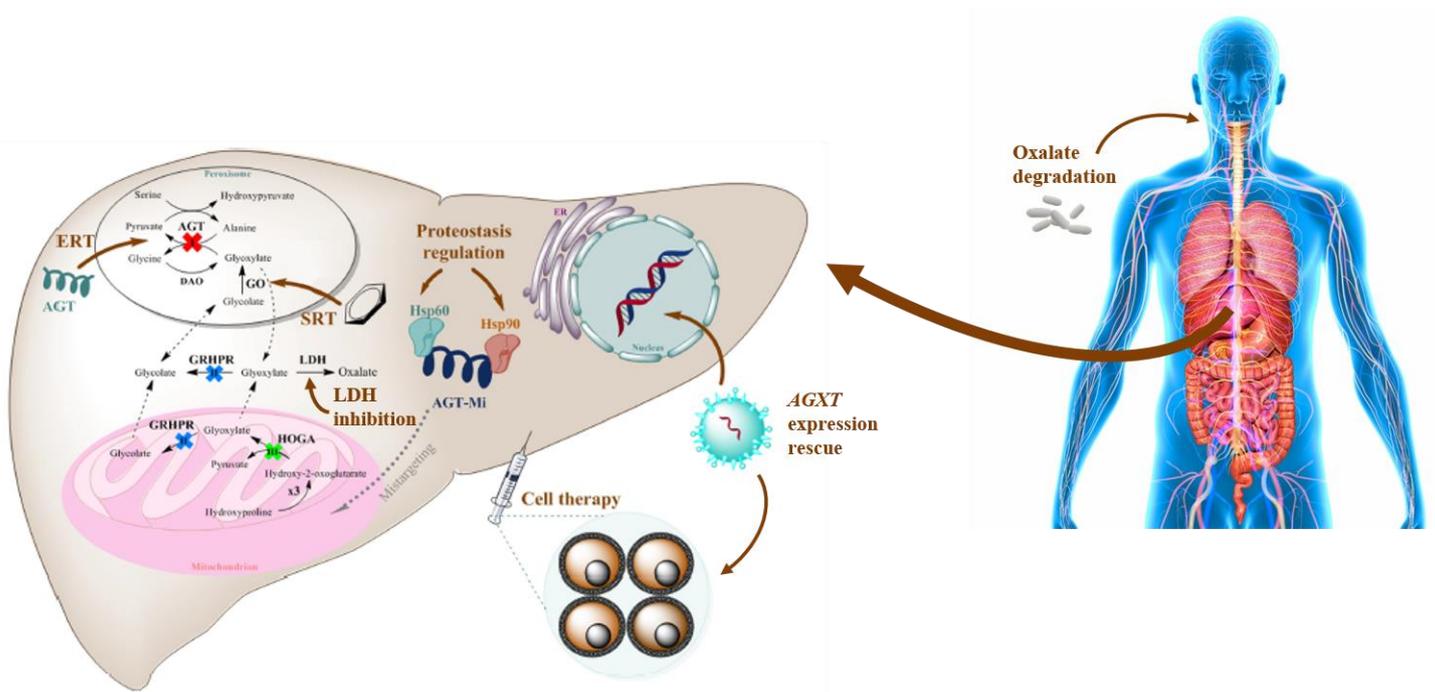


Figure 10. Stratégies thérapeutiques alternatives pour l'hyperoxalurie primitive de type 1 (d'après Martin-Higueras *et al.*, 2017 et Borrel and Maslo, 2015)^{8,110}. Ces différentes thérapies ciblent des acteurs situés en amont et en aval de la synthèse d'oxalate, à l'échelle moléculaire ou cellulaire, et peuvent donc être utilisées en complémentarité. Abréviations : AGT, alanine:glyoxylate aminotransférase ; AGT-Mi, haplotype mineur de l'AGT ; AspAT, aspartate aminotransférase ; DAO, D-aminoacide oxydase ; ER, endoplasmic reticulum ; ERT, *enzyme replacement therapy* ou thérapie enzymatique substitutive ; GO, glycolate oxydase ; GRHPR, glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase ; HOGA, 4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase 1 ; Hsp, *heat shock protein* ou protéine de choc thermique ; HYPDH, hydroxyproline déshydrogénase ; LDH, lactate déshydrogénase ; SRT, *substrate reduction therapy* ou thérapie par réduction du substrat ; 1P5CDH, Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase.

a. Thérapie cellulaire

1. Présentation, succès et limites de la thérapie cellulaire hépatocytaire

La thérapie cellulaire consiste en une greffe de cellules destinée à restaurer la fonction d'un tissu ou d'un organe. Elle constitue l'un des fondements de la médecine régénérative, qui inclut également l'ingénierie tissulaire, les dispositifs médicaux et les organes artificiels dans l'objectif de remplacer ou réparer les tissus endommagés.

Bien que restant dépendante de la disponibilité d'un donneur compatible et de la mise en œuvre d'un traitement immunosuppresseur, la thérapie cellulaire représente une alternative intéressante à la greffe d'organes, car elle est moins invasive, moins coûteuse et moins complexe à mettre en œuvre. La plupart des protocoles et produits de thérapie cellulaire actuellement sur le marché et en développement considère l'utilisation de cellules souches (cutanées pour reconstituer l'épiderme des grands brûlés, hématopoïétiques pour traiter les hémopathies

malignes, ou limbiques pour reconstituer une cornée lésée, à titre d'exemple)¹¹¹, mais cette approche peut également concerner l'utilisation de cellules somatiques différenciées. Dans le cadre des pathologies hépatiques, les cellules utilisées correspondent dans la majorité des cas aux hépatocytes, qui peuvent être assimilés aux unités fonctionnelles minimales du foie (Figure 11). Ces cellules sont injectées par voie intraportale (veine porte), intra-artérielle (artères hépatiques) ou intrasplénique pour leur permettre d'atteindre les sinusoides hépatiques et de s'implanter au sein du parenchyme du foie. Elles peuvent également être administrées de façon extra-hépatique, par voie intrapéritonéale.

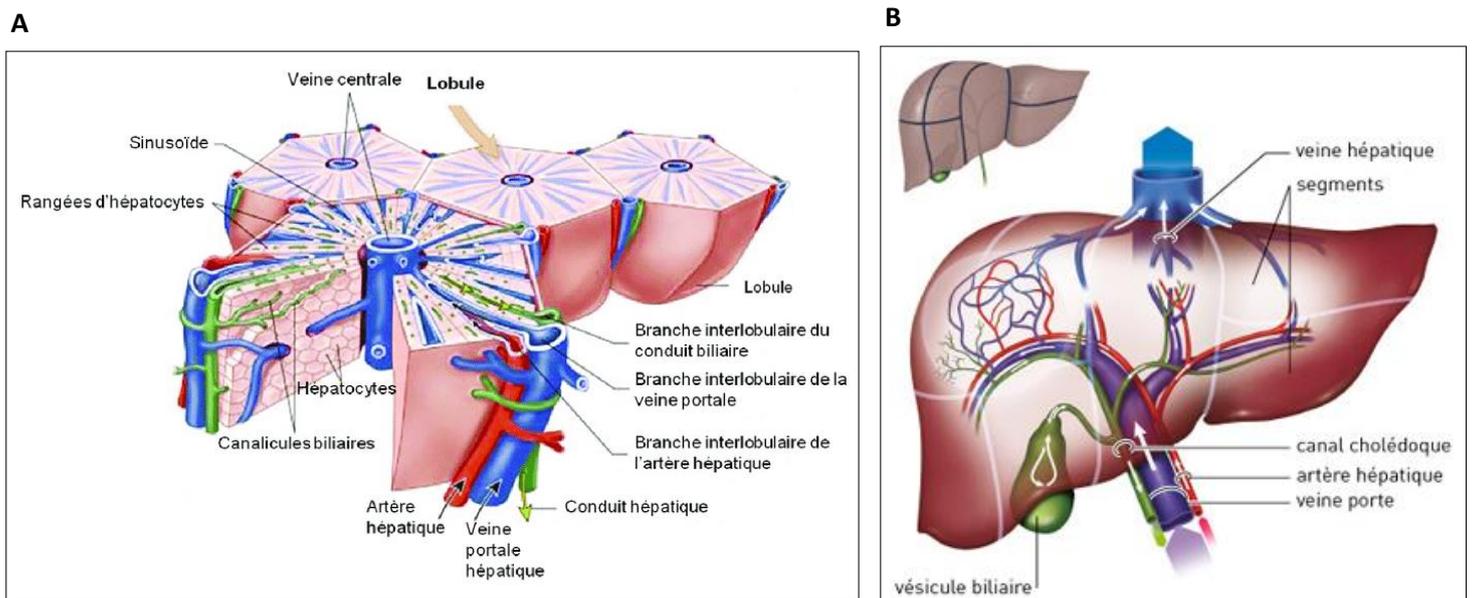


Figure 11. Structure des lobules hépatiques et circulation lobulaire (d'après *Development of a new microfluidic platform in order to study intestinal and hepatic first pass effects*, consulté le 08.09.2018 et *Anatomie du foie - Cancer du foie*, consulté le 08.09.2018)^{112,113}. (A) Le sang véhiculé par l'artère (provenant du cœur) et la veine porte (provenant de l'œsophage, de l'estomac et des intestins) hépatiques circule entre les travées d'hépatocytes *via* les sinusoides en direction des veines hépatiques centrales. En parallèle, les cellules hépatiques produisent de la bile qui est dirigée vers les conduits biliaires hépatiques par l'intermédiaire des canalicules biliaires. (B) Après avoir irrigué l'ensemble des cellules du foie, le sang est évacué par les veines hépatiques qui convergent vers la veine cave inférieure, cette dernière étant reliée directement au cœur.

La transplantation d'hépatocytes primaires a été envisagée en tant que traitement de nombreuses affections du métabolisme hépatique chez l'Homme (Tableau 3).

Disease	Cells	Age at infusion	Dose	Outcome	Reference
Crigler-Najjar Disease	Cadaveric donor	10 yrs	Single infusion of 7.5×10^9 hepatocytes	Decrease in serum bilirubin; enzyme activity in liver biopsy	Fox et al. (1998)
	Cadaveric donors	9 yrs	18 infusions from 3 donors over 5 mo, total 0.16 billion/kg (4% liver cell mass)	Decrease in serum bilirubin; OLT at 6 mo	Lysy et al. (2008)
	Cadaveric donor	1 yr	14 infusions over 15 days, total 0.35 billion/kg (9% liver cell mass)	Decrease in serum bilirubin; OLT at 4 mo	Lysy et al. (2008)
	Cadaveric donors	7 mo	15 infusions over 15 days, total 6.7×10^9 hepatocytes (17% liver cell mass)	Decrease in serum bilirubin; improvement in neurological functions	Ribes-Koninckx et al. (2012)
	Cadaveric donor	9 yrs	Two infusions of 7.5×10^9 hepatocytes over 1 day	Decrease in serum bilirubin; OLT at 5 mo	Ambrosino et al. (2005)
	18 wk foetus	2 yrs	Single infusion of 15×10^6 hepatoblasts	50% reduction in bilirubin levels 2 mo post infusion	Khan et al. (2008a)
OTC deficiency	Cadaveric donors	10 h	11 infusions over 15 days, total of 4.4×10^9 hepatocytes	Decrease in ammonia; Transient protein tolerance; OLT at 6 mo	Horslen et al. (2003)
	Living donor	1 day	1.7×10^9 hepatocytes	Improvement in blood ammonia and serum urea; OLT at 7 mo	Mitry et al. (2004)
	Unidentified donor(s)	1 day	7 infusions over 1 mo, total 1.57×10^9 hepatocytes	Initial maintenance of ammonia levels; complications from rotavirus infection; POLT at 6 mo	Puppi et al. (2008)
	Cadaveric donors	12 yrs	2 infusions over 1 week, total 0.87×10^9 hepatocytes (2% liver cell mass)	Decrease in ammonia increase in urea. Died of nosocomial infection at 2 weeks"	Ribes-Koninckx et al. (2012)
ASS deficiency	Cadaveric donors	42 mo	11 infusions over 5 mo, total 0.35 billion/kg	Ammonia normalisation; disease converted from severe to moderate-late onset; Increase in ASS activity and detection of infused donor cells via FISH	Stephene et al. (2006)
Glycogen storage disease type Ia	Cadaveric donor	47 yrs	2 infusions over 2 sessions, total of 2×10^9 hepatocytes (1% of liver cell mass)	Improved fasting tolerance with marked decrease in triglycerides for at least 3 years	Muraca et al. (2002); Burlina (2004)
	Cadaveric donors	6 yrs	7 infusions over 65 days, total 2.3×10^9 hepatocytes (6% liver cell mass)	Improvement but nor normalisation in blood glucose levels. Well to time of report at 1 year	Ribes-Koninckx et al. (2012)
Glycogen storage disease type Ib	Cadaveric donors	18 yrs	3 infusions over 1 mo, total 6×10^9 hepatocytes (6% of liver cell mass)	Marked improvement in hyperglycemic symptoms 2 mo post-infusion with substantial weight and height gains over the next year	Lee et al. (2007)
Tyrosinaemia type I	Cadaveric donors	45 days	2 infusions over 2 days, total 0.66×10^9 hepatocytes (3.5% liver cell mass)	Improvement in clotting factors and decrease in bilirubin levels. OLT 4 weeks after infusion	Ribes-Koninckx et al. (2012)
Primary oxaluria	Cadaveric donor	15 mo	Daily infusion of hepatocytes over 6 days, total 2.1×10^9 cells	Decrease in plasma oxalate; OLT 12 mo post cell infusion; detected donor hepatocytes by PCR after OLT	Beck et al. (2012)
Infantile Refsum disease	Cadaveric donors	4 yrs	8 infusions over 6 days, total 2×10^9 hepatocytes (5% of liver cell mass)	Decrease in total bile acids and DHCA 5 days post infusion. Progressive decrease in C26/C22 fatty acid ratio and pipercholic acid over following 18 mo	Sokal et al. (2003)

Tableau 3. Résumé des essais cliniques de thérapie cellulaire hépatocytaire réalisés dans le cadre du traitement d'anomalies congénitales du métabolisme et attestant d'un bénéfice clinique (d'après Logan *et al.*, 2014)¹¹⁴. Ce tableau présente les essais cliniques répertoriés jusqu'en 2014. Abréviations : ASS, arginine-succinate synthétase ; DHCA, *dihydroxycoprostanic acid* ; FISH, *fluorescence in situ hybridization* ; mo, *month* ; OLT, *orthotopic liver transplant* ; OTC, ornithine transcarbamylase ; PCR, *polymerase chain reaction* ; wk, *week* ; yr(s), *year(s)*.

Cependant, il faut noter que, contrairement à la greffe de cellules souches, les protocoles de transplantation d'hépatocytes ne sont pas suffisamment optimisés pour être utilisés en routine chez l'Homme. En effet, de nombreux obstacles sont à prendre en considération, tels que la difficulté à isoler des cellules de bonne qualité provenant de foies non optimaux (souvent utilisés en seconde indication après avoir été récusés

de la greffe d'organes), la complexité de la cryopréservation des hépatocytes humains sans perte de viabilité cellulaire, et une faible capacité de prise de greffe et de prolifération au sein du foie receveur¹¹⁵. Ce dernier élément est particulièrement critique lorsque les greffons cellulaires ne présentent aucun avantage sélectif par rapport aux cellules hôtes, comme c'est le cas dans la PH1. En effet, malgré leurs difficultés à détoxifier le glyoxylate, les hépatocytes mutés pour le gène *AGXT* ne semblent pas souffrir d'une réduction de leur demi-vie ou de leur capacité de prolifération, ce qui résulte en une faible prise de greffe et une durée de vie limitée des greffons⁸. Il est alors nécessaire de conférer artificiellement un avantage sélectif aux cellules transplantées pour favoriser le repeuplement de l'organe receveur, comme cela a été réalisé dans les études non cliniques évoquées ci-après.

2. Application à la PH1

Dans le cadre de la PH1, plusieurs études de faisabilité de la greffe d'hépatocytes ont été réalisées dans un modèle murin *Agxt*^{-/-}. Ce modèle se caractérise par une délétion homozygote des exons 4 à 8 du gène *Agxt* (équivalent murin du gène *AGXT* humain), et présente les principales caractéristiques biochimiques des patients souffrant de PH1, dont un déficit hépatique en enzyme AGT¹¹⁶. Lors de ces études, 1 million d'hépatocytes murins *Agxt*^{+/+} ont été administrés par injection intrasplénique au sein de souris *Agxt*^{-/-}, préalablement préparées à la greffe par irradiation hépatique inhibant la prolifération des hépatocytes hôtes, combinée à une hépatectomie partielle ou à l'administration du facteur de croissance hépatocytaire (HGF), dans l'objectif de stimuler la mitose des hépatocytes transplantés^{117,118}. Ces études ont montré une repopulation hépatique importante à long terme des receveurs (jusqu'à 90% des hépatocytes des receveurs ont été remplacés par les transplants, 20 semaines après la greffe, dans la condition d'administration de l'HGF¹¹⁷), associée à une réduction significative du ratio urinaire oxalate/créatinine (80% en moyenne) par rapport aux souris *Agxt*^{-/-} non transplantées.

En dépit de ces résultats prometteurs, les expériences décrites ci-dessus n'ont été que peu développées chez les patients hyperoxaluriques. Seule une étude, publiée en 2012, rapporte la mise en œuvre d'une greffe d'hépatocytes qui a servi de pont thérapeutique préalable à la réalisation d'une transplantation hépatique¹¹⁹. Le sujet de l'étude était une fillette de 15 mois homozygote pour le variant p.Arg360Gln de l'AGT, souffrant de PH1 infantile et ayant développé une insuffisance rénale terminale à l'âge de 3 mois. Au cours de cette expérience, 2,1.10⁹ hépatocytes prélevés chez un donneur mâle néonatal ont été administrés au receveur par injection intraportale, ce qui a permis de réduire la concentration plasmatique en oxalate de 25% à long terme (dernière analyse réalisée à J335 post-greffe) et a conduit à une amélioration significative de la condition clinique de l'enfant, permettant la réalisation d'une

transplantation hépatorénale 12 mois après la greffe cellulaire. Il faut cependant noter qu'aucune cellule issue du donneur mâle n'a pu être détectée chez le receveur lors d'une biopsie réalisée 5 mois après la greffe cellulaire. Cette observation serait consécutive à un rejet de greffe lié à une immunosuppression trop faible car mal tolérée, et à une difficulté de survie à long terme des hépatocytes transplantés, aucun avantage sélectif ne leur ayant été conféré.

Dans l'objectif d'augmenter l'efficacité de la thérapie cellulaire et de favoriser son utilisation en clinique, notamment pour les pathologies les moins favorables à cette procédure, la communauté scientifique a considéré l'utilisation de cellules hépatiques alternatives aux hépatocytes primaires.

3. Sources alternatives de cellules

La première source de cellules évoquée pour remplacer l'utilisation d'hépatocytes primaires adultes correspond à l'emploi de cellules souches embryonnaires et d'hépatocytes fœtaux¹¹⁵. Les cellules souches embryonnaires sont dérivées de la masse cellulaire interne du blastocyste (stade embryonnaire précoce) et se caractérisent par une capacité de prolifération (ou auto-renouvellement) considérable, et par un potentiel de différenciation (appelé pluripotence) en l'ensemble des cellules de l'organisme humain, dont les hépatocytes. Les hépatocytes fœtaux correspondent quant à eux aux hépatocytes immatures présents chez le fœtus. Si l'utilisation de ces cellules peut s'avérer efficace dans le traitement de pathologies hépatiques (la greffe d'hépatocytes fœtaux humains a notamment permis le rétablissement complet d'individus présentant une insuffisance hépatique aiguë^{120,121}), la destruction de blastocystes et de fœtus nécessaires à leur approvisionnement soulève cependant des controverses éthiques qui constituent des freins à leur utilisation à grande échelle. En outre, les protocoles actuels de différenciation des cellules souches vers la lignée hépatique (qui seront évoqués dans un chapitre dédié) aboutissent à l'obtention de cellules dont le phénotype est plus proche des hépatocytes fœtaux que des cellules adultes¹²², tandis que les capacités de repopulation hépatique des hépatocytes fœtaux eux-mêmes sont débattues¹²³. L'emploi de progéniteurs hépatocytaires adultes, qui présenteraient la capacité de se différencier en hépatocytes et en cellules épithéliales biliaires¹²⁴, est également évoquée, mais des études de caractérisation de ces cellules sont toujours en cours¹²⁵, et leur implication dans la régénération du parenchyme hépatique est controversée^{126,127}.

Dans un autre registre, différentes équipes ont développé des protocoles de transdifférenciation de fibroblastes humains en hépatocytes induits : les fibroblastes ont été convertis par induction de l'expression des facteurs de transcription HNF1 α , HNF4 α , FOXA3 et *SV40 large T antigen*¹²⁸ ou HNF1 α , HNF4 α , HNF6, ATF5, PROX1, CEBPA et c-MYC associés à une inhibition de p53¹²⁹, ces facteurs étant véhiculés par

des vecteurs lentiviraux. Les hépatocytes induits obtenus ont montré une activité métabolique comparable à celle des hépatocytes primaires humains, ainsi qu'une capacité de repopulation allant jusqu'à 30% du foie de souris immunodéficientes. Cependant, la mise au point de protocoles de transdifférenciation non intégratifs, basés sur l'utilisation de petites molécules ou de plasmides (fragments extrachromosomiques d'ADN circulaire dérivés de bactéries), serait préférable dans le cadre de l'utilisation clinique de ce type de cellules. Le développement de tels protocoles est en cours chez la souris¹³⁰.

Enfin, de grands espoirs se portent actuellement sur l'utilisation de cellules souches pluripotentes induites humaines (*induced Pluripotent Stem Cells* ou *iPSCs*) reprogrammées à partir de cellules adultes différenciées¹³¹, qui présentent les mêmes caractéristiques d'auto-renouvellement et de pluripotence que les cellules souches embryonnaires. Les *iPSCs* sont en revanche dotées d'un avantage éthique par rapport aux cellules souches embryonnaires, car elles ne nécessitent l'utilisation d'aucun matériel biologique prénatal. Elles peuvent en outre être développées à partir de cellules autologues, ce qui permet de s'affranchir de la nécessité d'un donneur extérieur, et d'un traitement immunosuppresseur dans le cas d'une greffe. Il faut cependant considérer que l'utilisation d'hépatocytes autologues dérivés d'*iPSCs* dans le traitement d'une pathologie hépatique d'origine génétique nécessite au préalable de modifier le génome des *iPSCs ex vivo* afin de restaurer un phénotype cellulaire sain. Les aspects de modification génique des cellules, et d'obtention et de différenciation des *iPSCs* en hépatocytes seront détaillés au sein de chapitres dédiés.

b. Thérapie génique

La thérapie génique peut être définie comme un ensemble de stratégies permettant de délivrer des acides nucléiques (ADN ou ARN) au sein de cellules spécifiques, dans l'objectif de modifier l'expression génique d'un individu afin de traiter une pathologie déterminée¹³². Cette approche thérapeutique est actuellement en plein essor, et des succès majeurs ont été obtenus en clinique, conduisant à la mise sur le marché de produits de thérapie génique destinés à des indications variées telles que le cancer, le déficit immunitaire combiné sévère, le rejet de greffe de moelle osseuse, la dystrophie rétinienne de Leber et la dystrophie musculaire de Duchenne¹³³. L'emploi de la thérapie génique dans le traitement de pathologies hépatiques est également étudié (Tableau 4), et l'accès au marché a été accordé pour un premier médicament de cette catégorie, destiné au traitement du déficit familial en lipoprotéine lipase.

Year (Start of trial)	Viral vector	Disease	Therapeutic	Route	Dose	Number of treated patients	Status	Reference
1992	MoMLV Retrovirus 5	Homozygous familial hypercholesterolaemia	LDL receptor gene	Intraportal (Ex vivo approach)	1 to 3.3 × 10e9 hepatocytes	5	Terminated	Grossman et al 1994 Grossman et al 1995
1998	Adenovirus 5	Ornithine transcarbamylase deficiency	OTC gene	Intrahepatic	2 × 10e9 to 6 × 10e11vg/kg	18	Terminated	Raper et al 2003
1999	AAV2	Haemophilia B	Factor IX gene	Intramuscular	2 × 10e11 to 1.8 × 10e12vg/kg	8	Terminated	Kay et al 2000 Manno et al 2003
2003	MoMLV Retrovirus	Haemophilia A	FVIII gene	Intravenous	2.8 × 10e7 to 4.4 × 10e8vg/kg	13	Terminated	Powell et al 2003
2004	HD-Adenovirus	Haemophilia A	FVIII gene	Intravenous	4.3 × 10e10vg/kg	1	Terminated	Chuah et al 2004
	AAV2	α1-antitrypsin	hAAT	Intramuscular	2.1 × 10e12 to 6.9 × 10e13vg	12	Terminated	Flotte et al 2004 Brantly et al 2006
	AAV2	Haemophilia B	Factor IX gene	Intrahepatic	8 × 10e10 to 2 × 10e12vg/kg	7	Terminated	Manno et al 2006
2006	AAV1	α1-antitrypsin	hAAT	Intramuscular	6.9 × 10e12 to 6 × 10e13vg	9	Terminated	Brantly et al 2009
2009	AAV2/8	Haemophilia B	Factor IX gene	Intravenous	2 × 10e11 to 2 × 10e12vg/kg	10	Recruiting	Nathwani et al 2014
2010	AAV1	α1-antitrypsin	hAAT	Intramuscular	6 × 10e12 to 6 × 10e12vg/kg	9	Terminated	Flotte et al 2011
2012	AAV2/8	Haemophilia B	Padua mutant factor IX gene	Intravenous	2 × 10e11 to 3 × 10e12vg/kg	6	Terminated	Monahan et al 2015
2014	AAV2/5	Acute intermittent porphyria	PBGD gene	Intravenous	5 × 10e11 to 1.8 × 10e13vg/kg	8	Terminated	D'Avola et al 2016
2015	Engineered AAV	Haemophilia B	Padua mutant factor IX gene	Intravenous	5 × 10e11 vg/kg (Low dose)	7	Recruiting	George et al 2016
	AAV2/5	Haemophilia B	Factor IX gene	Intravenous	5 × 10e12 to 2 × 10e13vg/kg	5	Recruiting	Miesbach et al 2016
	AAV2/rh10	Haemophilia B	Factor IX gene	Intravenous	1.6 × 10e12 to 1 × 10e13vg/kg	Undisclosed	Recruiting	clinicaltrials.gov
	AAV2/5	Haemophilia A	Factor VIII gene	Intravenous	6 × 10e12 to 6 × 10e13vg/kg	9	Recruiting	Pasi et al 2016
2016	AAV2/6	Haemophilia B	Factor IX integrating in the albumin locus via Zinc-finger-nuclease	Intravenous	cDNA 4 × 10e12 to 4 × 10e13vg/kg and ZFN 5 × 10e11 to 5 × 10e12vg/kg	Undisclosed	Recruiting	clinicaltrials.gov
	AAV2/8	Homozygous familial hypercholesterolaemia	LDL receptor gene	Intravenous	2.5 × 10e12 to 7.5 × 10e12vg/kg	Undisclosed	Recruiting	clinicaltrials.gov
Announced for 2017	AAV2/8	Ornithine transcarbamylase deficiency	OTC gene	Intravenous	2 × 10e12 to 2 × 10e13vg/kg	Undisclosed	Recruiting	clinicaltrials.gov
	Engineered AAV	Haemophilia A	Factor VIII gene	Intravenous	Undisclosed	Undisclosed	Recruiting	clinicaltrials.gov
	AAV2/8	Haemophilia A	Factor VIII gene	Intravenous	6 × 10e11 to 6 × 10e12vg/kg	NA	Not yet recruiting	clinicaltrials.gov
	Engineered AAV	Haemophilia B	Undisclosed					
	AAV2/8	Haemophilia A	Factor VIII gene					
	AVV	Haemophilia A	Factor VIII gene					
	AAV2/6	Haemophilia A	Factor VIII integrating in the albumin locus via Zinc-finger-nuclease					
	AAV2/8	Mucopolysaccharidosis VI	ARSB gene					
AAV2/8	Crigler Najjar	UGT1A1 gene						

Tableau 4. Essais cliniques de thérapie génique réalisés à l'aide de vecteurs viraux dans le cadre du traitement de pathologies hépatiques monogéniques (d'après Baruteau *et al.*, 2017)¹³⁴. Ce tableau présente les essais de thérapie génique répertoriés jusqu'en 2017 (pour l'année 2017, la liste est indicative, et non exhaustive). Les voies d'administration intraportale et intrahépatique se réfèrent à une injection au sein de la veine porte et de l'artère hépatique, respectivement. FVIII : facteur VIII de la coagulation ; FIX : facteur IX de la coagulation ; HD-adenovirus : *Helper-Dependent adenovirus* ; LDL : *Low Density Lipoprotein* ; MoMLV : *Moloney Murine Leukaemia Virus* ; NA, *Not Applicable* ; OTC : *Ornithine Transcarbamylase* ; PBGD : *Porphobilinogen Deaminase*.

La mise en place d'un protocole de thérapie génique nécessite au préalable de définir la stratégie d'administration de la « séquence médicament », qui sera discutée dans le chapitre suivant.

1. Stratégie d'administration des produits de thérapie génique

1.1. Mode d'administration des acides nucléiques

Les protocoles de thérapie génique peuvent être réalisés *ex vivo*, par modification de cellules cultivées en laboratoire puis transplantées chez le patient, ou *in vivo*, en administrant directement les acides nucléiques thérapeutiques dans l'organisme du patient (Figure 12).

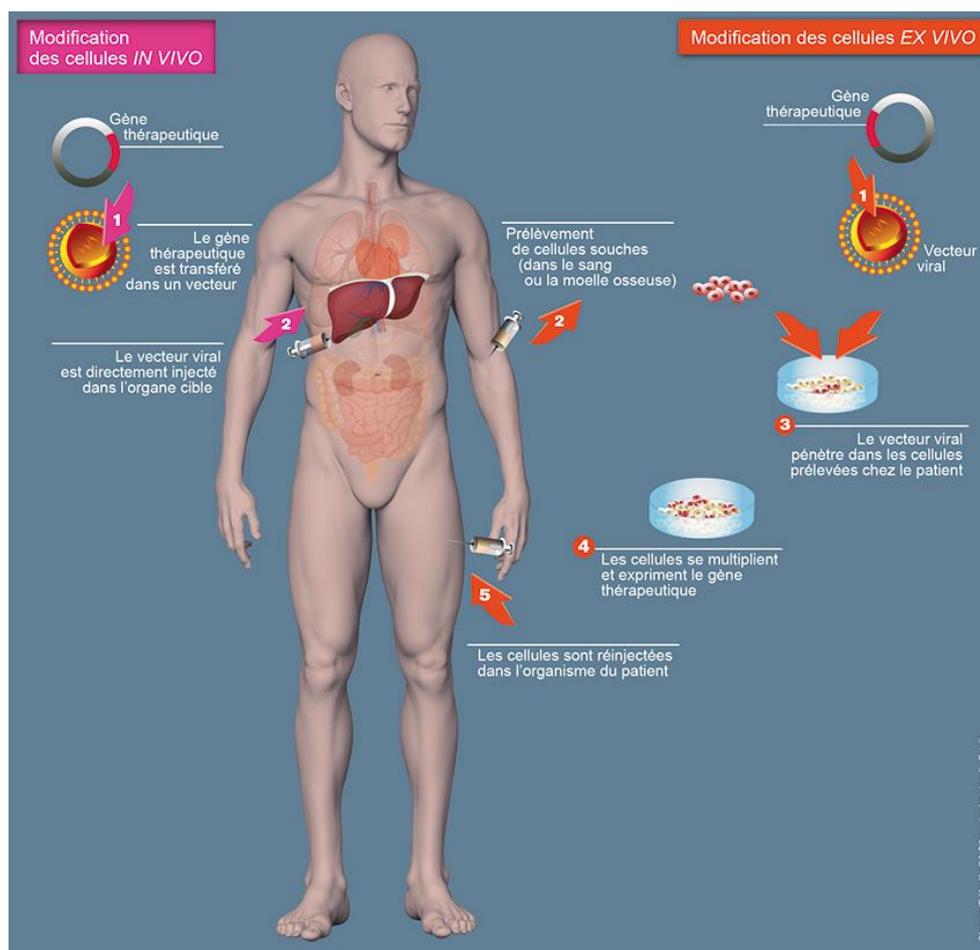


Figure 12. Modalités d'administration des produits de thérapie génique (d'après Thérapie génique Inserm, consulté le 27.08.2018)¹³³. Cette figure illustre l'administration d'acides nucléiques vectorisés à l'aide de virus, mais des stratégies identiques sont employées lors de l'utilisation de vecteurs non viraux. De même, la stratégie *ex vivo* représentée cible les cellules souches hématopoïétiques, mais il faut considérer que cette approche peut être utilisée pour corriger de nombreux autres types cellulaires, dès lors que le prélèvement et la culture *ex vivo* des cellules sont réalisables.

L'avantage de l'administration *ex vivo* réside dans la promiscuité du contact entre les acides nucléiques et les cellules cibles en culture, ce qui réduit les risques de dégradation des acides nucléiques, facilite l'accès aux génomes cibles et focalise la

thérapie uniquement sur les cellules d'intérêt. Cette approche permet également d'annihiler les risques de dissémination des acides nucléiques dans l'organisme, et de caractériser les modifications apportées au génome en s'assurant de leur efficacité et de leur intégrité avant de transplanter les cellules chez le patient. Cependant, de la même façon que la thérapie cellulaire, la thérapie génique *ex vivo* expose les cellules thérapeutiques aux difficultés de prise de greffe et de repeuplement des organes cibles de la thérapie, les hépatocytes présentant en outre une capacité d'expansion et une durée de vie limitées *ex vivo*, si l'on considère une thérapie à destination de pathologies hépatiques¹¹⁵.

La thérapie génique *in vivo*, quant à elle, permet de s'affranchir de la manipulation des cellules et des contraintes de la greffe. En revanche, cette approche s'accompagne d'un obstacle majeur, qui consiste à cibler les cellules d'intérêt en évitant la dispersion et la dégradation des acides nucléiques au sein de l'organisme. Cette difficulté peut être surmontée en administrant les séquences à l'aide de vecteurs, qui peuvent être considérés comme des transporteurs d'acides nucléiques.

1.2. Vectorisation des acides nucléiques

La fonction principale des vecteurs de thérapie génique consiste à faciliter le passage du matériel génétique à travers les membranes cellulaires, qui sont constituées d'une bicouche lipidique chargée négativement les rendant réfractaires au passage des acides nucléiques. Les vecteurs jouent également un rôle de protection de ce matériel face aux composants cellulaires susceptibles de le dégrader (nucléases, lysosome) et présentent, pour certains, la capacité de restreindre la libération du matériel génétique aux seules cellules d'intérêt.

La majorité des vecteurs utilisés actuellement dans les protocoles de thérapie génique est dérivée de virus, mais l'utilisation de vecteurs non viraux (tels que les plasmides et les vecteurs lipidiques) est également répandue (Figure 13).

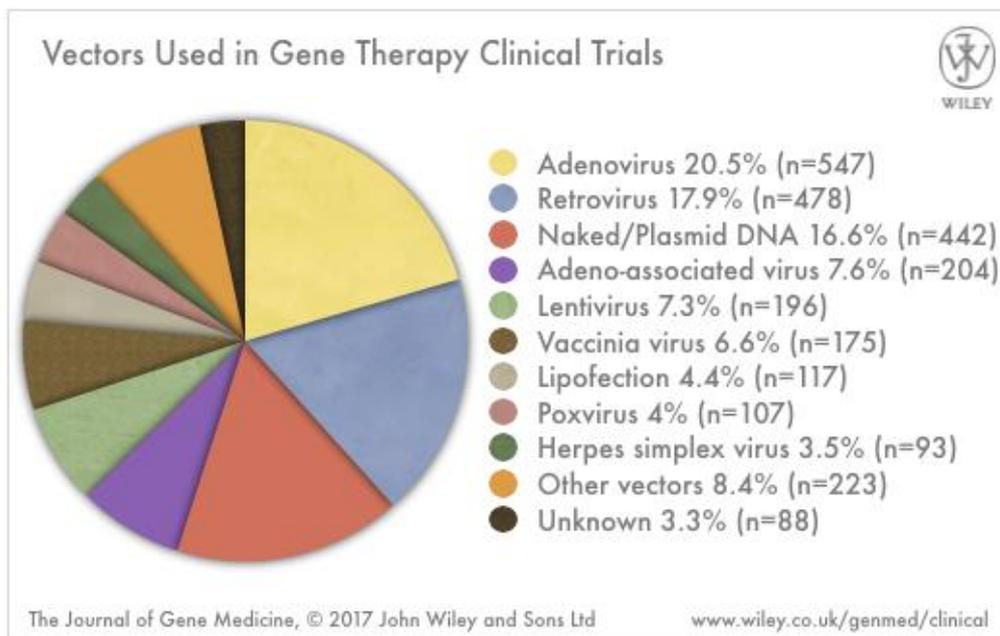


Figure 13. Emploi des vecteurs dans les essais cliniques de thérapie génique (d'après *Gene Therapy Clinical Trials Worldwide*, consulté le 27.08.2018)¹³⁵. Le graphique prend en considération l'ensemble des essais cliniques de thérapie génique répertoriés jusqu'en 2017. La « lipofection » correspond à l'utilisation de vecteurs lipidiques.

Le choix du type de vecteur utilisé influence les stratégies de thérapie génique mises en place, qui peuvent être classées en deux catégories : intégrative et non intégrative. Les deux chapitres suivants présenteront les caractéristiques de chacune de ces approches, ainsi que les principaux vecteurs viraux utilisés en thérapie génique et évoqués tout au long de ce mémoire.

1.2.1. Approches intégratives non ciblées

La stratégie intégrative consiste à modifier la séquence du génome cellulaire, le plus souvent en y intégrant un « transgène », qui correspond à une séquence nucléotidique exogène responsable des effets de la thérapie génique. L'intégration du transgène dans le génome peut être facilitée par des enzymes spécifiques, les intégrases, fournies par les vecteurs oncorétroviraux et lentiviraux, qui procèdent à une intégration efficace mais aléatoire dans le génome ; l'intégration peut également suivre le principe de la recombinaison homologue, un concept permettant une insertion génique ciblée de séquences qui sera détaillé dans un chapitre ultérieur.

L'approche de thérapie génique intégrative permet d'obtenir une modification pérenne de l'expression du génome, maintenue pendant toute la durée de la vie de la cellule corrigée et transmise à ses cellules filles. Elle ne nécessite donc potentiellement qu'une seule administration du produit de thérapie génique, ce qui est bénéfique à la

qualité de vie des patients et réduit les risques de toxicité et d'immunogénicité liés au produit (notamment lorsqu'il est vectorisé par des virus). Cependant, l'intégration de transgènes au sein du génome cellulaire expose l'individu receveur à d'importants risques de dérégulation de l'expression des gènes, liés au phénomène de mutagenèse insertionnelle (apparition de mutations génomiques suite à l'insertion de séquences exogènes)¹³⁶ : la construction du transgène et les vecteurs utilisés doivent être optimisés pour éviter ce risque, et un suivi des patients doit être mis en place après administration des produits de thérapie génique pour détecter une éventuelle tumorigenèse associée.

1.2.1.1. Vecteurs oncorétroviraux

Les oncorétrovirus appartiennent à la famille des *Retroviridae* ; ce sont des virus enveloppés dont le génome, long de 7 à 12 kb, se compose de deux segments linéaires identiques d'ARN monocaténaire, de polarité positive (polarité identique à celle des ARN messagers cellulaires) et reliés de façon covalente à leur extrémité 5'. Tous les génomes oncorétroviraux présentent 3 gènes communs, nommés *GAG*, *POL* et *ENV*, qui codent pour des polyprotéines devenant matures après action lytique d'une protéase oncorétrovirale¹³⁷. Les protéines résultant de l'expression de *GAG* correspondent à l'ensemble des protéines de structure des particules virales (matrice, nucléocapside) ; le gène *POL* code pour les enzymes virales (transcriptase inverse, intégrase, et protéase dans la majorité des cas) ; le gène *ENV* est responsable de la synthèse des glycoprotéines d'enveloppe. Ces trois gènes sont encadrés en 5' par les segments **R** (qui comporte la séquence promotrice TATA Box et le site d'initiation de la transcription, actifs en 5', ainsi que la séquence signal de polyadénylation, active en 3') et **U5** (nécessaire au processus d'intégration du génome viral au sein du locus cellulaire cible) ; l'extrémité 3' est composée des segments **U3** (qui contient des séquences *enhancer*, activatrices de transcription) et **R**¹³⁸ (Figure 14).

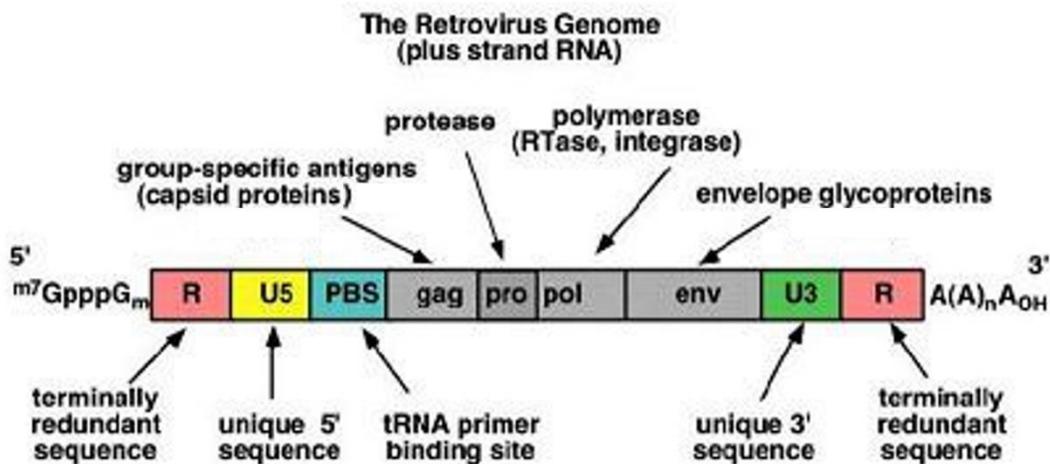


Figure 14. Représentation schématique du génome oncorétroviral (d'après *Retroviral Vector Gene Therapy Review*, consulté le 01.10.2018)¹³⁹. Les séquences m^7GpppG_m et $A(A)_nA_{OH}$ correspondent respectivement à la coiffe 5' et à la séquence signal de polyadénylation du génome oncorétroviral. La séquence signal d'encapsidation du génome dans les particules oncorétrovirales, située entre la séquence PBS et le gène GAG, n'est pas représentée sur ce schéma. Abréviations : RTase, rétrotranscriptase ; tRNA, ARN de transfert nécessaire à la rétrotranscription.

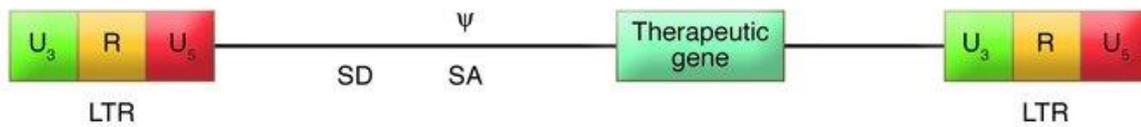
La réplication des oncorétrovirus dans les cellules hôtes est dépendante de la « rétrotranscription » cytoplasmique de l'ARN oncorétroviral en ADN complémentaire à l'aide de la transcriptase inverse, puis l'ADN néosynthétisé franchit passivement l'enveloppe nucléaire (ce qui implique que les oncorétrovirus se répliquent uniquement dans des cellules en division, dont l'enveloppe nucléaire est fragmentée) pour finalement s'intégrer au sein du génome cellulaire à l'aide de l'intégrase. Cette dernière étape nécessite la formation d'une boucle par l'ADN viral complémentaire, dont la résolution aboutit à la duplication du segment U3 en 5' du génome, et du segment U5 en 3' du génome. Les séquences 5'-U3-R-U5-3' ainsi formées de part et d'autre de l'ADN viral correspondent aux LTR (*Long Terminal Repeat*), responsables du contrôle de l'expression des gènes oncorétroviraux^{140,141}.

La génération des vecteurs dérivés des oncorétrovirus consiste *a minima*, comme pour l'ensemble des vecteurs dérivés de virus, à remplacer les séquences responsables du potentiel infectieux des virus par les séquences transgéniques d'intérêt, afin de sécuriser leur administration en inhibant toute possibilité de prolifération pathogène et de permettre le transport des séquences géniques dont la taille peut être conséquente. Concernant les oncorétrovirus, cela se traduit par une élimination de l'ensemble des gènes GAG, POL et ENV du vecteur oncorétroviral (Figure 15).

L'importante efficacité de transduction des vecteurs, et la possibilité d'une expression permanente du transgène d'intérêt après insertion dans le génome hôte, ont placé les vecteurs oncorétroviraux au centre de nombreux projets de recherche en

thérapie génique. Ces vecteurs ont ainsi fait l'objet du premier essai clinique de thérapie génique autorisé au monde en 1990, mené par WF Anderson et RM Bleise et destiné à traiter le déficit immunitaire combiné sévère (caractérisé par une absence combinée des fonctions lymphocytaires T et B) consécutif à une insuffisance en adénosine désaminase¹⁴². Les résultats de cette première étude furent difficilement interprétables, du fait du maintien d'un traitement pharmacologique en parallèle de la thérapie génique, mais le protocole mis en place a quant à lui ouvert la voie à d'autres essais, dont celui réalisé par l'équipe d'Alain Fischer en 1999. Cet essai avait pour objectif le traitement *ex vivo* du déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X, caractérisé par un blocage du développement des cellules lymphocytaires T et *natural killer*¹⁴³ : le protocole de thérapie génique s'est révélé très efficace, mais le déroulement de cet essai s'est distingué par l'apparition de 2 cas de leucémie sur les 10 patients traités, liée à l'intégration du vecteur oncorétroviral au sein du promoteur du proto-oncogène *LMO-2* (*LIM domain Only 2*) conduisant à un effet activateur des LTR sur la transcription de ce gène¹³⁶. Ces résultats ont été déterminants dans la prise de conscience du risque et des conséquences du phénomène de mutagenèse insertionnelle lié à l'intégration génomique des vecteurs de thérapie génique, et ils ont contribué au développement de vecteurs oncorétroviraux modifiés de façon à réduire l'effet activateur exercé par les LTR (Figure 15).

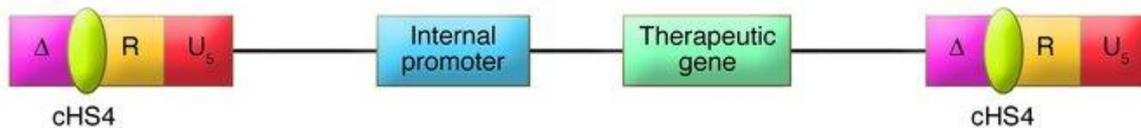
A Retroviral vector used for the SCID clinical trials



B Self-inactivated vectors



C Self-inactivated vector containing 2 x (250 bp) cHS4 insulators



D Self-inactivated vector containing insulator and a suicide gene (TK)

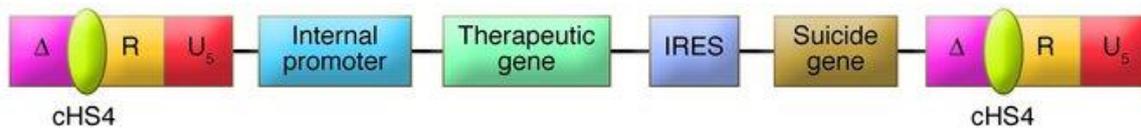


Figure 15. Représentation schématique d'un exemple de vecteur oncorétroviral et de ses modifications, permettant d'améliorer sa sécurité. (d'après Cavazzana-Calvo and Fischer, 2007)¹⁴⁴. Quel que soit le type de vecteur développé, la capacité d'encapsulation (taille maximale des transgènes à véhiculer) est de 8 kb environ. (A) La transcription du gène thérapeutique est dirigée par l'activité promotrice et activatrice de la région U3 du LTR oncorétroviral. (B) La transcription du gène thérapeutique est dirigée par un promoteur interne pouvant correspondre au promoteur ubiquitaire de la phosphoglycérate kinase (PGK) ou du facteur d'élongation 1 α (EF-1 α), tandis que la région U3 des LTR oncorétroviraux est supprimée : le vecteur ainsi créé est dit « auto-inactivé » (*self-inactivating*). (C) Le vecteur se compose de deux séquences insulatrices cHS4 (*chicken beta-globin 5'-DNase I-Hypersensitive Site 4*), qui isolent l'ADN flancant de l'influence du vecteur oncorétroviral et réciproquement. (D) La transcription de la cassette oncorétrovirale est dépendante du promoteur interne et aboutit à la synthèse de deux protéines distinctes, résultant de l'expression du transgène thérapeutique et d'un « gène suicide », grâce à la présence de la séquence IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) qui permet la réalisation d'une initiation de la traduction indépendante de la coiffe 5' de l'ARN. La présence du gène suicide est destinée à éliminer les cellules génétiquement modifiées en cas d'apparition d'effets indésirables tels qu'une prolifération cellulaire anormale. Le gène codant pour la thymidine kinase (TK) du virus *Herpes simplex*, responsable de la mort cellulaire par blocage de la réplication de l'ADN après administration de ganciclovir, est fréquemment utilisé. Abréviations : LTR, *Long Terminal Repeat* ; SA, site accepteur d'épissage ; SD, site donneur d'épissage ; ψ : séquence signal d'encapsulation, seules les séquences

pourvues de ce signal sont susceptibles d'être présentes au sein de la capsid des particules virales matures.

1.2.1.2. Vecteurs lentiviraux

Comme les oncorétrovirus, les lentivirus appartiennent à la famille des *Retroviridae* ; leurs propriétés structurales et biologiques sont donc similaires. Cependant, trois caractéristiques importantes des lentivirus diffèrent de celles des oncorétrovirus, et présentent un intérêt significatif pour l'élaboration des vecteurs lentiviraux.

Premièrement, les lentivirus sont capables de franchir activement la membrane nucléaire : contrairement aux oncorétrovirus, les lentivirus sont donc actifs à la fois dans les cellules quiescentes et en division^{144,145}, ce qui permet d'envisager l'utilisation de vecteurs lentiviraux pour cibler des cellules à faible taux de prolifération, telles que les neurones et les cellules hépatiques^{146,147}. De plus, bien que constitué de deux LTR encadrant les 3 gènes fondamentaux *GAG*, *POL* et *ENV*, le génome des lentivirus présente une organisation plus complexe que celle des oncorétrovirus : il inclut en effet des gènes accessoires et de régulation absents chez les oncorétrovirus¹³⁸ (Figure 16). Enfin, tandis que les oncorétrovirus tendent à insérer leur matériel génétique au sein des régions promotrices des gènes, il a été montré que l'intégration du génome lentiviral s'effectue préférentiellement en aval des sites d'initiation de transcription génique¹⁴⁸. Ces deux dernières propriétés confèrent un profil d'intégration génomique plus sûr aux lentivirus, et aux vecteurs qui en dérivent.

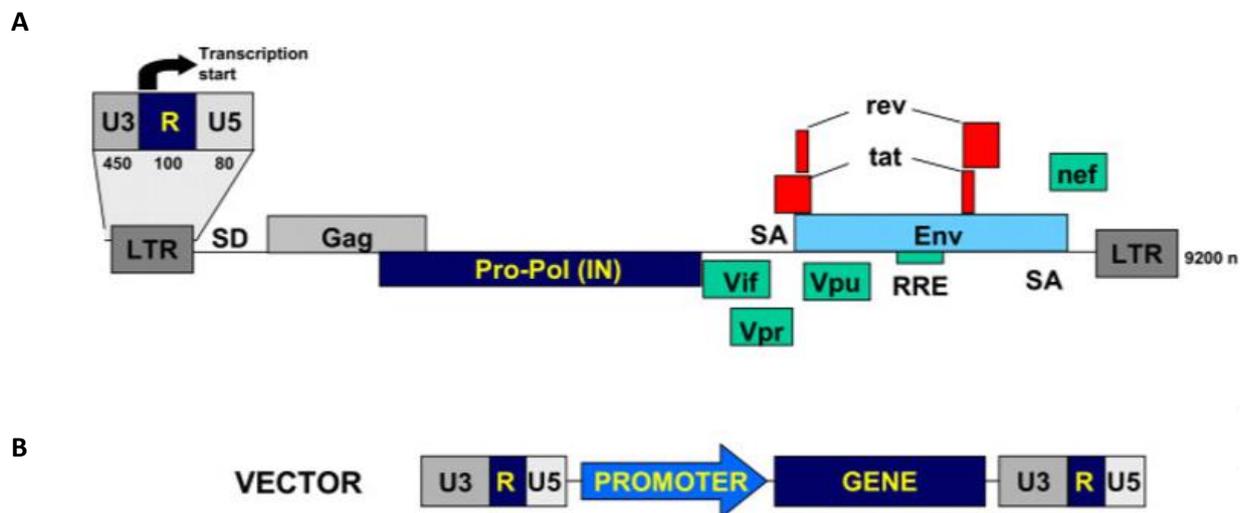


Figure 16. Représentation schématique du génome lentiviral et de sa vectorisation (d'après Dufait *et al.*, 2013)¹³⁸. (A) Génome lentiviral (environ 9200 nucléotides) représenté après intégration dans celui de la cellule hôte. Comme chez les oncorétrovirus, le gène *GAG* code pour les protéines de structure virales, le gène *POL* code pour la protéase (Pro), l'intégrase (IN) et la transcriptase inverse (non mentionnée), tandis que le gène *ENV* est responsable de la synthèse des glycoprotéines d'enveloppe. En rouge : séquences codant pour les protéines de régulation du lentivirus, soient Rev : protéine essentielle au

transport post-transcriptionnel de l'ARN messager viral incomplètement ou non épissé, depuis le noyau vers le cytoplasme ; et Tat : protéine transactivatrice de la transcription de l'ADN proviral et du génome des cellules infectées, et modulatrice de différentes voies de signalisation cellulaires pour conduire à l'expansion de l'infection virale et à une dérégulation immunitaire. En vert : séquences codant pour les protéines accessoires du lentivirus, nécessaires au processus infectieux *in vivo*, soient Vpr : protéine favorisant la dissémination du lentivirus au sein des lymphocytes T CD4⁺, et interférant avec la réponse antivirale spécifique des macrophages ; Vif, Vpu et Nef : protéines conférant au virus la capacité d'atténuer les effets délétères d'une réponse immunitaire antivirale induite par les interférons en interagissant avec différents facteurs de l'immunité cellulaire ; et RRE : *Rev Responsive Element*, séquence de liaison de la protéine Rev. (B) De façon similaire aux vecteurs oncorétroviraux, les vecteurs lentiviraux sont généralement constitués d'un promoteur interne régulant l'expression du transgène d'intérêt, ces séquences étant encadrées par des LTR caractérisés par une inactivation des régions promotrices et activatrices de transcription situées dans la région U3. Leur capacité d'encapsidation est de 8 kb environ. Abréviations : LTR, *Long Terminal Repeat* ; SA, site accepteur d'épissage ; SD, site donneur d'épissage.

Comme nous venons de l'évoquer, les propriétés naturelles des lentivirus assurent une sécurité plus importante de l'intégration génomique médiée par les vecteurs qui en sont dérivés, en comparaison des vecteurs oncorétroviraux. Cependant, la gravité des pathologies engendrées par certains lentivirus (dont le syndrome de l'immunodéficience acquise, consécutif à une infection par les virus de l'immunodéficience humaine ou VIH de type 1 et 2) impose la prudence lors du développement de protocoles de thérapie génique impliquant les vecteurs lentiviraux.

De ce fait, des techniques similaires à celles employées pour modifier les vecteurs oncorétroviraux ont été envisagées pour contrôler les effets génomiques des vecteurs lentiviraux, telles que la délétion de la région U3 des LTR (vecteurs « auto-inactivés »)^{149,150} et l'emploi de séquences insultrices¹⁵⁰.

Au cours de cette thèse, nous avons employé des vecteurs lentiviraux de type auto-inactivé afin de développer une approche de thérapie génique additive pour la PH1. Ce type d'approche consiste en l'apport d'une copie fonctionnelle d'un gène dans le noyau d'une cellule cible. Si notre projet (décrit en détails dans la partie « Résultats » de cette thèse) constitue à notre connaissance la première application des vecteurs lentiviraux au traitement de la PH1, ces vecteurs ont en revanche été largement employés au cours d'études de transfert de gènes à destination d'une multitude de pathologies d'origine génétique, dont plusieurs sont en lien avec un dysfonctionnement hépatique.

Les vecteurs lentiviraux ont notamment été utilisés en tant que médiateurs de l'intégration hépatocytaire du gène de structure du facteur IX (*F9*) pour traiter l'hémophilie B, un trouble de la coagulation caractérisé par un déficit en facteur IX : l'étude la plus avancée dans ce registre, réalisée chez un modèle canin en 2017, a révélé qu'une administration unique de ces vecteurs *in vivo* conduisait à la persistance de l'activité du facteur IX à hauteur de 1% de sa valeur physiologique pendant 1,5 an, suffisante pour réduire significativement les épisodes d'hémorragie spontanée survenant chez les animaux¹⁵¹.

Ces vecteurs ont également été employés pour traiter le syndrome de Crigler-Najjar de type 1, qui consiste en une hyperbilirubinémie non-conjugée provoquant un ictère chronique pouvant évoluer vers une encéphalopathie bilirubinique. Ce syndrome résulte du déficit hépatique de l'activité de la bilirubine-uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransférase, une enzyme métabolique codée par le gène *UGT1A1*. Des études ont montré que l'administration *in vivo* de vecteurs lentiviraux véhiculant le transgène *UGT1A1* chez des rats de type Gunn (modèles du syndrome de Crigler-Najjar de type 1) néonataux¹⁴⁶ et adultes¹⁵² permettait de normaliser les taux de bilirubine sérique pendant 10,5 et 6 mois respectivement, tandis que la greffe d'hépatocytes humains transduits *ex vivo* avec ce type de vecteurs s'est traduite par une expression transcriptionnelle du transgène *UGT1A1* pendant 26 semaines chez des souris immunodéficientes¹⁵³.

1.2.2. Approches non intégratives

La stratégie de thérapie génique non intégrative n'implique aucune modification de la séquence génomique. Cette méthode est donc plus sécuritaire que la stratégie précédente, mais elle se caractérise par des effets temporaires, et implique plusieurs administrations du produit de thérapie génique pour obtenir un effet à long terme. L'objectif d'une approche non intégrative peut consister en (i) l'apport d'une séquence supplémentaire au sein des cellules hôtes ou (ii) la modification de la régulation de l'expression du génome par modulation des étapes de transcription et de traduction. Les technologies les plus répandues de cette deuxième catégorie correspondent au saut d'exon (excision d'un exon muté pour favoriser la transcription d'une protéine fonctionnelle), qui est notamment étudié dans le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne¹⁵⁴ ; au *trans*-épissage (recombinaison d'une molécule de pré-ARN messager endogène non épissé avec une molécule d'ARN exogène pour supprimer une mutation située en aval de la recombinaison) qui a montré une efficacité satisfaisante lors d'études non cliniques dans le traitement du cancer colorectal, de l'hépatocarcinome et de l'épidermolyse bulleuse¹⁵⁵⁻¹⁵⁷ ; et à l'inhibition de l'expression génique par interférence à ARN, qui a été étudiée dans le traitement de la PH1 et sera développée dans le chapitre « Réduction du substrat par interférence à ARN ».

Dans le cadre de la thérapie génique non intégrative, les vecteurs viraux les plus utilisés sont dérivés d'adénovirus et d'adénovirus associé ; ces deux types de vecteurs seront présentés dans les chapitres suivants.

1.2.2.1. Vecteurs adénoviraux

Les adénovirus (Ad) appartiennent à la famille des *Adenoviridae*. Ce sont des virus non enveloppés à ADN linéaire bicaténaire (taille du génome : 36 kb), qui présentent

un tropisme cellulaire large. Ils se caractérisent par une distribution mondiale, et les infections humaines sont fréquentes, bien que peu symptomatiques chez les individus immunocompétents. 51 sérotypes d'adénovirus, définis par les anticorps induits lors d'une infection virale, ont été identifiés chez l'Homme¹⁵⁸. Les séquences génomiques des adénovirus sont réparties en deux catégories : d'une part, les séquences E1, E2A et B, E3 et E4 qui codent pour des protéines impliquées dans la réplication virale, et d'autre part, les séquences L1, L2, L3, L4 et L5 qui codent pour des protéines nécessaires à la structure des particules virales (Figure 17). La région E3 est également corrélée au blocage de la réponse immunitaire antivirale. L'ensemble de ces séquences est encadré de part et d'autre par des répétitions terminales inversées ou ITR (*Inverted Terminal Repeat*), qui sont nécessaires à la circularisation du génome adénoviral et à sa persistance sous forme d'épisomes au sein du noyau cellulaire, tout en jouant le rôle de promoteur pour les séquences nécessaires à la réplication virale. La synthèse des protéines de structure est quant à elle régulée par le promoteur tardif majeur ou MLP (*Major Late Promoter*)¹⁵⁹.

Les sérotypes d'adénovirus les plus employés en tant que vecteurs de thérapie génique correspondent aux sérotypes 2 et 5. Ces vecteurs sont particulièrement adaptés à la thérapie génique de cellules eucaryotes, car ils présentent une grande efficacité de transduction cellulaire, à la fois dans les cellules quiescentes et en division, et ils sont compatibles avec une production à grande échelle¹⁵⁹. Il faut ainsi noter que ce sont ces vecteurs qui ont été utilisés pour développer le premier médicament de thérapie génique mis sur le marché au monde sous la dénomination de spécialité Gendicine®, autorisé par la *State Food and Drug Administration of China* (agence de régulation du médicament chinoise) en 2003 pour traiter le carcinome à cellules squameuses de la tête et du cou¹⁶⁰.

Cependant, ces vecteurs présentent un inconvénient majeur qui réside en l'induction de réactions inflammatoires, rendant très complexe la répétition des administrations du vecteur et aboutissant progressivement à l'élimination des vecteurs viraux et des cellules transduites, conduisant alors à la perte du transgène thérapeutique¹⁶¹. Dans l'objectif de réduire ces réponses, plusieurs générations de vecteurs ont été développées, qui ont également permis d'aboutir à une capacité d'encapsidation considérable (Figure 17).

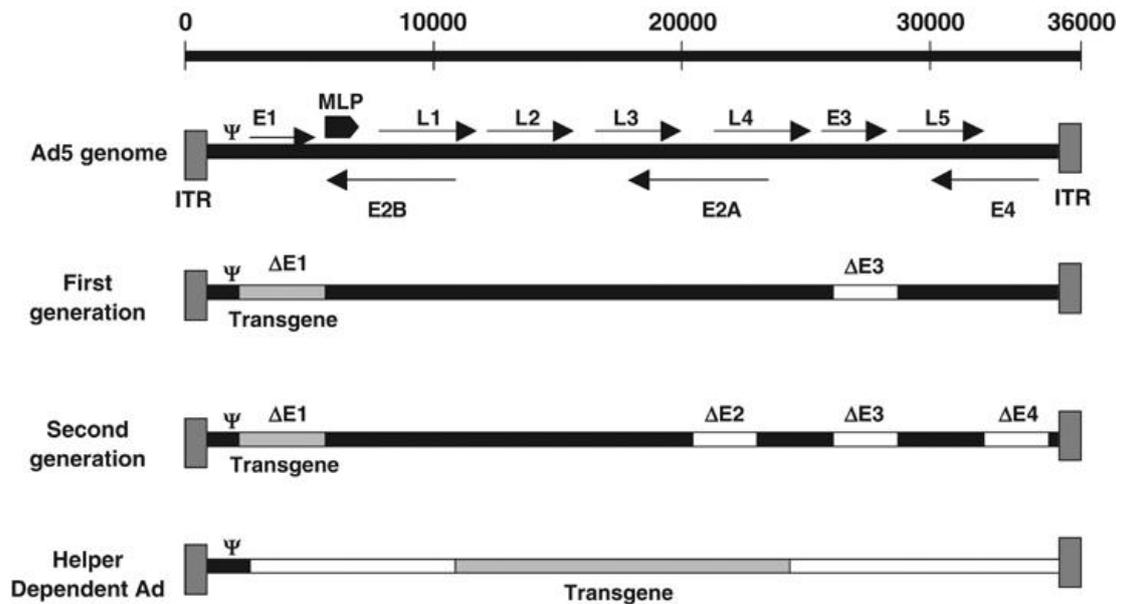


Figure 17. Différentes générations de vecteurs adaptés du génome de l'adénovirus (exemple du sérotype 5 ; d'après Alba *et al.*, 2005)¹⁵⁹. Les vecteurs de première génération sont constitués de l'ensemble du génome adénoviral à l'exception du MLP et des régions E1 et E3, et sont capables d'encapsider un transgène d'environ 8 kb, tandis que les vecteurs de deuxième génération combinent la délétion des régions E1, E2, E4 et parfois E3, et présentent une capacité d'encapsidation de 14kb. Bien que considérablement modifiés par rapport aux virus originaux, ces vecteurs se caractérisent par une immunogénicité non négligeable. Une troisième et dernière génération de vecteurs dépourvus de l'ensemble des régions adénovirales codantes a finalement été générée, permettant de réduire la stimulation du système immunitaire et ainsi d'augmenter la stabilité des séquences introduites dans les cellules transduites. Ceci implique également une capacité d'encapsidation considérable, pouvant atteindre 36 kb, et la nécessité de la présence d'un adénovirus auxiliaire (ou *Helper*) pourvu de l'ensemble des régions codantes lors de la production des vecteurs. La taille des séquences est exprimée en paires de bases. Abréviations : Ad5, adénovirus de sérotype 5 ; ITR, *Inverted Terminal Repeat* ; MLP, *Major Late Promoter* ; Ψ, séquence signal d'encapsidation du génome ; Δ, délétion de la séquence correspondante.

1.2.2.2. Vecteurs viraux associés aux adénovirus

Les virus associés aux adénovirus (*Adeno-Associated Viruses*, AAV) appartiennent à la famille des *Parvoviridae*. Ce sont des virus à ADN monocaténaire linéaire, non enveloppés, dont la réplication est dépendante de la présence d'un virus auxiliaire, principalement l'adénovirus (d'où leur nom) et l'herpesvirus¹⁶². Ce sont des virus majoritairement épisomaux, mais des événements intégratifs sont cependant rapportés à faible fréquence (environ 1 intégration / 1000 particules infectieuses), préférentiellement au sein de l'intron 1 du gène *PPP1R12C* situé dans le chromosome 19, appelé site *AAVS1* (*AAV integration Site 1*)^{163,164}. Comme les adénovirus, les AAV sont fréquemment rencontrés chez l'Homme (70 à 80% de la population est

séropositive), mais ne sont en revanche associés à aucune pathologie connue. 11 sérotypes différents d'AAV ont été identifiés, chacun correspondant à un tropisme cellulaire particulier ; les cellules hépatiques sont principalement ciblées par les sérotypes 5 et 8 (AAV5 et AAV8).

Les vecteurs dérivés des AAV résultent du remplacement des gènes *Rep* et *Cap* de l'AAV sauvage, respectivement responsables de la réplication virale et de la synthèse des protéines de capsid, par le transgène thérapeutique (Figure 18). Ces vecteurs sont communément utilisés dans les études de thérapie génique, essentiellement parce que les AAV sauvages ne sont assimilés à aucune pathogénicité chez l'Homme, et que les vecteurs présentent une faible immunogénicité, associée à un maintien possible de l'expression du transgène pendant plusieurs années dans des cellules quiescentes chez lesquelles ils persistent sous forme d'épisome¹⁶⁵. Ces vecteurs ont ainsi été utilisés dans le développement du premier médicament de thérapie génique mis sur le marché en Europe sous le nom de spécialité Glybera®, indiqué dans le traitement du déficit en lipoprotéine lipase, une pathologie héréditaire rare consécutive à des altérations du gène de structure de la lipoprotéine lipase (gène *LPL*) se caractérisant par une augmentation sanguine du taux de chylomicrons (complexes lipido-protéiques) pouvant être à l'origine d'épisodes de pancréatite aiguë¹⁶⁶. Cependant, il faut noter que le type de transgène véhiculé par les AAV est limité par leur faible capacité d'encapsulation, qui est au maximum de 5 kb.

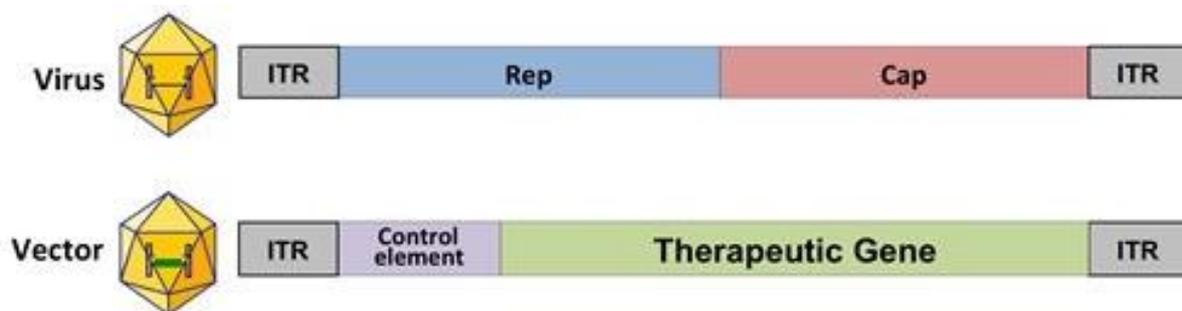


Figure 18. Vectorisation des AAV (d'après *the Children's Medical Research Institute*, consulté le 28.08.2018)¹⁶⁷. Les vecteurs dérivés des AAV résultent du remplacement, par la cassette thérapeutique, des gènes *Rep* et *Cap* de l'AAV sauvage (respectivement responsables de la réplication virale et de la synthèse des protéines de capsid) ainsi que des promoteurs responsables de l'expression de ces gènes, et de la séquence de polyadénylation (non représentés sur la figure). Des séquences promotrices (« *control element* », sur la figure) et de polyadénylation doivent donc être ajoutées au transgène pour assurer son expression. Seules les séquences ITR de l'AAV sauvage sont conservées, car elles sont nécessaires à l'encapsulation du génome dans les particules virales (signal d'encapsulation Ψ présent dans l'ITR 5', non représenté sur la figure).

2. Application de la thérapie génique au traitement de la PH1

2.1. Restauration de l'expression du gène AGXT par thérapie génique additive

Dans le cas de l'hyperoxalurie primitive de type 1, trois expériences de thérapie additive *in vivo* ont été menées dans le modèle de souris *Agxt*^{-/-}, chacune employant un vecteur viral non intégratif véhiculant une version saine du gène *Agxt*.

La première étude, publiée en 2006, impliquait l'administration du transgène *Agxt* vectorisé par un adénovirus de première génération (construction Ad-AGT)¹¹⁶, qui s'est montrée efficace dans la restauration d'un phénotype sain : une injection unique de 2.10⁹ unités infectieuses a permis de normaliser l'activité de l'enzyme AGT au sein des hépatocytes de souris *Agxt*^{-/-}, ce qui s'est traduit par une réduction d'un facteur 8 à 20 de la concentration urinaire d'oxalate pour atteindre une concentration non significativement différente des souris *Agxt*^{+/+} (analyses réalisées 7 et 14 jours après l'injection), et par une inhibition de la formation de cristaux oxalo-calciques. Cependant, ces effets se sont révélés uniquement transitoires, s'illustrant par une augmentation de la concentration urinaire d'oxalate atteignant jusqu'à 70% de sa valeur initiale avant traitement, et ce 30 jours après l'injection, ce qui suggère une perte progressive de l'expression du transgène¹¹⁶.

Une seconde étude impliquant l'administration d'un transgène *Agxt* vectorisé par un adénovirus au sein de souris *Agxt*^{-/-} a été publiée en 2016, en employant cette fois un vecteur adénoviral *Helper-dependant* ou HDAd¹⁰⁹. Lors de cette étude, 1.10¹², 5.10¹² et 1.10¹³ particules de vecteurs HDAd exprimant la protéine AGT sauvage sous la dépendance du promoteur hépato-spécifique de la phosphoenolpyruvatecarboxykinase ont été administrées par kg en dose unique à des souris *Agxt*^{-/-}¹⁰⁹. Tandis que l'injection de la plus faible dose s'est traduite par des résultats modérés, l'administration de 5.10¹² et 1.10¹³ particules virales s'est caractérisée par une transduction cellulaire estimée à 80% et 100% des hépatocytes murins, respectivement, résultant en une restauration de l'activité de l'AGT à un niveau physiologique (voire supra-physiologique) et une normalisation de l'excrétion urinaire de l'oxalate maintenue pendant 24 semaines après injection.

Enfin, une dernière expérience a été réalisée à l'aide de vecteurs AAV : au cours de cette étude, 5. 10¹¹, 5.10¹² et 1,5.10¹³ particules de vecteurs AAV5, et 5.10¹² particules de vecteurs AAV8 exprimant le transgène *Agxt* sous la dépendance du promoteur hépato-spécifique EalbAAT (promoteur de l' α 1-antitrypsine associé aux séquences régulatrices de l'enhancer de l'albumine humaine ; constructions AAV5-AGT et AAV8-AGT) ont été administrées par kg en dose unique à des souris *Agxt*^{-/-}¹⁰⁸. Les injections du vecteur AAV8-AGT et de la plus haute dose du vecteur AAV5-AGT se sont caractérisées par une transduction cellulaire estimée entre 80 et 90% des hépatocytes murins, résultant en une normalisation de l'excrétion urinaire de l'oxalate

maintenue pendant 4 semaines après injection. De plus, des analyses réalisées chez les souris 50 jours après administration du vecteur AAV8-AGT montrent une restauration de l'activité AGT à un niveau physiologique, l'absence de développement de cristaux d'oxalate de calcium dans les reins, et une innocuité satisfaisante du vecteur caractérisée par une absence de lésion hépatique, d'élévation sérique des transaminases (alanine aminotransférase et aspartate aminotransférase) et d'anticorps sériques anti-AGT.

2.2. Réduction du substrat par interférence à ARN

L'accumulation de substrat lié à la perte de fonction de gènes codant pour des enzymes clés du métabolisme peut résulter en une toxicité cellulaire et fonctionnelle importante, qu'elle soit consécutive à la présence en grande quantité du substrat en lui-même (exemple de l'accumulation du glycogène lysosomal dans la maladie de Pompe¹⁶⁸), ou en lien avec la prise en charge du substrat par une voie métabolique secondaire, comme c'est le cas dans les hyperoxaluries primitives où le substrat « glyoxylate » est transformé en produit nocif « oxalate ». L'objectif de l'approche thérapeutique décrite à présent consiste à annihiler ce phénomène toxique en réduisant la quantité de substrat à un niveau tolérable par l'organisme.

Nous avons vu précédemment que l'une des principales sources de glyoxylate chez les êtres humains correspond à la transformation du glycolate par l'enzyme hépatique glycolate oxydase (GO). Il a été envisagé qu'une suppression de l'activité de la GO pourrait entraîner une réduction de la production de glyoxylate bénéfique aux patients souffrant de PH1, tandis que l'augmentation consécutive de la concentration du glycolate, qui est une molécule soluble rapidement excrétée dans les urines, ne semble pas présenter de caractère délétère au vu du phénotype asymptomatique observé chez des patients déficitaires en GO¹⁶⁹.

La sécurité et l'efficacité de l'inhibition de la glycolate oxydase ont tout d'abord été testées dans des modèles de souris génétiquement modifiées. Un modèle de souris *Hao1*^{-/-} a été développé à ce effet : ce modèle présente une absence totale d'expression de la protéine GO suite à une délétion homozygote de l'exon 3 du gène *Hao1* murin (équivalent du gène *HAO1* humain), et l'ensemble de ses caractéristiques histologiques, biochimiques et d'accouplement s'avère non significativement différent des souris contrôles *Hao1*^{+/+}, à l'exception d'une élévation asymptomatique de la concentration urinaire en glycolate¹⁷⁰. Un second modèle de souris *Agxt1*^{-/-} *Hao1*^{-/-}, déficitaire pour les gènes *Agxt1* et *Hao1* murins, a ensuite été mis au point par croisement de souris *Hao1*^{-/-} avec le modèle murin de PH1 *Agxt1*^{-/-} précédemment évoqué¹¹⁶. Contrairement aux souris *Agxt1*^{-/-}, le modèle *Agxt1*^{-/-} *Hao1*^{-/-} s'est révélé non pathologique, ne différant encore une fois des souris contrôles *Agxt1*^{+/+} *Hao1*^{+/+} que par une augmentation asymptomatique du taux de glycolate urinaire¹⁷⁰. Ces

résultats attestent de la sécurité et de l'efficacité de la stratégie d'inhibition de la glycolate oxydase dans la réversion du phénotype de PH1 chez la souris.

Suite à cette preuve de concept, une stratégie de thérapie génique a été testée sur le modèle de souris *Agxt1*^{-/-}. Dans cette stratégie, la technologie des ARN interférents (ARNi, voir figure 19) a été utilisée pour inhiber l'expression transcriptionnelle du gène *Hao1*. Ces ARNi, administrés sous forme de *Dicer-substrate small interfering RNA* (DsiRNA) vectorisé par des nanoparticules lipidiques, ou de *small interfering RNA* (siRNA) conjugué à des résidus de N-acétylgalactosamine (désigné sous l'appellation ALN-GO1), ont permis de réduire de 90% l'expression de l'ARN messager (ARNm) du gène *Hao1* chez la souris *Agxt1*^{-/-}, ce qui s'est traduit par une réduction de 50% du taux urinaire d'oxalate^{171,172}, tandis que leur profil de tolérance, testé chez les rongeurs (souris et rat) et les primates non humains, s'est révélé satisfaisant. Les bons résultats obtenus ont permis l'autorisation d'un essai clinique de phase I/II pour l'ARNi ALN-GO1 développé par Alnylam Pharmaceuticals¹⁷³ : l'ARNi a démontré un profil de tolérance satisfaisant chez 32 volontaires sains et 20 patients atteints de PH1, tandis qu'une diminution moyenne de 64% du taux urinaire d'oxalate a été constatée chez les 12 patients atteints de PH1 chez lesquels ce paramètre a pu être évalué (http://www.alnylam.com/wp-content/uploads/2018/06/Luma_OxalEurope_Slides_FINAL060820182.pdf). L'essai a ensuite été étendu en phase II (essai ouvert non randomisé) pour évaluer la tolérance à long terme de l'ALN-GO1 au sein d'une cohorte constituée d'une vingtaine de patients atteints de PH1¹⁷⁴, et se poursuit actuellement en phase III, sous une forme multicentrique en double aveugle randomisée *versus* placebo afin d'évaluer la sécurité et l'efficacité du produit chez 30 patients pédiatriques et adultes souffrant d'hyperoxalurie primitive de type 1¹⁷⁵.

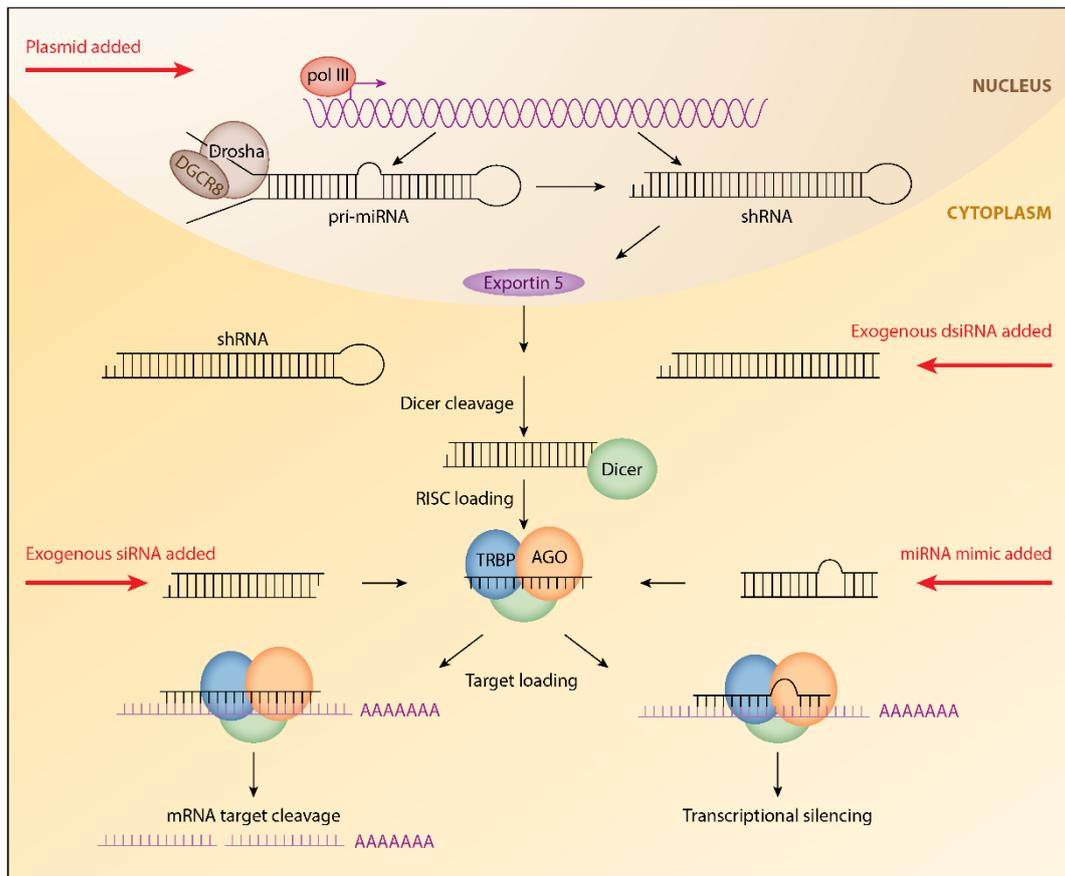


Figure 19. Fonctionnement de la technologie des ARN interférents (d'après Bobbin and Rossi, 2016)¹⁷⁶. A l'origine du processus, au sein des cellules animales, un transcrit primaire de *microRNA* (pri-miRNA) est synthétisé dans le noyau, puis il est pris en charge par le complexe ribonucléasique Drosha/DGCR8 qui permet sa maturation en *short hairpin RNA* (shRNA). Ce dernier est véhiculé vers le cytoplasme à l'aide de l'exportine 5 où il subit une seconde étape de clivage par la ribonucléase Dicer pour former un duplex de *small interfering RNA* (siRNA) de 21pb. La dernière étape de maturation consiste en l'incorporation du brin fonctionnel « dominant » du duplex (choisi notamment en fonction de sa stabilité) au sein du complexe RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*), qui comprend les protéines argonautes AGO associées au cofacteur TRBP (*TAR (HIV) RNA Binding Protein 2*). Ce complexe est alors capable de se fixer à une séquence d'ARNm homologue à l'ARN interférent pour inhiber son expression. L'action des protéines AGO diffère en fonction du degré d'homologie entre le brin fonctionnel du siRNA et la séquence d'ARNm cible : si l'appariement entre le siRNA et l'ARNm est parfait (à gauche sur la figure), la protéine AGO2 intervient pour déstabiliser et cliver l'ARNm cible ; en revanche, si l'appariement est imparfait, ce sont majoritairement les protéines AGO 1, 3 et 4 qui interviennent pour inhiber la traduction protéique (répression de l'initiation de la traduction, de l'élongation ou protéolyse des peptides naissants). Les ARNi synthétiques utilisés en thérapeutique peuvent se présenter sous 4 formes différentes, et entrent dans le processus de maturation à diverses étapes (flèches rouges). L'étape la plus précoce correspond à l'introduction de plasmides au sein du noyau, destinés à exprimer des shRNAs qui nécessiteront un processus de maturation nucléaire avant d'être exportés dans le cytoplasme. L'utilisation de DsiRNAs permet de se soustraire à l'étape nucléaire, en ne nécessitant qu'une étape de maturation endonucléolytique par la protéine Dicer, tandis que les formes « siRNA » et « miRNA mimic » sont directement matures. La différence entre ces deux dernières formes

correspond au degré d'homologie avec leur ARNm cible, l'hybridation étant parfaite pour les siRNAs et imparfaite pour les miRNA mimic. Abréviation : pol III, ARN polymérase III.

2.3. Inhibition de la lactate déshydrogénase hépatique par interférence à ARN

Une dernière piste de thérapie génique, très récemment explorée, consiste à inhiber l'expression de la lactate déshydrogénase, qui est l'enzyme clé de la conversion du glyoxylate en oxalate. Cette protéine est composée de quatre chaînes polypeptidiques formant un tétramère. Les deux sous-unités les plus communes, nommées M (« muscle ») et H (« heart ») sont codées chez l'Homme par les gènes *LDHA* et *LDHB*, respectivement. Cinq isozymes différents (LDH1 à LDH5) ont été identifiés en fonction des sous-unités qui les composent (4H, 3H1M, 2H2M, 1H3M, 4M). L'isozyme majoritairement présent dans le foie (et également prépondérant dans le muscle squelettique), LDH5, est composé de quatre sous-unités M^{177,178}. Outre son rôle dans la régulation du métabolisme du glyoxylate et de l'oxalate, la LDH est également responsable de la balance systémique du lactate et du pyruvate, nommée cycle de Cori (Figure 20). Lors de ce procédé, le lactate produit par les organes (en particulier les muscles) pendant la glycolyse anaérobie est transféré au foie et aux reins pour être converti en pyruvate par la LDH, ce dernier étant nécessaire au processus de néoglucogenèse. Le risque d'acidose lactique consécutif à l'inhibition de la LDH5 doit être pris en considération, car une accumulation trop importante de lactate peut conduire au développement de myopathies, d'érythèmes squameux et de rigidité utérine, comme cela a été rapporté chez des individus déficitaires pour le gène *LDHA*¹⁷⁹⁻¹⁸¹.

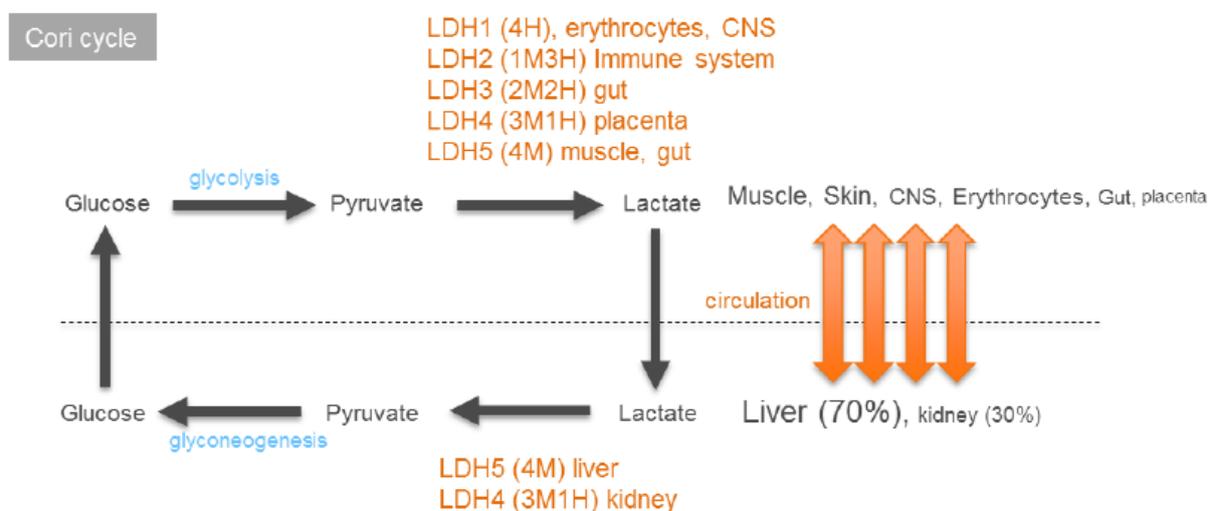


Figure 20. Cycle de Cori (d'après Lai *et al.*, 2018)¹⁸². Cette suite réactionnelle, également appelée cycle de l'acide lactique, fait référence à la voie métabolique au cours de laquelle le lactate, produit en

conditions anaérobies à partir du pyruvate dérivé de la glycolyse se déroulant au sein des muscles, de la peau, du système nerveux central et des hématies notamment, circule vers le foie et les reins. Le lactate est alors métabolisé par la LDH pour produire du pyruvate, qui constitue le composé initial de la réaction de néoglucogenèse aboutissant à la formation du glucose. Ce dernier est ensuite administré vers les organes initiaux pour une nouvelle réaction de glycolyse. Les cinq isoformes de la LDH présentent une activité enzymatique similaire, bien que leur distribution soit différente.

Le bénéfice d'une inhibition de la LDH sur l'excrétion d'oxalate a été étudié chez la souris *Agxt^{-/-}*, via l'administration de siRNAs dirigés contre les ARN messagers exprimés par le gène *Ldha* murin, conjugués à des résidus de N-acétylgalactosamine (GalNac-siRNAs) leur conférant une spécificité hépatique¹⁸². Cette expérience de thérapie génique s'est traduite par une diminution de 50% du ratio urinaire oxalate/créatinine par rapport aux souris non traitées, rapprochant ainsi sensiblement l'excrétion urinaire d'oxalate des souris PH1 traitées de celle des souris *Agxt^{+/+}* (ratio urinaire oxalate/créatine égal à 260 mg/g vs 250 mg/g en moyenne, respectivement). De plus, l'inhibition de l'expression du gène *Ldha* a conféré aux animaux une protection rénale significative, s'illustrant par une absence totale de dépôts d'oxalate de calcium après 8 semaines de traitement hebdomadaire par les GalNac-siRNAs associés à l'administration d'éthylène glycol, un précurseur du glycolate favorisant la formation des cristaux oxalo-calciques. L'étude a également montré une diminution de 25% du ratio urinaire oxalate/créatinine après administration de GalNac-siRNAs anti-*Ldha* au sein d'un modèle de souris PH2 *Grhpr^{-/-}*, qui se caractérise par un déficit total en protéine GRHPR suite à une insertion homozygote au sein de l'intron 1 du gène *Grhpr* murin (équivalent du gène *GRHPR* humain) et présente, comme les patients souffrant de PH2, une excrétion urinaire d'oxalate et une néphrocalcinose modérées¹⁸³. Enfin, l'étude stipule qu'aucune élévation significative de la concentration plasmatique du lactate n'a été observée dans les souris PH1 traitées avec les GalNac-siRNAs anti-*Ldha* par rapport aux souris contrôles (l'analyse n'a pas été réalisée dans les souris PH2), aucune toxicité hépatique aiguë n'est apparue, et aucune diminution significative de l'ARN messager *Ldha* n'a été constatée dans les reins, la peau, le muscle et l'utérus, ce qui témoigne de la spécificité de la construction.

Les excellents résultats obtenus avec cette stratégie ont conduit au transfert de la technologie vers un développement industriel, réalisé par l'entreprise Dicerna Pharmaceuticals, qui a récemment reçu l'autorisation de mise en place d'un essai clinique multicentrique de phase I, destiné à évaluer la sécurité d'emploi et les paramètres pharmacologiques des siRNAs anti-LDHA chez des volontaires sains et des patients atteints de PH1 et PH2 (cohorte totale attendue de 41 participants)^{184,185}.

c. Thérapie enzymatique substitutive

L'objectif de cette approche est d'apporter l'enzyme déficitaire *in vivo* sur son site d'action pharmacologique, directement sous sa forme protéique, ce qui permet d'obtenir des résultats immédiats mais nécessite de réitérer l'administration de la thérapie.

Avant de parvenir à leur cible, les protéines se heurtent à de nombreuses barrières intra- et extracellulaires. Si l'on considère l'exemple de l'AGT, les deux premiers obstacles consistent à cibler les hépatocytes, puis à franchir la membrane cellulaire, qui entrave la pénétration des macromolécules hydrophiles. Les molécules sont ensuite généralement prises en charge par la voie d'endocytose, constituée par une succession de compartiments endosomaux et lysosomaux de pH décroissant. Si ce mécanisme facilite le traitement des pathologies lysosomales (telles que la maladie de Pompe, par exemple) par thérapie enzymatique^{186,187}, il complique en revanche l'utilisation de cette approche pour une enzyme telle que l'AGT, qui doit être capable de se soustraire à la dégradation endolysosomale, rester stable dans le cytosol et interagir avec le récepteur Pex5p (par reconnaissance de la séquence PTS1) pour être finalement ciblée vers le peroxysome¹⁸⁸.

Dans l'objectif de faciliter le franchissement de ces étapes, différentes stratégies visant à modifier la structure de l'AGT et/ou à l'associer à d'autres molécules ont été explorées. Ainsi, une étude récente a montré une amélioration significative de l'internalisation cellulaire de l'AGT dans un modèle CHO-GO après conjugaison de la protéine avec un bloc de copolymères poly(ethylene glycol)-co-poly(L-glutamic acid), sans altération des propriétés fonctionnelles de la protéine¹⁸⁹, tandis que des travaux visant à mieux comprendre les interactions entre la séquence PTS1 et le récepteur Pex5p ont été entrepris afin d'optimiser la distribution de l'AGT vers le peroxysome¹⁸⁸. L'utilisation d'une séquence consensus de l'AGT, qui diffère de la protéine sauvage par 5 mutations, est également étudiée dans le cadre d'une thérapie enzymatique substitutive : la protéine obtenue se caractérise *in vitro* par une activité catalytique augmentée et par des stabilités thermique et cinétique plus importantes que celles de la protéine sauvage, qui sont susceptibles d'améliorer l'efficacité de la thérapie *in vivo*¹⁹⁰.

Dans l'objectif de faciliter le transfert de cette approche chez les patients, il est possible d'envisager d'autres types de modification protéique, non testés dans le cadre de la PH1 pour le moment, mais qui ont fait leurs preuves sur différentes protéines et pourraient faciliter l'adressage de l'AGT. Le ciblage des hépatocytes, tout d'abord, pourrait être amélioré par conjugaison chimique de l'AGT avec des résidus galactosyl (interagissant avec les récepteurs hépatocytaires des asialoglycoprotéines)^{191,192}. Alternativement à l'utilisation de copolymères, dont la toxicité cellulaire est parfois significative, le passage membranaire de la protéine peut quant à lui être facilité par

couplage avec des peptides de type CPP (*cell-penetrating peptides*) tels que la protéine transactivatrice TAT du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), la protéine VP22 du virus *Herpes simplex* ou des séquences de polyarginine : ces molécules, qui présentent une charge nette positive, favorisent le passage de leur cargo protéique par interaction avec des composants membranaires chargés négativement, tels que le protéoglycane héparane sulfate¹⁹³. Ces CPP peuvent en outre être couplés à des épitopes d'hémagglutinine dérivés du virus *Influenza* (virus de la grippe) qui facilitent significativement la libération des cargos protéiques associés depuis l'endosome vers le cytosol¹⁹⁴.

d. Modulation du repliement protéique

L'existence de formes intermédiaires de repliement est fréquente pour les protéines, et ces intermédiaires nécessitent souvent une réorganisation structurale importante médiée par l'intervention de chaperons moléculaires afin de parvenir à leur forme native¹⁹⁵. Cependant, si l'intervention de ces chaperons est bénéfique et nécessaire à la maturation des protéines, elle peut également être néfaste et contribuer aux effets pathogènes de formes mutées mal repliées, comme c'est le cas pour l'AGT (Figure 21). Il semblerait alors que la modulation des interactions entre les variants pathogènes de l'AGT et les chaperons moléculaires associés constitue une approche intéressante pour le traitement de la PH1.

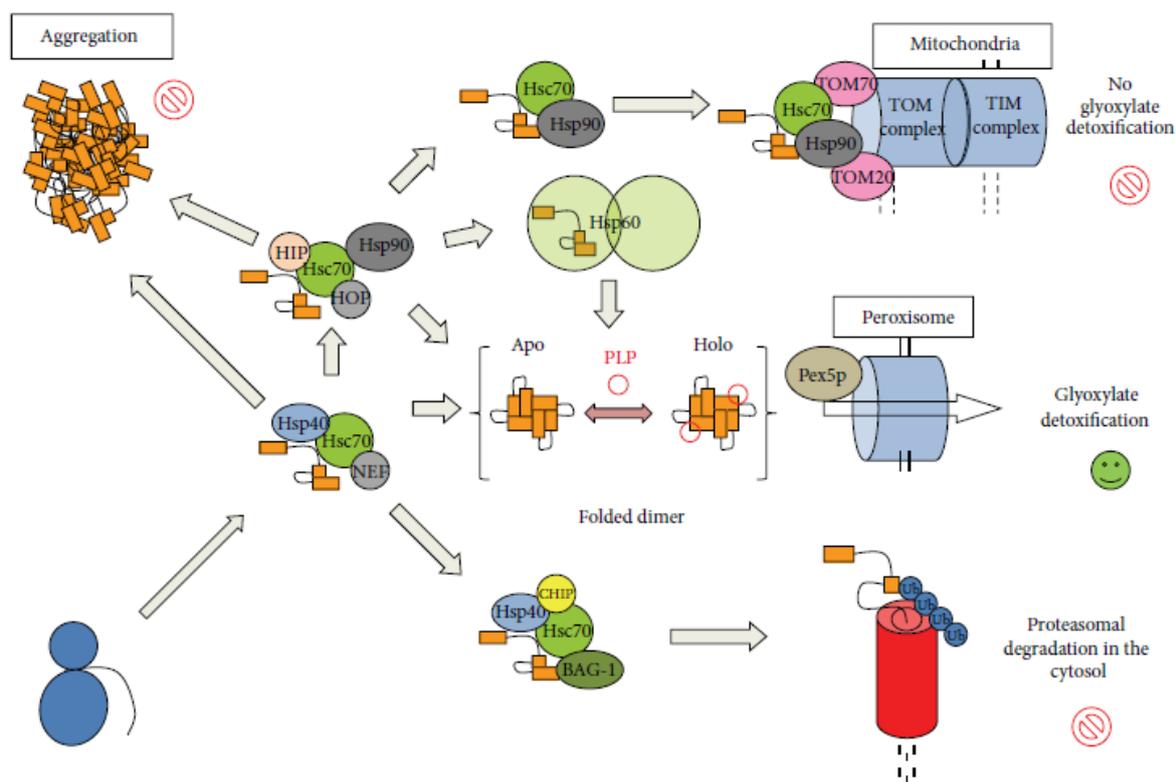


Figure 21. Représentation schématique des principales étapes du repliement de l'AGT, native ou mutée (d'après Pey *et al.*, 2013)¹⁹⁶. Après sa synthèse par le ribosome (représenté en bas à gauche de la figure), le monomère d'AGT est maintenu dans un état soluble partiellement replié par interaction avec les chaperons Hsp40 (*Heat shock protein 40*), ce qui autorise son engagement vers la machinerie de repliement Hsp70 incluant les chaperons NEF (*Nucleotide Exchange Factor*) et Hsc70 (*Heat shock cognate 70*), ainsi que les cofacteurs de ce dernier nommés Hip (*Hsc70-interacting protein*) et Hop (*Hsc70-Hsp90-organizing protein*). Les modifications conformationnelles se poursuivent à travers le transfert du polypeptide partiellement replié vers les machineries Hsp90 et Hsp60 pour aboutir à une protéine AGT dimérique, capable de s'associer avec son cofacteur (le PLP) et d'interagir avec le récepteur Pex5p pour être finalement transportée vers le peroxysome. Cependant, certains variants pathogènes de l'AGT présentent des interactions plus fortes que la protéine sauvage avec les chaperons Hsp70, Hsp60, et Hsp90 qui peuvent (i) retarder le repliement de la protéine et conduire à son agrégation, (ii) engager l'AGT vers un processus de dégradation par le protéasome, suite à une interaction avec les protéines CHIP (*Carboxy terminus of Hsc70 Interacting Protein*) et BAG-1 (*BCL2-Associated Athanogene 1*) et (iii) conduire à une présentation de l'AGT vers la machinerie d'import mitochondrial par interaction avec les récepteurs TOM20 et TOM70. Abréviations : Apo, apoprotéine (sans cofacteur) ; Holo, holoprotéine (avec cofacteur) ; TIM, Translocase of Inner Membrane ; TOM, Translocase of Outer Membrane ; Ub, ubiquitine.

Une première approche thérapeutique de cette catégorie, ayant fait ses preuves depuis longtemps en clinique, semblerait être l'administration de pyridoxine, mais les mécanismes sous-jacents à son rôle de chaperon ne sont pas encore identifiés (voir paragraphe dédié précédemment).

Différents criblages pharmacologiques réalisés ces dernières années^{197,198} ont permis de mettre en évidence de nouvelles molécules, qui pourraient jouer un rôle

dans le repliement et l'adressage de l'AGT. Certaines de ces molécules sont en repositionnement, ce qui signifie que leur utilisation chez l'être humain a déjà été approuvée par une autorité de santé, et que leur mise à disposition dans l'indication de l'hyperoxalurie primitive de type 1 sera facilitée (par minimisation des études de toxicité, notamment).

Dans ce registre, une étude menée sur le chlorure de déqualinium (un agent bactéricide et fongicide utilisé dans le traitement des infections gynécologiques) a montré une restauration de l'adressage du variant muté AGT^{Pro11Leu/Gly170Arg} vers le peroxysome (au lieu de la mitochondrie) au sein d'un modèle de cellules CHO-GO, cet effet s'accompagnant d'une réduction de l'accumulation d'oxalate d'environ 25% dans les cellules¹⁹⁹. Le mécanisme d'action supposé du chlorure de déqualinium serait l'induction d'un blocage de la protéine AGT^{Pro11Leu/Gly170Arg} au niveau des translocons TOM et TIM, le domaine C-terminal de la protéine étant positionné en regard du cytosol ; cette conformation permettrait un maintien de l'import vers le peroxysome par interaction avec le récepteur Pex5p.

Des effets similaires de restauration de l'import peroxysomal ont été observés suite à l'administration d'émétine (un alcaloïde utilisé dans le traitement des amibiases) au sein de cellules CHO exprimant le variant p.Gly170Arg-Mi (Mi, *minor allele*)²⁰⁰. Bien que n'étant pas elle-même un chaperon moléculaire, l'émétine présente la propriété d'inhiber légèrement la phase d'élongation de la traduction protéique (inhibition de 25% de la synthèse globale des protéines), ce qui entraîne une diminution du nombre de substrats des protéines chaperonnes et pourrait augmenter la performance du système de repliement²⁰¹.

Enfin, une expérience réalisée dans des cellules Cos7 (fibroblastes-like issus de reins simiens) exprimant le variant p.Ile244Thr-Mi a montré une amélioration significative de la solubilité de la protéine suite à l'administration de bétaine (substance extraite de la betterave, utilisée dans le traitement de l'homocystéinurie)⁶³. La protéine ainsi solubilisée présentait une activité catalytique équivalente à 50% de la protéine AGT sauvage, alors que l'activité du variant est inférieure à 10% de celle de la protéine sauvage en l'absence de traitement. Cependant, l'efficacité de cette drogue dans la réduction de la production d'oxalate reste à confirmer.

e. Enzymes de dégradation de l'oxalate

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'oxalate ne peut pas être métabolisé par les mammifères, et c'est ce qui constitue la raison de l'accumulation de cette molécule dans leurs hépatocytes. Cependant, d'autres formes de vie sont pourvues d'enzymes capables de dégrader l'oxalate en produisant des métabolites non toxiques pour l'Homme, et seraient donc potentiellement utiles au traitement des hyperoxaluries primitives.

L'organisme le plus étudié correspond à *Oxalobacter formigenes*, une bactérie anaérobie commensale dépendante de l'oxalate en tant que source de carbone et d'énergie²⁰² (Figure 22). Outre ses facultés de métabolisation de l'oxalate, de nombreux tests effectués chez des animaux (souris et rats) indiquent que la bactérie favorise la sécrétion d'oxalate depuis le plasma vers le côlon, par activation du transporteur SLC26A6²⁰³⁻²⁰⁵.

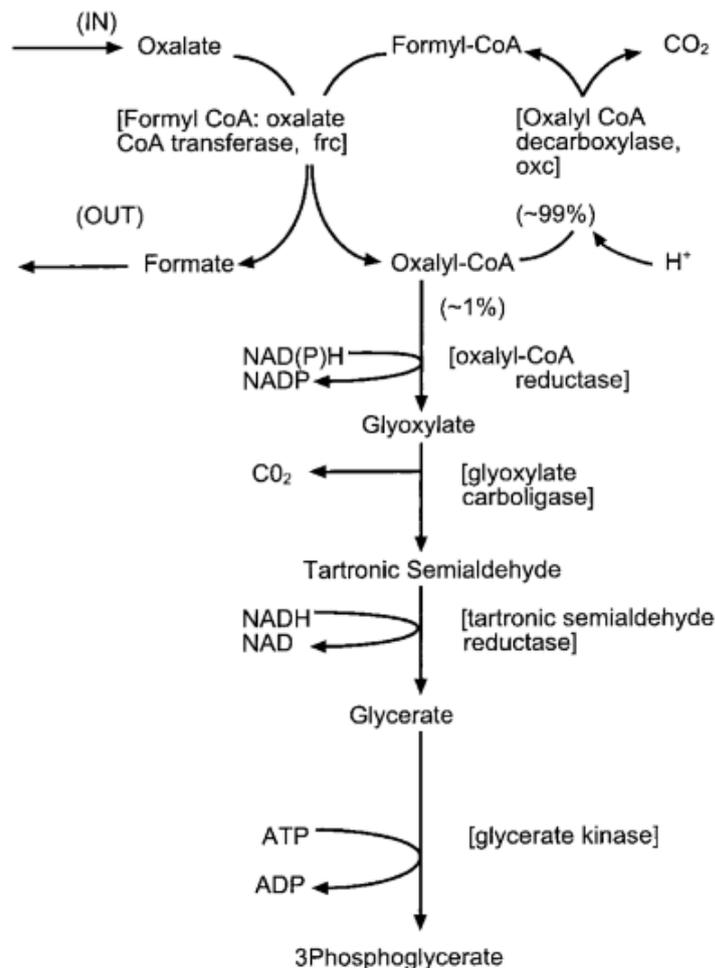


Figure 22. Principales étapes du métabolisme de l'oxalate vers le formate et le 3-phosphoglycérate chez *Oxalobacter formigenes* (d'après Stewart *et al.*, 2004)²⁰⁶. Environ 99% du carbone issu de l'oxalate est converti en formate et en CO₂. Les 1% restants entrent dans la voie de biosynthèse du 3-phosphoglycérate.

O. formigenes appartient au microbiote intestinal des êtres humains²⁰⁷, et il a été mis en évidence qu'un défaut de colonisation intestinale par cette bactérie constitue un facteur de risque de néphrolithiase oxalo-calcique récurrente idiopathique^{208,209}. De plus, plusieurs études ont révélé que l'excrétion urinaire d'oxalate est significativement inférieure chez les patients néphrolithiasiques colonisés par la bactérie, en comparaison de ceux qui en sont dépourvus²¹⁰⁻²¹². Ces observations prometteuses ont encouragé la communauté scientifique à étudier les effets d'une

administration du commensal dans le cadre du traitement des hyperoxaluries primitives.

Une étude de principe a été réalisée chez le modèle murin *Agxt1^{-/-}* : l'inoculation d'*O. formigenes* s'est révélée satisfaisante, s'illustrant par une réduction de 50% du taux plasmatique et de l'excrétion urinaire d'oxalate, en comparaison des animaux non traités²⁰³. Chez l'Homme, une première étude publiée en 2002 a montré une réduction de 40% de l'excrétion urinaire d'oxalate et du ratio oxalate/créatinine chez 4 sujets sains non colonisés par *O. formigenes*, après administration orale simultanée d'une charge importante d'oxalate et d'un inoculum d'environ $5 \cdot 10^{10}$ bactéries (sujets contrôles : ingestion de l'oxalate sans inoculum bactérien)²¹³.

Cependant, ces résultats doivent être nuancés par des études cliniques récentes de phase II/III de plus grande envergure (cohortes de 42 patients en 2011²¹⁴ et 36 patients en 2018²¹⁵), randomisées et en double aveugle, effectuées chez des individus hyperoxaluriques. Au cours de ces études, les patients ont reçu des doses quotidiennes d'une (en 2011) ou deux (en 2018) capsules contenant $1 \cdot 10^7$ *colony forming units* de *O. formigenes* lyophilisées ou un placebo pendant 24 semaines. Bien que les traitements aient été bien tolérés, aucune de ces deux études n'a mis en évidence de réduction significative de l'excrétion urinaire d'oxalate par rapport au placebo. Une nouvelle formulation du produit, plus concentrée et présentant un délai d'action plus court, est actuellement la cible d'une étude clinique multicentrique de phase III, qui devrait inclure 22 patients hyperoxaluriques^{215,216}.

Une autre voie de dégradation est également étudiée, impliquant l'enzyme oxalate décarboxylase dérivée de la souche bactérienne *Bacillus subtilis*²¹⁷, qui est fréquemment retrouvée dans les sols. Cette enzyme, administrée par voie orale sous forme recombinante, est capable de dégrader l'oxalate présent dans le tractus gastro-intestinal, et a permis de réduire significativement (jusqu'à 50%) l'excrétion urinaire d'oxalate chez la souris *Agxt1^{-/-}*²¹⁸. Cet effet bénéfique a été corroboré par une étude clinique de phase I, randomisée *versus* placebo et en double aveugle, réalisée chez 30 volontaires sains rendus hyperoxaluriques par ingestion d'un régime riche en oxalate et pauvre en calcium : les individus ayant reçu l'oxalate décarboxylase ont présenté une réduction significative (bien que modeste) de l'excrétion urinaire d'oxalate par rapport aux individus ayant reçu le placebo (excrétion de 67.2 ± 18.8 mg *versus* 80.5 ± 27.4 mg oxalate/jour, soit une réduction de 17%)²¹⁹. Une nouvelle étude clinique, de phase II, est actuellement en cours pour évaluer la sécurité et l'efficacité de l'administration de l'oxalate décarboxylase chez des patients adultes et pédiatriques (âgés de plus de 12 ans) souffrant d'hyperoxalurie primitive ou d'origine entérique, constituant une cohorte totale d'une vingtaine de participants^{220,221}.

Chacune des thérapies alternatives évoquées précédemment a été traitée individuellement ; cependant, il semble raisonnable d'imaginer que, lorsque ces thérapies auront été validées cliniquement pour une utilisation chez les patients, elles pourront être combinées, entre elles et/ou avec le support des mesures conservatives, afin d'obtenir une restauration du métabolisme hépatique du glyoxylate et un maintien de la fonction rénale suffisants pour supplanter toute nécessité de transplantation, y compris chez les phénotypes hyperoxaluriques les plus sévères.

Chapitre 2 :
Développement d'une stratégie de
médecine régénérative
pour le traitement de
l'hyperoxalurie primitive de type 1

Dans le cadre de notre projet de recherche, nous avons envisagé la mise au point d'une approche de médecine régénérative pour le traitement de l'hyperoxalurie primitive de type 1, consistant en la génération d'hépatocytes-*like* autologues génétiquement modifiés. Ce choix fut motivé par la découverte fondamentale des capacités de reprogrammation des cellules somatiques en cellules souches pluripotentes induites, associée aux progrès considérables réalisés ces dernières années dans le développement des outils de thérapie génique.

Dans cette partie, nous nous intéresserons à la génération des cellules souches pluripotentes induites et à leur différenciation en hépatocytes-*like*, puis nous aborderons les approches de modification ciblée du génome étudiées lors de cette thèse.

I- Obtention et différenciation des cellules souches pluripotentes induites

A. Reprogrammation de cellules somatiques différenciées en cellules souches pluripotentes induites

i. Emergence du concept de reprogrammation des cellules somatiques

L'origine de tout être vivant eucaryote multicellulaire correspond à la formation d'un zygote, issu de la fusion de deux gamètes mâle et femelle. Le zygote est une cellule souche « totipotente », possédant un potentiel de division (appelé auto-renouvellement) illimité et capable de se différencier en l'ensemble des cellules de l'organisme. Cette cellule souche est dotée de la faculté de développer à elle seule un organisme entier, ainsi que les annexes embryonnaires nécessaires à la croissance prénatale de ce dernier.

Le développement de l'organisme s'effectue grâce à la division du zygote en cellules filles, qui se spécialisent graduellement en cellules souches pluripotentes, multipotentes et unipotentes, en perdant à chaque étape une partie de leur potentiel de division et de différenciation envers les cellules qui composent les tissus, pour aboutir à une cellule mature totalement différenciée. Dans un contexte physiologique, ce processus de développement est irréversible, ce qui permet de maintenir l'intégrité de l'architecture de l'organisme ; il peut être comparé à une bille dévalant une pente, depuis l'état de cellule souche jusqu'à un stade cellulaire physiologiquement mature, comme cela a été représenté par Conrad Waddington au milieu du vingtième siècle²²² (Figure 23 ; désigné par l'étape de « maturation », sur la figure).

Cependant, le dogme de la linéarité de la spécialisation des cellules souches a été rapidement remis en question, grâce au succès majeur de l'expérience menée par Sir

John B. Gurdon en 1962, correspondant au clonage de l'amphibien *Xenopus laevis* par transfert du noyau d'une cellule somatique différenciée dans un ovocyte énucléé²²³. La naissance du premier mammifère cloné par ce processus à la fin du vingtième siècle, une brebis nommée Dolly, a confirmé que la « programmation » des cellules pouvait être modifiée, y compris chez les mammifères²²⁴.

Les acteurs responsables de la plasticité de la programmation cellulaire, appelés facteurs de transcription (protéines régulatrices de l'expression des gènes), ont été mis en évidence pour la première fois en 1987 par Davis *et al.* au cours d'une expérience de transdifférenciation cellulaire : l'équipe a montré que l'induction de la seule expression du « facteur de différenciation myogénique 1 » était capable de convertir des fibroblastes (cellules principales du tissu conjonctif) en précurseurs des fibres musculaires ou myoblastes stables, exprimant de façon caractéristique la myosine, une protéine nécessaire à la contraction des cellules musculaires²²⁵.

C'est sur la base de ces découvertes que le concept de cellule souche pluripotente induite, détaillé dans la partie suivante, a été développé.

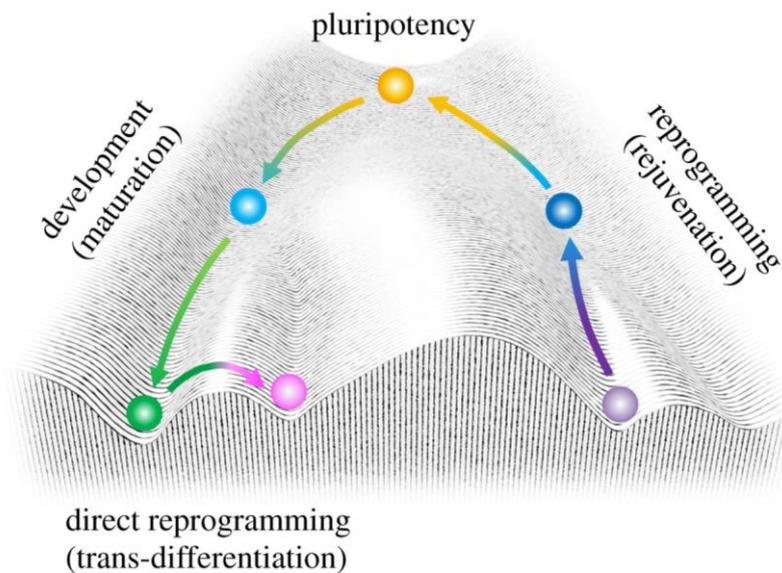


Figure 23. Modification du devenir des cellules au sein du paysage épigénétique de Waddington (d'après Ohnuki and Takahashi, 2015)²²⁶. Les cellules souches pluripotentes (représentées en jaune, au sommet) correspondent à la première étape de spécialisation du zygote. Elles sont présentes uniquement chez l'embryon, et peuvent se différencier en tout type cellulaire d'un organisme (bille verte) *via* un statut intermédiaire de progéniteur (bille bleu clair, à gauche), au cours du développement embryonnaire ou d'un processus de différenciation *in vitro*. La reprogrammation directe, ou transdifférenciation, correspond à la conversion d'une lignée cellulaire différenciée (bille verte) vers une autre lignée (bille rose) grâce à l'induction de l'expression de facteurs de transcription spécifiques de tissus, en outrepassant le statut de progéniteur. Enfin, la reprogrammation (ou rajeunissement cellulaire) correspond à une dédifférenciation de la cellule spécialisée (bille violette) vers un statut de

cellule souche pluripotente, *via* l'implication de progéniteurs (bille bleu foncé, à droite). Cette figure a été adaptée, par ses auteurs, de la représentation originale de Waddington²²².

ii. Génération et culture des cellules souches pluripotentes induites humaines

La mise au point des cellules souches pluripotentes induites (ou *induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs*) tient son origine dans une expérience menée par deux chercheurs, Shinya Yamanaka et Kazutoshi Takahashi, qui ont entrepris d'identifier les gènes impliqués dans le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires murines. Leurs recherches, essentiellement bibliographiques, ont mené à une liste de 24 facteurs de reprogrammation candidats. Ils ont ensuite développé une méthode de criblage afin d'identifier la capacité de ces facteurs, exprimés seuls ou en combinaisons, à induire un statut de pluripotence chez des cellules somatiques différenciées, se manifestant par l'apparition d'une résistance cellulaire à l'antibiotique généticine, également appelé G418²²⁷ (voir Figure 24).

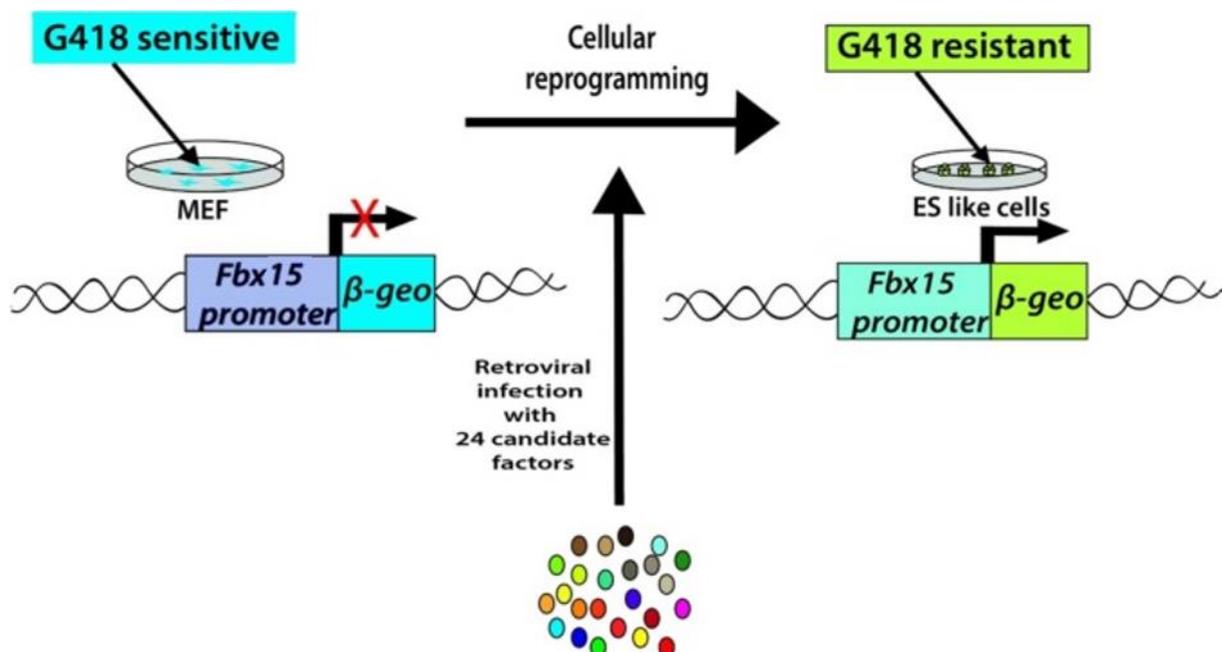


Figure 24. Stratégie de criblage des facteurs de reprogrammation candidats (d'après Omole and Fakoya, 2018)²²⁸. Une cassette de résistance au G418 « β -geo », correspondant à la fusion des gènes de la β -galactosidase et de résistance à la néomycine, a été insérée au sein du gène *Fbx15* de fibroblastes de souris, ce dernier étant spécifiquement exprimé au sein des cellules souches embryonnaires murines et des embryons à un stade de développement précoce. La présence de la construction « *Fbx15 promoter*- β -geo » au sein du génome confère à la cellule correspondante une résistance au G418 dépendante de l'expression du promoteur du gène *Fbx15*, ce qui permet de sélectionner les cellules engagées dans un processus de reprogrammation vers un état de pluripotence. Les facteurs de reprogrammation candidats à l'induction de cet état de pluripotence ont été administrés aux cellules fibroblastiques

différenciées à l'aide de vecteurs oncorétroviraux. Abréviations : MEF, *Mouse Embryonic Fibroblast* ; ES like cell, *Embryonic Stem-like cell*.

Plusieurs séries consécutives de sélection ont permis aux deux chercheurs de mettre en évidence que la combinaison des seuls facteurs Oct3/4, Sox2, KLF4 et c-Myc, couramment appelée OSKM, était suffisante à la reprogrammation de cellules murines différenciées en « cellules souches embryonnaires-*like* », qu'ils ont nommées cellules souches pluripotentes induites. Pour cette découverte, Shinya Yamanaka a reçu en 2012 le Prix Nobel de Physiologie ou Médecine, conjointement à Sir John B. Gurdon. La possibilité de reprogrammation de cellules somatiques humaines par ce processus a été confirmée un an plus tard¹³¹.

La caractérisation des iPSCs générées par les facteurs OSKM a révélé que ces cellules étaient hautement similaires aux cellules souches embryonnaires, en termes de morphologie, capacités de prolifération, profil d'expression génique (dont celui des antigènes de surface cellulaire), statut épigénétique des gènes spécifiquement exprimés par les cellules pluripotentes, activité des télomérases et capacité de différenciation en cellules issues de chacun des trois feuillets embryonnaires (mésoderme, ectoderme et endoderme), cette dernière correspondant au critère le plus significatif de la pluripotence des cellules (voir Figure 25 ; exemple des cellules humaines).

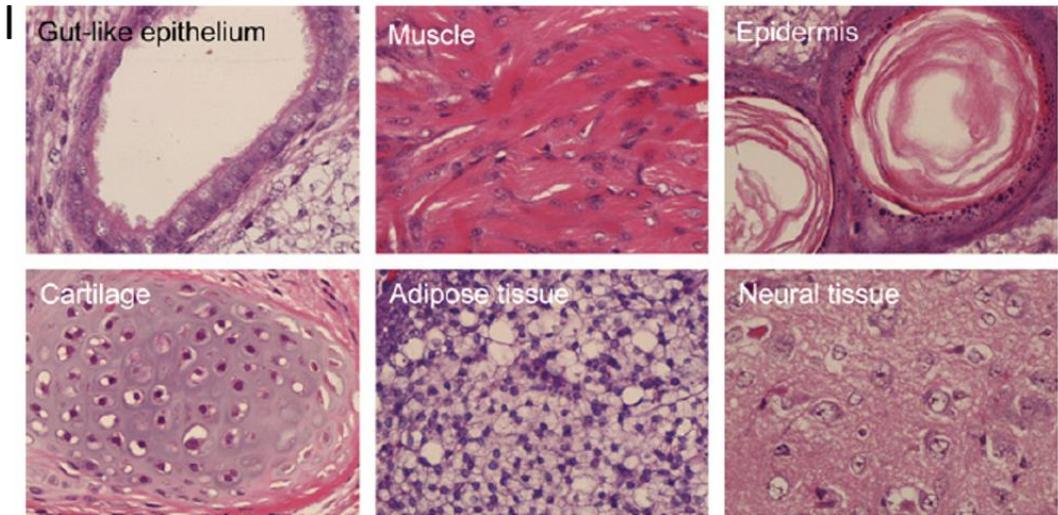
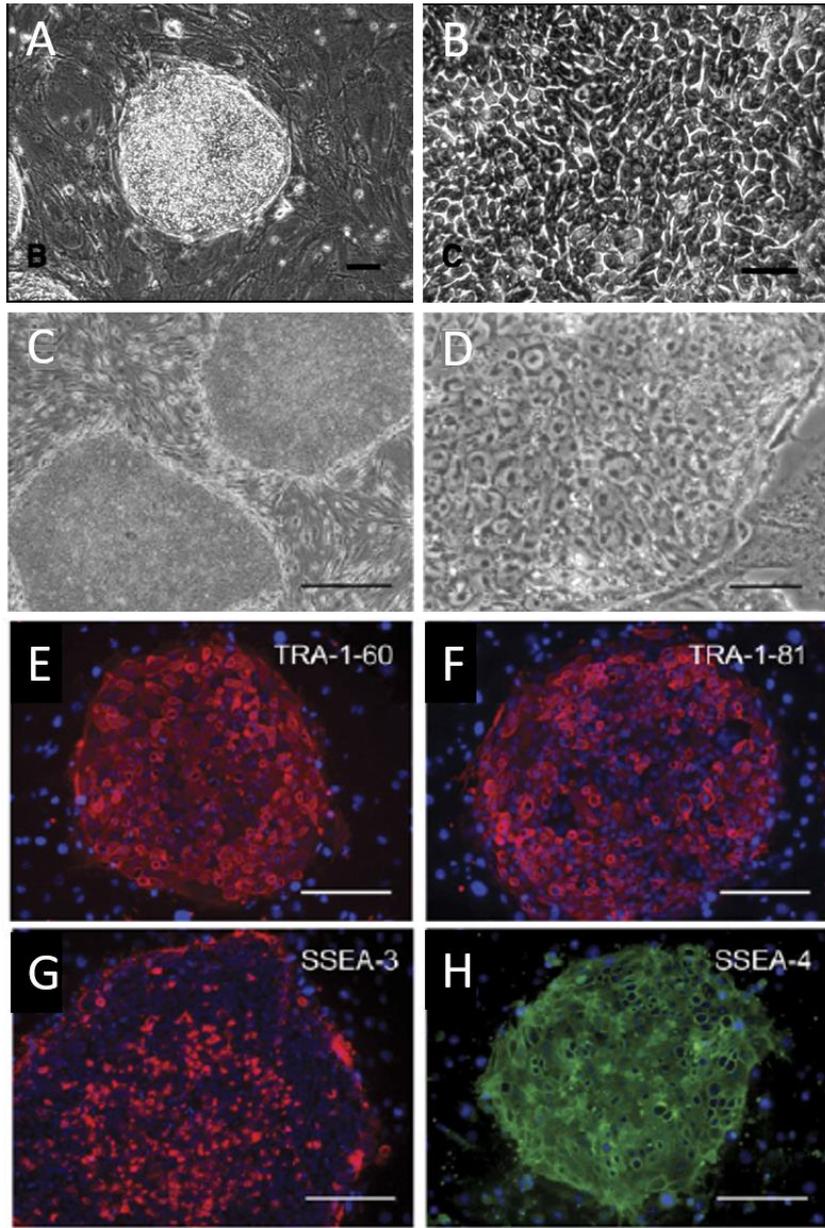


Figure 25. Caractérisation des iPSCs humaines (d'après Takahashi *et al.*, 2007 et Thomson *et al.*, 1998)^{131,229}. (A, B, C et D) Comparaison de la morphologie des iPSCs humaines (C et D) avec celle des cellules souches embryonnaires humaines (A et B). Dans chaque catégorie, les cellules croissent en colonies monocouches à bords définis et lisses (A et C). A plus fort grossissement, on distingue typiquement un large noyau ne laissant place qu'à une faible zone cytoplasmique (B et D). Les cellules situées en arrière-plan correspondent à des fibroblastes embryonnaires murins, qui exercent la fonction de cellules nourricières des cellules pluripotentes cultivées *in vitro*. Barres d'échelle : A = 100 μm , B = 50 μm , C = 200 μm , D = 20 μm . (E, F, G et H) Les iPSCs humaines expriment les marqueurs embryonnaires spécifiques TRA-1-60 et TRA-1-81 (*Keratan Sulphate-Related Antigens*) et SSEA-3 et -4 (*Stage-Specific Embryonic Antigens*). Barres d'échelle = 100 μm . (I) Après injection sous-cutanée au sein de souris immunodéficientes, les iPSCs présentent la capacité de former des tératomes, qui correspondent à des tumeurs bénignes constituées d'un entremêlement anarchique de cellules dérivées des trois feuillettes embryonnaires endoderme (tissu épithélial intestinal), mésoderme (muscle, tissu adipeux et cartilage) et ectoderme (épiderme et tissu neural).

La mise au point des iPSCs a constitué une véritable révolution dans le domaine de la médecine régénérative : ces cellules présentent des capacités de prolifération considérables, elles peuvent être produites de façon autologue (ce qui limite les problèmes immunitaires de compatibilité de greffe et outrepassa la nécessité d'un donneur de cellules) et sont potentiellement capables de se différencier en l'ensemble des cellules constituant les tissus de l'organisme humain. De plus, la technologie iPSC semble universelle, ces cellules pouvant être obtenues chez de nombreuses espèces (humaine¹³¹, murine²²⁷, porcine²³⁰ ou simienne²³¹ par exemple) à partir d'une multitude de cellules différentes telles que les fibroblastes (dans la majorité des cas), mais aussi les lymphocytes B matures, les cellules épithéliales gastriques, les cellules hépatiques, les progéniteurs neuraux, les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules β -pancréatiques et les adipocytes²³²⁻²³⁸.

La généralisation de l'utilisation des iPSCs a cependant nécessité la réalisation d'améliorations du protocole d'obtention initial de ces cellules, qui se heurtait à trois obstacles principaux : une faible efficacité de génération des cellules, correspondant à environ 1 cellule reprogrammée sur 10 000 cellules transduites^{131,227,239,240} ; une forte propension à la tumorigénèse, notamment liée à la surexpression du facteur c-Myc²³⁹ et une faible efficacité de différenciation des cellules iPSCs en cellules somatiques, consécutive à la surexpression à long terme des facteurs de reprogrammation intégrés dans le génome des iPSCs²⁴¹. Ces limitations ont été progressivement surmontées grâce à la modification des méthodes de reprogrammation des cellules, que nous évoquerons dans les paragraphes suivants. Nous nous intéresserons ensuite à l'évolution des protocoles de culture des iPSCs, qui ont également contribué à la diffusion à grande échelle de la technologie.

a. Méthodes de reprogrammation des iPSCs

1. Les facteurs de reprogrammation

La combinaison originale de reprogrammation des cellules somatiques en iPSCs, couramment appelée OSKM, est constituée de facteurs impliqués dans la pluripotence et l'auto-renouvellement des cellules souches embryonnaires. Après une brève présentation de chacun de ces facteurs, nous aborderons les différentes modifications apportées à cette combinaison en vue d'une amélioration du processus de reprogrammation, bien que le standard reste aujourd'hui l'introduction des quatre facteurs de Yamanaka.

Les facteurs Oct3/4 (Octamer-binding transcription factor 4, également appelé POU5F1 pour POU domain, class 5, transcription Factor 1) et Sox2 (SRY [Sex determining Region of Y]-box 2) sont des facteurs clés du développement embryonnaire, et leur expression est critique pour le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires^{242,243}. Oct3/4 et Sox2 présentent notamment la capacité de se complexer pour former des hétérodimères stimulant l'expression du facteur Nanog, par liaison à la séquence ADN de son promoteur²⁴⁴. Ce dernier facteur, bien que non nécessaire à l'initiation du processus de reprogrammation, est indispensable au maintien de la pluripotence des cellules^{245,246}.

KLF4 (Kruppel-like factor 4) est un facteur majeur de l'auto-renouvellement des cellules souches embryonnaires, et il est impliqué dans de nombreux processus tels que le développement, la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaires²⁴⁷. Il est également capable d'interagir avec les complexes Oct3/4-Sox2 pour réguler l'expression d'autres facteurs tels que Lefty1, qui est impliqué dans l'équilibre entre auto-renouvellement et différenciation des cellules souches embryonnaires²⁴⁸.

Le facteur c-Myc, quant à lui, est un proto-oncogène associé à la régulation du cycle cellulaire, de la prolifération et de l'apoptose^{249,250}. Bien que les propriétés catalytiques de ce facteur sur l'efficacité et la vitesse de reprogrammation cellulaire soient reconnues, l'induction de sa surexpression dans les protocoles de génération des iPSCs est controversée à cause de son potentiel oncogénique.

Le remplacement de c-Myc, ainsi que la nécessité d'une amélioration globale de l'efficacité de reprogrammation ont constitué deux moteurs principaux dans l'entreprise d'études destinées à évaluer le potentiel activateur ou inhibiteur de différents facteurs sur la génération des iPSCs (Tableau 5). Ces facteurs, correspondant à des protéines (facteurs de transcription), des ARN non codants et de petites molécules, peuvent être classés en trois catégories en fonction de leur mécanisme d'action : facteurs associés à la pluripotence, régulateurs du cycle cellulaire et modificateurs du statut épigénétique. Des exemples représentatifs de chacune de ces catégories seront proposés dans les paragraphes suivants.

Reprogramming factors	Function	Effect on pluripotency	References
Transcription factors			
Oct4	Maintenance of pluripotency and self-renewal	+	<i>Takahashi et al. (2007)</i>
Sox2	Maintenance of pluripotency and self-renewal	+	<i>Takahashi et al. (2007)</i>
Klf4	Maintenance of pluripotency and self-renewal	+	<i>Dang, Pevsner & Yang (2000), Nakatake et al. (2006) and Guo et al. (2009)</i>
c-Myc	Maintenance of self-renewal	+	<i>Takahashi et al. (2007)</i>
Lin28	Maintenance of pluripotency, translational enhancer, inhibits let7	+	<i>Yu et al. (2007) and Buganim et al. (2012)</i>
Nanog	Maintenance of pluripotency and self-renewal	+	<i>Yu et al. (2007) and Buganim et al. (2012)</i>
Sall4	Maintenance of pluripotency and self-renewal	+	<i>Tsubooka et al. (2009) and Buganim et al. (2012)</i>
Utf1	Maintenance of pluripotency	+	<i>Zhao et al. (2008) and Buganim et al. (2012)</i>
p53	Induces senescence, tumor suppressor	-	<i>Kawamura et al. (2009), Marion et al. (2009), Urikal et al. (2009b), Hong et al. (2009) and Banito et al. (2009)</i>
p21	Induces senescence, tumor suppressor	+	<i>Hong et al. (2009), Banito et al. (2009) and Li et al. (2009a)</i>
MDM2	p53 inhibitor	+	<i>Hong et al. (2009)</i>
REM2	p53 inhibitor	+	<i>Edel et al. (2010)</i>
Cyclin D1	Stimulates E2F/G1-S cell cycle transition	+	<i>Edel et al. (2010)</i>
SV40 large T antigen	Inhibits p53 tumor suppression	+	<i>Mali et al. (2008)</i>
DOT1L	Histone H3K79 methyltransferase	-	<i>Onder et al. (2012)</i>
MBD3	Histone deacetylation, chromatin remodeling	-	<i>Rais et al. (2013)</i>
Sirt6	Chromatin remodeling/ telomere maintenance	+	<i>Sharma et al. (2013)</i>
RCOR2	Facilitates histone demethylation	+	<i>Yang et al. (2011)</i>
Non-coding RNA			
miR367	Inhibits EMT	+	<i>Anokye-Danso et al. (2011)</i>
LincRNA-ROR	Regulates expression of core transcriptional factors	+	<i>Loewer et al. (2010), Wang et al. (2013), Melton, Judson & Blelloch (2010) and Worringer et al. (2014)</i>
miR302	Inhibits EMT/stimulates oct4 expression	+	<i>Anokye-Danso et al. (2011), Lin et al. (2010, 2011) and Subramanyam et al. (2011)</i>
miR766	Inhibits Sirt6	-	<i>Sharma et al. (2013)</i>
miR200c	Inhibits EMT/TGFβ pathway	+	<i>Miyoshi et al. (2011)</i>
miR369	Inhibits EMT/TGFβ pathway	+	<i>Miyoshi et al. (2011)</i>
miR372	Inhibits EMT/TGFβ pathway	+	<i>Subramanyam et al. (2011)</i>
Let7	Regulates expression of core transcriptional factors and prodifferentiaion genes	-	<i>Loewer et al. (2010), Wang et al. (2013), Melton, Judson & Blelloch (2010) and Worringer et al. (2014)</i>
Small molecules			
Vitamin C	Alleviates cell senescence/ antioxidant	+	<i>Wang et al. (2011), Esteban et al. (2010) and Chung et al. (2010)</i>
Valproic acid	Inhibits histone deacetylases	+	<i>Huangfu et al. (2008a)</i>
CHIR99021	GSK3-inhibitor	+	<i>Li et al. (2009b)</i>
Pamate	Lysine-specific demethylase 1 inhibitor	+	<i>Li et al. (2009b)</i>
BIX-01294	Methyltransferase G9a inhibitor	+	<i>Feldman et al. (2006) and Shi et al. (2008)</i>
5-Azacytidine	DNA methyltransferase inhibitor	+	<i>Huangfu et al. (2008a)</i>
Trichostatin A	Inhibits histone deacetylases	+	<i>Huangfu et al. (2008a)</i>

Tableau 5. Evaluation du potentiel d'induction de la reprogrammation chez différents facteurs (d'après Omole and Fakoya, 2018)²²⁸. Les symboles « + » et « - » indiquent respectivement un effet activateur et inhibiteur du facteur correspondant sur la reprogrammation. Abréviations : EMT, transition épithélio-mésenchymateuse ; lincRNA, large ARN non-codant intergénique ; miR, micro RNA.

Facteurs associés à la pluripotence cellulaire

La plupart des facteurs de transcription testés dans la reprogrammation des cellules somatiques, tels que les facteurs originaux Oct3/4 et Sox2, sont associés au maintien de la pluripotence cellulaire et exprimés durant le développement embryonnaire. Il a été montré que l'expression d'autres facteurs de ce type pouvait améliorer l'efficacité de la reprogrammation obtenue avec la combinaison OSKM, et même remplacer certains facteurs de cette combinaison (notamment le facteur c-Myc) dans l'objectif d'améliorer la sécurité du processus.

Il a ainsi été révélé que l'association d'une activation de LincRoR (impliqué dans la régulation de Oct3/4, Nanog et Sox2) et d'une répression de Let7 (inhibiteur des facteurs de reprogrammation c-Myc, Lin28 et Sall4) était bénéfique au processus de génération des iPSCs, et que l'inhibition de Let7 pouvait supplanter efficacement l'expression du facteur c-Myc²⁵¹⁻²⁵³.

De même, il a été mis en évidence que les facteurs Nanog et Lin28 (régulateur post-transcriptionnel de gènes impliqués dans le développement et l'auto-renouvellement des cellules souches embryonnaires) peuvent respectivement se substituer à KLF4 et c-Myc²⁴¹, tandis que l'association des microARNs miR302, miR367, miR369, miR372 et miR200c, qui sont des cibles directes des facteurs Oct3/4 et Sox2, semble capable de remplacer l'intégralité de la combinaison OSKM dans la génération des iPSCs²⁵⁴.

Facteurs régulateurs du cycle cellulaire

Parallèlement à leur engagement vers le stade de pluripotence, les cellules somatiques acquièrent la capacité de proliférer indéfiniment. Cette capacité est inhérente aux iPSCs, et il a été estimé que sa potentialisation pourrait être bénéfique à l'efficacité de la reprogrammation.

Dans cet objectif, un acteur clé de la régulation du cycle cellulaire, le facteur p53, a été particulièrement étudié dans le cadre de la génération des iPSCs. Cette protéine présente un rôle de suppresseur de tumeur, par ses fonctions d'inhibition de la prolifération et de promotion de la sénescence cellulaire (processus de vieillissement physiologique des cellules) ; ceci implique que l'expression de p53 se caractérise par un important effet inhibiteur sur l'efficacité de reprogrammation des cellules somatiques^{255,256}. Plusieurs études de dédifférenciation cellulaire menées en présence d'inhibiteurs de p53 (tels que le large antigène T du virus simien 40, la GTPase Rem2 et l'ubiquitine ligase Mdm2) ont permis de lever cet obstacle, et ont conduit à une

augmentation significative de l'efficacité de la reprogrammation^{255,257,258}. De même, il a été montré que l'association des facteurs OSKM à Nanog et Lin28 permettait une réversion de l'état de sénescence cellulaire induit par p53, s'illustrant par la reprogrammation de fibroblastes humains centenaires ou sénescents en iPSCs pourvues de caractéristiques semblables aux cellules souches embryonnaires humaines²⁵⁹.

Il faut cependant noter que, bien qu'efficace, la régulation à la baisse de la voie p53 peut être associée à une perte de contrôle de la prolifération cellulaire conduisant potentiellement à une transformation tumorale des cellules reprogrammées. Cet aspect est à prendre en considération lors de la mise en œuvre des protocoles de dédifférenciation cellulaire.

Facteurs modificateurs du statut épigénétique

La reprogrammation de cellules somatiques en iPSCs est caractérisée par des modifications épigénétiques affectant le remodelage de la chromatine. Ce dernier étant considéré comme une étape limitante du processus de reprogrammation, la modulation de l'épigénétique à visée de dédifférenciation cellulaire a fait l'objet de nombreuses études.

La méthylation de l'ADN et des histones a notamment été étudiée, et il a été montré qu'une inhibition de ces processus par la 5-azacytidine (pour l'ADN) et la molécule BIX-01294 (pour les histones) favorisait le processus de reprogrammation, le facteur BIX-01294 étant même capable de faciliter la dédifférenciation cellulaire en présence d'Oct3/4 et KLF4 seulement^{260,261}. De même, la vitamine C semble favoriser la génération d'iPSCs en induisant une déméthylation de l'ADN par stimulation de l'activité des histones déméthylases KDM2A et KDM2B^{262,263}.

La modulation de l'acétylation des histones présente également un intérêt, car plusieurs études ont révélé que l'utilisation d'inhibiteurs d'histones désacétylases, tels que la trichostatine A et l'acide valproïque, favorisait la reprogrammation de fibroblastes embryonnaires murins, l'acide valproïque étant même capable de promouvoir la dédifférenciation des cellules en présence d'Oct3/4 et Sox2 seuls^{261,264}.

Outre le type de facteurs utilisés, les vecteurs et la catégorie moléculaire (ADN, ARN, protéine) des facteurs administrés ont profondément évolué, comme nous allons le découvrir dans le chapitre suivant.

2. Les modes d'administration des facteurs de reprogrammation

De nombreuses méthodes ont été utilisées au cours de ces dix dernières années pour introduire les facteurs de reprogrammation au sein des cellules somatiques. Elles peuvent être regroupées en deux catégories en fonction de l'implication ou non d'une

intégration des séquences d'expression des facteurs de reprogrammation exogènes au sein du génome hôte. Il faut noter que l'expression des facteurs exogènes est uniquement nécessaire à l'induction de la dédifférenciation cellulaire ; une fois le stade d'iPSCs atteint, les caractéristiques de pluripotence et d'auto-renouvellement des cellules sont maintenues par l'expression des facteurs endogènes associés à ces fonctions. De ce fait, la plupart des protocoles actuels recommande l'utilisation de méthodes non intégratives d'administration des facteurs, préférables à la sécurité du processus de reprogrammation et à l'efficacité de la différenciation ultérieure des iPSCs.

2.1. Systèmes intégratifs

2.1.1. Approches virales

Les vecteurs oncorétroviraux correspondent aux premiers vecteurs utilisés pour administrer les facteurs de reprogrammation conduisant à la génération des iPSCs^{131,227}, rapidement suivis par l'emploi de vecteurs lentiviraux^{241,265}. Ce sont des systèmes d'administration de transgènes efficaces, mais leur caractère intégratif, qui peut être avantageux dans certains protocoles de thérapie génique, pose deux problèmes majeurs dans le cadre de la reprogrammation cellulaire. Tout d'abord, le caractère aléatoire de leur intégration dans le génome peut conduire à la survenue de mutations insertionnelles qui sont susceptibles d'agir en synergie avec le caractère prolifératif des facteurs de reprogrammation administrés, et conduire à la transformation des cellules souches vers un état tumorigène²³⁹. De plus, il est possible que l'extinction de l'expression des vecteurs, qui s'opère généralement une fois le stade d'iPSCs atteint²⁶⁶, ne soit pas optimale, ce qui rend difficile la différenciation ultérieure des iPSCs vers une lignée somatique déterminée²⁴¹.

Plusieurs modifications ont été apportées à ces systèmes dans l'objectif de réduire les effets délétères de l'intégration des génomes viraux et d'améliorer le contrôle de l'expression des transgènes. Parmi elles, la création de vecteurs oncorétroviraux²⁶⁷ et lentiviraux^{268,269} polycistroniques a permis l'administration de l'ensemble des facteurs de reprogrammation par un seul vecteur (contrairement à l'utilisation initiale d'un type de vecteur par facteur de reprogrammation), ce qui a conduit à une réduction du nombre d'intégrations génomiques nécessaires au processus de reprogrammation, et ainsi à une amélioration de l'efficacité et de la sécurité du processus. De même, l'utilisation de systèmes excisables (tels que Cre/loxP)²⁷⁰ et inductibles (dépendants de l'administration de tétracycline ou de doxycycline)^{271,272} ont permis une meilleure maîtrise de l'expression des transgènes.

2.1.2. Approches non virales

La principale alternative intégrative à l'emploi des vecteurs viraux dans le cadre de la génération des iPSCs consiste à utiliser le système des transposons, qui correspondent à des séquences d'ADN mobiles associées à une enzyme, la transposase, qui est responsable de l'intégration génomique des transposons²⁷³. L'administration des facteurs de reprogrammation par cette approche s'avère efficace, à l'image des taux de 0,02 à 0,05% de reprogrammation rapportés lors de la génération d'iPSCs à partir de fibroblastes humains^{274,275}. En outre, une fois le processus d'induction de la reprogrammation achevé, ce système permet d'exciser les facteurs exogènes et d'éviter ainsi les contraintes de leur expression à long terme. Cependant, il faut noter que l'excision des éléments transposables peut s'avérer imparfaite, en particulier si l'on considère l'utilisation du système *Sleeping Beauty*, qui implique une conversion du site 5'-TA-3' d'intégration en la séquence 5'-TAG(T/A)CTA-3' après excision²⁷⁶.

2.2. Systèmes non intégratifs

2.2.1. Approches virales

En 2008, fut rapportée la première génération d'iPSCs dépourvues de toute intégration transgénique, dérivées de cellules hépatiques murines à l'aide de vecteurs d'expression adénoviraux²⁷⁷ ; l'expérience fut reproduite au sein de fibroblastes humains un an plus tard²⁷⁸. Cependant, l'efficacité de reprogrammation induite par l'utilisation de ces vecteurs s'est révélée faible par rapport à celle des vecteurs viraux intégratifs.

Actuellement, le vecteur viral non intégratif le plus utilisé dans la reprogrammation de cellules somatiques correspond au vecteur Sendaï. Les virus Sendaï (SeV) sont des virus enveloppés non intégratifs appartenant à la famille des *Paramyxoviridae*. Ces virus sont non pathogènes pour l'Homme et ils se caractérisent par un haut niveau d'expression génique et une excellente efficacité d'infection au sein des cellules quiescentes et en division, ce qui les rend particulièrement attractifs en tant que vecteurs de transgènes²⁷³. Le génome des SeV est constitué d'une séquence d'ARN négative monocaténaire linéaire et non segmentée de 15 kb, composée de 6 gènes majeurs (voir figure 26). Trois de ces gènes codent pour les protéines virales nucléoprotéine (NP), phosphoprotéine (P) et large protéine (L) qui forment un complexe ribonucléoprotéique avec l'ARN génomique viral nécessaire à la transcription et à la réplication du génome. La protéine de matrice (M) est responsable de l'assemblage des particules virales, tandis que les deux protéines d'enveloppe hémagglutinine-neuraminidase (HN) et protéine de fusion (F) participent

respectivement à l'attachement cellulaire des virions (*via* une reconnaissance des résidus acides sialiques membranaires) et à la pénétration des complexes ribonucléoprotéiques au sein des cellules infectées. Ce mode d'infection cellulaire confère aux SeV un tropisme cellulaire large, les acides sialiques étant communément exprimés par les cellules mammaliennes²⁷⁹⁻²⁸². La réplication du SeV est indépendante de la fonction nucléaire et s'effectue intégralement dans le cytoplasme cellulaire, sans recourir à une phase génomique d'ADN ; le SeV est donc incapable d'intégrer son information génétique au sein du génome de la cellule hôte^{283,284}.

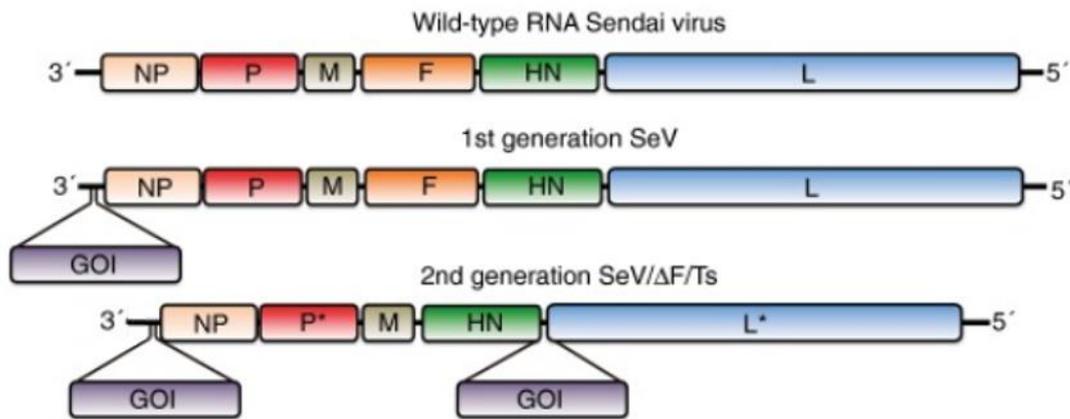


Figure 26. Vectorisation du virus Sendai (d'après Bernal, 2013)²⁷³. Les séquences signalées par le symbole * au sein du vecteur de deuxième génération codent pour des protéines thermosensibles. Abréviations : F, protéine de fusion ; GOI, gène d'intérêt ; HN, hémagglutinine-neuraminidase ; L, large protéine ; M, protéine de matrice ; NP, nucléoprotéine ; P, phosphoprotéine ; SeV, vecteur Sendai ; Ts, thermosensible ; Δ, délétion.

Deux principales générations de vecteurs Sendai ont été développées à partir du virus sauvage (Figure 26).

Dans la première génération, le génome du vecteur correspond en tous points à celui du virus sauvage, à l'exception de l'ajout de la séquence du gène d'intérêt entre l'extrémité 3' du génome et la séquence codant pour la nucléoprotéine. Ces vecteurs se caractérisent par une expression satisfaisante du transgène mais la conservation de leur potentiel infectieux, liée à la présence de l'intégralité du génome viral, expose à des difficultés de contrôle de la multiplication virale et de sécurité du vecteur, bien que le virus sauvage ne soit pas pathogène²⁷³.

Pour surmonter cette limitation, la seconde génération de vecteurs, qui est largement utilisée actuellement, présente deux innovations majeures. Tout d'abord, le génome du vecteur se caractérise par la délétion de la séquence codant pour la protéine de fusion, ce qui entraîne la perte du pouvoir infectieux du vecteur et permet l'ajout d'une seconde séquence transgénique^{283,285}. La seconde innovation consiste en l'introduction de mutations au sein des séquences de la phosphoprotéine et de la large

protéine, ce qui les rend thermosensibles et interfère avec la stabilité des complexes ribonucléoprotéiques et la réplication virale²⁸⁶ : cette astuce permet de faciliter l'élimination cellulaire des vecteurs (qui s'effectue normalement de façon naturelle après plusieurs passages) en cultivant les cellules hôtes pendant quelques jours à une température de 38°C ou 39°C.

Dans le cadre de la génération des iPSCs, la vectorisation des facteurs de reprogrammation à l'aide de Sendai s'est révélée très satisfaisante, permettant la dédifférenciation de divers types cellulaires tels que les fibroblastes, les cellules souches hématopoïétiques CD34+ et les lymphocytes T²⁸⁷⁻²⁸⁹, avec une efficacité pouvant atteindre 1,5% de reprogrammation²⁹⁰.

2.2.2. Approches non virales

L'utilisation de vecteurs à ADN épisomaux non réplicatifs (plasmides ou « minicircles » - vecteurs dérivés de plasmides dont le squelette bactérien a été supprimé -) ou auto-réplicatifs (vecteurs circulaires dérivés du virus Epstein-Barr) a été étudiée en tant qu'alternative non intégrative aux vecteurs viraux. Cependant, quelle que soit leur nature, ces vecteurs nécessitent le plus souvent plusieurs séries de transfection cellulaire pour parvenir à une reprogrammation totale, ce qui peut s'avérer toxique pour les cellules, et leur efficacité de reprogrammation est insatisfaisante (0,0003-0,005%)²⁹¹⁻²⁹⁴.

La capacité de reprogrammation de facteurs administrés sous forme d'ARN messagers a également été étudiée dans l'objectif d'obtenir des iPSCs dénuées de transgène. Pour cela, plusieurs optimisations ont dû être effectuées : (i) l'efficacité de la synthèse des ARNm a été augmentée en employant des ARN polymérases dérivées de bactériophages, telles que la *T7 RNA polymerase*²⁹⁵ ; (ii) la stabilité des molécules et l'efficacité de leur traduction ont été améliorées par l'emploi de séquences 5' cap « non réversibles » (s'insérant systématiquement dans le bon sens sur la molécule d'ARNm)^{296,297} et par les substitutions respectives des bases cytidine et uridine par des molécules de 5-méthylcytidine et de pseudouridine²⁹⁸, ces dernières ayant en outre (iii) la capacité d'inhiber les réactions immunitaires dirigées vers les molécules d'ARNm^{299,300}. Grâce à ces modifications, l'administration de facteurs de reprogrammation sous forme d'ARN messagers s'est révélée très efficace, jusqu'à obtenir 4% de reprogrammation de fibroblastes humains après administration des facteurs Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc et Lin28³⁰¹⁻³⁰³.

Enfin, la transfection directe de facteurs de reprogrammation sous forme protéique a été testée, mais le défi constitué par la synthèse d'importantes quantités de protéines bioactives capables de traverser la membrane plasmique s'est avéré complexe à relever, et seulement de faibles efficacités de reprogrammation (environ 0.001%) ont été rapportées^{304,305}.

Pour résumer cette partie, il semble que les modes d'administration de facteurs de reprogrammation les plus efficaces, en termes d'efficacité de dédifférenciation cellulaire et de sécurité, soient les vecteurs Sendai et l'utilisation d'ARN messagers modifiés, comme cela est illustré dans la figure 27.

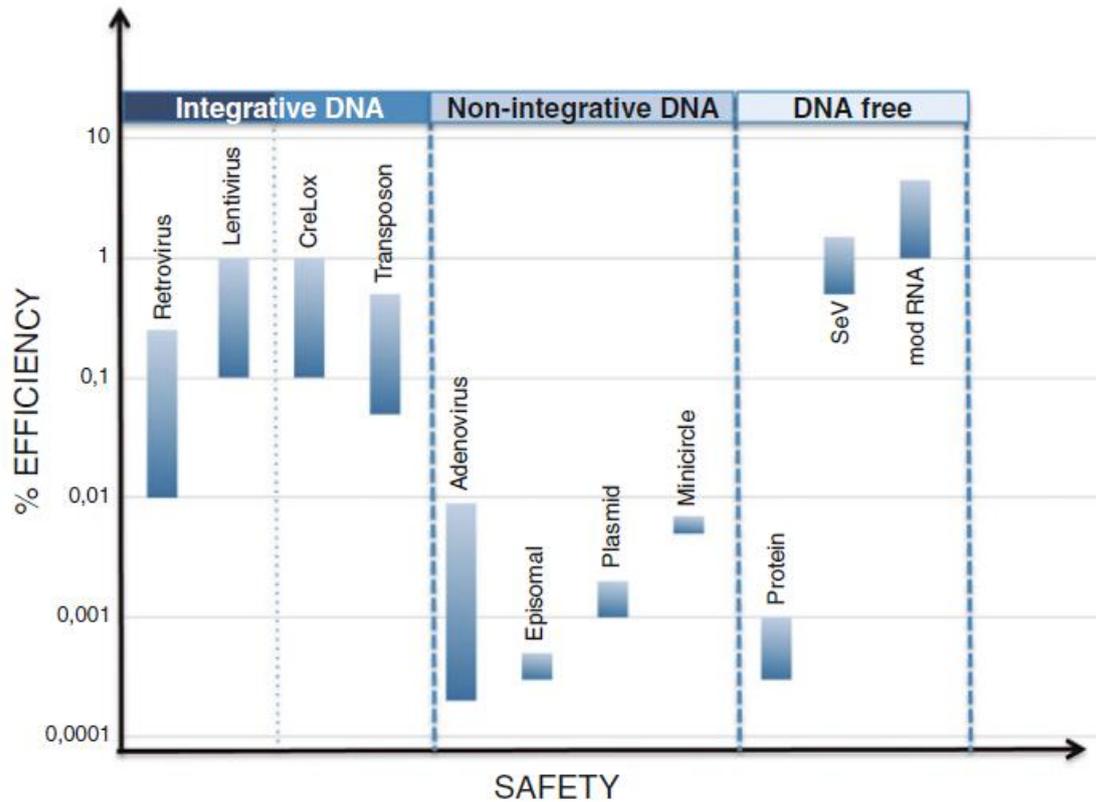


Figure 27. Graphique comparatif de l'efficacité et de la sécurité des méthodes d'administration des facteurs de reprogrammation actuellement disponibles (d'après Bernal, 2013)²⁷³. Les méthodes intégratives, bien qu'efficaces, se caractérisent par une sécurité médiocre, liée notamment au risque de mutagenèse insertionnelle consécutif à leur intégration ; la sécurité peut être légèrement améliorée grâce aux méthodes excisables (système Cre/Lox et transposons). Les techniques non intégratives d'administration des vecteurs sous forme d'ADN présentent une meilleure innocuité que les précédentes, mais leur efficacité est faible. Finalement, le meilleur compromis consiste à utiliser les systèmes de reprogrammation basés sur l'administration de molécules d'ARN, qu'elles soient dérivées de virus (Sendai) ou issues d'une synthèse *in vitro*. Abréviations : modRNA, ARN modifié ; SeV, virus Sendai.

b. Culture des iPSCs

1. Culture des iPSCs en colonies

A l'origine de leur mise au point, les iPSCs humaines étaient cultivées sous forme de colonies se développant sur des cellules nourricières (fibroblastes embryonnaires murins -ou MEFs- traités à la mitomycine C pour inhiber leur prolifération) favorisant le maintien des capacités d'auto-renouvellement et de pluripotence des cellules souches grâce à la sécrétion de facteurs de croissances tels que le *Transforming Growth Factor β* (TGF β), de cytokines (activine A) et de protéines de la matrice extracellulaire (laminine et vitronectine)³⁰⁶. D'autres facteurs, indispensables aux iPSCs et non sécrétés par les MEFs (tels que le facteur de croissance des fibroblastes bFGF) étaient apportés par le milieu de culture.

Cette méthode, bien qu'efficace, présente des inconvénients majeurs. Tout d'abord, l'utilisation de cellules nourricières est une source importante de variabilité des conditions de culture des iPSCs, car elles sécrètent les facteurs et protéines matricielles de façon inconstante³⁰⁷. Ce phénomène est exacerbé par le traitement antiprolifératif des cellules qui induit une apoptose précoce, et qui rend en outre la culture fastidieuse, les MEFs devant être renouvelés régulièrement. De plus, la co-culture des iPSCs et des MEFs rend difficiles le traitement et l'interprétation de résultats d'expériences menées sur les iPSCs, les mécanismes d'absorption et de sécrétion moléculaires des MEFs pouvant interférer avec ceux des cellules souches. Enfin, de façon plus générale, l'utilisation de dérivés animaux en tant que substrats cellulaires et composants du milieu de culture expose à un risque de contamination par des pathogènes (virus, mycoplasmes)^{308,309} et à l'apparition de réactions immunitaires dans la perspective d'une utilisation clinique des iPSCs développées ; elle rend également plus complexe la production à grande échelle des iPSCs, notamment à cause du coût et de la faible reproductibilité des dérivés³¹⁰.

Pour toutes ces raisons, les procédés de génération des iPSCs ont rapidement évolué vers une meilleure définition des composants du microenvironnement, ainsi qu'un abandon progressif de l'emploi de dérivés animaux (Figure 28).

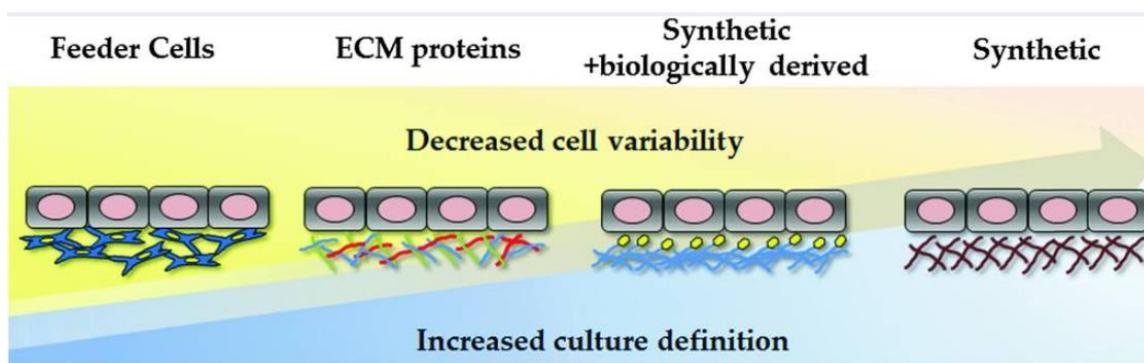


Figure 28. Evolution de la culture des cellules souches pluripotentes induites (d'après Lucendo-Villarin *et al.*, 2016)³¹¹. Les conditions de culture se caractérisent par une définition croissante, délaissant l'utilisation de cellules nourricières animales pour se tourner vers l'emploi de substrats protéiques recombinants ou synthétiques permettant de réduire la variabilité des cellules reprogrammées. Les iPSCs sont illustrées par des cellules rectangulaires grises à noyaux roses, tandis que les MEFs sont représentés par des cellules bleues allongées à noyaux jaunes. Abréviations : ECM, matrice extracellulaire.

La première alternative à la culture d'iPSCs sur cellules nourricières développée correspond à l'utilisation de Matrigel™ associé à un milieu conditionné dérivé de MEFs. Le Matrigel™ est principalement composé de protéines de la matrice extracellulaire telles que la laminine, le collagène de type IV, les protéoglycanes de type héparane sulfate et l'entactine³¹², et il permet de remplacer efficacement la présence des MEFs. Cependant, cette formule est dérivée de sarcomes murins, et est donc sujette à une importante variabilité inter-lots et à un risque d'introduction de contaminants xénogéniques.

L'utilisation de quantités définies de protéines recombinantes, telles que la E-cadhérine³¹³ et la vitronectine³¹⁴ ont constitué un nouveau pas vers la reproductibilité de la culture des iPSCs, jusqu'au développement de l'utilisation de polymères synthétiques (dérivés acryliques et vinyliques) en tant que substrats cellulaires. Ces polymères se caractérisent par une stabilité supérieure (notamment lors des processus de stérilisation) et par un coût de production plus faible que les protéines recombinantes^{315,316}. Cette évolution a été réalisée parallèlement au développement de milieux de culture chimiquement définis et dénués de composés xénogéniques, qui constituent un progrès important vers la compatibilité clinique des systèmes de cultures des iPSCs^{314,317}.

Outre les composants des systèmes de culture, le mode de croissance des iPSCs a également évolué ces dernières années, dans le sens d'une facilitation de la production des cellules à grande échelle. Dans ce registre, nous avons expérimenté, au

cours de cette thèse, la culture des iPSCs sous forme unicellulaire, qui s'avère beaucoup plus simple et reproductible que leur croissance en colonies.

2. Culture unicellulaire

La culture des iPSCs sous forme unicellulaire s'apparente à celle des lignées classiques : les cellules se développent en monocouches homogènes qui se densifient jusqu'à confluence, et peuvent être décollées à l'aide d'une enzyme (la trypsine), mises en suspension etensemencées dans de nouvelles boîtes de culture à la densité souhaitée³¹⁸ (Figure 29). Ce type de pratique est moins fastidieux que le repiquage manuel des iPSCs évoluant en colonies, et sa reproductibilité est supérieure. De plus, les iPSCs obtenues sont plus robustes que les cellules croissant en colonies : elles sont moins enclines à une différenciation spontanée et leur prolifération est régulière et prévisible ; elles semblent donc mieux adaptées à la production de cellules à grande échelle. En outre, il est possible de développer des clones dérivés de cellules isolées dans des puits (procédure difficilement réalisable avec les colonies d'iPSCs), ce qui est très utile au traitement et à la caractérisation des iPSCs dans le cadre de leur utilisation en thérapie génique, par exemple.

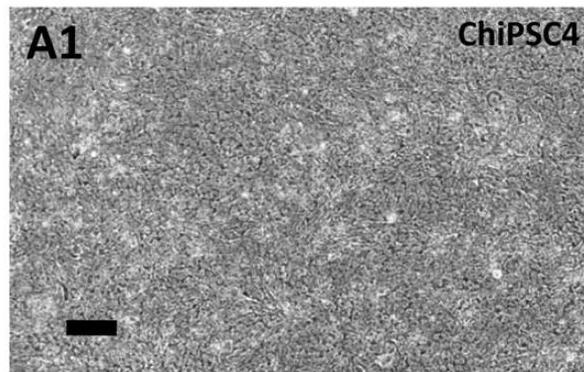


Figure 29. Cellules souches pluripotentes induites dérivées de fibroblastes humains et cultivées selon une procédure unicellulaire (d'après Asplund *et al.*, 2016)³¹⁹. La morphologie des cellules à confluence est identique à celle des iPSCs évoluant en colonies. Barre d'échelle = 100 μ m.

iii. Applications de la technologie iPSC

Depuis sa mise au point en 2006 à partir de fibroblastes murins, la technologie iPSC s'est largement répandue à travers le monde, donnant naissance à des populations reprogrammées à partir d'une multitude de cellules somatiques saines et pathologiques. De nombreuses plateformes sont actuellement en mesure de proposer des services « à façon » de création d'iPSCs pour des laboratoires de recherche et des industriels, notamment en France à Nantes (iPSC Nantes)³²⁰, à Montpellier (SAFE-IPS)³²¹ et à Paris (Imagine)³²². Ces plateformes permettent de faciliter les applications

de la technologie iPSC, qui a atteint le stade du développement clinique depuis quelques années.

Le premier essai clinique impliquant les iPSCs a été réalisé en 2014 au Japon, dans le cadre du traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge, qui correspond à une dégradation d'une partie de la rétine (la macula) pouvant mener à la perte de la vision centrale. L'objectif de cet essai était d'évaluer l'innocuité et la faisabilité d'une implantation de cellules rétinienne dérivées d'iPSCs autologues au niveau de l'épithélium rétinien pigmenté. Le premier patient greffé n'a montré aucun signe de rejet ou d'effet indésirable malgré une absence d'immunosuppression ; cependant, une interruption précoce de l'essai a dû être réalisée au bout de 6 mois, suite à l'identification de mutations génétiques au sein des iPSCs reprogrammées à destination d'un second patient, qui étaient absentes des cellules somatiques parentales de ces iPSCs³²³.

Un nouvel essai est actuellement planifié pour cette même pathologie, en utilisant cette fois des iPSCs allogéniques³²⁴, tandis que l'agence réglementaire des produits de santé japonaise, la PMDA (*Pharmaceuticals and Medical Devices Agency*) a donné son accord pour le lancement de deux autres essais impliquant les iPSCs, à destination du traitement de la maladie de Parkinson³²⁵ et de l'ischémie cardiaque³²⁶.

Dans le cadre de l'application de la technologie iPSC à la médecine régénérative des pathologies hépatiques, qui est l'objet de cette thèse, il est nécessaire de procéder à une différenciation des iPSCs en hépatocytes fonctionnels avant de les administrer chez les patients, pour éviter tout risque de formation de tératome *in vivo*. Nous étudierons dans la partie suivante les techniques de différenciation des iPSCs vers la lignée hépatique, et nous nous intéresserons aux applications des hépatocytes dérivés d'iPSCs.

B. Différenciation des cellules souches pluripotentes induites en « hépatocytes-like »

i. Protocole de différenciation hépatocytaire

Au cours des dix dernières années, de nombreux protocoles ont été établis pour générer des hépatocytes dérivés d'iPSCs, que nous appellerons « HLCs » pour *Hepatocyte-Like Cells*. Les protocoles les plus efficaces correspondent à une reproduction des étapes du développement hépatique embryonnaire, qui consistent en la formation d'un endoderme définitif, suivie par sa spécification vers la lignée hépatique et la formation de progéniteurs hépatocytaires ou hépatoblastes, ces derniers subissant eux-mêmes une dernière étape de maturation en hépatocytes^{327,328}. Comme pour la culture des iPSCs, les deux facteurs à prendre en considération dans

les protocoles de différenciation correspondent aux matrices qui constituent les supports d'attachement des cellules et aux composants du milieu de culture cellulaire.

La première étape de différenciation des iPSCs en HLCs correspond au développement de l'endoderme hépatique, qui s'effectue en deux phases. La première phase consiste à différencier les iPSCs en endoderme définitif, qui représente le précurseur le plus précoce de l'ensemble des organes endodermiques incluant le foie, le pancréas, les poumons, les intestins et la thyroïde. Cette phase de différenciation est réalisée par exposition des iPSCs au bFGF et à deux membres de la famille du TGF β , qui sont l'activine A et le BMP4 (*Bone Morphogenetic Protein 4*), suivie par une supplémentation en activine A seule^{329,330}. Les cellules différenciées en endoderme définitif acquièrent typiquement une morphologie triangulaire, et expriment les marqueurs Sox17 (*SRY [Sex determining Region of Y]-box 17*) et Foxa2 (*Forkhead box A2*)³³¹. L'exposition ultérieure des cellules endodermiques au bFGF et au BMP4 permet dans une seconde phase de spécifier l'endoderme définitif vers la lignée hépatique, ce qui se traduit par l'induction de l'expression du facteur de transcription HNF4 α (*Hepatocyte Nuclear Factor 4-alpha*), qui se maintiendra dans la suite du développement³³².

La seconde étape de différenciation hépatocytaire correspond à la formation des progéniteurs hépatocytaires ou hépatoblastes, grâce à une supplémentation du milieu en facteur de croissance HGF (*Hepatocyte Growth Factor*)^{333,334}. Le marqueur le plus représentatif de cette deuxième étape correspond à l'expression de l'alpha-foetoprotéine (aFP), qui est spécifique des hépatocytes primitifs³³⁵.

La formation des HLCs s'effectue finalement suite à la maturation des progéniteurs hépatocytaires en présence de l'oncostatine M (cytokine appartenant à la famille de l'interleukine-6)³³⁶. A ce stade, les HLCs présentent une morphologie polygonale à bords sillonnés typique des hépatocytes, et acquièrent des fonctions hépatocytaires telles que la synthèse d'albumine, l'assimilation des LDL (*Low Density Lipoprotein*), l'accumulation de glycogène et l'expression de différents isotypes du cytochrome P450³³⁰.

Le protocole décrit ci-dessus est résumé dans la figure 30.

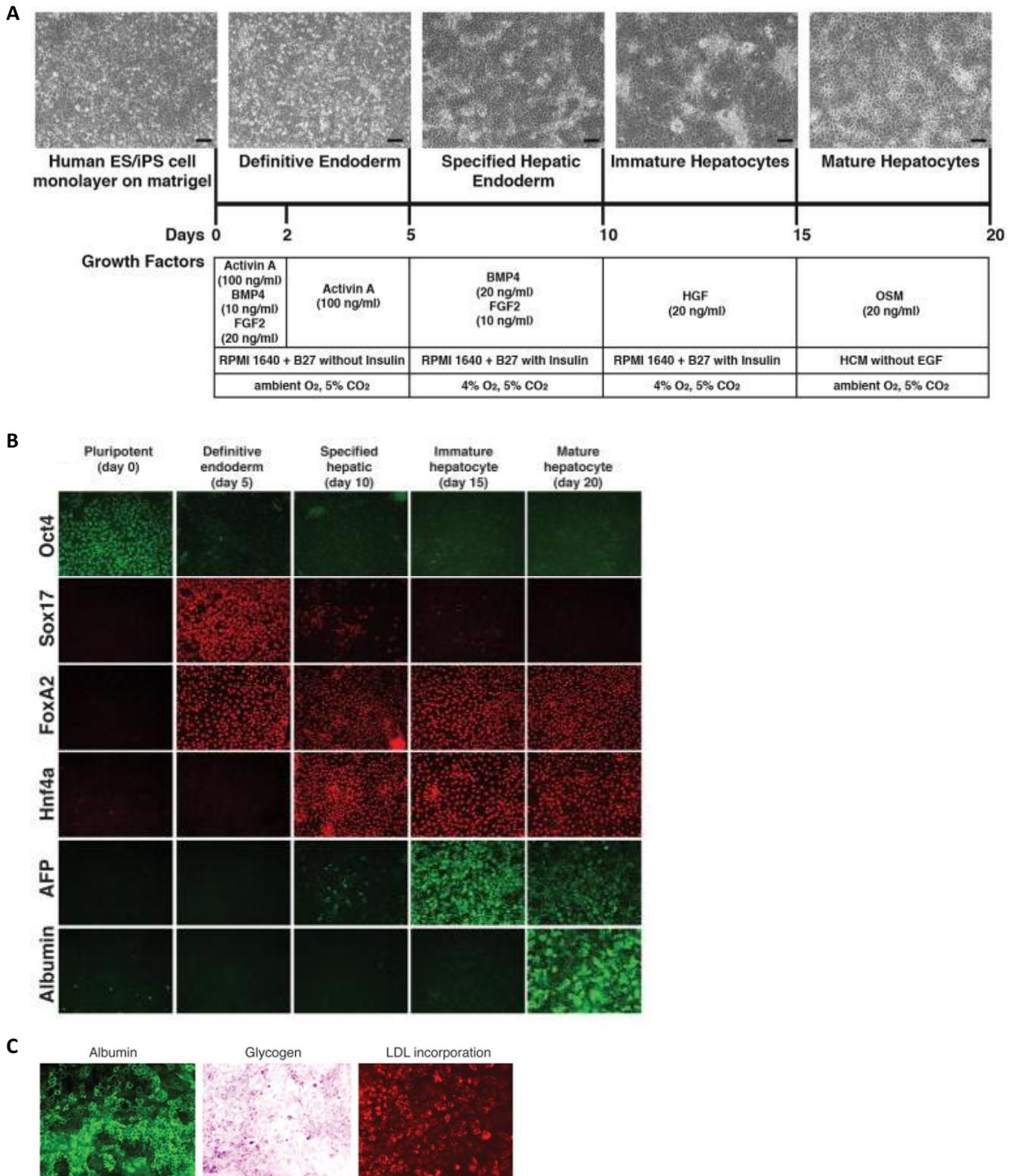


Figure 30. Différenciation hépatocytaire des iPSCs (d'après Rashid *et al.*, 2010 ; Mallanna and Duncan, 2013 et Si-Tayeb *et al.*, 2010)^{330,337,338}. (A) Protocole de différenciation des cellules souches embryonnaires et des iPSCs en HLCs. La différenciation des cellules souches embryonnaires et des iPSCs est ici traitée de façon indifférenciée, et l'on peut considérer que la morphologie des cellules hépatiques obtenues est similaire dans les deux cas. Le protocole indique les différents temps d'exposition aux

cytokines et facteurs de croissance en fonction des étapes de différenciation, ainsi que les milieux de culture appropriés (RPMI ou HCM). Le supplément B27 correspond à un substitut sérique. La culture en milieu hypoxique, bien qu'indiquée dans ce protocole, est rarement pratiquée. Barre d'échelle = 100 µm. (B) Evolution de l'expression des marqueurs cellulaires au cours de la différenciation hépatocytaire d'iPSCs humaines. L'expression du facteur de pluripotence Oct4 laisse place, dès le début de la différenciation, à celle des marqueurs hépatocytaires endodermiques, primitifs puis matures. L'expression des protéines est détectée par immunofluorescence. (C) Les HLCs dérivées de cellules souches pluripotentes induites humaines montrent une activité fonctionnelle caractéristique des hépatocytes primaires humains, incluant la synthèse d'albumine (immunofluorescence), l'accumulation de glycogène (coloration *Periodic Acid Schiff*) et l'assimilation des LDL (incorporation des LDL marquées à la fluorescéine). Abréviations : AFP, *Alpha-FetoProtein* ; BMP4, *Bone Morphogenetic Protein 4* ; EGF, *Epidermal Growth Factor* ; FGF, *Fibroblast Growth Factor* ; Foxa2 (*Forkhead box A2*) ; HCM, *Hepatocyte Culture Medium* ; HGF, *Hepatocyte Growth Factor* ; HNF4α (*Hepatocyte Nuclear Factor 4-alpha*) ; LDL (*Low Density Lipoprotein*) ; Oct4, *Octamer-binding transcription factor 4* ; OSM, *oncostatine M* ; RPMI, *Roswell Park Memorial Institute medium* ; Sox17 (*SRY [Sex determining Region of Y]-box 2*).

En ce qui concerne les matrices de croissance cellulaire, la plupart des protocoles considère l'utilisation de Matrigel^{TM339,340}, bien que l'emploi de composants définis de la matrice extracellulaire tels que le collagène³⁴¹, la laminine³⁴², la fibronectine³⁴³ et la vitronectine modifiée³⁴⁴ se généralise, ces composants étant utilisés seuls ou en combinaison³⁴⁵.

ii. Applications des hépatocytes-like dérivés des iPSCs humaines

Les HLCs constituent potentiellement une source considérable de cellules hépatiques, pouvant être obtenues à partir de profils cellulaires et génétiques variés, et présentant des restrictions éthiques très limitées. L'ensemble de ces caractéristiques avantageuses a conduit la communauté scientifique à envisager l'utilisation des HLCs en tant que (i) plateforme d'étude de la toxicité et de l'efficacité de molécules, à l'échelle de la population humaine ou des patients considérés individuellement dans un contexte de médecine personnalisée, (ii) modèle cellulaire permettant d'accroître notre compréhension des pathologies hépatiques et (iii) source renouvelable de cellules pour la médecine régénérative. Ces trois aspects sont schématisés dans la figure 31, et des exemples d'études réalisées dans chaque domaine seront évoqués dans les chapitres suivants.

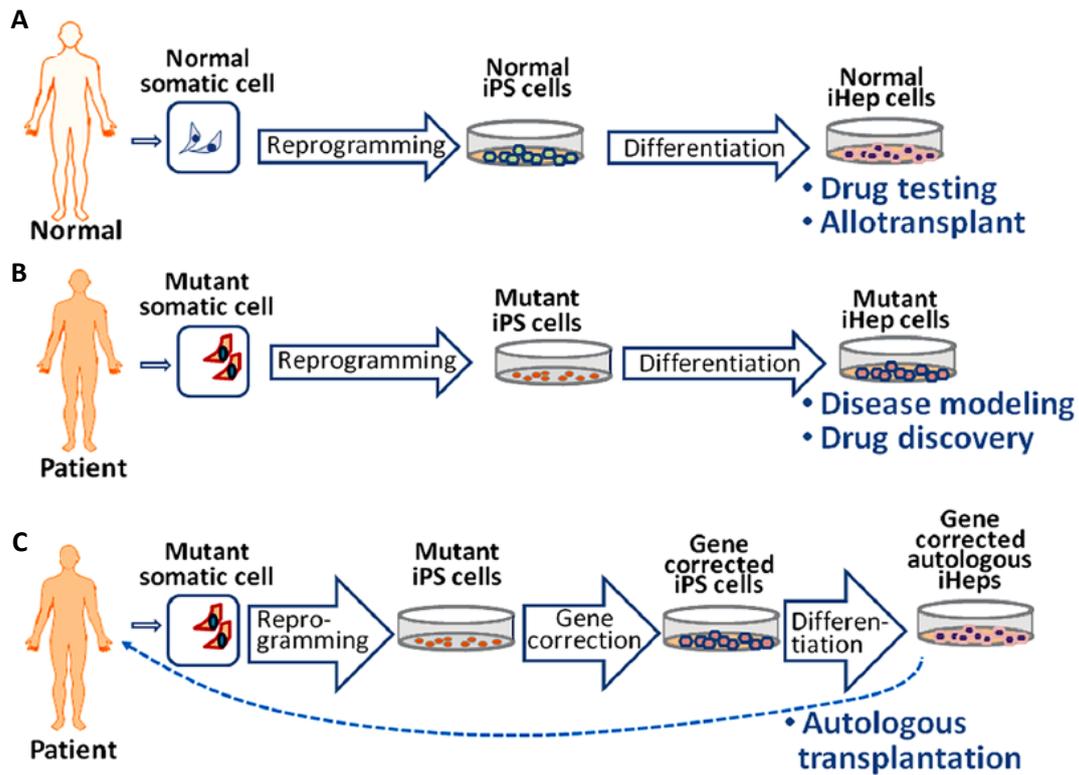


Figure 31. Applications potentielles des hépatocytes-like dérivés de cellules souches pluripotentes induites (Roy-Chowdhury *et al.*, 2017)³⁴⁶. (A) Les cellules somatiques de sujets sains humains peuvent être reprogrammées en iPSCs puis différenciées en hépatocytes induits (iHeps, autre dénomination des HLCs). Après vérification du caractère hépatique de leur profil d'expression génétique et de leurs fonctions, les iHeps sains peuvent être utilisés dans le cadre du criblage de drogue (en particulier dans les études de métabolisme et de toxicité cellulaire des composés) et à des fins de médecine régénérative, dans l'objectif d'une transplantation allogénique de cellules saines à des individus atteints de pathologies hépatiques. (B) Il est envisageable de reprogrammer des cellules somatiques de patients souffrant de pathologies hépatiques d'origine génétique en iPSCs et de les différencier en iHeps également porteurs des mutations morbides. Dans ce cas, les iHeps peuvent servir de modèles cellulaires pour progresser dans la compréhension des mécanismes des pathologies considérées, et constituer une plateforme de criblage utile à la découverte de nouvelles drogues thérapeutiques. (C) Les iPSCs évoquées en (B) peuvent également être corrigées génétiquement puis différenciées en iHeps caractérisés par un phénotype cellulaire sain. Ces derniers peuvent alors être implantés de façon autologue chez le donneur afin de traiter la pathologie hépatique considérée sans avoir recours à un donneur de cellules extérieur.

a. Criblage pharmacologique

1. Etudes métaboliques et de toxicité

Le foie, qui consiste principalement en une population d'hépatocytes, est caractérisé par une concentration en enzymes métaboliques plus importante que les autres organes, ce qui lui confère un rôle central dans le métabolisme des composants

de l'organisme et des xénobiotiques et l'expose donc aux effets néfastes potentiels de ces composés et de leurs métabolites intermédiaires. La faible concordance de résultats existant entre les tests sur modèles animaux et les études cliniques, les capacités métaboliques médiocres des lignées cellulaires dérivées de carcinomes hépatocellulaires (HepG2, Huh7) et la faible disponibilité des hépatocytes primaires ont encouragé les investigateurs à se tourner vers les HLCs en tant que plateforme de criblage pour les études métaboliques et de toxicité.

Plusieurs études de prédictibilité de la toxicité des drogues réalisées dans des HLCs dérivées d'iPSCs humaines ont montré des résultats encourageants. Une étude de toxicité aiguë a ainsi rapporté une classification correcte de 24 drogues hépatotoxiques sur 37 et de 10 drogues non toxiques sur 10 proposées aux cellules³⁴⁷. Des études de toxicité chronique ont également été effectuées, consistant en l'administration à doses répétées pendant 14 jours de quatre composés hépatotoxiques : amiodarone (médicament antiarythmique), aflatoxine b1 (mycotoxine), troglitazone (médicament antidiabétique) et ximelagatran (médicament anticoagulant). Les HLCs ainsi traitées ont manifesté une sensibilité croissante aux trois premiers composés, ce qui s'est traduit par le développement d'une phospholipidose et d'une stéatose (accumulations intracellulaires de lipides) caractéristiques de la toxicité hépatocellulaire³⁴⁸.

Outre la prédiction globale de l'hépatotoxicité des drogues, il a été montré que les HLCs sont capables de refléter les différences interindividuelles du métabolisme. Ce potentiel a été révélé lors d'études menées au sein de HLCs dérivées d'iPSCs elles-mêmes issues d'hépatocytes de patients « faibles métaboliseurs » pour les isotypes 2C9 et 2D6 du CYP450, qui se caractérisent par une activité réduite de ces isotypes suite à un polymorphisme de leur gène de structure. En comparaison des cellules contrôles, les HLCs et les hépatocytes parentaux « faibles métaboliseurs » se sont montrés significativement plus résistants au benzbromarone (médicament hypouricémiant rendu hépatotoxique par métabolisation *via* le CYP2C9) et plus sensibles à la desipramine (médicament antidépresseur hépatotoxique rendu inactif par métabolisation *via* le CYP2D6)³⁴⁹. L'utilisation des HLCs en tant que modèles prédictifs de la sensibilité aux drogues des individus faibles métaboliseurs devrait faciliter la réalisation d'études de toxicité chez ces profils faiblement représentés dans la population, et par conséquent dans les cohortes cliniques, mais qui sont potentiellement plus exposés aux effets néfastes des drogues hépatotoxiques.

2. Etudes de l'efficacité des drogues

Grâce à leur potentiel de modélisation, et selon un rationnel identique à celui des études toxicologiques, les HLCs dérivées de patients malades peuvent être utilisées en tant que plateformes de criblage de l'efficacité de molécules candidates à une application thérapeutique déterminée.

Une étude de ce type a notamment été réalisée en présence de HLCs dérivées de patients atteints du déficit en α 1-antitrypsine, qui se manifeste par une accumulation hépatotoxique de variants mutés de l' α 1-antitrypsine et par des complications pulmonaires liées à la diminution de la concentration plasmatique de la protéine sauvage. Les cellules ont été utilisées en tant que plateforme de criblage à haut débit d'une banque de composés employés en clinique (la *Johns Hopkins Drug Library*), et ont mené à l'identification de cinq composés capables de réduire l'accumulation cellulaire de la protéine α 1-antitrypsine mutée³⁵⁰. Cette technologie a également été employée dans le cadre de l'hypercholestérolémie familiale, une pathologie caractérisée par l'augmentation de la concentration sanguine en particules de LDL (*Low Density Lipoprotein*) véhiculant le cholestérol, qui expose les patients à un risque élevé de lésions coronariennes. Les HLCs dérivées de patients souffrant de cette pathologie ont permis, après exposition à une banque de molécules cliniquement approuvées³⁵¹, d'identifier plusieurs composés permettant de réduire l'accumulation des LDL par diminution de la synthèse hépatocytaire d'une protéine (l'apolipoprotéine B) nécessaire à la formation de leurs précurseurs, les VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*)³⁵².

Dans la perspective d'une médecine personnalisée, il a également été montré que les HLCs étaient capables de reproduire l'influence de l'activité des isotypes du CYP450 sur l'efficacité de prodrogues (substances pharmacologiques nécessitant une modification métabolique pour acquérir leur activité). Une étude menée sur le tamoxifène, médicament anticancéreux dont l'activité dépend de sa conversion en endoxifène par le CYP2D6, a révélé que les hépatocytes primaires de patients faibles métaboliseurs pour le CYP2D6 et les HLCs dérivées de ces cellules convertissaient moins efficacement le médicament que les hépatocytes primaires et HLCs contrôles³⁴⁹. L'emploi des HLCs pourrait donc constituer un intermédiaire bénéfique à l'adaptation des traitements chez les patients, en particulier dans le cas du cancer, dont les solutions thérapeutiques sont caractérisées par une efficacité variable et une toxicité importante.

b. Aide à la compréhension des mécanismes physiopathologiques

Au-delà de leur emploi en tant que plateforme de criblage pharmacologique, les HLCs dérivées de sujets malades offrent l'opportunité d'étudier les mécanismes morbides sous-jacents aux pathologies et de progresser dans la compréhension de leur

survenue et de leur déroulement, pour parvenir potentiellement à l'identification de cibles thérapeutiques.

Cette technologie a été mise à profit dans le cas du déficit en α 1-antitrypsine, dont la présentation phénotypique est variable : les patients porteurs d'une même mutation du gène causal *SERPINA1* peuvent présenter une cirrhose hépatique, un emphysème pulmonaire, une combinaison de ces deux symptômes ou se révéler totalement asymptomatiques. Des études réalisées au sein de HLCs dérivées de cellules de patients souffrant de ce déficit ont permis de mettre en évidence un catabolisme accéléré chez les sujets ne présentant pas d'atteinte hépatique, conduisant à la réduction de l'accumulation de la protéine α 1-antitrypsine mutée³⁵³. Il a donc été envisagé que la modulation de la protéostase cellulaire (équilibre de la synthèse et de la dégradation des protéines) pouvait constituer une cible thérapeutique potentielle pour cette pathologie.

c. Source renouvelable de cellules pour la médecine régénérative

De façon similaire aux applications précédentes, les HLCs ont été envisagées en tant qu'alternatives à l'utilisation des hépatocytes primaires dans les protocoles de médecine régénérative hépatique. L'administration de ces cellules chez les patients peut être réalisée selon un procédé allogénique ou autologue ; ces deux aspects seront discutés dans les chapitres suivants.

1. Transplantation allogénique

La transplantation allogénique de HLCs reproduit la transplantation « classique » d'hépatocytes primaires : elle consiste à greffer des HLCs dérivées de sujets sains chez des patients présentant des anomalies hépatiques. Cette procédure est soumise, comme la transplantation d'hépatocytes, à l'identification de cellules caractérisées par une compatibilité tissulaire avec le receveur, mais cette recherche est facilitée par la possibilité de reprogrammation des iPSCs à partir de cellules somatiques faciles d'accès, telles que les fibroblastes, ce qui élargit l'échantillon des donneurs potentiels. En outre, les capacités prolifératives des iPSCs ont permis la création de banques de cellules présentant un large panel de profils antigéniques, ce qui engendre une réduction du coût et du temps nécessaires à l'obtention de cellules compatibles avec les patients receveurs^{354,355}. De nombreuses banques d'iPSCs sont actuellement en développement à travers le monde, y compris en Europe (*European Bank for induced Pluripotent Stem Cells* et *StemBANCC*), au Japon (*Kyoto University Stem Cell Bank*), au Royaume-Uni (*HipSci*) et aux États-Unis (*Coriell Institute*)³⁵⁶.

En termes d'application, à titre d'exemple, la transplantation allogénique de HLCs humaines saines a été rapportée avec succès chez des rats de type Gunn

modélisant le syndrome de Crigler-Najjar de type 1, chez lesquels la greffe a permis de restaurer l'élimination par excrétion biliaire de dérivés glucuroconjugés de la bilirubine, ce qui s'est traduit par une réduction de 30 à 60% de la concentration sérique de la bilirubine³⁵⁷.

2. Transplantation autologue

La possibilité de reprogrammation et de différenciation de cellules somatiques autologues constitue un avantage considérable de la technologie iPSCs. Elle permet la production de cellules au patrimoine génétique identique à celui du receveur, réduisant ou supprimant ainsi la nécessité d'un traitement immunosuppresseur, et outrepassant toute considération de donneurs compatibles. Il est envisageable que des hépatocytes-*like* sains autologues obtenus par la technologie iPSC puissent être greffés sans autre manipulation chez des individus présentant des lésions hépatiques toxiques ou infectieuses, à condition que l'exposition aux agents morbides soit annihilée avant la greffe. Dans le cadre du traitement de pathologies d'origine génétique, en revanche, il est nécessaire de recourir à une modification du génome des HLCs pour restaurer une expression sauvage des séquences géniques causales des pathologies considérées avant de procéder à la greffe des cellules.

La modification génique de HLCs humaines a été étudiée dans le cadre du traitement de la maladie de Wilson, qui est caractérisée par des lésions hépatiques et cérébrales causées par une accumulation de cuivre dans ces organes, suite à un déficit du gène *ATP7B* codant pour un transporteur hépatocytaire actif du cuivre. Après avoir généré des iPSCs de patients présentant une mutation du gène *ATP7B*, une équipe a montré que l'intégration d'une version sauvage de ce gène au sein des HLCs en différenciation à l'aide d'un vecteur lentiviral (transduction réalisée du 8^e au 11^e jour de différenciation hépatocytaire) permettait de rétablir un transport physiologique du cuivre *in vitro* chez les cellules différenciées³⁵⁸.

D'autres études de ce type ont été réalisées avec des approches de modification génique plus récentes, à destination du traitement du déficit en α 1-antitrypsine : deux équipes ont procédé à une restauration de la séquence sauvage du gène *SERPINA1* dans des iPSCs de patients par correction ponctuelle d'une substitution faux-sens à l'aide des technologies d'édition du génome TALEN (*Transcription Activator-Like Effector Nuclease*)³⁵⁰ et ZFN (*Zinc Finger Nuclease*)³⁵⁹, qui seront détaillées dans la suite du mémoire. Dans chaque cas, la modification réalisée a permis de supprimer la synthèse de l' α 1-antitrypsine mutée et de restaurer une concentration intracellulaire et une sécrétion physiologiques de la protéine sauvage chez les HLCs dérivées des iPSCs. De plus, la transplantation des HLCs différenciées à partir des iPSCs modifiées par les ZFNs au sein de souris immunodéficientes s'est traduite par un maintien de la

sécrétion de l' α 1-antitrypsine pendant une période minimale de 14 jours après la greffe (aucune analyse n'a été réalisée au-delà).

Bien qu'aucune étude clinique impliquant des HLCs dérivées d'iPSCs n'ait pour le moment été autorisée, la démonstration de la fonctionnalité des cellules autologues génétiquement corrigées constitue un pas supplémentaire vers une application de cette technologie chez les patients.

II- Approches de modification ciblée du génome cellulaire

Au cours de cette thèse, nous avons procédé à une modification du génome d'iPSCs dérivées de fibroblastes d'un patient souffrant de PH1, dans l'objectif de restaurer l'expression du gène *AGXT* sauvage au sein d'hépatocytes-like différenciés à partir de ces iPSCs.

Pour cela, nous avons employé deux technologies distinctes : les vecteurs lentiviraux d'une part, dans l'objectif de procéder à une stratégie de thérapie génique additive non ciblée, et le système CRISPR/Cas9 d'autre part, nous permettant de mettre en œuvre des approches ciblées (i) de thérapie génique additive au sein du locus *AAVS1* et (ii) de correction ponctuelle d'une mutation morbide au sein du locus *AGXT*. Les vecteurs lentiviraux ayant été détaillés dans un chapitre précédent, cette partie sera consacrée à la présentation des éléments employés dans la réalisation de nos expériences de thérapie génique ciblée.

A. Les mécanismes de réparation de l'ADN

La modification génique ciblée (également appelée édition du génome) repose sur l'activation des mécanismes cellulaires de réparation des cassures de l'ADN au niveau de sites génomiques déterminés. Ces mécanismes correspondent de façon prépondérante (80 à 90%) à une jonction non homologue des extrémités clivées (NHEJ, *Non-Homologous End-Joining*), et de manière moins fréquente à la voie de la recombinaison homologue (HDR, *Homology-Directed Repair*) (Figure 32).

La réparation par la voie HDR consiste en un échange de séquences d'ADN entre le site génomique à réparer et une matrice d'ADN pourvue de séquences homologues à ce site, de sorte qu'aucune mutation ne soit introduite à l'issue du processus de réparation. Ce phénomène se produit naturellement lors du cycle cellulaire, *via* l'utilisation des chromatides sœurs en tant que matrices de recombinaison³⁶⁰. A la fin du XX^e siècle, des expériences de transgénèse animale ont montré qu'il était possible d'utiliser ce processus de recombinaison pour introduire une séquence d'ADN exogène au sein du génome des cellules de mammifères³⁶¹. Cependant, la fréquence naturelle de ciblage génique par recombinaison homologue, estimée entre 1.10^{-5} et 1.10^{-8} , s'est révélée trop faible pour être compatible avec une application thérapeutique³⁶². Des études plus récentes ont indiqué que cet obstacle pouvait être surmonté par la création d'une coupure double-brin de l'ADN au sein de la région cible de recombinaison, ce processus étant capable d'augmenter plusieurs milliers de fois la fréquence du ciblage, afin d'atteindre des niveaux potentiellement utilisables en thérapeutique^{363,364}.

Le mécanisme de NHEJ, quant à lui, ne nécessite la présence d'aucune matrice, et consiste en une ligation des extrémités clivées de la séquence d'ADN à réparer. De ce fait, contrairement à l'HDR, la réparation par NHEJ peut résulter en la création

d'insertions ou de délétions de l'ADN (l'ensemble étant désigné sous le terme « *indels* »), qui correspondent généralement à des variations de quelques nucléotides³⁶⁵. L'apparition de ces indels est susceptible de conduire à un décalage du cadre de lecture de l'ADN, ainsi qu'à des mutations faux-sens et non-sens de la région codante, le tout pouvant résulter en une inactivation du gène correspondant.

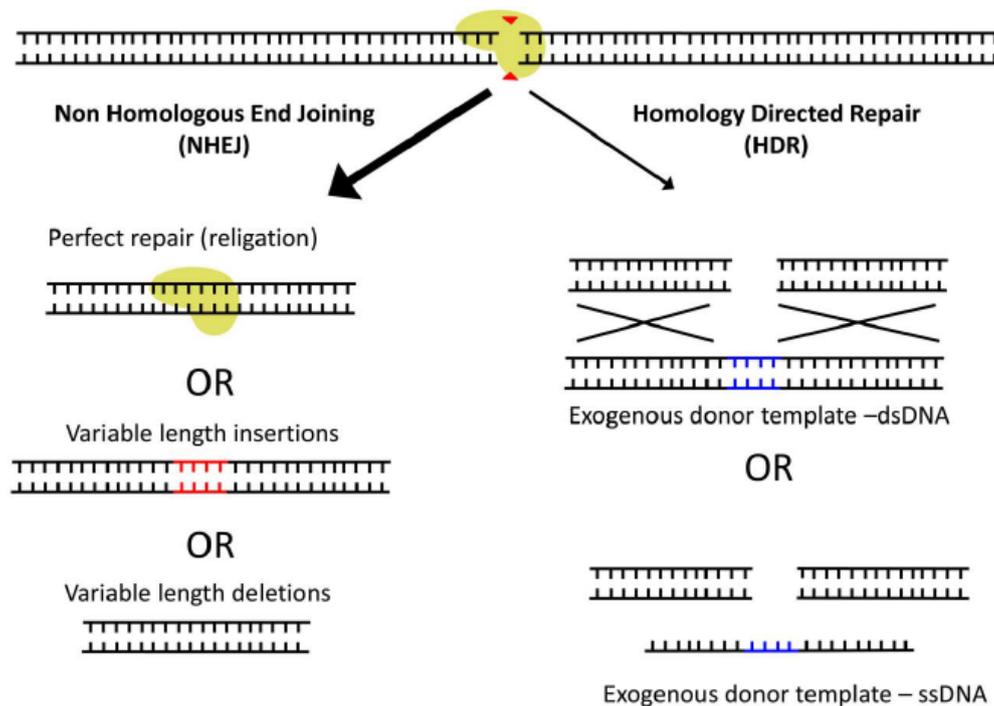


Figure 32. Représentation schématique des mécanismes de réparation des cassures de l'ADN (d'après Pankowicz *et al.*, 2017)³⁶⁶. Après clivage de l'ADN génomique par une nucléase (flèches rouges sur fond jaune), deux voies de réparation se mettent en place : la voie du NHEJ, prépondérante, peut mener à une réparation parfaite de la cassure, ou introduire des insertions ou délétions susceptibles de provoquer une inactivation de gènes ; la voie de l'HDR, moins fréquente, nécessite la présence d'une matrice de recombinaison (endogène ou exogène) afin de procéder à une réparation parfaite de la séquence initiale, ou d'introduire une séquence supplémentaire dans le génome de la cellule (séquence bleue). Si la voie naturelle de l'HDR fait toujours intervenir des matrices d'ADN double-brin, les expériences de recombinaison ont montré qu'il était également possible d'utiliser des matrices exogènes simple-brin, bien que le mécanisme de réparation sous-jacent ne soit pas encore établi avec certitude. Abréviation : dsDNA, ADN double-brin ; ssDNA, ADN simple-brin.

La clé de l'application de ces mécanismes dans le domaine de la thérapie génique a résidé dans le développement de systèmes de clivage de l'ADN capables de réaliser des cassures orientées au sein du génome. La partie suivante proposera une description de ces nucléases en accordant une attention particulière à la technologie CRISPR/Cas9, qui a été utilisée au cours d'expériences menées lors de cette thèse.

B. Systèmes de clivage ciblé de l'ADN

Depuis leur mise au point dans les années 1990, et jusqu'en 2010, les méganucléases (MNs) et les nucléases à doigts de zinc (« *Zinc Finger Nucleases* », ZFNs) ont dominé la sphère de la manipulation génomique ciblée. Les MNs, qui fonctionnent en unités monomériques, ont été développées sur la base de la structure protéique des endonucléases LAGLIDADG (famille d'endonucléases à domaines en hélices α), qui se lient et procèdent au clivage de longues séquences cibles d'ADN formées de 14 à 40 nucléotides³⁶⁷. Les ZFNs correspondent quant à elles à des protéines dimériques, dont chaque monomère consiste en la fusion du domaine catalytique de l'endonucléase de restriction FokI, et de 3 à 6 domaines protéiques en doigt de zinc se liant à l'ADN³⁶⁸.

Ces deux catégories de nucléases ont été employées pour modifier le génome d'une grande variété d'organismes, s'étendant des simples procaryotes aux eucaryotes complexes végétaux et animaux. Il faut également noter que les ZFNs ont permis au domaine de l'édition génomique d'entrer dans l'ère des études cliniques : le premier essai clinique de thérapie génique impliquant des nucléases spécifiques a en effet été mis au point à l'aide de ZFNs, dans l'objectif de créer un système immunitaire résistant à l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine *via* une altération de la séquence génique codant pour le co-récepteur CCR5 du virus. L'étude, publiée en 2014, a fourni des résultats encourageants, en démontrant que l'injection de lymphocytes T CD4⁺ autologues génétiquement modifiés par les ZFNs était sécuritaire et efficace, rendant l'ARN génomique lentiviral indétectable chez 1 patient sur 4 évalués pour ce critère³⁶⁹. Il faut cependant noter que la modulation de la spécificité des MNs et des ZFNs est laborieuse, car elle nécessite une ingénierie protéique complexe basée sur une modélisation *in silico* et/ou sur une sélection *in vitro*³⁷⁰. Ces contraintes ont été progressivement dépassées par l'émergence successive de deux nouvelles technologies d'édition génomique, au début des années 2000.

En 2010, le déchiffrement du code régissant la spécificité de liaison génomique des facteurs protéiques TALEs (*Transcription Activator-Like Effectors*) des bactéries du genre *Xanthomonas* a permis la mise au point d'un nouvel outil protéique d'édition génomique, les TALENs (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*). Comme les ZFNs, les TALENs fonctionnent en dimères, dont chaque sous-unité résulte de la fusion entre le domaine catalytique de l'endonucléase de restriction FokI et une structure de liaison à l'ADN constituée de 15 à 20 modules, chaque module étant composé de 34 acides aminés ; la spécificité de liaison des TALENs à l'ADN est assurée par les acides aminés situés en positions 12 et 13 de chaque module³⁷¹. Ce nouveau type de nucléase spécifique s'est révélé plus simple à développer que les MNs et les ZFNs, et doté d'une efficacité de clivage satisfaisante, ce qui a permis le transfert de son utilisation vers les essais cliniques, notamment dans le cadre d'études de traitements contre le cancer³⁷². Le bel avenir envisagé pour la technologie TALENs dans la sphère de l'édition génique a cependant été rapidement compromis suite à la publication, moins de deux ans après la première mention de l'utilisation des TALENs dans un contexte humain³⁷³, de la mise au point d'un nouvel outil de modification

génique ciblée qui a révolutionné ce domaine par sa simplicité et sa flexibilité : le système CRISPR/Cas9.

C. Le système CRISPR/Cas9

i. Présentation de la technologie et de ses adaptations

Le système CRISPR/Cas9 dérive des découvertes réalisées depuis les années 1980 à propos de l'immunité bactérienne, dont les plus célèbres contributrices sont Jennifer Doudna et Emmanuelle Charpentier, qui ont été les premières à transférer la technologie bactérienne vers l'édition génique ciblée eucaryote. Les CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) correspondent à des segments de séquences d'ADN répétées identifiés dans le génome bactérien ; ils permettent à ces organismes de se protéger contre l'invasion d'acides nucléiques étrangers^{374,375}. En effet, les bactéries présentant un ou plusieurs loci CRISPR répondent à une invasion virale ou plasmidique par l'intégration de petits fragments d'ADN étranger (« *protospacers* ») entre les séquences répétées des CRISPR. Lors d'une seconde introduction de ces mêmes acides nucléiques étrangers au sein de la bactérie, la transcription de la matrice composée des fragments d'ADN exogènes insérés entre les séquences répétées endogènes conduit à la formation de précurseurs de CRISPR RNA, appelé « pré-crRNAs ». Après clivage enzymatique, ces précurseurs deviennent des crRNAs composés d'un fragment « *spacer* » capable de s'hybrider avec les séquences d'ADN à l'origine de la production des crRNAs correspondants^{376,377}. La reconnaissance des séquences exogènes par les spacers entraîne leur clivage par une nucléase de la famille des protéines « Cas » (« *CRISPR-associated protein* », protéines fonctionnant en association avec les crRNAs) et ainsi l'extinction de leur expression³⁷⁸.

Il existe trois types de systèmes CRISPR/Cas. Les types I et III partagent plusieurs caractéristiques : les pré-crRNAs sont transformés en crRNAs par des endonucléases Cas spécialisées et, une fois matures, les copies de crRNAs identiques s'assemblent en un complexe comprenant de multiples protéines Cas, capable de reconnaître et de cliver les séquences d'acides nucléiques complémentaires aux crRNAs. La transformation des pré-crRNAs dans les systèmes de type II s'effectue selon un mécanisme différent, faisant intervenir des ARNs transactivateurs (*transactivating CRISPR RNAs* ou « *tracrRNAs* ») complémentaires des séquences répétées présentes dans les pré-crRNAs (Figure 33). L'hybridation des tracrRNAs avec les pré-crRNAs déclenche la maturation de ces derniers par action de la RNase III, qui est une ribonucléase spécifique de l'ARN double-brin. Il a été montré que le tracrRNA est nécessaire à la liaison de l'ensemble du complexe CRISPR/Cas9 avec l'ADN cible, et à la stimulation de l'activité nucléasique de la Cas9³⁷⁶.

Dans le système de type II dérivé de *Streptococcus pyogenes*, le plus étudié, la spécificité du ciblage de la séquence d'ADN exogène repose en partie sur la reconnaissance du « *Protospacer Adjacent Motif* » (PAM) par le complexe Cas9/crRNA.

Ce motif, qui correspond à la séquence consensus 5'-NGG-3' (avec N = Adénine, Cytosine, Guanine ou Thymine), constitue un élément critique de la liaison initiale du complexe CRISPR/Cas9 à l'ADN cible, et autorise la séparation des brins de la double hélice d'ADN ainsi que l'hybridation du crRNA avec sa cible³⁷⁹⁻³⁸¹. Le clivage double-brin de l'ADN réalisé par la Cas9 s'effectue majoritairement à une position située 3 bases en 5' du PAM, et entraîne la formation d'extrémités franches : le domaine HNH, formé des résidus catalytiques conservés His-Asn-His et d'un site de liaison au zinc (CxxC)₂³⁸², clive le brin complémentaire au crRNA, tandis que le domaine RuvC-like (RuvC : rôle principal de résolution des jonctions de Holliday³⁸³) clive le brin non complémentaire³⁷⁶.

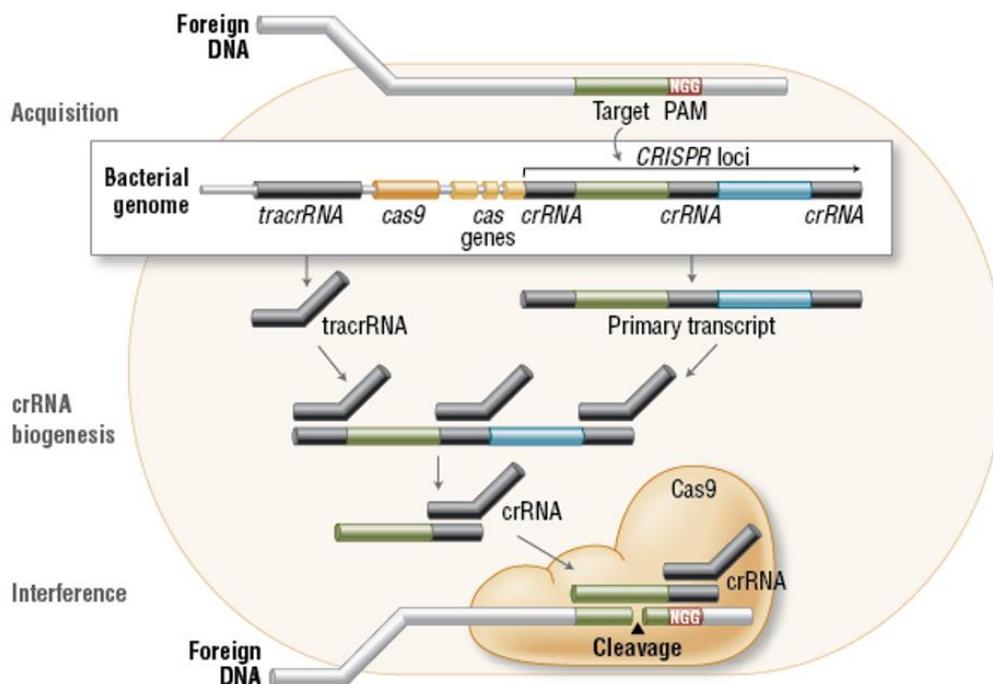


Figure 33. Fonctionnement du système CRISPR/Cas de type II de *Streptococcus pyogenes* (d'après Reis *et al.*, 2014)³⁸⁴. Lors de la phase d'acquisition, l'ADN étranger est incorporé au génome bactérien, au niveau d'un locus CRISPR. Lors d'une seconde introduction de cet ADN étranger au sein de la bactérie, le locus CRISPR est transcrit, et le transcrit primaire obtenu (« pré-crRNA ») est assemblé avec des séquences transactivatrices (« tracrRNA ») avant d'être clivé en crRNA mature. Pendant la phase d'interférence, l'endonucléase Cas9 complexée avec le crRNA et le tracrRNA clive les séquences d'ADN étranger contenant un segment de 20 nucléotides complémentaire au crRNA et adjacent à la séquence PAM. Abréviations : Cas, CRISPR-associated protein ; CRISPR, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats ; crRNA, CRISPR RNA ; PAM, Protospacer Adjacent Motif ; tracrRNA, transactivating CRISPR RNA.

Dans l'objectif d'optimiser son application dans le domaine de la recherche scientifique, le système CRISPR/Cas9 dérivé de *Streptococcus pyogenes* a fait l'objet de plusieurs modifications, concernant à la fois la structure des séquences ARN du complexe et l'activité de la protéine Cas9.

a. Développement d'un ARN guide chimérique

La première adaptation notable du système CRISPR/Cas9 a consisté en une ingénierie de la structure des séquences crRNA et tracrRNA, qui a rendu la technologie extrêmement simple d'utilisation, depuis sa conception jusqu'à son exécution. Il a en effet été montré que la structure secondaire du duplex tracrRNA/crRNA pouvait être modélisée par un ARN simple brin chimérique ou « ARN guide », composé d'une séquence spacer de 20 nucléotides reconnaissant la cible ADN, suivie d'une structure en épingle à cheveux mimant l'interaction du tracrRNA et du crRNA^{376,377}. La seule adaptation du spacer, situé à l'extrémité 5' de l'ARN guide, permet alors de guider la Cas9 vers un site putatif spécifique de clivage, afin de générer des coupures double-brins (Figure 34).

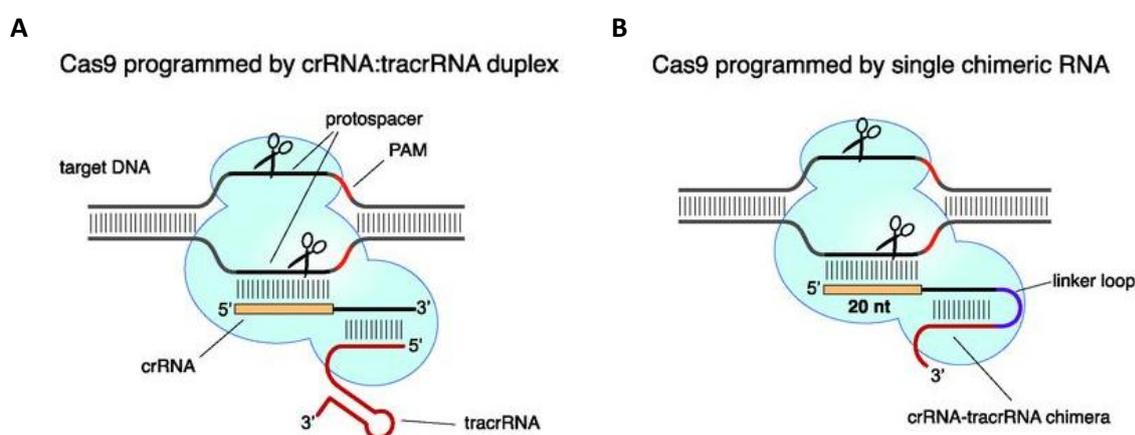


Figure 34. Programmation de la Cas9 par un ARN guide chimérique (d'après Jinek *et al.*, 2012)³⁷⁶. (A) Dans le système CRISPR/Cas9 de type II de *Streptococcus pyogenes*, la Cas9 (forme bleu clair) est guidée par une structure composée du tracrRNA et du crRNA, afin de cliver spécifiquement l'ADN cible. (B) L'association du tracrRNA et du crRNA peut être modélisée et remplacée par une molécule d'ARN simple brin chimérique, générée par fusion des extrémités 3' du crRNA et 5' du tracrRNA à une boucle de liaison intermédiaire (*linker loop*). Abréviations : Cas, *CRISPR-associated protein* ; CRISPR, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* ; crRNA, *CRISPR RNA* ; nt, nucléotide ; PAM, *Protospacer Adjacent Motif* ; tracrRNA, *transactivating CRISPR RNA*.

b. Modification de l'activité de la Cas9

Outre le développement d'ARN guides chimériques, la flexibilité du système CRISPR/Cas9 s'est illustrée par la possibilité de procéder à une ingénierie des domaines de clivage de la Cas9, dans l'objectif d'augmenter la spécificité de la cassure de l'ADN. En effet, bien que très spécifiques, les ARN guides chimériques peuvent tolérer jusqu'à 5 mésappariements de bases nucléotidiques^{385,386}, ce qui peut conduire à une hybridation du système CRISPR/Cas9 et à la génération de modifications au niveau de régions génomiques différentes de la cible. Il a été montré qu'une réduction significative (50 à 1 500 fois) des effets hors cibles était possible en remplaçant la

nucléase Cas9 native par un couple de Cas9 modifiées dont un seul domaine de clivage est fonctionnel, ce qui réduit leur activité à celle de nickases, enzymes responsables de coupures simple-brins de l'ADN^{376,381,387}. Selon le type de modification générée, le clivage réalisé par les Cas9 nickases peut être restreint au brin d'ADN s'hybridant à la région spacer de l'ARN guide (si perte de fonction du domaine RuvC-like par mutation p.Asp10Ala ou D10A ; voir figure 35) ou au brin opposé (si perte de fonction du domaine HNH par mutation p.His840Ala)³⁸⁶. La stœchiométrie de l'association CRISPR/Cas9 étant conservée, le clivage double-brin d'une séquence d'ADN nécessite donc l'hybridation de deux ARN guides au lieu d'un seul, sur des segments différents. Cette stratégie permet de mimer la création d'un clivage double-brin, à condition que les séquences cibles des ARN guides soient espacées d'au maximum 100 pb (la fenêtre optimale ayant été estimée entre -4 et +20 pb)³⁸¹.

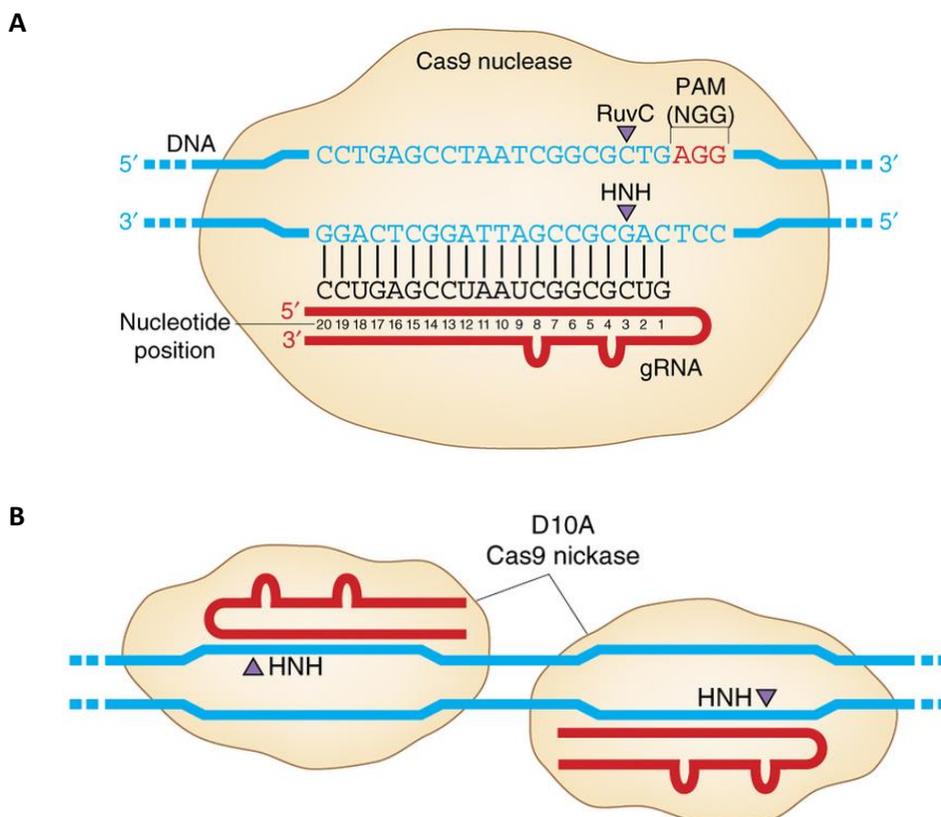


Figure 35. Transformation des nucléases Cas9 en nickases, via la mutation D10A (d'après Sander and Joung, 2014)³⁸⁷. (A) Nucléase Cas9 native, capable de cliver les deux brins d'ADN grâce à ses domaines catalytiques RuvC et HNH, après reconnaissance de la cible par le spacer d'un ARN guide. (B) Cas9 nickases créées par inactivation du domaine RuvC par mutation D10A. L'activité de ces nickases est réduite au clivage exclusif du brin d'ADN cible complémentaire à l'ARN guide, mais le couplage de deux systèmes CRISPR/Cas9 nickase permet la création de coupures double-brins de l'ADN, après reconnaissance de deux sites distincts. Abréviations : Cas, *CRISPR-associated protein* ; CRISPR, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* ; gRNA, ARN guide ; PAM, *Protospacer Adjacent Motif*.

Depuis sa découverte, et grâce à sa simplicité d'utilisation et sa flexibilité, la technologie CRISPR/Cas9 a été largement employée dans le domaine biomédical ; ceci inclut la modélisation et le traitement de pathologies d'origine hépatique, dont nous évoquerons des exemples dans le chapitre suivant.

ii. Applications du système CRISPR/Cas9

A l'image de la fulgurance de la diffusion de la technologie et de sa facilité d'utilisation, après seulement 6 années de développement, plusieurs essais cliniques ont d'ores et déjà été lancés pour tester la sécurité et l'efficacité d'emploi du système CRISPR/Cas9 chez l'Homme, essentiellement en Chine à visée de traitement contre le cancer^{388,389}, mais également pour la première fois en Europe depuis la fin du mois d'août 2018, dans le cadre du développement d'une thérapie pour la β -thalassémie, une pathologie caractérisée par un déficit total ou partiel de la synthèse des chaînes de bêta-globine³⁹⁰. Les applications cliniques de cette technologie se résument pour le moment exclusivement à l'utilisation du mécanisme de NHEJ pour inactiver des séquences cibles, mais de nombreuses études non cliniques impliquant une recombinaison ciblée par la voie HDR sont également en cours. La figure 36 résume les applications potentielles de ces deux mécanismes de réparation, dont nous évoquerons par la suite des exemples dans le cadre de pathologies hépatiques. Les études citées impliquent, sauf mention contraire, la protéine Cas9 nucléase.

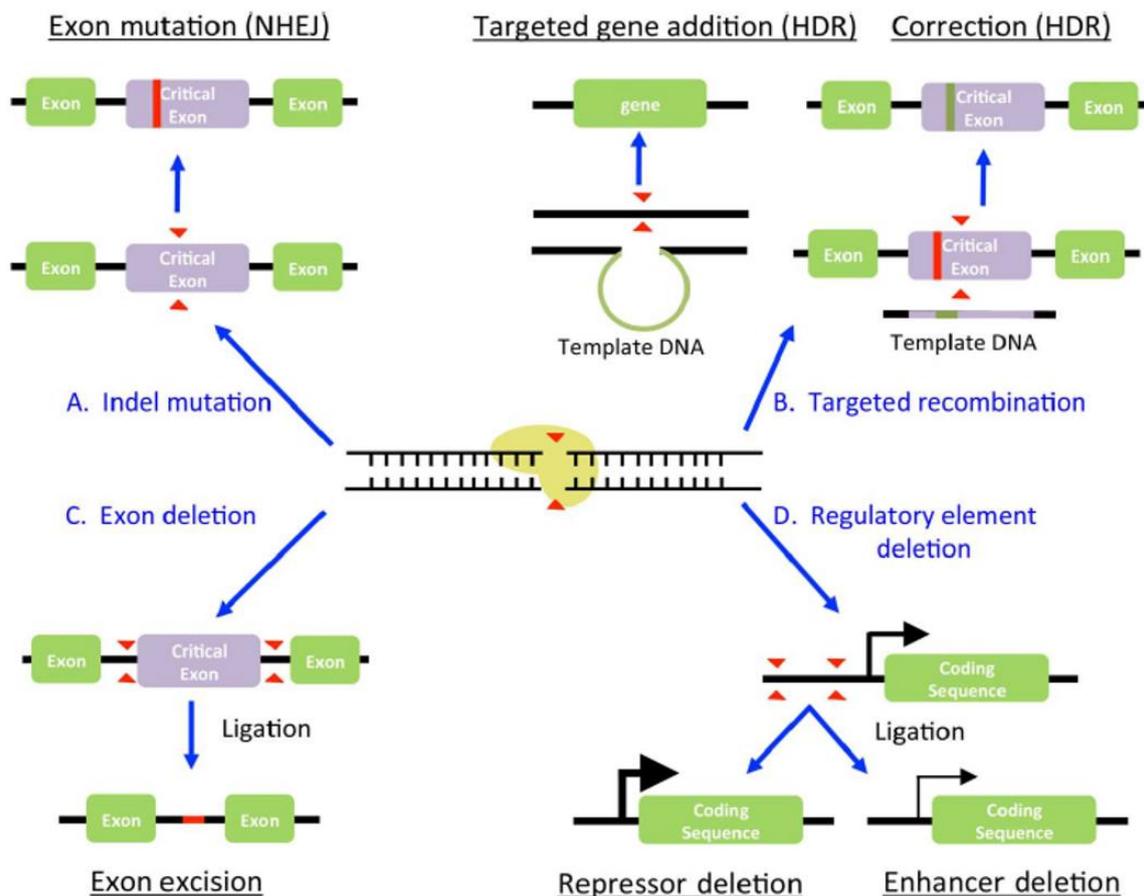


Figure 36. Approches de modification de l'expression génique par la technologie CRISPR/Cas9 (d'après Pankowicz *et al.*, 2017)³⁶⁶. (A) En l'absence d'une matrice de recombinaison, le clivage médié par la nucléase Cas9 peut induire des mutations et ainsi une inactivation du gène cible suite à la réparation de la cassure de l'ADN par le mécanisme NHEJ. (B) En présence d'une matrice de recombinaison, les cassures de l'ADN produites par le système CRISPR/Cas9 peuvent être réparées par la voie de l'HDR, permettant ainsi la correction d'une mutation ou l'intégration d'une séquence supplémentaire dans le génome de la cellule hôte. (C) et (D) Lors de l'utilisation de plusieurs ARN guides ciblant une même région génique, il est possible de procéder à une excision des séquences encadrées par les cassures de l'ADN, telles que des exons (C) ou des séquences régulatrices (D). Abréviations : HDR, *Homology-Directed Repair* ; NHEJ, *Non-Homologous End-Joining*.

a. Inactivation et délétion géniques

L'induction du mécanisme de NHEJ par clivage ciblé de l'ADN est très utilisée pour modéliser et/ou traiter des pathologies d'origine génétique. L'une des affections les plus étudiées correspond à l'hypercholestérolémie autosomale dominante, qui est liée à un gain de fonction de la *Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9* (PCSK9), suite à une mutation du gène du même nom. La surexpression de cette protéine entraîne une diminution de l'internalisation hépatocytaire des LDL, ce qui conduit à une hypercholestérolémie pouvant aboutir à des complications cardiaques³⁹¹. Plusieurs études thérapeutiques d'inactivation de ce gène ont été réalisées *in vivo* chez

la souris, *via* l'administration de systèmes CRISPR/Cas9 nucléases dérivés de *Streptococcus pyogenes*³⁹² (vecteur adénoviral), *Staphylococcus aureus*³⁹³ (vecteur AAV) et *Neisseria meningitidis*³⁹⁴ (vecteur AAV), les deux derniers systèmes se distinguant de celui de *S. pyogenes* par une séquence d'expression de la Cas9 plus courte et la reconnaissance d'un PAM différent. Ces approches ont permis d'introduire des indels au niveau du gène *Pcsk9* murin dans des proportions de 35 à 50% des hépatocytes, ce qui s'est traduit par une diminution significative du taux de cholestérol plasmatique chez les souris traitées.

Le système CRISPR/Cas9 a également été utilisé pour modéliser et traiter l'hypercholestérolémie familiale, qui est consécutive à la perte de fonction du récepteur aux LDL (gène *LDLR*), et la tyrosinémie héréditaire de type 1, qui se caractérise par une accumulation toxique des catabolites de la tyrosine dans le foie suite à une mutation du gène de structure de la fumarylacétoacétate hydrolase (*FAH*). Dans le premier cas, l'administration *in vivo* chez la souris du système CRISPR/Cas9 ciblant le gène *Ldlr* à l'aide d'un vecteur AAV s'est traduite par l'inactivation génique de 50% des hépatocytes murins, résultant en la création d'un modèle murin d'hypercholestérolémie familiale caractérisé par une importante hypercholestérolémie et la formation de plaques d'athéromes³⁹⁵. Les auteurs ont ensuite procédé à la restauration d'un phénotype sain chez ce modèle par inactivation du gène de structure de l'apolipoprotéine B, une protéine indispensable à la structure des précurseurs des LDL. La tyrosinémie héréditaire de type 1, quant à elle, a été modélisée après microinjection du système CRISPR/Cas9 (sous forme de séquences d'ARN) dirigé contre le gène *Fah* au sein de zygotes de rats³⁹⁶. Les animaux ayant résulté de ce traitement se sont caractérisés par le développement de la symptomatologie typique de la pathologie chez les êtres humains, incluant une hypertyrosinémie, une insuffisance hépatique et des lésions rénales tubulaires, ainsi qu'une cirrhose et une fibrose hépatiques qu'aucun autre modèle animal n'avait jusque-là réussi à reproduire. L'approche CRISPR/Cas9 a également été utilisée pour traiter un modèle de souris *Fah*^{-/-} par injection d'un important volume de solution véhiculant des plasmides d'expression du système CRISPR/Cas9 dans la veine de la queue des animaux (technique de l'injection hydrodynamique dans la veine de la queue ou HTVI)³⁹⁷. Lors de cette étude, une combinaison de plusieurs ARN guides a été utilisée pour « rerouter » la voie métabolique déficiente par délétion de plusieurs exons du gène de structure de l'hydroxyphénylpyruvate dioxygénase, une enzyme située en amont de la fumarylacétoacétate hydrolase dans le catabolisme de la tyrosine, ce qui s'est traduit par la restauration d'un phénotype asymptomatique chez les souris.

b. Intégration de séquences

1. Intégration ciblée de séquences additionnelles

Cette approche consiste en l'intégration de la cassette d'expression d'un transgène thérapeutique au sein d'un locus cible, après clivage de ce locus par le système CRISPR/Cas9. Outre le « gène médicament », les cassettes sont généralement composées d'un promoteur responsable de la régulation de l'expression de ce gène, et de systèmes de sélection permettant d'enrichir la population des cellules recombinées.

La plupart des approches de ce type ciblent des régions génomiques considérées comme « sécuritaires », qui peuvent supporter l'intégration et l'expression d'un transgène en minimisant les risques d'interactions avec le génome des cellules hôtes. Parmi les régions les plus étudiées de cette catégorie, nous pouvons citer le gène de structure du corécepteur CCR5 du VIH-1, le site humain orthologue au locus murin *Rosa26* et le locus *AAVS1*³⁹⁸. Ce dernier, utilisé comme cible de thérapie génique additive dans le cadre de la présente thèse, se caractérise par une expression constitutive au sein de multiples cellules primaires et lignées (dont les iPSCs humaines)³⁹⁹, qui est isolée du reste du génome par la présence de séquences insultrices⁴⁰⁰ ; l'inactivation du gène *PPP1R12C* n'est en outre reliée à aucun phénotype pathologique connu⁴⁰¹. A titre d'exemple, le ciblage du locus *AAVS1* par le système CRISPR/Cas9 a été utilisé pour intégrer le gène *F9* dans le génome d'iPSCs issues de patients souffrant d'hémophilie B : après différenciation hépatocytaire, les HLCs dérivées de ces iPSCs se sont caractérisées par une augmentation significative de l'expression et de l'activité du facteur IX *in vitro* et *in vivo* après transplantation chez des souris immunodéficientes, par rapport aux contrôles non génétiquement modifiés⁴⁰².

Une autre stratégie de thérapie génique additive très pratiquée consiste à cibler des régions génomiques dont l'inactivation, suite à l'intégration du transgène thérapeutique, constitue un moyen de sélection des cellules recombinées. Cette stratégie a notamment été étudiée dans le traitement du déficit en arginase, qui correspond à un trouble du cycle de l'urée consécutif à une mutation du gène de structure de l'arginase 1 (*Arg1*) : dans cette expérience, les auteurs ont procédé à une intégration du gène *Arg1* au sein du locus du gène *HPRT* (*Hypoxanthine-guanine PhosphoRibosylTransférase*) d'iPSCs de patients déficitaires en arginase 1. L'inactivation de ce locus a permis une sélection positive des cellules recombinées *via* l'acquisition d'une résistance à l'administration de 6-thioguanine, tandis que l'expression du gène *Arg1* s'est illustrée par une restauration de l'activité de l'arginase 1 et du cycle de l'urée au sein des hépatocytes-*like* dérivés des iPSCs recombinées⁴⁰³.

Ce type d'intégration est très efficace, notamment grâce à la possibilité de sélection des cellules recombinées, et universel, car il est indépendant des mutations

portées par les patients. Cependant, il se caractérise par l'addition de séquences exogènes pouvant perturber le fonctionnement des cellules, et implique une régulation de l'expression du transgène rarement identique à la régulation physiologique. Ces limitations peuvent être dépassées par la réalisation de remplacements ponctuels de nucléotides dans le génome.

2. Modifications ponctuelles de nucléotides

Cette méthode consiste à intégrer un court fragment d'ADN exogène à l'exact emplacement de son homologue dans le génome, après clivage de ce site par le système CRISPR/Cas9. Dans ce cas, la matrice de recombinaison est généralement constituée d'une séquence polynucléotidique simple brin d'une longueur de 100 à 200 nucléotides. Cette façon de procéder permet d'aboutir à une expression physiologique de la séquence recombinée, mais l'absence d'un avantage sélectif apporté par la matrice complexifie l'identification des cellules corrigées.

Ce processus de correction a été étudié dans la modélisation et le traitement de l'hémophilie B chez la souris : après introduction d'une mutation ponctuelle du gène *F9* dans le zygote de souris par microinjection des ARN guides, polynucléotides de recombinaison et Cas9 (sous forme ARNm), le phénotype des souris obtenues, caractérisé par une diminution significative de l'activité du facteur IX, a été restauré *in vivo* par injection hydrodynamique (HTVI) de plasmides d'expression du système CRISPR/Cas9 et d'une matrice de recombinaison double-brin ou simple-brin conduisant respectivement à une correction de 1,5 et 0,56% des hépatocytes⁴⁰⁴.

Plusieurs expériences de correction ponctuelle ont également été menées *in vivo* chez un modèle murin de tyrosinémie héréditaire de type 1 : il a été montré que l'administration par HTVI de plasmides d'expression CRISPR/Cas9 associés à des polynucléotides de recombinaison d'une part⁴⁰⁵, et l'administration intraveineuse de particules lipidiques véhiculant l'ARNm Cas9 associées à des vecteurs AAV exprimant les ARN guides et la matrice de recombinaison d'autre part⁴⁰⁶, permet d'obtenir une correction de la mutation ciblée chez 0,4% et 6% des hépatocytes murins respectivement, ce qui est suffisant pour rétablir un phénotype sauvage chez les souris. Ce résultat s'explique notamment par l'avantage sélectif que confère la correction de la mutation aux hépatocytes traités, favorisant ainsi le repeuplement du foie des animaux par ces cellules.

L'approche de modification ponctuelle de nucléotides a également été appliquée aux iPSCs dans le traitement de l'hypercholestérolémie familiale, par exemple⁴⁰⁷. Une délétion de 3 pb présente dans le gène *LDLR* a ainsi pu être corrigée au sein du génome d'iPSCs de patients après transfection de plasmides d'expression du système CRISPR/Cas9 nickase et d'une matrice polynucléotidique simple brin homologue à la région mutée. La correction a permis de restaurer l'expression du

récepteur aux LDL et la capacité d'internalisation de ces particules chez les HLCs différenciées à partir des iPSCs génétiquement modifiées.

L'application de la thérapie génique médiée par le système CRISPR/Cas9, et par les vecteurs lentiviraux, au traitement de l'hyperoxalurie primitive de type 1 sera quant à elle décrite dans la partie suivante de cette thèse.

RESULTATS

Présentation générale

Au cours de cette thèse, je me suis intéressée au développement de plusieurs approches thérapeutiques de médecine régénérative pour les patients atteints d'hyperoxalurie primitive de type 1, une pathologie héréditaire rare du métabolisme hépatique consécutive au déficit fonctionnel de l'alanine:glyoxylate aminotransférase, une enzyme spécifique du peroxyosome des hépatocytes humains codée par le gène *AGXT*. Ce déficit implique la surproduction hépatique et l'accumulation toxique d'un produit terminal du métabolisme, l'oxalate, susceptible de causer des dommages rénaux irréversibles pouvant évoluer vers une atteinte systémique lorsque l'élimination rénale n'est plus assurée. Le seul traitement curatif de cette pathologie consiste actuellement en une transplantation hépatique limitée par la disponibilité des greffons et par les comorbidités associées à la prise d'un traitement immunosuppresseur au long cours. Il est donc nécessaire de développer des thérapies alternatives pour élargir l'offre médicale destinée aux patients et proposer des traitements caractérisés par un ratio bénéfice/risque plus avantageux.

Le traitement définitif de l'hyperoxalurie primitive de type 1 implique une restauration de la voie métabolique du glyoxylate au sein des hépatocytes. Nous avons, dans le cadre de ce projet de recherche, choisi de cibler directement le gène *AGXT* causal dans une approche de thérapie génique *ex vivo*, qui s'avère mieux contrôlable et ainsi plus sécuritaire que les protocoles *in vivo*. Le développement d'une thérapie *ex vivo* nécessite cependant la manipulation de cellules *in vitro*, qui est difficilement compatible avec l'instabilité phénotypique des hépatocytes primaires en culture. Pour surmonter cet obstacle, nous avons choisi d'utiliser la technologie des cellules souches pluripotentes induites ou iPSCs qui, outre la possibilité d'être générées de manière autologue, présentent un potentiel de prolifération considérable et la capacité de se différencier en l'ensemble des tissus de l'organisme. L'objectif des travaux réalisés pendant ma thèse a consisté en la mise au point d'hépatocytes-*like* autologues à un patient atteint de PH1, dérivés de cellules souches pluripotentes induites génétiquement modifiées pour permettre l'expression d'une version sauvage de l'enzyme alanine:glyoxylate aminotransférase. Le patient donneur des cellules à l'origine de notre étude, âgé de 24 ans, présente un génotype homozygote pour la mutation c.731T>C du gène *AGXT* (correspondant au variant p.Ile244Thr de la protéine AGT), qui est associé à l'haplotype mineur du gène. Le phénotype hyperoxalorique présenté par ce patient est modéré : après plusieurs crises de coliques néphrétiques ayant nécessité une exérèse des calculs rénaux dans son enfance, la fonction rénale du patient est actuellement stabilisée à l'aide d'un traitement conservateur.

Un schéma récapitulatif de l'ensemble des travaux réalisés pendant la thèse est proposé ci-dessous ; chaque projet représenté sera détaillé dans la suite du mémoire.

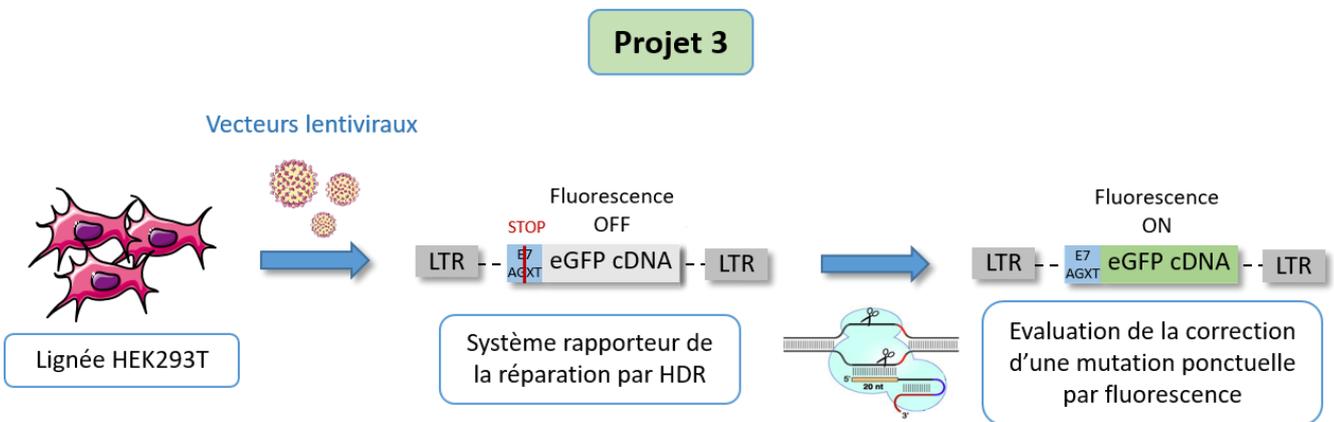
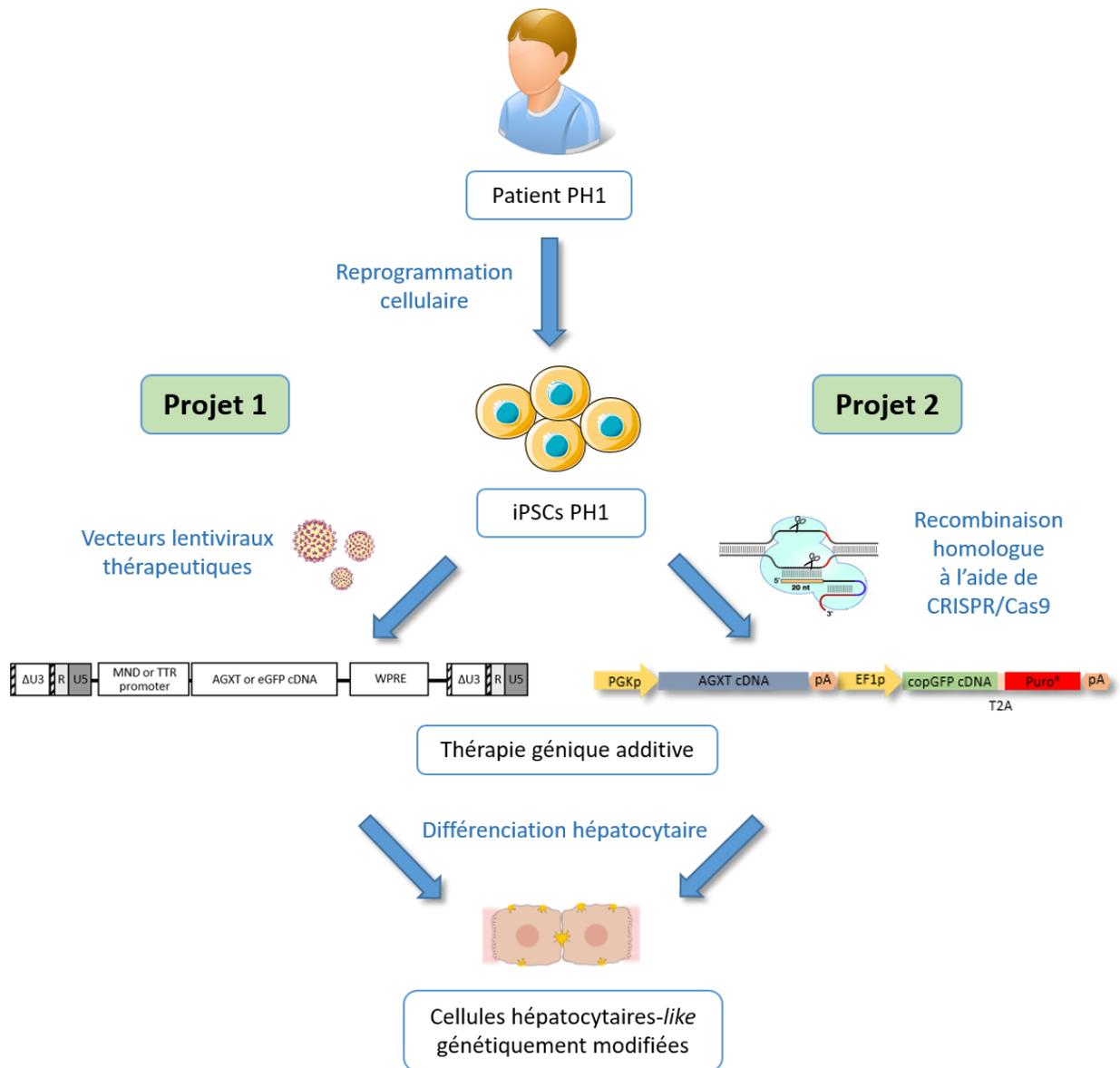


Figure 37. Schéma récapitulatif des projets menés pendant cette thèse. Ces projets consistent en deux protocoles de thérapie génique additive réalisés au sein de cellules souches pluripotentes induites dérivées d'un patient hyperoxalurique (projets 1 et 2), et en une approche de correction ciblée au locus *AGXT* testée dans la lignée cellulaire HEK293T (projet 3). Abréviations : Cas, *CRISPR-associated protein* ; cDNA, *complementary DNA* ; copGFP, *copepoda Green Fluorescent Protein* ; CRISPR, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* ; EF1p, *Elongation Factor 1a promoter* ; E7 *AGXT*, exon 7 du gène *AGXT* ; eGFP, *enhanced Green Fluorescent Protein* ; HDR, *Homology-Directed Repair* ; HEK, *Human Embryonic Kidney* ; iPSC, *induced Pluripotent Stem Cell* ; LTR, *Long Terminal Repeat* ; pA, *polyadenylation signal* ; PGKp, *Phosphoglycerate Kinase promoter* ; PH1, *Primary Hyperoxaluria type 1* ; Puro^R, *puromycine resistance gene* ; TTR, *transthyretin* ; WPRE, *Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element*.

La première étape de développement de nos approches de médecine régénérative a consisté en la génération d'iPSCs dérivées du tissu conjonctif d'un patient hyperoxalurique donneur. Pour produire les iPSCs, nous avons employé une méthode de reprogrammation non intégrative à l'aide d'un vecteur viral Sendaï, qui se caractérise par une excellente efficacité d'action et permet d'obtenir des cellules indifférenciées dépourvues de facteurs exogènes après quelques passages. Les cellules ont ensuite été caractérisées pour vérifier leur caractère pluripotent, leur intégrité chromosomique et l'absence d'expression des facteurs de reprogrammation exogènes. Une expérience similaire a précédemment été réalisée par une équipe espagnole, à l'aide de cellules présentant fortuitement le même génotype que celles de notre patient, mais l'équipe n'avait alors pas procédé à la manipulation et à la différenciation hépatocytaire des iPSCs obtenues⁴⁰⁸. Après validation de nos iPSCs, nous avons pu envisager la modification de leur génome à des fins thérapeutiques, selon trois stratégies distinctes.

I) La première méthode envisagée correspond à une thérapie génique additive non ciblée, consistant en l'apport d'une copie de la séquence sauvage du gène *AGXT* associée à un promoteur hépato-spécifique à l'aide d'un vecteur lentiviral. Après vérification de la spécificité et de l'efficacité d'expression du vecteur, nous avons procédé à la transduction des iPSCs dérivées du patient et à leur différenciation en hépatocytes-like ou HLCs. Plusieurs expériences de caractérisation ont permis de confirmer l'engagement des iPSCs vers la lignée hépatique, ainsi que l'expression du transgène *AGXT* aux niveaux transcriptionnel et protéique.

II) La méthode précédente, bien qu'efficace, s'accompagne d'un risque de dérégulation fonctionnelle non négligeable lié au caractère aléatoire de l'intégration des vecteurs lentiviraux dans le génome des cellules hôtes. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi de développer une seconde stratégie de thérapie génique additive, en suivant cette fois le principe de la recombinaison homologue pour insérer une copie saine du gène *AGXT* de façon ciblée au locus *AAVS1*, au sein duquel l'intégration de transgènes est sans dommage pour les cellules. Cette approche est plus délicate à mettre en œuvre que la précédente, car les événements de recombinaison génomique s'opèrent à une fréquence faible, mais elle assure un excellent contrôle de l'intégration du transgène. Ce type de protocole peut en outre être facilité par la création de coupures de l'ADN au niveau du site cible de recombinaison, qui augmentent significativement la

fréquence des événements de recombinaison homologue. Pour parvenir à l'intégration souhaitée, nous avons procédé à la transfection des iPSCs en présence du système de clivage ciblé de l'ADN CRISPR/Cas9 et d'une matrice de recombinaison plasmidique constituée du transgène *AGXT* associé à un promoteur ubiquitaire. Après vérification de la spécificité de l'intégration du transgène au sein du site *AAVS1*, nous avons réalisé la différenciation des iPSCs en hépatocytes-*like* qui se sont caractérisés par une expression significative de la protéine AGT sauvage.

III) Les deux stratégies de thérapie génique additive que nous avons mises en œuvre ont fourni des résultats satisfaisants ; néanmoins, l'intégration (contrôlée ou non) d'une cassette d'expression transgénique dans le génome des cellules implique l'apport d'une copie surnuméraire du transgène, associée à des séquences promotrices et de sélection qui créent un environnement génomique non physiologique. Nous avons souhaité nous affranchir de ces inconvénients en procédant à une dernière stratégie de thérapie génique, consistant en une correction ponctuelle de la mutation c.731T>C présente dans l'exon 7 du gène *AGXT* via le remplacement du nucléotide morbide par sa version physiologique. Pour parvenir à ce résultat, nous avons développé une stratégie de recombinaison ciblée impliquant le système CRISPR/Cas9 nickase et une matrice homologue polynucléotidique simple brin, dont nous avons testé l'efficacité à l'aide de systèmes rapporteurs fluorescents intégrés au sein de la lignée HEK293T (*Human Embryonic Kidney*), qui est particulièrement permissive aux expériences d'édition génique. Le taux de recombinaison obtenu s'est cependant révélé très faible et la possibilité de transposer ces résultats aux iPSCs dérivées de patients reste à déterminer.

Finalement, les résultats obtenus ouvrent des perspectives de médecine régénérative pour les patients atteints d'hyperoxalurie primitive de type 1, via le recours à un processus de thérapie génique additive au sein d'hépatocytes-*like* autologues dérivés d'iPSCs. Des améliorations sont à envisager pour développer une stratégie de correction ponctuelle des mutations du gène *AGXT*, qui permettra d'obtenir une séquence sauvage dépourvue de toute trace de manipulation génique.

Résultats 1 (Article 1)

AGXT expression rescue in hepatocyte-like cells from primary hyperoxaluria type 1-induced pluripotent stem cells using liver-specific lentiviral vector.

(soumis pour publication)

Ce premier projet a été développé afin de vérifier la faisabilité de la production d'hépatocytes-like dérivés d'iPSCs issues d'un patient atteint d'hyperoxalurie primitive de type 1, et d'évaluer la possibilité d'une restauration de l'expression du gène *AGXT* dans ces cellules selon une approche de thérapie génique additive *ex vivo*.

Nous avons dans un premier temps généré des iPSCs dérivées de fibroblastes cutanés prélevés chez un volontaire sain contrôle et chez un patient atteint de PH1 porteur de la mutation faux-sens c.731T>C du gène *AGXT*. La reprogrammation a été effectuée à l'aide de vecteurs viraux Sendai permettant une expression transitoire des facteurs de reprogrammation Oct3/4, Sox2, KLF4 et c-Myc sous forme épisomique. Après reprogrammation, les cellules obtenues ont été caractérisées : nous nous sommes assurés de l'extinction de l'expression transcriptionnelle des facteurs exogènes de reprogrammation, tandis que le caractère pluripotent des cellules a été confirmé par l'expression de marqueurs embryonnaires (transcriptionnels et protéiques) et par leur capacité à former des tératomes constitués de tissus dérivés des trois feuilletts embryonnaires endoderme, mésoderme et ectoderme. Nous avons également vérifié l'absence d'impact du processus de reprogrammation sur le génotype du gène *AGXT* et sur l'intégrité chromosomique des cellules. Les iPSCs ont été générées et cultivées pendant une courte période sous la forme de colonies sur des cellules stromales (fibroblastes embryonnaires), puis nous avons procédé au transfert de la culture vers une méthode de croissance unicellulaire sur un stroma acellulaire, afin de faciliter à la fois l'entretien des cellules et la réalisation ultérieure des expériences de thérapie génique.

Dans l'objectif de procéder à la restauration de l'expression du gène *AGXT* dans les iPSCs dérivées du patient hyperoxalurique, nous avons développé un vecteur thérapeutique lentiviral auto-inactivé porteur d'une séquence d'ADN complémentaire du gène *AGXT*, optimisée pour son expression dans les cellules humaines¹⁹⁰. Un vecteur lentiviral contrôle véhiculant l'ADN complémentaire de la protéine eGFP a également été produit. Au sein des vecteurs, l'expression des séquences *AGXT* et *eGFP* a été placée sous la dépendance du promoteur murin de la transthyréline (protéine

hépatique assurant le transport du rétinol et des hormones thyroïdiennes T3 et T4) fusionné à une séquence activatrice hépato-spécifique, l'ensemble (appelé TTRp) permettant de limiter l'expression des transgènes aux cellules hépatiques¹⁴⁶. La spécificité du TTRp a été évaluée par comparaison de la fluorescence de la protéine eGFP exprimée par des populations cellulaires hépatiques et non hépatiques transduites avec le vecteur lentiviral contrôle. Nous avons ensuite confirmé l'efficacité d'expression des vecteurs thérapeutique et contrôle au niveau transcriptionnel et protéique au sein de la lignée hépatocellulaire HepG2.

Après validation des constructions lentivirales, nous avons réalisé la transduction des iPSCs dérivées du patient à l'aide des vecteurs thérapeutique et contrôle, puis nous avons procédé à la différenciation hépatocytaire des cellules, d'abord en endoderme définitif, puis en hépatocytes-*like* ou HLCs. Le processus de différenciation a été réalisé à l'aide de milieux de culture et d'un stroma de composition définie, respectivement dépourvus de sérum et de cellule. L'engagement hépatocytaire des cellules a été confirmé à travers l'expression de marqueurs spécifiques, et par la mise en évidence d'une activité cytochromique caractéristique. Des analyses transcriptionnelles et protéiques ont finalement permis de démontrer l'expression du transgène *AGXT* dans les HLCs, validant ainsi la faisabilité d'une approche de thérapie génique additive *ex vivo* au sein d'hépatocytes-*like* autologues dérivés d'iPSCs pour le traitement de l'hyperoxalurie primitive de type 1.

AGXT expression rescue in hepatocyte-like cells from primary hyperoxaluria type 1-induced pluripotent stem cells using liver-specific lentiviral vector.

Julie Estève^{a,b*}, Jean-Marc Blouin^{a,b*}, Magalie Lalanne^{a,b}, Lamia Azzi-Martin^{a,c}, Pierre Dubus^{a,c}, Audrey Bidet^d, Jérôme Harambat^e, Brigitte Llanas^e, Isabelle Moranvillier^{a,b}, Aurélie Bedel^{a,b}, François Moreau-Gaudry^{a,b}, Emmanuel Richard^{a,b#}.

^a Université de Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France.

^b INSERM, Biothérapie des Maladies Génétiques, Inflammatoires et Cancers, U1035, F-33000 Bordeaux, France.

^c INSERM, Bordeaux Research in Translational Oncology, U1053, F-33000 Bordeaux, France.

^d Laboratoire d'Hématologie, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France.

^e Service de Néphrologie Pédiatrique, Centre de Référence Maladies Rénales Rares du Sud-Ouest, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, F33000 Bordeaux cedex, France.

* Contributed equally.

Correspondence to:

Dr. Emmanuel Richard, PhD, Université de Bordeaux, INSERM U1035, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France. Email: emmanuel.richard@u-bordeaux.fr

Phone: 33 5 57 57 13 78 / Fax: 33 5 57 57 13 74

Abstract

Primary hyperoxaluria type 1 (PH1) is a rare autosomal recessive disorder of the liver metabolism due to functional deficiency of the peroxisomal enzyme alanine:glyoxylate aminotransferase (AGT). AGT deficiency results in overproduction of oxalate which complexes with calcium to form insoluble calcium-oxalate salts in urinary tracts, ultimately leading to end-stage renal disease. Currently, the only curative treatment for PH1 is combined liver-kidney transplantation, which is limited by donor organ shortage and lifelong requirement for immunosuppression. Transplantation of genetically modified autologous hepatocytes is an attractive therapeutic option for PH1. However, the use of fresh primary hepatocytes suffers from limitations such as organ availability, insufficient cell proliferation, loss of function, and the risk of immune rejection. We developed patient-specific induced pluripotent stem cells (PH1-iPSCs) free of reprogramming factors as a source of renewable and genetically defined autologous PH1-hepatocytes. We then investigated additive gene therapy using a lentiviral vector encoding wild-type AGT under the control of the liver-specific transthyretin promoter. Genetically modified PH1-iPSCs successfully provided hepatocyte-like cells (HLCs) that exhibited significant AGT expression at both RNA and protein levels after liver-specific differentiation process. These results pave the way for cell-based therapy of PH1 by transplantation of genetically modified autologous HLCs derived from patient-specific iPSCs.

Highlights

- Primary hyperoxaluria (PH1) is due to a deficient AGT activity leading to oxalate overproduction by the liver
- Oxalate complexes with calcium in urinary tracts leading to severe inherited urolithiasis
- Sendai vectors allow the generation of viral-free PH1-induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts
- PH1-induced pluripotent stem cells differentiate into functional hepatocytes-like cells
- Hepatic-specific lentiviral vector efficiently rescue AGT expression in hepatocyte like-cells

Key words: hyperoxaluria, induced pluripotent stem cell, gene therapy, hepatic differentiation, lentiviral vector.

Abbreviations:

Primary hyperoxaluria type 1 (PH1), alanine:glyoxylate aminotransferase (AGT), patient-specific induced pluripotent stem cells (PH1-iPSCs), hepatocyte-like cells (HLCs), pyridoxal 5'-phosphate (PLP), lentiviral vectors (LVs), Sendai virus (SeV), mouse embryonic fibroblasts (MEFs), KnockOut™ Serum Replacement (KOSR), human serum albumin (HSA), hematoxylin and eosin (HE), Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4), bovine serum albumin (BSA), transthyretin promoter (TTRp),

1. Introduction

Primary hyperoxalurias (PHs) are rare inborn errors of glyoxylate metabolism characterized by increased synthesis and excretion of the end-product oxalate, and deposition of insoluble calcium oxalate in the kidney and urinary tract (Harambat et al., 2011; Hoppe et al., 2009). Primary hyperoxaluria type 1 (PH1, MIM 259900) is a rare autosomal recessive metabolic disorder occurring in 1 per 120 000 live births. It is caused by a functional deficiency of the liver-specific enzyme alanine:glyoxylate aminotransferase (AGT, EC 2.6.1.44) encoded by the *AGXT* gene (locus 2q37.3), which normally localizes to hepatocyte peroxisome (Santana et al., 2003). AGT uses pyridoxal 5'-phosphate (PLP) as a cofactor and catalyzes the nearly irreversible transfer of the amino group from alanine to glyoxylate to yield pyruvate and glycine. In PH1 patients, glyoxylate cannot be efficiently converted into glycine and is instead oxidized to oxalate by lactate dehydrogenase, leading to hyperoxaluria. Oxalate complexes with calcium in the urinary tract, leading to the formation of insoluble calcium-oxalate salts. The salts readily precipitate in tissues, resulting in kidney stones, kidney damage/failure and injury to other organs, which accounts for all the pathological characteristics of PH1 including urolithiasis, nephrocalcinosis and systemic oxalosis (Hoppe et al., 2009).

Therapeutic strategies aiming at either reducing oxalate production or degrading excessive oxalate in the body would be beneficial for PH1 patients. In some patients, the disease process can be slowed by implementation of hyper diuresis, low oxalate diet or pharmacological treatment (supplementation with either vitamin B6, a precursor of pyridoxal phosphate, or betaine, a chemical chaperone) (Cochat et al., 2012; Santana et al., 2003). However, the only curative treatment for PH1 is combined liver-kidney transplantation, which represents a form of enzyme replacement therapy by restoring a normal hepatic AGT activity (Bergstralh et al., 2010; Cochat et al., 2010). Nevertheless, this treatment is limited by organ suitability, significant morbidity and mortality and the lifelong requirement for immunosuppressive agents (Alonso and Ryckman, 1998; Newstead, 1998). Allogeneic hepatocyte transplantation has been investigated as an alternative strategy (Beck et al., 2012; Jiang et al., 2008) but it is unlikely to be successful because the high number of engrafted hepatocytes required for clinical recovery of PH1 can hardly be provided by this procedure. In addition, allogeneic hepatocyte transplantation would still involve lifelong immunosuppression.

Given the limitations of current therapy and the severity of the disease, PH1 is an attractive target for gene therapy, providing both a long-lasting and less costly method for AGT delivery to the liver. *In vivo* gene therapy experiments using either adenoviral vectors (Castello et al., 2016; Salido et al., 2006) or adeno-associated virus vectors (Salido et al., 2011) encoding the human AGT yielded encouraging results in *AGXT*^{-/-} mice. Nevertheless, long-term correction using non-integrative viral vectors involves iterative injections of vectors, potentially leading to cytotoxicity and immunotoxicity. This pitfall may be overcome by an alternative approach based on *ex vivo* genomic integration of the wild-type human *AGXT* gene into hepatic cells using lentiviral vectors (LVs). LVs are suitable tools for gene therapy by virtue of their ability to stably integrate into the target cell genome and the absence of pre-existing humoral and cellular immunity against vector components in most humans. Moreover, the liver cell transduction efficacy of LVs has been demonstrated in numerous studies, notably in the field of hemophilia gene therapy (Annoni et al., 2013; Cantore et al., 2015; Ohmori et al., 2018), while tissue-specific vector expression can be achieved by addition of internal promoters to HIV-1-derived vectors exhibiting partially deleted LTR sequences (Moreau-Gaudry et al., 2001; Zufferey et al., 1998). Ideally, LVs should target primary human hepatocytes, but the invasiveness of liver biopsies along with the poor growth activity and lifespan of hepatocytes in primary culture limit their use *in vitro* (Fukuda et al., 2017; Laurent et al., 2010). The recent advent of hepatocyte-like cells (HLCs) derived from human induced pluripotent stem cells (iPSCs) (Takahashi et al., 2007) represents an attractive alternative to primary human hepatocytes. Indeed, the capacity of patient-specific iPSCs to differentiate into genetically similar somatic cell types allows the generation of a substantial quantity of patient-specific cells, including hepatocytes, for use as *in vitro* models for disease modeling and toxicological studies, as well as cell or gene therapy (Gao and Liu, 2017; Takayama et al., 2018; Zhang et al., 2011).

In this study, we successfully generated iPSCs derived from a homozygous PH1 patient (PH1-iPSCs) harboring a c.731T>C mutation (p.I244T) in exon 7 of *AGXT* gene, which is the second most common mutation accounting for PH1 (Santana et al., 2003). Furthermore, we demonstrate for the first time the therapeutic genome modification of HLCs derived from PH1-iPSCs, after transduction with a liver-specific lentiviral vector expressing wild-type *AGXT* cDNA. These results will contribute to the proof-of-principle of PH1 regenerative medicine, based on the transplantation of autologous HLCs derived from iPSCs.

2. Material and Methods

2.1. Cell culture

Cryopreserved primary human fibroblasts were obtained from skin punch biopsies of a healthy volunteer and a PH1-diagnosed patient harboring the homozygous c.731T>C mutation (p.I244T) in exon 7 of the *AGXT* gene. We obtained written informed consent from both participants. Cells were thawed and cultured for one week on 0.1% gelatin-coated culture plates (Sigma-Aldrich) in complete Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Life Technologies) containing 10% fetal bovine serum (FBS, Eurobio) and 100 UI/mL penicillin/streptomycin (P/S, Hyclone) before reprogramming. The human hepatoma (HepG2 and Huh7) and human embryonic kidney 293T (HEK293T) cell lines were maintained in complete DMEM. The human myelogenous K562 cell line was maintained in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) (Life Technologies), supplemented with 10% FBS and 100 UI/mL P/S.

2.2. Human iPSC culture

Fibroblast-derived iPSCs free of reprogramming transgene were generated by transducing wild-type (WT)- and PH1-fibroblasts with Sendai viral (SeV) particles (Ban et al., 2011) using the CytoTune[®]-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Briefly, fibroblasts were transiently exposed to SeV particles for 20h at 37°C and cultured for six additional days in fibroblast culture media. Cells were then transferred onto a feeder layer of mitomycin-inactivated mouse embryonic fibroblasts (MEFs) at multiple densities (850, 1700 and 3400 cells/cm²) and cultivated in KnockOut DMEM/F12 (Life Technologies) containing 20% KnockOut[™] Serum Replacement (KOSR, Life Technologies), 1% non-essential amino acids (Life Technologies), 1% GlutaMAX (Life Technologies), 0.5 mM sodium butyrate (Sigma-Aldrich), 0,1 mM beta-mercaptoethanol (Life Technologies), 50 µg/mL L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate (Sigma-Aldrich), 10 ng/mL basic fibroblast growth factor (Peprotech) and 100 UI/mL P/S. Four weeks after transduction, emerging iPSC colonies were individually picked up and expanded onto MEF monolayer. Two WT- and two PH1-iPSC clones were further selected on the basis of typical undifferentiated stem cell morphology (high nucleus-to-cytoplasm ratio, defined borders and prominent nucleoli). Selected iPSC clones were finally transferred onto feeder-free Cellartis[®] DEF-CS[™] Culture System (Takara Bio Europe), therefore exhibiting proliferation as monolayer iPSC lines with continuous passaging twice a week, as previously described (Asplund et al., 2016).

2.3. Genomic DNA extraction and amplification

Genomic DNA was isolated using the NucleoSpin[®] Tissue kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions and were PCR-amplified using specific primers (online Supplemental Table 1). For fibroblast and iPSC genotyping, PCR products from the *AGXT* exon 7 were analyzed by Sanger sequencing. To assess lentiviral cassette integration into iPSC and HepG2 genome, we designed specific primers to amplify the region overlapping the *AGXT* or eGFP cDNA sequence and the WPRE sequence (online Supplemental Table 1).

2.4. RNA extraction and RT-PCR analysis

Total RNA was isolated using NucleoSpin[®] RNA kit (Macherey-Nagel) and cDNA was synthesized using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems[™]) according to the manufacturer's instructions. Cellular expression of pluripotency-associated markers and Sendai reprogramming factors, as well as lentiviral cassette expression, was analyzed by RT-PCR using specific primers (online Supplemental Table 1). A semi-quantitative real-time PCR (RT-qPCR) assay was used to quantify hepatic marker expression using the GoTaq[®] qPCR Master Mix kit (Promega); relative hepatic gene expression was normalized to endogenous human ribosomal protein lateral stalk subunit P0 (HuPO) mRNA.

2.6. Alkaline phosphatase activity and immunocytofluorescence

iPSCs were challenged for alkaline phosphatase activity using the Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit (Sigma-Aldrich), according to the manufacturer's instructions. For immunocytofluorescence analysis, cells were fixed for 15 min at 4°C in 4% paraformaldehyde and then washed three times in PBS containing 0,2% Triton X-100 for permeabilization. Cells were blocked in PBS/0,2% Triton X-100/1% human serum albumin (HSA) for 1 hour at 4°C, washed three times with PBS/1% HSA and incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted at working concentration in PBS/0,2% Triton X-100/1% HSA. After incubation, cells were washed three times with PBS/1% HSA and incubated for 1 hour at room temperature with secondary antibodies diluted at working concentration in PBS/0,2% Triton X-100/1% HSA. Cells were washed twice with PBS and finally incubated with 1 × 4,6-diamidino-2-2-phenylindole (DAPI) for 15 minutes at room temperature. The primary and secondary antibodies used in this study are listed online (Supplemental Table 2). Images were captured with an inverted fluorescence microscope (Nikon Eclipse Ti microscope).

2.7. Teratoma formation and analysis

Teratomas were obtained after injecting 1×10^6 WT- or PH1-iPSCs suspended in extracellular matrix gel (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) in the subcutaneous neck region of immunodeficient NSG mice (NOD Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ, animal facilities A2, University of Bordeaux, France). Tumors were harvested 6 weeks after injection and fixed in 4% paraformaldehyde. Tissues were paraffin-embedded, sectioned and stained with hematoxylin and eosin (HE), and alcian blue. All animal procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Bordeaux University.

2.8. Karyotype analysis

WT- and PH1-iPSCs were cultured to 80% confluence in 6-well plates. After synchronization with bromodeoxyuridine, thymidine kinase and colcemid, cells were trypsinized with trypsin/EDTA (0,05%/0,2%) (Fisher Scientific), treated with 0.075M KCl and prefixed with 1 ml of fixative solution composed of Methanol/Acetic Acid (3:1) and resuspended in 10 ml of fixative solution. Cells were centrifuged for 6 min at 200g before final resuspension in 5 ml of fixative. Standard R-banding analysis was performed on metaphases obtained from iPSC clones. At least 20 metaphases were fully karyotyped with the help of an automated imaging system (MetaSystems).

2.9 Lentiviral vectors and cell transduction

Self-inactivated (SIN) lentiviral vectors derived from the previously described pRRL-MND-MCS-WPRE lentivector (Richard et al., 2004). Lentiviral vectors harbored the optimized human AGXT cDNA (Mesa-Torres et al., 2014) or eGFP cDNA under control of the murine transthyretin promoter (TTRp) fused to a synthetic hepatocyte-specific enhancer to direct liver-specific expression (Nguyen et al., 2005). The modified retroviral MND promoter was used to drive ubiquitous expression of *AGXT* and *eGFP* transgenes (Richard et al., 2004). VSV-G-pseudotyped recombinant lentiviral particles were produced by triple-transient transfection of three plasmids in 293T cells: the transfer vector plasmid, the packaging plasmid pCMV Δ R8.91, and the VSV-G envelope protein-coding plasmid pMD.G as described (Bedel et al., 2012). Titers of eGFP-expressing vectors were determined after serial dilutions in HepG2 hepatoblastoma cell lines. Titers of AGXT-containing lentivectors were estimated on the basis of p24 antigen levels determined by ELISA assay in the viral supernatant (Innotest HIV p24,

INGEN SA, Rungis, France), by comparison with that of simultaneously produced eGFP vectors as previously described (Richard et al., 2004). Lentiviral vector supernatants were tested for the absence of replication-competent virus. To evaluate tissue-specific expression of lentiviral vectors, hepatic (Huh7, HepG2), epithelial (HEK293T) and myelogenous (K562) human cell lines, as well as primary human fibroblasts and WT-iPSCs, were transduced with lentiviral vectors at a low multiplicity of infection (m.o.i. = 1) to obtain proviral integration of around one copy/cell. In additive gene therapy experiments, iPSCs from the PH1 patient were transduced at a multiplicity of infection of 5.

2.10. Flow cytometry analysis

At day 7 post-lentiviral transduction, eGFP fluorescence was analyzed using FACSCanto™ II (BD Biosciences) and FACSDiva™ software (BD Biosciences).

2.11. *In vitro* differentiation of iPSCs toward hepatic lineage

Feeder-free cultured iPSCs were differentiated into hepatocyte-like cells (HLCs) by applying a serum- and feeder-free procedure recapitulating liver development, as previously described (Asplund et al., 2016; Ghosheh et al., 2016). First, iPSCs were guided to differentiate into definitive endoderm cells (DECs) using the Cellartis® Definitive Endoderm Differentiation Kit (Takara Bio Europe), according to the manufacturer's instructions. At day 7, the DECs were enzymatically dissociated with TrypLE™ Select Enzyme (Life Technologies), reseeded into appropriate cell culture vessels, and differentiated into HLCs using the Cellartis® Hepatocyte Differentiation Kit (Takara Bio Europe), according to the manufacturer's instructions.

2.12. Assay for cytochrome P450 activity

Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) activity was measured in iPSCs and HLCs by using the P450-Glo™ CYP3A4 Assay kit (Promega) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were incubated for 1 hour at 37°C with respective cell culture media containing 3 µM of the CYP3A4 substrate luciferin isopropyl acetal (proluciferin). After incubation, 25 µL of culture media were transferred from each well to a 96-well opaque white luminometer plate. Next, a luciferin detection reagent (25 µL) was added to the samples to initiate a luminescent reaction. The plate was incubated at room temperature for 20 min, and luminescence was measured using a GloMax® Multi Detection System luminometer (Promega). Luminescence

signal was standardized for each well by cell protein content determined by the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific), according to the manufacturer's instructions.

2.13. Western Blot

Total cellular protein extraction was carried out using T3EN buffer (10 mM Tris base, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, H₂O) and SB2X buffer (4% SDS, 20% glycerol, 50 mM Tris-HCl pH 6.8, H₂O), followed by 10 min incubation at 100°C. Protein concentration was determined with the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific), according to the manufacturer's instructions. Respectively 20 µg and 1 µg of protein from HLC and HepG2 lines were separated by electrophoresis on 12% (w/v) acrylamide SDS-PAGE and transferred onto a polyvinylidene difluoride Immobilon-P membrane (Millipore Corp.). The blot was blocked with TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 136 mM NaCl) containing 5% skimmed milk, and then incubated at 4°C overnight with primary antibodies diluted at working concentration in TBS containing 5% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich). The following day, the membrane was washed three times for 5 minutes in TBS with 0.1% Tween 20 (TBS-T) and then incubated with horseradish peroxidase-linked secondary antibodies diluted at working concentration in TBS-milk for 1 hour at room temperature. The membrane was washed a further three times for 5 minutes with TBS-T before developing using the Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent kit (GE Healthcare), according to the manufacturer's instructions. Images were captured with the LAS-3000 Imager (Fujifilm). The primary and secondary antibodies used for western blotting are listed in online Supplemental Table 3.

2.14. Statistical analysis

Values shown represent the mean \pm SD (n=3 to 4 independent experiments). P-values were determined using a one-way analysis of variance (ANOVA) complemented by Tukey's multiple comparisons test to examine significance across comparisons. Difference was considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Generation and characterization of iPSCs from PH1 patient-derived dermal cells

Skin fibroblasts were isolated from a healthy volunteer and a PH1-diagnosed patient harboring the homozygous *c.731T>C* mutation (p.I244T) in exon 7 of *AGXT* gene (Fig. 1A). WT- and PH1-iPSC lines were generated *in vitro* from primary fibroblasts after transduction with a modified, non-transmissible form of Sendai Virus (SeV) particles carrying the reprogramming factors SOX2, OCT3/4, c-MYC and KLF4, which is sufficient for efficient reprogramming (Takahashi et al., 2007). The exclusive cytoplasmic expression of SeV particles allows the generation of iPSCs free of reprogramming transgenes, as confirmed by RT-PCR analysis. SeV structural genome and exogenous reprogramming transgene expression was detected exclusively in transduced primary fibroblasts (Sendai fibroblasts), whereas non-transduced fibroblasts and iPSC lines (at 18-19 passages) harbored neither SeV genome nor reprogramming transcript expression (Fig. 2A).

iPSCs were established and expanded as individual colonies onto MEFs for 12 weeks. Two isolated WT-iPSC clones (hereinafter named WT-iPSC#1 and WT-iPSC#2) and two isolated PH1-iPSC clones (hereinafter named PH1-iPSC#1 and PH1-iPSC#2) were switched to feeder-free culture conditions using the Cellartis® DEF-CS™ Culture System, which allows enzymatic passaging of pluripotent stem cells and expansion as monolayer iPSC lines. We confirmed the stability of the *AGXT* genotype in all established iPSC lines (Fig. 1B, WT-iPSC#2 and PH1-iPSC#2 and online Supplemental Fig. S1, WT-iPSC#1 and PH1-iPSC#1). Feeder-free WT and PH1-iPSC lines exhibited undifferentiated stem cell morphology with a high nucleus/cytoplasm ratio and prominent nucleoli (Fig. 2B, WT-iPSC#2 and PH1-iPSC#2 and online Supplemental Fig. S2, WT-iPSC#1 and PH1-iPSC#1). Moreover, all iPSC clones expressed endogenous pluripotency-associated markers (OCT3/4, SOX2, NANOG, REX1, ESG1, DPPA4, hTERT, KLF4, c-MYC), as demonstrated by alkaline phosphatase activity, immunocytofluorescence (Fig. 2B, WT-iPSC#2 and PH1-iPSC#2 and online Supplemental Fig. S2, WT-iPSC#1 and PH1-iPSC#1) and RT-PCR analysis (Fig. 2C). We detected endogenous expression of *KLF4* and *c-MYC* genes by RT-PCR analysis in primary fibroblasts as previously described (Takahashi et al., 2007). We then generated teratoma by subcutaneous injection of 1×10^6 cells from all WT- and PH1-iPSC lines into 2-month-old immunodeficient NSG mice. About 6 weeks after injection, tumors exhibited goblet cells (endoderm), chondrocytes (mesoderm) and neuroectoderm and pigmented tissue (ectoderm), which demonstrates the ability of iPSCs to differentiate into all three germ layers (Fig. 3A). Finally, karyotype analyses

by R-banding studies confirmed the absence of macroscopic genetic abnormality in WT- and PH1-iPSC lines (Fig. 3B, WT-iPSC#2 and PH1-iPSC#2 and online Supplemental Fig. S3, WT-iPSC#1 and PH1-iPSC#1). Therefore, we have successfully committed WT- and PH1-fibroblasts in pluripotent stem cells free of reprogramming transgenes that display human embryonic stem cell-like features.

3.2. Lentiviral-mediated delivery of therapeutic AGT in PH1-iPSCs

To trigger wild-type AGT expression in the PH1-iPSC line, we designed a third-generation lentiviral vector (LV) carrying a full-length codon-optimized human AGXT cDNA. Lentiviral constructs carried the modified retroviral MND promoter or the liver-specific transthyretin promoter (TTRp) to drive ubiquitous or liver-specific expression of the therapeutic (*AGXT*) or control (*eGFP*) transgenes, respectively (Fig. 4A). We confirmed ubiquitous and specific expression towards the hepatic lineage after lentiviral transduction of both hepatic (HepG2 and Huh7) and non-hepatic (HEK293T, K562, WT-fibroblast and WT-iPSC#2) cell lines at low multiplicity of infection (m.o.i = 1) (Fig. 4B). As expected, MNDp-eGFP lentivector was expressed in each of the different cell lines, while TTRp-eGFP lentivector was selectively expressed in hepatic cells.

We then investigated lentiviral vector-mediated AGXT and eGFP expression in HepG2 cells transduced with the corresponding lentivectors at m.o.i of 5. Once HepG2 genomic integration of the cassettes had been confirmed (Fig. 4C), we observed significant lentiviral vector-mediated transgene expression in transduced HepG2 cells by RT-PCR (Fig. 4D) and western blotting analysis (Fig. 4E). RT-PCR analysis revealed transcriptional expression of TTRp-AGXT and TTRp-eGFP cassettes limited to transduced HepG2 lines, while the endogenous *AGXT* gene was expressed in all conditions (Fig. 4D). Similarly, western blotting analysis using a primary antibody detecting indistinctly both endogenous and exogenous (derived from TTRp-AGXT cassette) AGT revealed basal expression of endogenous AGT in both non-transduced HepG2 and HepG2-TTRp-eGFP lines, while the HepG2-TTRp-AGXT line exhibited increased global AGT expression (Fig. 4E). These results confirmed therapeutic AGT expression at both transcript and protein levels in the hepatic HepG2 cell line after transduction with the therapeutic TTRp-AGXT lentiviral vector.

We then performed genome modification of PH1-iPSCs by transduction with TTRp-AGXT or TTRp-eGFP lentivector at m.o.i. of 5. We preferentially targeted PH1-iPSC#2 because we observed sustained proliferation and maintenance of stem-cell morphology

characteristics through passages of this clone (data not shown). PCR analysis confirmed genomic integration of lentivectors into transduced iPSC lines, referred to as PH1-iPSC#2-TTRp-AGXT and PH1-iPSC#2-TTRp-eGFP lines, respectively (Fig. 4F).

3.3 AGT rescue in iPSC-derived hepatocyte-like cells transduced with TTRp-AGXT lentivector

We next proceeded to *in vitro* differentiation of WT-iPSC#2, PH1-iPSC#2, PH1-iPSC#2-TTRp-AGXT and PH1-iPSC#2-TTRp-eGFP lines into hepatocyte-like cells (HLCs), respectively named WT-HLC#2, PH1-HLC#2, PH1-HLC#2-TTRp-AGXT and PH1-HLC#2-TTRp-eGFP. We used a protocol simulating normal liver development in three main phases: definitive endoderm, hepatic progenitors and hepatocyte-like cells. During the first phase, we used the Cellartis[®] Definitive Endoderm Differentiation medium to differentiate iPSCs into a monolayer culture of definitive endoderm cells (DECs), which represent the earliest precursors of all endodermal organs; namely, liver, pancreas, lung, gut and thyroid (Hannan et al., 2013). Whereas iPSC lines showed typical embryonic stem cell morphology prior to the differentiation process, they progressively exhibited spiky or triangular shapes, a typical morphology of DEC reaching confluence (Fig. 5A). We confirmed definitive endoderm commitment by immunofluorescence detection of the specific endodermal marker SOX17 at day 7 of differentiation (Fig. 5A).

During the second phase, we guided DECs to subsequent hepatoblast and HLC differentiation for 3 weeks in Cellartis[®] Hepatocyte Differentiation medium. The cellular morphology progressively changed during the differentiation process to finally reach typical hepatocyte-like polygonal shape with canaliculated borders from day 21 of differentiation (Fig. 5A). Immunofluorescence analysis confirmed hepatic cell commitment, as demonstrated by the specific expression of the hepatic markers HNF4a and alpha-fetoprotein (aFP) in HLC by day 14 and day 21 of differentiation respectively. By day 31, we compared the expression profile of several hepatic markers (albumin, aFP, alpha-1 antitrypsin (a1AT) and HNF4a) between iPSC lines, iPSC-derived hepatocyte-like cells, primary fetal hepatocytes and primary adult hepatocytes (Fig. 5B). Although we observed evidence of liver-specific expression in HLCs generated in our culture system, we acknowledge that these cells were not terminally differentiated, as evidenced by remaining aFP expression. This observation is consistent with previous studies demonstrating that pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells more similarly mimic fetal rather than adult hepatocytes (Baxter et al., 2015; Rashid et al., 2010). Detoxification activity of cytochrome P450 3A4 (CYP3A4), which corresponds to the most

abundant CYP450 expressed in adult liver (Guengerich, 1999), was also evaluated (Fig. 5C). CYP3A4 activity was significantly higher in HLCs (25- to 40-fold increase) than in undifferentiated control iPSCs. Interestingly, PH1-HLC#2 cell lines showed similar CYP3A4 activity, independently of the genetic modification (TTRp-AGXT, TTRp-eGFP, mock), which suggests homogeneous hepatic differentiation.

We then analyzed the therapeutic benefit of *AGXT* additive gene therapy in PH1-HLCs. We evaluated AGT rescue in PH1-iPSC-derived HLC after transduction with TTRp-AGXT or TTRp-eGFP lentivectors. RT-PCR analysis revealed transcriptional expression of TTRp-AGXT and TTRp-eGFP lentivectors exclusively in PH1-HLC#2-TTRp-AGXT and PH1-HLC#2-TTRp-eGFP respectively, while endogenous *AGXT* gene was expressed in all HLC lines (Fig. 5D). On the other hand, AGT protein was detected only in WT-HLC#2 and PH1-HLC#2-TTRp-AGXT cells, whereas PH1-HLC#2 and PH1-HLC#2-TTRp-eGFP exhibited no endogenous AGT expression (Fig. 5E). These results suggest that the mutant p.I244T AGT is unstable in HLCs and rapidly turns into non-functional aggregates that are subsequently eliminated before reaching hepatocyte peroxisome. Therefore, we hypothesize that WT-HLC#2 exhibited basal endogenous wild-type AGT expression, whereas the AGT protein detected in PH1-HLC#2-TTRp-AGXT was entirely due to the expression of the therapeutic TTRp-AGXT lentivector. Taken together, these results show that we have achieved the first successful rescue of AGT by using liver-specific lentiviral vector in iPSC-derived hepatocyte-like cells from a PH1 patient.

4. Discussion

PH1 is an inherited metabolic disease arising from the liver deficiency of the AGT enzyme that leads to overproduction of oxalate, which forms insoluble calcium salts in the kidney, resulting in nephrocalcinosis and urolithiasis. Combined liver-kidney transplantation is the only curative treatment for PH1 but it suffers from limitations, which provides the impetus to develop innovative therapeutic options such as liver-directed gene therapy. The recent advent of iPSCs has opened up new avenues in the field of regenerative medicine, and the availability of efficient hepatic differentiation procedures has made iPSCs attractive for the treatment of liver diseases such as PH1 (Asplund et al., 2016; Ghosheh et al., 2016; Hannan et al., 2013; Rashid et al., 2010). In this study, we efficiently generated PH1-iPSCs free of reprogramming factors and expanded them under feeder-free conditions. We then successfully differentiated *in vitro* PH1-iPSCs into hepatocyte-like cells, which are suitable for disease modeling and gene therapy experiments. Finally, we rescued AGT expression in PH1-iPSC-derived HLCs after transduction with a self-inactivated liver-specific lentiviral vector expressing an optimized AGT enzyme.

During the past decade, iPSCs have been generated with several integrative and non-integrative methods, the former exploiting viral vectors integrated in the host cell genome and stably expressing the transgene, and the latter including any approach that enables transient transgene expression in target cells. However, the persistence of residual transgene expression may alter the potential for iPSC differentiation or induce malignant transformation (Okita and Yamanaka, 2011). Sendai vectors are the safest and most commonly used viral-based approach to obtain iPSCs using non-integrative methods. Furthermore, they allow the generation of iPSCs with much greater efficiency than the conventional integrative vectors without influencing the gene expression profile of the reprogrammed iPSCs (Trevisan et al., 2017). In our study, we obtained an initial reprogramming efficiency on feeder cells ranging from 0.002% to 0.08% for PH1- and WT-iPSCs respectively, which corresponds to levels previously reported in the literature (Ban et al., 2011).

Traditional biomedical research and preclinical studies frequently rely on animal models that often fail to reproduce important clinical phenotypes. Conventional cell lines are also frequently used but they represent only a small number of cell types or diseases, and are characterized by limited genetic diversity, rapid senescence and potentially confounding immortalizing mutations. In recent years, human pluripotent stem cells have attracted much attention, partly due to their promising potential for modeling human diseases accurately. In

this study, we generated PH1-iPSCs from primary fibroblasts harboring the *AGXT* c.731T>C mutation, which is highly prevalent in Western Europe, North Africa and the Middle East, as it has been reported in around 20% of PH1 patients from these countries (Harambat et al., 2010). To our knowledge, this is the first report of PH1-iPSC-derived hepatocyte-like cells from a PH1 patient. In a previous study, primary fibroblasts from a PH1 patient harboring the homozygous c.731T>C mutation in exon 7 of the *AGXT* gene were fully reprogrammed into transgene-free iPSCs using the Sendai virus vector, but the potential for hepatic differentiation was not demonstrated (Zapata-Linares et al., 2016). The p.I244T AGT protein is known to be responsive to pharmacological chaperones such as betaine (Santana et al., 2003), and we believe that the combination of additive *AGXT* gene therapy and pharmacological treatments could significantly improve the phenotype of PH1 patients carrying the c.731T>C mutation.

To facilitate the differentiation process and subsequent analysis of the hepatocyte phenotype, we expanded WT- and PH1-iPSCs under feeder-free conditions. To date, most pathophysiological studies of *AGXT* mutations have been conducted in the stably transformed CHO-GO cell line overexpressing glycolate oxidase (GO) and WT-AGT or pathogenic variants (Dindo et al., 2018). We propose that HLCs derived from PH1-iPSCs would offer new perspectives for the identification of molecular defects associated with AGT mutations in liver cells. In the future, the generation of iPSCs originating from a wide panel of PH1 patients and their differentiation into hepatocytes could play an important role in the exploration of phenotype/genotype correlations and drug susceptibilities.

The present study goes further by demonstrating the stable genome modification of hepatocyte-like cells derived from PH1-iPSCs, which were previously transduced with a liver-specific self-inactivating lentiviral vector expressing wild-type *AGXT* cDNA. The *AGXT* sequence was optimized for expression in human cells (Mesa-Torres et al., 2014) and placed under the control of the liver-specific transthyretin promoter, whose efficacy has already been demonstrated *ex vivo* and *in vivo* in liver-disease animal models (Nguyen et al., 2005; Schmitt et al., 2010). Importantly, we rescued AGT synthesis in PH1-HLC#2-TTRp-*AGXT* following TTRp-*AGXT* lentiviral transduction, even though we observed a lower AGT expression level than with WT-HLCs. This might be due to the suboptimal expression of the transthyretin promoter and/or incomplete differentiation state of iPSC-derived HLCs, as previously reported (Baxter et al., 2015; Rashid et al., 2010; Roy-Chowdhury et al., 2017). Integration of the therapeutic TTRp-*AGXT* lentiviral vector into PH1-iPSCs allowed specific expression of AGT at both transcript and protein levels in differentiated hepatocyte-like cells. Furthermore, we demonstrated the neutral effect of genome modification on the hepatic differentiation process.

However, caution is required regarding the exhaustive consequences of genomic lentiviral integration. Despite numerous safety improvements in lentiviral vectors (Cavazzana-Calvo and Fischer, 2007), integration targeting is still challenging and insertional mutagenesis cannot be strictly ruled out unless fully investigated. For these reasons, strategies involving controlled genome modification would be beneficial for establishing safer gene therapy protocols. Recent advances in the field of targeted gene editing, mainly including CRISPR/Cas9 system (Fineran and Charpentier, 2012; Jinek et al., 2012), are likely to offer solutions. Indeed, the efficacy of the targeted CRISPR/Cas9 DNA break in enhancing therapeutic homology-directed repair has been demonstrated in numerous studies, including hepatic diseases, and could be a powerful alternative to viral vectors for PH1 gene therapy (Lee et al., 2016; Pankowicz et al., 2017).

5. Conclusion and/or summary

Human induced pluripotent stem cells can differentiate into hepatocyte like-cells with the potential of clinical and experimental use for inherited liver diseases. We generated PH1-iPSCs free of reprogramming factors from a patient with primary hyperoxaluria type 1 and demonstrated efficient hepatic lineage differentiation *in vitro*. In a gene therapy experiment, we rescued AGT expression in hepatocyte-like cells from PH1-iPSCs transduced with a therapeutic liver-specific lentiviral vector. Taken together, our results pave the way for studying and correcting primary hyperoxaluria type 1 using hepatocyte-like cells derived from patient-specific induced pluripotent stem cells.

Acknowledgments:

This work was supported by research grants from Association Française contre les Myopathies (AFM), Fondation du rein, Association pour l'Information et la Recherche sur les maladies Rénales Génétiques (AIRG France), Oxalosis and Hyperoxaluria Foundation (OHF), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Université de Bordeaux. We thank Dr. D. Trono and Dr. TH. Nguyen for the mTTR promoter, Dr. C. Grosset for liver cell mRNA, Dr. E. Salido for the modified human AGXT cDNA, and Dr. C. Danpure and Dr. S. Fargue for the AGT antibodies.

Authors' contributions

E.R.: conception and design, data analysis and interpretation, manuscript writing; J.E. and J.M.B.: collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing; A.Be. and F.M.G.: data analysis and interpretation; J.H. and B.L: provision of study material or patients; A.Bi., M.L., I.M., L.A.M and P.D.: collection and/or assembly of data. All authors: final approval of manuscript.

Disclosure of potential conflicts of interest

The authors indicate no potential conflicts of interest.

References

- Alonso, M.H., Ryckman, F.C., 1998. Current Concepts in Pediatric Liver Transplant. *Semin Liver Dis* 18, 295–307.
- Annoni, A., Cantore, A., Della Valle, P., Goudy, K., Akbarpour, M., Russo, F., Bartolaccini, S., D'Angelo, A., Roncarolo, M.G., Naldini, L., 2013. Liver gene therapy by lentiviral vectors reverses anti-factor IX pre-existing immunity in haemophilic mice. *EMBO Mol Med* 5, 1684–1697.
- Asplund, A., Pradip, A., Giezen, M. van, Aspegren, A., Choukair, H., Rehnström, M., Jacobsson, S., Ghosheh, N., Hajjam, D.E., Holmgren, S., Larsson, S., Benecke, J., Butron, M., Wigander, A., Noaksson, K., Sartipy, P., Björquist, P., Edsbacke, J., Küppers-Munther, B., 2016. One Standardized Differentiation Procedure Robustly Generates Homogenous Hepatocyte Cultures Displaying Metabolic Diversity from a Large Panel of Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rev and Rep* 12, 90–104.
- Ban, H., Nishishita, N., Fusaki, N., Tabata, T., Saeki, K., Shikamura, M., Takada, N., Inoue, M., Hasegawa, M., Kawamata, S., Nishikawa, S.-I., 2011. 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.
- Baxter, M., Withey, S., Harrison, S., Segeritz, C.-P., Zhang, F., Atkinson-Dell, R., Rowe, C., Gerrard, D.T., Sison-Young, R., Jenkins, R., Henry, J., Berry, A.A., Mohamet, L., Best, M., Fenwick, S.W., Malik, H., Kitteringham, N.R., Goldring, C.E., Piper Hanley, K., Vallier, L., Hanley, N.A., 2015. Phenotypic and functional analyses show stem cell-derived hepatocyte-like cells better mimic fetal rather than adult hepatocytes. *J Hepatol* 62, 581–589.

Beck, B.B., Habbig, S., Dittrich, K., Stippel, D., Kaul, I., Koerber, F., Goebel, H., Salido, E.C., Kemper, M., Meyburg, J., Hoppe, B., 2012. Liver cell transplantation in severe infantile oxalosis—a potential bridging procedure to orthotopic liver transplantation? *Nephrol Dial Transplant* 27, 2984–2989.

Bedel, A., Taillepierre, M., Guyonnet-Duperat, V., Lippert, E., Dubus, P., Dabernat, S., Mautuit, T., Cardinaud, B., Pain, C., Rousseau, B., Lalanne, M., Ged, C., Duchartre, Y., Richard, E., de Verneuil, H., Moreau-Gaudry, F., 2012. Metabolic Correction of Congenital Erythropoietic Porphyria with iPSCs Free of Reprogramming Factors. *Am J Hum Genet* 91, 109–121.

Bergstralh, E.J., Monico, C.G., Lieske, J.C., Herges, R.M., Langman, C.B., Hoppe, B., Milliner, D.S., 2010. Transplantation Outcomes in Primary Hyperoxaluria. *Am J Transplant* 10, 2493–2501.

Cantore, A., Ranzani, M., Bartholomae, C.C., Volpin, M., Della Valle, P., Sanvito, F., Sergi, L., Gallina, P., Benedicenti, F., Bellinger, D., Raymer, R., Merricks, E., Bellintani, F., Martin, S., Doglioni, C., D’Angelo, A., VandenDriessche, T., Chuah, M.K., Schmidt, M., Nichols, T., Montini, E., Naldini, L., 2015. Liver-Directed Lentiviral Gene Therapy in a Dog Model of Hemophilia B. *Sci Transl Med* 7, 277ra28.

Castello, R., Borzone, R., D’Aria, S., Annunziata, P., Piccolo, P., Brunetti-Pierri, N., 2016. Helper-dependent adenoviral vectors for liver-directed gene therapy of primary hyperoxaluria type 1. *Gene Ther* 23, 129–134.

Cavazzana-Calvo, M., Fischer, A., 2007. Gene therapy for severe combined immunodeficiency: are we there yet? *J Clin Invest* 117, 1456–1465.

Cochat, P., Fargue, S., Harambat, J., 2010. Primary hyperoxaluria type 1: strategy for organ transplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation* 15, 590–593.

Cochat, P., Hulton, S.-A., Acquaviva, C., Danpure, C.J., Daudon, M., De Marchi, M., Fargue, S., Groothoff, J., Harambat, J., Hoppe, B., Jamieson, N.V., Kemper, M.J., Mandrile, G., Marangella, M., Picca, S., Rumsby, G., Salido, E., Straub, M., Woerden, V., S, C., 2012. Primary hyperoxaluria Type 1: indications for screening and guidance for diagnosis and treatment. *Nephrol Dial Transplant* 27, 1729–1736.

Dindo, M., Oppici, E., Dell’Orco, D., Montone, R., Cellini, B., 2018. Correlation between the molecular effects of mutations at the dimer interface of alanine–glyoxylate aminotransferase leading to primary hyperoxaluria type I and the cellular response to vitamin B6. *J Inherit Metab Dis* 41, 263–275.

Fineran, P.C., Charpentier, E., 2012. Memory of viral infections by CRISPR-Cas adaptive immune systems: Acquisition of new information. *Virology*, Special issue: viruses of microbes 434, 202–209.

Fukuda, T., Takayama, K., Hirata, M., Liu, Y.-J., Yanagihara, K., Suga, M., Mizuguchi, H., Furue, M.K., 2017. Isolation and expansion of human pluripotent stem cell-derived hepatic progenitor cells by growth factor defined serum-free culture conditions. *Experimental Cell Research* 352, 333–345.

Gao, X., Liu, Y., 2017. A transcriptomic study suggesting human iPSC-derived hepatocytes potentially offer a better in vitro model of hepatotoxicity than most hepatoma cell lines. *Cell Biol Toxicol* 33, 407–421.

Ghosheh, N., Olsson, B., Edsbacke, J., Küppers-Munther, B., Van Giezen, M., Asplund, A., Andersson, T.B., Björquist, P., Carén, H., Simonsson, S., Sartipy, P., Synnergren, J., 2016. Highly Synchronized Expression of Lineage-Specific Genes during In Vitro Hepatic Differentiation of Human Pluripotent Stem Cell Lines. *Stem Cells Int* 2016.

Guengerich, F.P., 1999. CYTOCHROME P-450 3A4: Regulation and Role in Drug Metabolism. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 39, 1–17.

Hannan, N.R., Segeritz, C.-P., Touboul, T., Vallier, L., 2013. Production of hepatocyte like cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 8, 430–437.

Harambat, J., Fargue, S., Acquaviva, C., Gagnadoux, M.-F., Janssen, F., Liutkus, A., Mourani, C., Macher, M.-A., Abramowicz, D., Legendre, C., Durrbach, A., Tsimaratos, M., Nivet, H., Girardin, E., Schott, A.-M., Rolland, M.-O., Cochat, P., 2010. Genotype–phenotype correlation in primary hyperoxaluria type 1: the p.Gly170Arg AGXT mutation is associated with a better outcome. *Kidney International* 77, 443–449.

Harambat, J., Fargue, S., Bacchetta, J., Acquaviva, C., Cochat, P., 2011. Primary Hyperoxaluria. *Int J Nephrol* 2011.

Hoppe, B., Beck, B.B., Milliner, D., 2009. The Primary Hyperoxalurias. *Kidney Int* 75, 1264–1271.

Jiang, J., Salido, E.C., Guha, C., Wang, X., Moitra, R., Liu, L., Roy-chowdhury, J., Roy-chowdhury, N., 2008. Correction of Hyperoxaluria by Liver Repopulation With Hepatocytes in a Mouse Model of Primary Hyperoxaluria Type-1. *Transplantation* 85, 1253–1260.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E., 2012. A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* 337, 816–821.

Laurent, V., Fraix, A., Montier, T., Cammas-Marion, S., Ribault, C., Benvegna, T., Jaffres, P.-A., Loyer, P., 2010. Highly efficient gene transfer into hepatocyte-like HepaRG cells: new means for drug metabolism and toxicity studies. *Biotechnol J* 5, 314–320.

Lee, P.C., Truong, B., Vega-Crespo, A., Gilmore, W.B., Hermann, K., Angarita, S.A., Tang, J.K., Chang, K.M., Wininger, A.E., Lam, A.K., Schoenberg, B.E., Cederbaum, S.D., Pyle, A.D., Byrne, J.A., Lipshutz, G.S., 2016. Restoring Ureagenesis in Hepatocytes by CRISPR/Cas9-mediated Genomic Addition to Arginase-deficient Induced Pluripotent Stem Cells. *Mol Ther Nucleic Acids* 5, e394.

Mesa-Torres, N., Yunta, C., Fabelo-Rosa, I., Gonzalez-Rubio, J.M., Sánchez-Ruiz, J.M., Salido, E., Albert, A., Pey, A.L., 2014. The consensus-based approach for gene/enzyme replacement therapies and crystallization strategies: the case of human alanine–glyoxylate aminotransferase. *Biochemical Journal* 462, 453–463.

Moreau-Gaudry, F., Xia, P., Jiang, G., Perelman, N.P., Bauer, G., Ellis, J., Surinya, K.H., Mavilio, F., Shen, C.K., Malik, P., 2001. High-level erythroid-specific gene expression in primary human and murine hematopoietic cells with self-inactivating lentiviral vectors. *Blood* 98, 2664–2672.

Newstead, C.G., 1998. Assessment of risk of cancer after renal transplantation. *The Lancet* 351, 610–611.

Nguyen, T.H., Bellodi-Privato, M., Aubert, D., Pichard, V., Myara, A., Trono, D., Ferry, N., 2005. Therapeutic Lentivirus-Mediated Neonatal in Vivo Gene Therapy in Hyperbilirubinemic Gunn Rats. *Molecular Therapy* 12, 852–859.

Ohmori, T., Mizukami, H., Katakai, Y., Kawai, S., Nakamura, H., Inoue, M., Shu, T., Sugimoto, H., Sakata, Y., 2018. Safety of intra-articular transplantation of lentivirally transduced mesenchymal stromal cells for haemophilic arthropathy in a non-human primate. *Int J Hematol* 1–7.

Okita, K., Yamanaka, S., 2011. Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366, 2198–2207.

Pankowicz, F.P., Jarrett, K.E., Lagor, W.R., Bissig, K.-D., 2017. CRISPR/Cas9: at the cutting edge of hepatology. *Gut* 66, 1329–1340.

Rashid, S.T., Corbineau, S., Hannan, N., Marciniak, S.J., Miranda, E., Alexander, G., Huang-Doran, I., Griffin, J., Ahrlund-Richter, L., Skepper, J., Semple, R., Weber, A., Lomas, D.A., Vallier, L., 2010. Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. *J Clin Invest* 120, 3127–3136.

Richard, E., Robert, E., Cario-André, M., Ged, C., Géronimi, F., Gerson, S.L., Verneuil, H. de, Moreau-Gaudry, F., 2004. Hematopoietic stem cell gene therapy of murine protoporphyria by methylguanine-DNA-methyltransferase-mediated *in vivo* drug selection. *Gene Therapy* 11, 1638–1647.

Roy-Chowdhury, N., Wang, X., Guha, C., Roy-Chowdhury, J., 2017. Hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells. *Hepatology* 65, 54–69.

Salido, E., Rodriguez-Pena, M., Santana, A., Beattie, S.G., Petry, H., Torres, A., 2011. Phenotypic Correction of a Mouse Model for Primary Hyperoxaluria With Adeno-associated Virus Gene Transfer. *Mol Ther* 19, 870–875.

Salido, E.C., Li, X.M., Lu, Y., Wang, X., Santana, A., Roy-Chowdhury, N., Torres, A., Shapiro, L.J., Roy-Chowdhury, J., 2006. Alanine-glyoxylate aminotransferase-deficient mice, a model for primary hyperoxaluria that responds to adenoviral gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18249–18254.

Santana, A., Salido, E., Torres, A., Shapiro, L.J., 2003. Primary hyperoxaluria type 1 in the Canary Islands: A conformational disease due to I244T mutation in the P11L-containing alanine:glyoxylate aminotransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7277–7282.

Schmitt, F., Remy, S., Dariel, A., Flageul, M., Pichard, V., Boni, S., Usal, C., Myara, A., Laplanche, S., Anegon, I., Labrune, P., Podevin, G., Ferry, N., Nguyen, T.H., 2010. Lentiviral Vectors That Express UGT1A1 in Liver and Contain miR-142 Target Sequences Normalize Hyperbilirubinemia in Gunn Rats. *Gastroenterology* 139, 999-1007.e2.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131, 861–872.

Takayama, K., Hagihara, Y., Toba, Y., Sekiguchi, K., Sakurai, F., Mizuguchi, H., 2018. Enrichment of high-functioning human iPS cell-derived hepatocyte-like cells for pharmaceutical research. *Biomaterials* 161, 24–32.

Trevisan, M., Desole, G., Costanzi, G., Lavezzo, E., Palù, G., Barzon, L., 2017. Reprogramming Methods Do Not Affect Gene Expression Profile of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Int J Mol Sci* 18.

Zapata-Linares, N., Rodriguez, S., Salido, E., Abizanda, G., Iglesias, E., Prosper, F., Gonzalez-Aseguinolaza, G., Rodriguez-Madoz, J.R., 2016. Generation and characterization of human iPSC lines derived from a Primary Hyperoxaluria Type I patient with p.I244T mutation. *Stem Cell Research* 16, 116–119.

Zhang, S., Chen, S., Li, W., Guo, X., Zhao, P., Xu, J., Chen, Y., Pan, Q., Liu, X., Zychlinski, D., Lu, H., Tortorella, M.D., Schambach, A., Wang, Y., Pei, D., Esteban, M.A., 2011. 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.

Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R.J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., Trono, D., 1998. Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient In Vivo Gene Delivery. *J Virol* 72, 9873–9880.

Figures legends

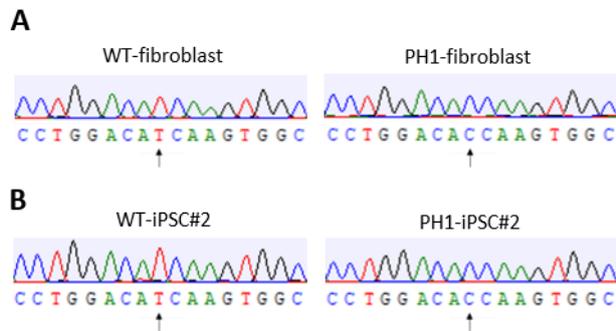


Figure 1. Analysis of *AGXT* mutations in primary fibroblasts and iPSCs.

The homozygous c.731T>C *AGXT* mutation was detected in PH1-fibroblasts (A) and PH1-iPSC lines (B) by Sanger sequencing of *AGXT* exon 7.

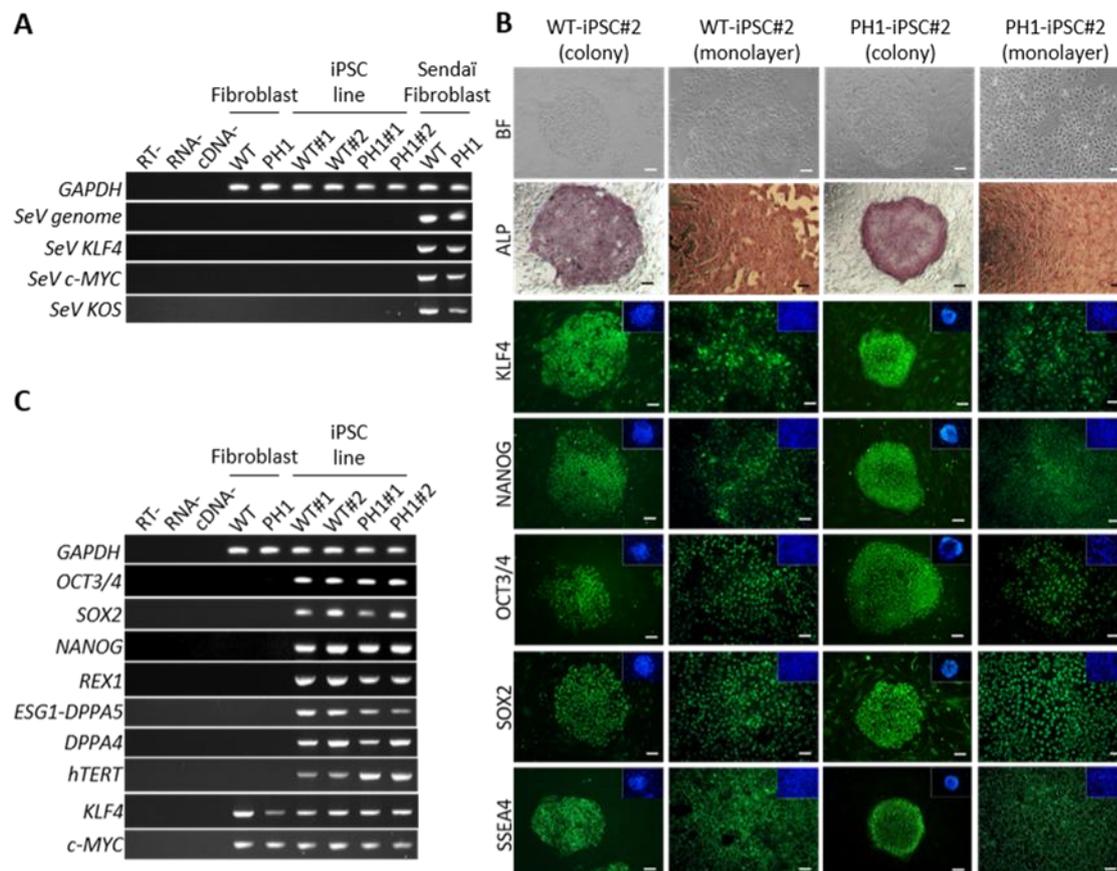


Figure 2. Generation and characterization of human WT and PH1-iPSCs.

(A) RT-PCR analysis of Sendai virus (SeV) reprogramming factor expression before SeV transduction (Fibroblast), 5 days after SeV transduction (Sendai fibroblast) and in established

iPSCs (iPSC line). (B) Analysis of iPSC morphology (BF, bright field), alkaline phosphatase activity (ALP) and pluripotency-associated marker expression (green immunofluorescence staining) in iPSCs expanded on stromal MEF cells (colony) or in feeder-free conditions (monolayer). DAPI staining revealed nuclei (blue). Scale bars, 100 μ m. Magnification, 100X. (C) RT-PCR analysis of endogenous pluripotency-associated marker expression in iPSC lines as compared with primary fibroblasts.

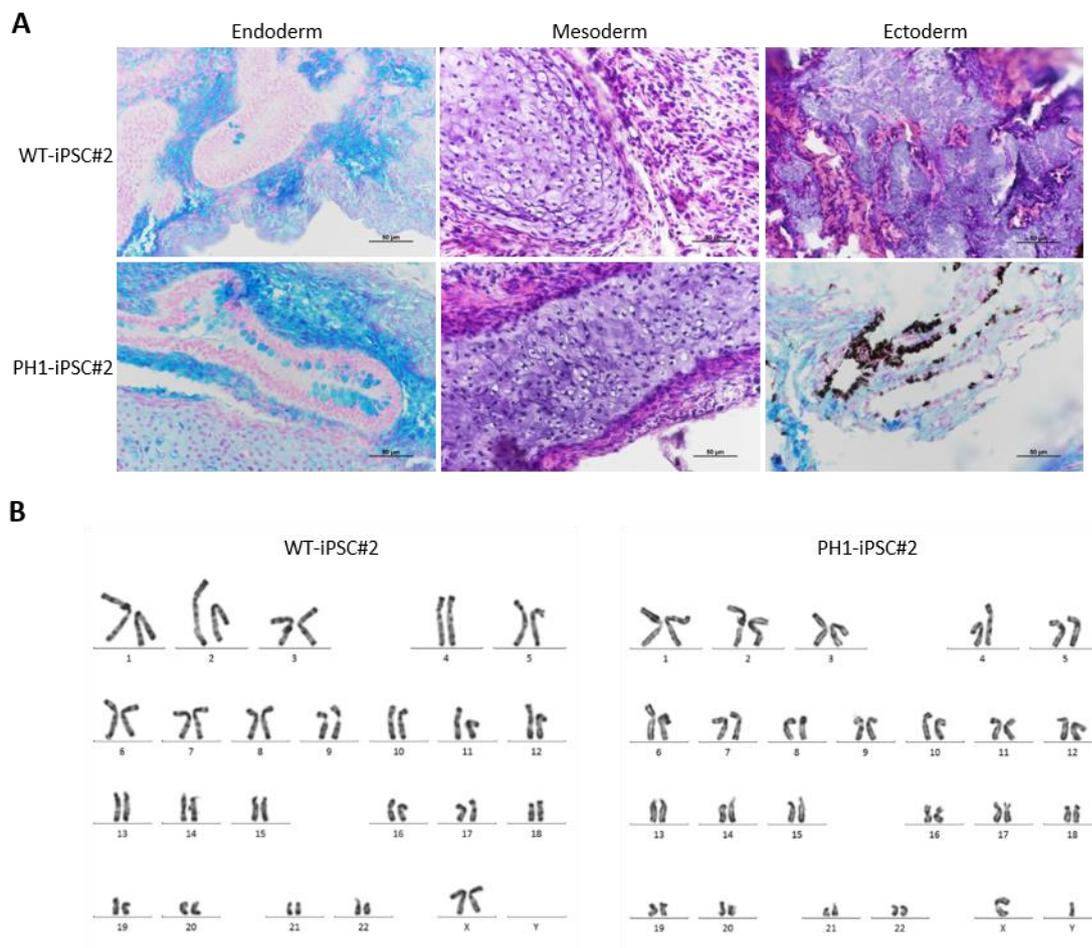


Figure 3. Teratoma and karyotype analysis.

(A) Alcian blue and hematoxylin/eosin staining of histological sections of a representative teratoma derived from WT-iPSC#2 and PH1-iPSC#2 shows tissues of all three germ layers. Scale bars, 50 μ m. Magnification, 40X. (B) Representative karyotype analysis of WT-iPSC#2 (46, XX) and PH1-iPSC#2 (46, XY) revealed no abnormalities.

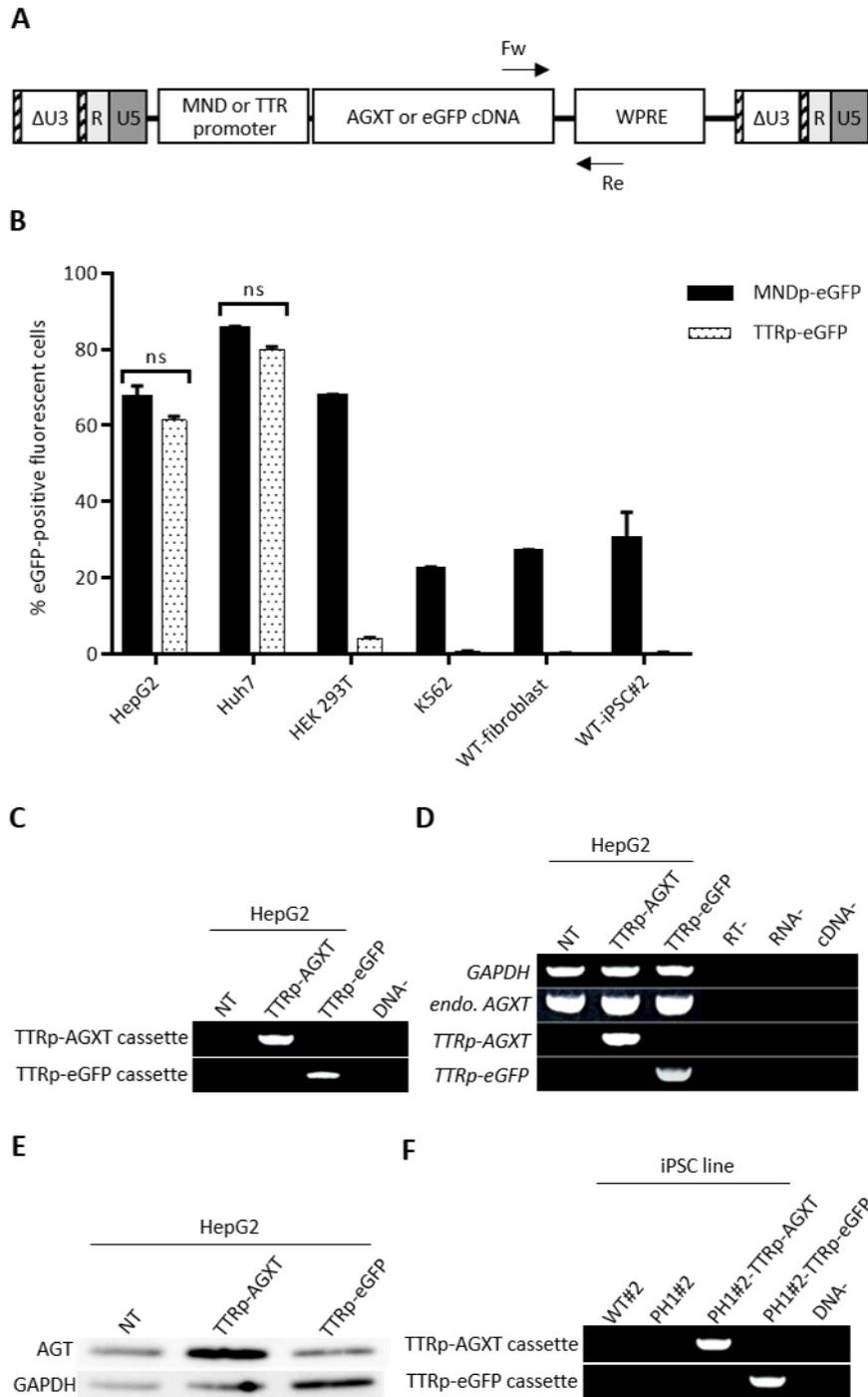


Figure 4. Characterization of the therapeutic AGT-expressing liver-specific lentiviral vector.

(A) Lentiviral vector construct and PCR primer location used for proviral integration analysis. (B) Analysis of eGFP expression in hepatic (HepG2 and Huh7) and non-hepatic (HEK 293T, K562, WT-fibroblast and WT-iPSC#2) cells after lentiviral transduction. eGFP expression was detected by flow cytometry analysis and data were expressed as means \pm SD of four

independent experiments. (C) PCR analysis of proviral integration in transduced HepG2 cells. (D) RT-PCR analysis of eGFP and AGXT expression in transduced HepG2 cells. (E) Western blotting analysis of AGT protein expression in transduced HepG2 cells. GAPDH was used as control housekeeping gene. (F) PCR analysis of proviral integration in transduced PH1-iPSC#2 cells. Abbreviations: ns, non-significant; endo., endogenous.

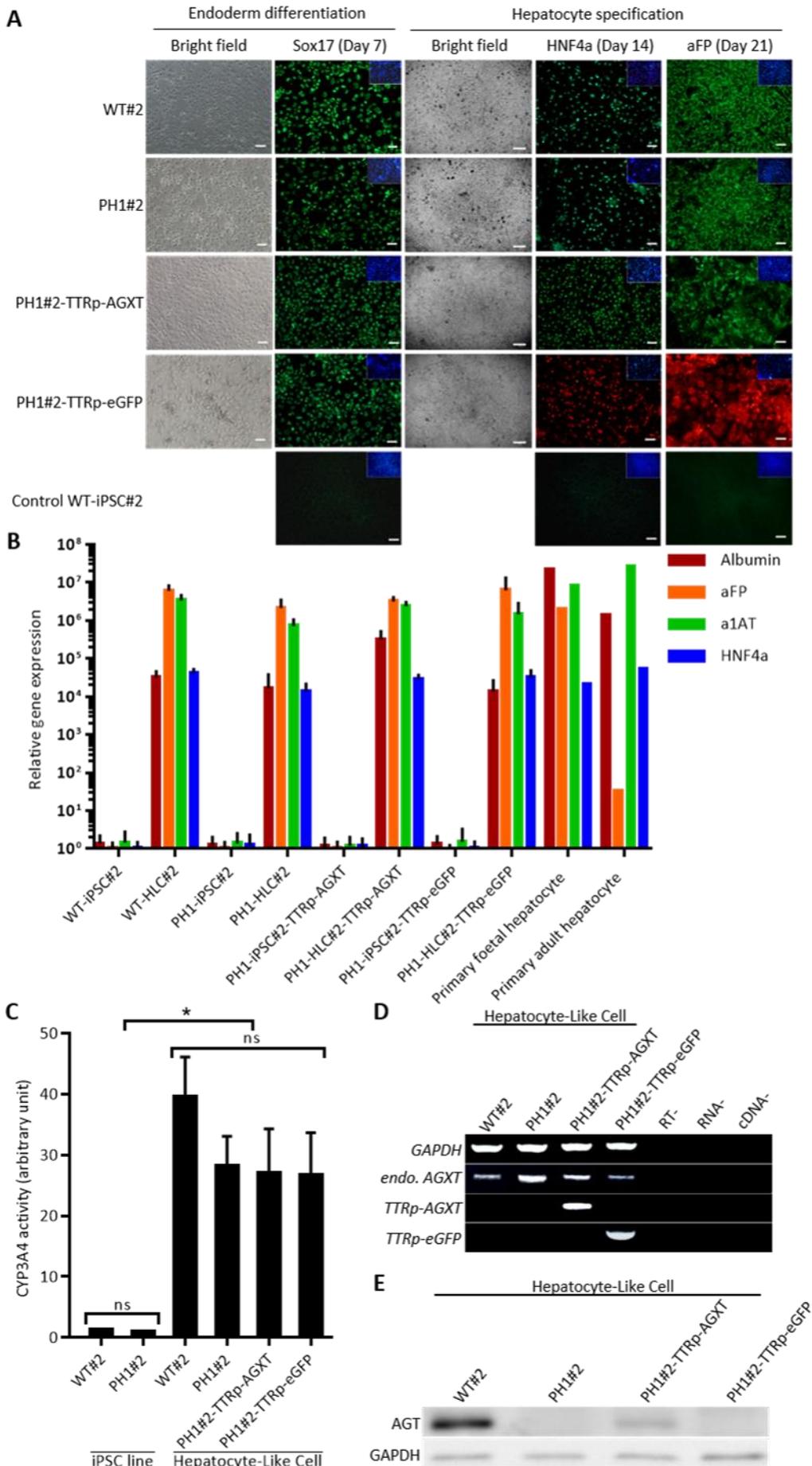
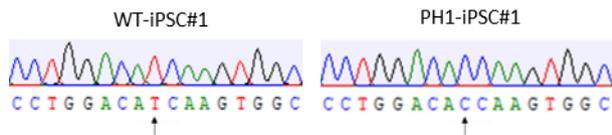
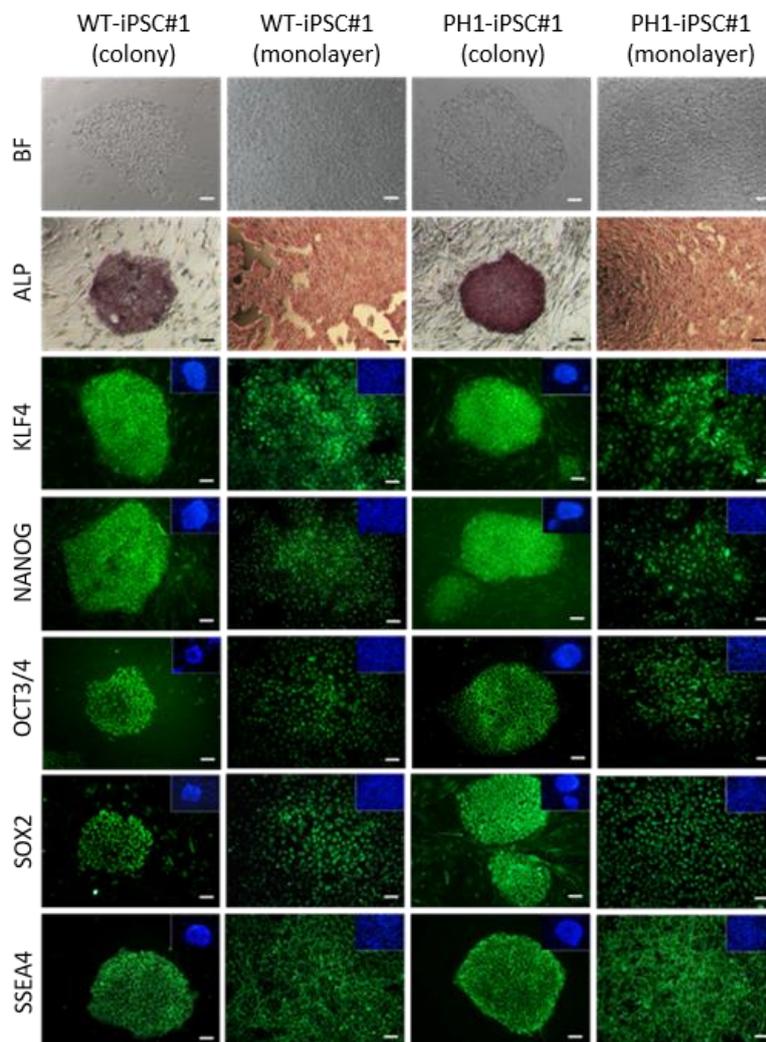


Figure 5. Characterization of hepatocyte-like cells (HLCs) and analysis of AGT expression rescue.

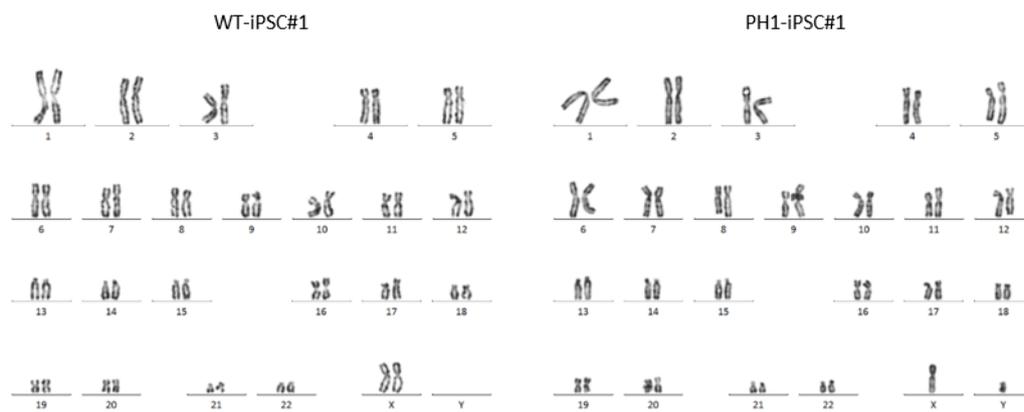
(A) Bright field and immunofluorescence staining of endodermic (SOX17) and hepatic markers (HNF4a and aFP) throughout hepatocyte differentiation. Nuclei were localized by DAPI (blue). Scale bars, 100 μ m. Magnification, 100X. (B) RT-qPCR analysis of hepatic gene markers in HLCs at day 31 of hepatocyte differentiation. Gene expression was normalized to the endogenous *HuP0* gene and data are means \pm SD of four independent experiments. (C) CYP3A4 activity analysis in HLCs at day 31 of differentiation. Data were expressed as means \pm SD of three independent experiments; *, $p < 0,05$. (D) RT-PCR analysis of eGFP and endogenous (endo. AGXT) or exogenous AGXT expression in HLCs. (E) Western blotting analysis of AGT protein expression in HLCs. Abbreviations: aFP, alpha-fetoprotein; a1AT, alpha-1 antitrypsin; ns, non-significant; endo., endogenous.



Supplemental Figure S1. Evaluation of *AGXT* genotype stability in WT- and PH1-iPSC clones #1 by Sanger sequencing of *AGXT* exon 7.



Supplemental Figure S2. Analysis of iPSC morphology (BF, bright field), alkaline phosphatase activity (ALP) and pluripotency-associated marker expression (green immunofluorescence staining) in iPSC clones #1 expanded on stromal MEF cells (colony) or in feeder-free conditions (monolayer). DAPI staining revealed nuclei (blue). Scale bars, 100 μ m. Magnification, 100X.



Supplemental Figure S3. Representative karyotype analysis of WT-iPSC#1 (46, XX) and PH1-iPSC#1 (46, XY) revealed no abnormalities.

Supplemental Table 1. Specific forward (F) and reverse (R) primer sets used in study.

Target	Primer sequence	Amplicon (bp)	Application
<i>AGXT_exon 7</i>	F: 5' GGGTGATGTGAGAAATGAAGG 3' R: 5' GATTCTGGGGCTCTAGTTGG 3'	552	PCR, <i>AGXT</i> genotyping
<i>AGXT-WPRE</i>	F: 5' CCACTTCGACATTGAGATC 3' R: 5' CCACATAGCGTAAAAGGAG 3'	240	PCR, proviral integration analysis and
<i>eGFP-WPRE</i>	F: 5' ACCACTACCAGCAGAACAC 3' R: 5' CCACATAGCGTAAAAGGAG 3'	287	RT-PCR, evaluation of lentiviral cassette expression
<i>AGXT</i>	F: 5' TACCCGCTGGCTATGACTG 3' R: 5' CGCCCAAGTGACTGTTT 3'	412	RT-PCR, evaluation of endogenous <i>AGXT</i> expression
<i>GAPDH</i>	F: 5' TCGGAGTCAACGGATTTGG 3' R: 5' ATCTCGCTCCTGGAAGATGG 3'	227	RT-PCR, housekeeping gene
<i>SeV genome</i>	F: 5' GGATCACTAGGTGATATCGAGC 3' R: 5' ACCAGACAAGAGTTTAAGAGATATGTATC 3'	181	RT-PCR, evaluation of reprogramming transgene silencing
<i>Sev KOS</i>	F: 5' ATGCACCGCTACGACGTGAGCGC 3' R: 5' ACCTTGACAATCCTGATGTGG 3'	528	
<i>SeV KLF4</i>	F: 5' TTCCTGCATGCCAGAGGAGCCC 3' R: 5' AATGTATCGAAGGTGCTCAA 3'	410	
<i>SeV c-MYC</i>	F: 5' TAACTGACTAGCAGGCTTGTCG 3' R: 5' TCCACATACAGTCCTGGATGATGATG 3'	532	
<i>OCT3/4</i>	F: 5' GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG 3' R : 5' CTCCCTCCAACCAGTTGCCCAAAC 3'	144	
<i>NANOG</i>	F: 5' CAGCCCTGATTCTTCCACCAGTCCC 3' R: 5' TGGAAGGTTCCAGTCGGGTTCAAC 3'	391	RT-PCR, evaluation of iPSC pluripotency
<i>SOX2</i>	F: 5' GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAAGAGG 3' R: 5' TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG 3'	151	
<i>hTERT</i>	F: 5' CCTGCTCAAGCTGACTCGACACCGTG 3' R: 5' GGAAAAGCTGGCCCTGGGGTGGAGC 3'	446	
<i>c-MYC</i>	F: 5' GCGTCTGGGAAGGGAGATCCGGAGC 3' R: 5' TTGAGGGGCATCGTCGCGGGAGGCTG 3'	328	
<i>REX1</i>	F: 5' CAGATCCTAAACAGCTCGCAGAAT 3' R: 5' GCGTACGCAAATTAAGTCCAGA 3'	306	
<i>KLF4</i>	F: 5' ACGATCGTGGCCCCGAAAAGGACC 3' R: 5' TGATTGTAGTGCTTTCTGGCTGGGCTCC 3'	397	
<i>DPPA4</i>	F: 5' GGAGCCGCCTGCCCTGGAAAATTC 3' R: 5' TTTTTCCTGATATTCTATCCCAT 3'	408	

<i>ESG1/DPPA5</i>	F: 5' ATATCCCGCCGTGGGTGAAAGTTC 3' R: 5' ACTCAGCCATGGACTGGAGCATCC 3'	243	
<i>HuPO</i>	F: 5' TGGAGGGTGTCCGCAATGTT 3' R: 5' GAAGCCTTGACCTTTTCAG 3'	158	RT-qPCR, housekeeping gene
<i>HNF4a</i>	F: 5' AAGCCGTCCAGAATGAGC 3' R: 5' GAATGTCGCCGTTGATCC 3'	147	RT-qPCR, hepatocyte-like cell characterization
<i>a1AT</i>	F: 5' CCTCCGTACCCTCAACCA 3' R: 5' GGTCTCTCCATTGCTT 3'	294	
<i>aFP</i>	F: 5' CAAACAAAGGCAGCAACAGT 3' R: 5' GCAGACAATCCAGCACATCT 3'	229	
<i>Albumin</i>	F: 5' GTGCTGCTGCTGAGACTTG 3' R: 5' TGCTGCCCACTTTTCCTAG 3'	277	

Supplemental Table 2. Primary and secondary antibodies used in study to demonstrate iPSC pluripotency and to characterize hepatocyte-like cell commitment by immunofluorescence analysis. Abbreviation: aFP, alpha-fetoprotein.

Target	Reference	Dilution	Isotype	Reference	Dilution
KLF4	Abcam, ab26648	1:200	Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 488	Life Technologies, A-11008	1:500
NANOG	Abcam, ab80892	1:50	Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 488	Life Technologies, A-11008	1:500
OCT3/4	SCBT, Santa Cruz, SC-5279	1:200	Chicken anti-Mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 488	Life Technologies, A-21200	1:500
SOX2	Abcam, ab59776	1:200	Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 488	Life Technologies, A-11008	1:500
SSEA4	StemCell Technologies, #01554	1:200	Chicken anti-Mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 488	Life Technologies, A-21200	1:500
SOX17	R&D Systems, AF1924	1:100	Chicken anti-Goat IgG (H+L), Alexa Fluor 488	Life Technologies, A-21467	1:500
HNF4a	SCBT, Santa Cruz, SC-6556	1:50	Chicken anti-Goat IgG (H+L), Alexa Fluor 488	Life Technologies, A-21467	1:500
			Donkey anti-Goat IgG (H+L), Alexa Fluor 555	Life Technologies, A-21432	1:250
aFP	Dako, A 0008	1:300	Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 488	Life Technologies, A-11008	1:500
			Donkey anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 555	Abcam, ab150074	1:250

Supplemental Table 3. Primary and secondary antibodies used to evaluate alanine:glyoxylate aminotransferase expression by western Blot. The polyclonal rabbit antibody to AGT was kindly provided by C.J. Danpure. Abbreviation: HRP, horseradish peroxidase.

Target	Reference	Dilution	Isotype	Reference	Dilution
AGT	Gift from C.J. Danpure	1:10000	Goat anti-Rabbit IgG (H+L), HRP-linked	CST, #7074	1:3000
GAPDH	CST, #2118	1:5000			

Résultats 2 (Article 2)

Targeted gene therapy in human induced pluripotent stem cells from a patient with primary hyperoxaluria type 1 using the CRISPR/Cas9 technology.

(en préparation pour publication)

Dans ce second projet de recherche, nous avons suivi un schéma de thérapie génique additive *ex vivo* similaire au projet précédent. Nous avons cependant souhaité accroître la sécurité du processus de modification du génome cellulaire grâce à la maîtrise du site d'intégration du vecteur thérapeutique. Le site d'insertion que nous avons choisi correspond au locus *AAVS1*, qui constitue le site préférentiel d'intégration des virus AAV et dont la manipulation génique est considérée comme sécuritaire pour les cellules.

Dans l'objectif de procéder à une intégration du transgène *AGXT* de façon ciblée au sein de ce locus, nous avons eu recours au processus de recombinaison homologue, qui consiste en un échange de séquences d'ADN entre une région génomique et une matrice endogène ou exogène présentant une homologie avec cette région. La fréquence d'exécution spontanée de ce processus est faible, mais elle peut être augmentée de façon significative en effectuant un clivage du site cible de recombinaison ; dans le cas de notre étude, le clivage du locus *AAVS1* a été réalisé à l'aide de la technologie CRISPR/Cas9. L'intégration du transgène *AGXT* dans le génome des iPSCs dérivées du patient atteint de PH1 a été réalisée après transfection des cellules en présence 1) d'une matrice de recombinaison plasmidique composée du transgène thérapeutique *AGXT* associé à la séquence d'expression de la copGFP (protéine verte fluorescence dérivée de l'arthropode *Pontellina plumata*) et au gène de résistance à la puromycine, l'ensemble étant encadré par des séquences homologues au locus *AAVS1*, 2) d'un plasmide d'expression de l'ARN guide chimérique ciblant le locus *AAVS1* et 3) de la Cas9 nucléase sous forme d'ARN messenger, permettant une action rapide et brève de la protéine et réduisant ainsi les risques de coupure en-dehors de la cible⁴⁰⁶.

Les cellules transfectées ont été sélectionnées de façon stable en présence de puromycine, puis nous avons procédé à un sous-clonage de la population par cytométrie en flux sur la base de l'expression de la copGFP. Nous avons ensuite caractérisé l'intégration de la matrice de recombinaison au sein des clones viables, en nous assurant de la spécificité de son insertion au sein du locus *AAVS1*. A la suite de

ces expériences de caractérisation, nous avons sélectionné un clone d'iPSCs correctement recombiné que nous avons soumis à une dernière série d'analyses afin de vérifier l'intégrité génomique de régions hors-cible susceptibles d'être clivées par le système CRISPR/Cas9 que nous avons utilisé.

Après avoir franchi avec succès toutes les étapes de caractérisation, le clone d'iPSCs sélectionné a finalement été différencié en hépatocytes-*like*, selon un processus identique au projet précédent. L'engagement des cellules vers la lignée hépatique a été confirmé *via* l'expression transcriptionnelle et protéique de marqueurs spécifiques, et par la démonstration de l'activité cytochromique des cellules. La mise en évidence de la restauration de l'expression protéique du gène *AGXT* au sein des hépatocytes-*like* génétiquement modifiés a finalement confirmé l'efficacité de notre protocole de thérapie génique additive ciblée.

Targeted gene therapy in human induced pluripotent stem cells from a patient with primary hyperoxaluria type 1 using the CRISPR/Cas9 technology.

Julie Estève ^{a,b,*}, Jean-Marc Blouin ^{a,b,*}, Magalie Lalanne ^{a,b}, Lamia Azzi-Martin ^{a,c}, Pierre Dubus ^{a,c}, Audrey Bidet ^d, Jérôme Harambat ^e, Brigitte Llanas ^e, Isabelle Moranvillier ^{a,b}, Aurélie Bedel ^{a,b}, François Moreau-Gaudry ^{a,b}, Emmanuel Richard ^{a,b,#}.

^a Université de Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France.

^b INSERM, Biothérapie des Maladies Génétiques, Inflammatoires et Cancers, U1035, F-33000 Bordeaux, France.

^c INSERM, Bordeaux Research in Translational Oncology, U1053, F-33000 Bordeaux, France.

^d Laboratoire d'Hématologie, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France.

^e Service de Néphrologie Pédiatrique, Centre de Référence Maladies Rénales Rares du Sud-Ouest, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, F33000 Bordeaux cedex, France.

* Contributed equally.

Corresponding author:

Dr. Emmanuel Richard, PhD, Université de Bordeaux, INSERM U1035, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France. Email: emmanuel.richard@u-bordeaux.fr

Phone: 33 5 57 57 13 78 / Fax: 33 5 57 57 13 74

Abbreviations

AAVS1	Adeno associated virus integration site 1
aFP	Alpha-foeto protein
AGT	Alanine glyoxylate amino-transferase
Cas 9	CRISPR associated nuclease 9
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
HLC	Hepatocyte-like cells
iPSCs	Induced pluripotent stem cells
NHEJ	Non homologous end joining
PH1	Primary hyperoxaluria type 1

Key words: hyperoxaluria, induced pluripotent stem cell, genome editing, CRISPR/Cas9, hepatic differentiation, AAVS1.

Highlights:

- Liver-targeted gene therapy is a therapeutic option for primary hyperoxaluria type 1 (PH1).
- An optimized AGT cDNA was targeted to the AAVS1 locus in iPSCs from a PH1 patient.
- AGT expression was rescued into hepatocyte-like cells derived from AAVS1-targeted PH1-iPSCs.

Abstract

Primary hyperoxaluria type 1 (PH1) is an inherited metabolic disorder caused by a deficiency of the peroxisomal enzyme alanine:glyoxylate aminotransferase (AGT) which leads to overproduction of oxalate by the liver resulting in urolithiasis, nephrocalcinosis and renal failure. The only curative treatment for PH1 is combined liver and kidney transplantation which is limited by the scarce supply of suitable organs, significant complications, and the life-long requirement for immunosuppressive agents to maintain organ tolerance. Hepatocyte-like cells (HLCs) generated from CRISPR/Cas9 genome edited human induced pluripotent stem cells would offer an attractive unlimited source of autologous gene-corrected liver cells as an alternative to orthotopic liver transplantation (OLT). Here we report the CRISPR/Cas9 nuclease-mediated gene targeting of an *AGXT* therapeutic minigene into the safe harbor AAVS1 locus in PH1-iPSCs without off-target inserts. We obtained a robust expression of a codon optimized AGT in HLCs derived from AAVS1 locus-edited PH1-iPSCs. Our study provides the proof-of-concept that CRISPR/Cas9-mediated integration of an *AGXT* minigene into the AAVS1 safe harbour locus in patient-specific iPSCs represents an efficient strategy to generate functionally corrected hepatocytes, which in the future may serve as a source for an autologous cell-based gene therapy for the treatment of PH1.

Introduction

Primary hyperoxaluria type 1 (PH1, OMIM #259900) is a rare inherited metabolic disease due to a deficit of the liver-specific enzyme alanine-glyoxylate aminotransferase (AGT, EC 2.6.1.44) encoded by the *AGXT* gene (locus 2q37.3) [1]. The AGT enzyme normally localizes in hepatocyte peroxisome where it metabolizes glyoxylate to glycine [2]. In PH1 patients, the lack of AGT activity results in a build-up of glyoxylate, which is oxidised to oxalate by the enzyme lactate dehydrogenase. Oxalate is excreted by the kidneys and complexes with calcium in the urinary tract, leading to the formation of insoluble calcium-oxalate crystals manifested as recurrent nephrolithiasis, nephrocalcinosis and progressive kidney failure. The most effective treatment for PH1 is pre-emptive liver transplantation which represents a form of enzyme replacement therapy by restoring a normal hepatic AGT activity [3]. Nevertheless, this treatment is limited by organ suitability, significant morbidity and mortality and the life-long requirement for immunosuppressive agents [4]. Transplantation of autologous gene-corrected hepatocytes would offer an interesting alternative to orthotopic liver transplantation (OLT) but the lack of effective cell-culture systems to expand and maintain mature, fully differentiated hepatocytes *in vitro* are major obstacles to basic and translational investigations of the pathogenesis and treatment of liver disease [5]. During the last years the possibility of reprogramming mature somatic cells to generate induced pluripotent stem cells (iPSCs) has enabled the derivation of disease-specific pluripotent stem cells that can be further differentiated in many cell types including liver cells [6–8]. The generation of patient-specific hepatocytes offers a wide range of applications in cell and gene therapy, and unsuspected perspectives for regenerative medicine of the liver. We recently reported the generation of transgene-free iPSCs after reprogramming dermal fibroblasts from a PH1 patient using non-integrative Sendai vectors [9]. PH1-iPSCs harboured homozygous c.731T>C mutation (p.I244T) in exon 7 of *AGXT* gene and could be readily differentiated into hepatocyte-like cells (HLCs) that displayed a low residual AGT^{I244T} expression. We were able to rescue AGT expression in PH1-HLCs after transduction with a lentiviral vector expressing a codon optimized AGT cDNA under the control of the liver specific transthyretin promoter.

Targeted gene therapy enables the insertion of therapeutic transgenes into safe loci of the genome and represents an alternative to the use of conventional integrative viral vectors. Gene-specific targeting in human and mouse iPSCs has highlighted the potential to overcome the hurdles of gene replacement therapy such as insertional mutagenesis and to prevent

unwanted positional effects of transgene expression [10]. Targeted endonucleases such as zinc finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like endonucleases (TALENs) and recently the clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated nuclease 9 (CRISPR/Cas9) induce a site-specific double-strand DNA break at a target locus and promote efficient genome editing via homology-directed repair triggering precise genome modification [11]. The AAVS1 locus lying in the first intron of the *PPP1R12C* gene on human chromosome 19, corresponds to an open chromosomal region that allows the insertion of an exogenous gene [12]. The AAVS1 locus is often considered a “safe harbour” for gene targeting due to the insulating properties attributed to the surrounding chromatin and the absence of side effect attributed to its disruption [13].

In this study, we aimed at targeting the integration of a PGK promoter-driven AGT transgene to the AAVS1 site of PH1 patient-iPSCs in order to rescue AGT expression in derived hepatocyte-like cells. Corrected PH1-iPSCs retained pluripotency and no CRISPR/Cas9-associated off-target mutations were detected in the top-five predicted off-target sites. We restored AGT expression in hepatocyte-like cells derived from corrected PH1-iPSCs.

Material and Methods

Human iPSCs

Induced pluripotent stem cells from a PH1 patient and WT individual were previously described [9]. iPSCs were maintained as monolayer cells in feeder-free Cellartis® DEF-CS™ Culture System (Takara Bio Europe) as previously described [14].

Donor vector and CRISPR/Cas9 related plasmids

A codon-optimized human *AGXT* cDNA was PCR-amplified and inserted between the NdeI and EcoRV restriction sites of the pAAVS1D-PGK-MCS-EF1a-copGFP-T2A-Puro donor cloning vector (#GE602A-1, System Biosciences) to generate the pAAVS1-PAEGP donor plasmid. This backbone is flanked at the 5' and 3' ends by sequences homologous to the upstream and downstream regions of the CRISPR/Cas9 recognition site in the AAVS1 locus. The pUC19-sgRNA-T2 plasmid was derived from the pUC19 cloning vector (#50005, Addgene) in which was inserted the single-guide RNA (sgRNA) cloning backbone from the pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX462) plasmid (#62987, Addgene) ; the sgRNA sequence targeting the AAVS1 locus, called sgRNA-T2 [15], was inserted into the cloning backbone at BbsI restriction site. The sgRNA cloning sequences are listed in Supplementary Table 1.

PH1-iPSC transfection and selection

2. 10^5 PH1-iPSCs were transfected by lipofection with 1 μ g of pAAVS1-PAEGP plasmid, 1 μ g of pUC19-sgRNA-T2 and 1 μ g of GeneArt CRISPR Nuclease mRNA (Invitrogen) using Lipofectamine® 2000 (Life Technologies). Puromycin selection (0.5 μ g/ml) started at day 9 after lipofection. One month later, puromycin-resistant PH1-iPSCs were subcloned as single cells into 96-well plates based on copGFP fluorescence, using fluorescence-activated cell sorting (BD FACSAria™ III sorter and FACSDiva™ software, BD Biosciences®). Isolated AAVS1-targeted PH1-iPSC clones were maintained under puromycin selection (0.5 μ g/ml) until hepatocyte differentiation.

PCR analysis of AAVS1-targeted PH1-iPSCs clones.

Genomic DNA was isolated using NucleoSpin® Tissue kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. To screen genomic DNA samples, we designed primers to PCR-amplify the AAVS1 locus. We obtained an integration-specific product that allows

discrimination between WT- and targeted-AAVS1 locus. The top 10 putative off-target sites of the AAVS1-targeting sgRNA-T2 used in the current study were previously identified [16]. The five most frequent putative off-target sites were PCR-amplified using specific primers and Sanger-sequenced. Primers used for the correction strategies performed in this study are listed in Supplementary Table 1.

Hepatocyte differentiation

Feeder-free cultured iPSCs were differentiated into hepatocyte-like cells (HLCs) applying a serum-free and feeder-free procedure recapitulating liver development as previously described [14]. We tracked the hepatic differentiation process by monitoring endoderm (Sox17) and hepatoblast/hepatocyte-specific markers (HNF4, α -fetoprotein, albumin, α -1 antitrypsin) expression at both transcript and protein levels as previously described [9]. Primer sequences used for gene expression analysis are listed in Supplementary Table 1. Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) activity was measured into iPSC-derived HLCs using the P450-Glo™ CYP3A4 Assay kit (Promega) as previously described [9].

Western Blot

For western blotting, 15 μ g of protein were separated by SDS-PAGE (sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) electrophoresis, and PVDF membranes were probed with rabbit polyclonal anti-AGT antibody (kindly provided by C.J. Danpure) as described [9]. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression was detected with rabbit polyclonal anti-GAPDH (Cell Signaling, clone 14C10) and used to control protein loading in Western Blot analyses. The signal was revealed with horseradish peroxidase-linked secondary antibody and visualized using ECL reagent (ECL prime reagent, GE Healthcare). Images were captured with the LAS-3000 Imager (Fujifilm).

Statistical analysis

Values shown represent the mean \pm SD (n=3 to 4 independent experiments). P-values were determined using a one-way analysis of variance (ANOVA) completed with Tukey's multiple comparisons test to examine significance across comparisons. Difference was considered significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

Efficient *AGXT* gene targeting into the *AAVS1* locus of PH1-iPSCs

We previously described WT- and PH1-iPSC clones as WT-iPSC#2 and PH1-iPSC#2 clones, respectively [9]. These reprogrammed transgene-free iPSCs exhibited typical features of pluripotent stem cells and formed teratomas displaying derivatives from all three embryonic germ layers after injection into immune-deficient mice. To promote insertion of an AGT expression cassette into the *AAVS1* locus of our patient-derived PH1-iPSC line, we designed a full-length codon-optimized human *AGXT* cDNA expression cassette flanked by *AAVS1* homology arms, referred to as PAEGP (Fig. 1A, B). In this PAEGP donor plasmid, *AGXT* cDNA was under the transcriptional control of the constitutive human phosphoglycerate kinase promoter (PGKp). Besides the donor PAEGP, a CRISPR/Cas9 nuclease expression system was used to introduce a double-strand DNA break into the *AAVS1* locus and enhance the efficiency of gene targeting. A transient Cas9 nuclease mRNA-based expression was preferred to rule out any constitutive Cas9 expression following Cas9-expressing plasmid delivery, which is known to favour off-target DNA cleavage [17]. Furthermore, the PAEGP donor vector encoded both a puromycin resistance gene and the copGFP cDNA under the transcriptional control of the constitutive human elongation factor 1 α promoter (EF1p), which afforded an efficient dual selection system to isolate a clonal population of iPSCs that successfully integrated our vector. After delivery of both CRISPR/Cas9 system and PAEGP construct, puromycin-resistant and copGFP-positive PH1-iPSCs were isolated by FACS for clonal analysis (Fig. 1C, D). Twenty-nine clones maintaining normal stem cell-like characteristics (data not shown), hereinafter named PH1-iPSC-PGKp-AGXT clones, were isolated for further analysis. PCR analysis of the 5' and 3' integration junctions between the PAEGP donor and the endogenous *AAVS1* locus evidenced the insertion of the AGT cassette into the *AAVS1* locus of the PH1-iPSC-PGKp-AGXT clones (Fig. 1 B, E, F). As a first screen, PCR analysis of the 5' end junction site identified 3 positive clones and on-targeted PAEGP donor integrity was confirmed at the 3' end junction site of the *AAVS1* locus (Fig. 1E, F). These PH1-iPSC-PGKp-AGXT clones showed consistent copGFP expression throughout several tens of passages during the course of the study, which confirmed the stability of the transgene integration at the *AAVS1* locus (data not shown). To further characterize PAEGP integration into the PH1-iPSC-PGKp-AGXT clones, we performed PCR amplification of potentially non-targeted *AAVS1* locus (hereinafter named WT *AAVS1* locus) to determine whether the PAEGP donor construct targeted one or both *AAVS1* alleles (Fig. 1B, F). We observed heterozygous PAEGP insertion at the *AAVS1* locus

in the targeted PH1-iPSC-PGKp-AGXT clones (#2, 11 and 23) (Fig. 1F). Although no deleterious phenotype has been reported for loss of *PPP1R12C* gene function, homozygous AAV integration was rarely observed [18]. As previously described, we observed that transgene integration into the AAVS1 locus did not change cell growth rate or pluripotency [19,20]. The PH1-iPSC-PGKp-AGXT#23 clone exhibited sustained proliferation and maintenance of stem-cell morphology characteristics through passages and was thus selected for further characterization (data not shown). We analysed insertion/deletion (indel) events resulting from non-homologous end joining (NHEJ) repair after CRISPR/Cas9 nuclease-mediated double strand DNA break at the native AAVS1 locus and putative off-target sites. Sequencing of the non-targeted AAVS1 allele in PH1-iPSC-PGKp-AGXT#23 line revealed a single nucleotide (G) deletion at the Cas9 cutting site (Table 1). This deletion is unlikely to affect the *PPP1R12C* gene function due to its localization into non-coding DNA region (intron 1); moreover, no cellular dysfunction has been reported yet to be associated with *PPP1R12C* gene disruption [21]. Indeed, in our experiment, the PH1-iPSC-PGKp-AGXT#23 clone proliferated indistinguishably from WT- and PH1-iPSC control lines, and retained similar stem cell-like features. We finally investigated potential NHEJ events at different CRISPR/Cas9 off-target cleavage sites previously described for AAVS1 locus-targeting nucleases. Main off-target sites have been described for the sgRNA-T2 although the frequencies of cleavage are far below that of on-target activity [16]. The genomic region of the five most frequent AAVS1-off-target sites was analysed and no modification of nucleotide sequence could be detected (Table 1). In addition to validated candidate off-target sites, it is well known that other off-target modifications may occur in unpredicted loci places due to genomic and epigenomic properties that may affect target recognizing and cleavage efficiency. Unbiased detection of off-target events would require a whole genome sequencing, especially in the prospect of corrected cell delivery to patients [22].

AGT expression rescue into AAVS1-targeted PH1-iPSC-derived hepatocyte-like cells

We next proceeded to *in vitro* differentiation of WT-iPSC, PH1-iPSC and PH1-iPSC-PGKp-AGXT#23 lines into hepatocyte-like cells (HLCs), respectively named WT-HLC, PH1-HLC and PH1-HLC-PGKp-AGXT#23, using a protocol simulating normal liver development [9,14]. In the first step, iPSCs were engaged towards definitive endoderm cells (DECs), which represent the earliest stage of differentiation of endoderm-derived organs; namely, liver, pancreas, lung, gut and thyroid. During this phase, iPSC morphology progressively turned into

spiky or triangular shapes, a typical morphology of DEC reaching confluence (Fig. 2A). Detection of the specific endodermal marker SOX17 by immunofluorescence at day 7 of differentiation definitely confirmed endoderm commitment (Fig. 2A).

In the second phase, DECs were induced to hepatoblast and definitive HLC differentiation during 3 additional weeks. DEC morphology progressively switched to the typical hepatocyte-like polygonal shape with canaliculated borders, and immunofluorescence analysis confirmed hepatic cell commitment by highlighting HLC specific expression of the hepatic markers HNF4a and alpha-fetoprotein (aFP) by day 14 and day 21 of differentiation respectively (Fig. 2A). These results were corroborated by RT-qPCR analysis of specific hepatic gene marker expression profile (albumin, aFP, α -1-antitrypsin and HNF4a) performed by day 31 in iPSC-derived HLCs, in comparison to native iPSC lines, primary fetal hepatocytes and primary adult hepatocytes (Fig. 2B). Taken together, these results state clear evidence of liver-specific gene expression in HLCs; however, considering the remaining aFP expression, we acknowledge that HLCs closely mimicked fetal rather than adult hepatocytes, which is consistent with previous reports of pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells [9,23]. We then evaluated the activity of the cytochrome P450 3A4 (CYP3A4), which is the most abundant CYP450 expressed in adult liver [24]. CYP3A4 activity was significantly induced in HLCs (50- to 280-fold increase) as compared to undifferentiated control iPSCs (Fig. 2C). However, the heterogeneity of CYP3A4 relative expression among the different HLC lines reflects the complex control of CYP450 expression and activity by several environmental and physiological parameters that are lacking in the cell culture environment [25,26]. We finally assessed the therapeutic benefit of *AGXT* additive gene therapy in PH1-iPSC-derived HLCs. RT-PCR analysis revealed that endogenous *AGXT* gene expression was induced during hepatocyte differentiation at levels similar to those observed in primary foetal and adult hepatocytes (Fig. 2B). We then evaluated AGT protein expression in HLCs by western blotting using an anti-AGT antibody indistinctly detecting both endogenous and exogenous AGT protein (Fig. 2D). While WT-HLCs showed significant AGT expression as compared with WT-iPSCs, no AGT protein was detected in both PH1-iPSCs and PH1-HLC lines. These results suggest that the mutant p.I244T AGT protein is unstable and aggregates into non-functional and non-immunoreactive complexes in differentiated HLCs as previously described [9,27]. To the contrary, we rescued AGT expression at both mRNA and protein levels in both PH1-iPSC-PGKp-AGXT#23 and PH1-HLC-PGKp-AGXT#23 lines (Fig. 2D). We hypothesize that AGT protein detected in PH1-iPSC-PGKp-AGXT#23 and PH1-HLC-PGKp-AGXT#23 resulted from the AAVS1-integrated PAEGP vector. Interestingly, PH1-HLC-PGKp-AGXT#23

exhibited substantial lower AGT expression level than PH1-iPSC-PGKp-AGXT#23. Although unexpected, this result is consistent with previous study demonstrating that the AAVS1 locus can be silenced through mechanisms that include DNA methylation, notably in hepatocyte-committed embryonic stem cells [28]. *Agxt* knockout (KO) mice reproduce some key features of PH1 such as severe hyperoxaluria and develop CaOx urolithiasis in the urinary tract [29]. However, a combined immune-deficient and *Agt*-deficient mice permissive to the engraftment of human cells would be required to evaluate the *in vivo* therapeutic potential of AAVS1-targeted PH1-iPSCs-derived HLCs as described in other inherited liver diseases [30]. Taken together, our results demonstrate for the first time the feasibility of restoring AGT expression using gene-targeting and cell reprogramming strategies for primary hyperoxaluria.

Acknowledgments:

This work was supported by research grants from Association Française contre les Myopathies (AFM), Fondation du rein, Association pour l'Information et la Recherche sur les maladies Rénales Génétiques (AIRG France), Oxalosis and Hyperoxaluria Foundation (OHF), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Université de Bordeaux. We are grateful to Dr. C. Grosset for liver cell mRNA, Dr. E. Salido for sharing the optimized human *AGXT* cDNA, and Dr. C. Danpure and Dr. S. Fargue for the generous gift of AGT antibodies.

Figures

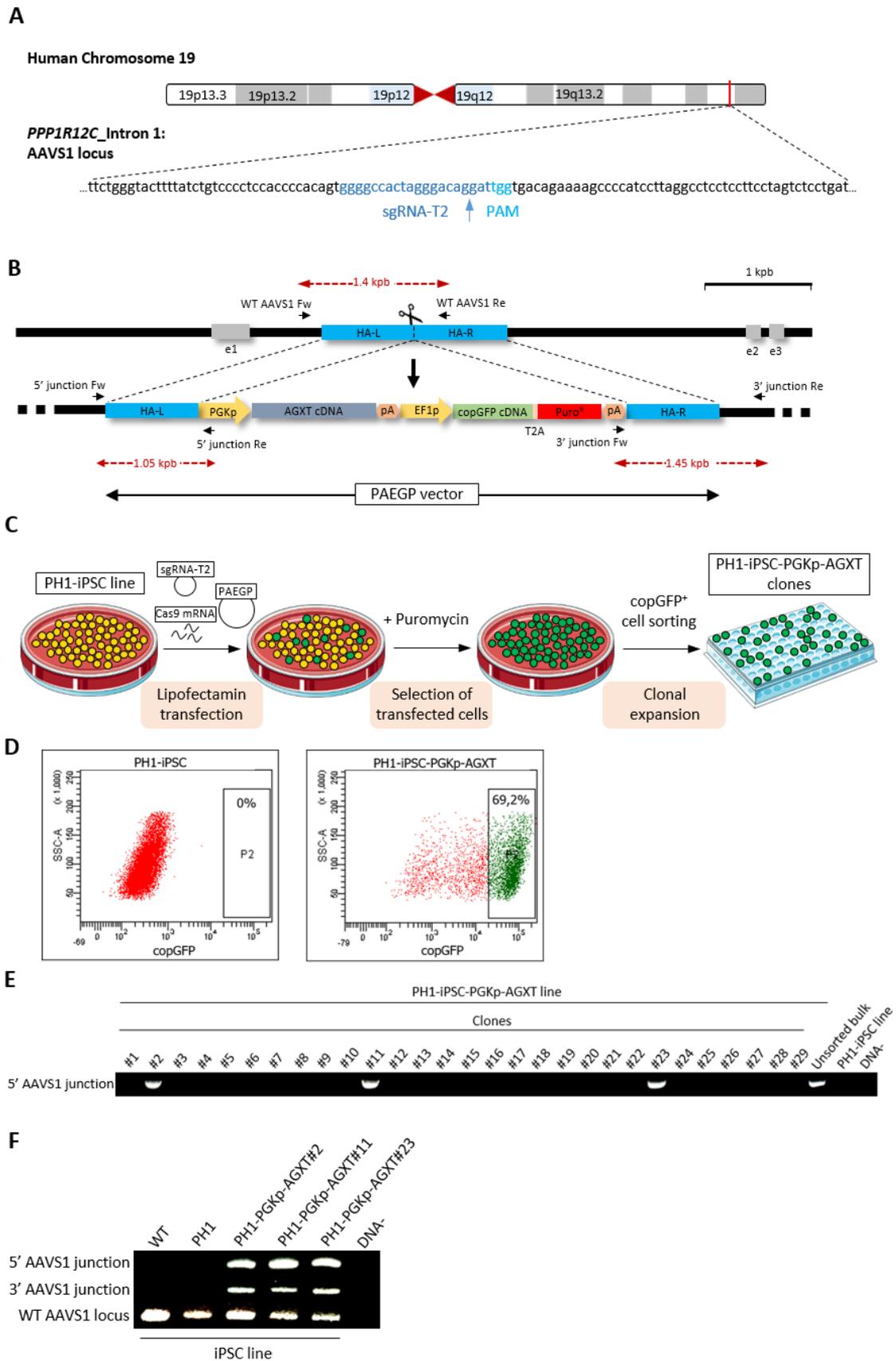


Figure 1. Integration of the PAEGP cassette into the AAVS1 locus of PH1-iPSC line. (A) Location of the AAVS1 target site in the first intron of the *PPP1R12C* gene, and sequence of the CRISPR/Cas9 recognition site. sgRNA-T2 [15] directs Cas9 double-strand breaks 3 bp upstream of the PAM (blue arrow). (B) Schematic of normal and targeted AAVS1 alleles. Universal PCR genotyping primers and the expected fragment sizes are indicated. Grey boxes indicate *PPP1R12C* exons; blue boxes indicate the regions of homology; scissors figure the CRISPR/Cas9 system. (C) Experimental scheme for the generation, selection and expansion of clones with PAEGP integration within the AAVS1 locus of PH1-iPSCs. (D) Selection of recombinant population for subcloning by fluorescence-activated cell sorting based on copGFP expression. (E) PCR genotyping of PH1-iPSC-PGKp-AGXT clones by amplification of the 5' AAVS1 junction site. The figure was built up from several PCR amplification and electrophoretic migration experiments. (F) PCR analysis of (i) targeted PAEGP construct integration into the iPSC AAVS1 locus at both 5' and 3' junctions and (ii) non-targeted (WT) AAVS1 locus, in comparison to non-transfected WT-iPSC and PH1-iPSC lines. Abbreviations: Fw, forward; HA-L and HA-R, homologous arms left and right; PAM, protospacer adjacent motif; Puro^R, puromycine resistance gene; Re, reverse; sgRNA, single-guide RNA.

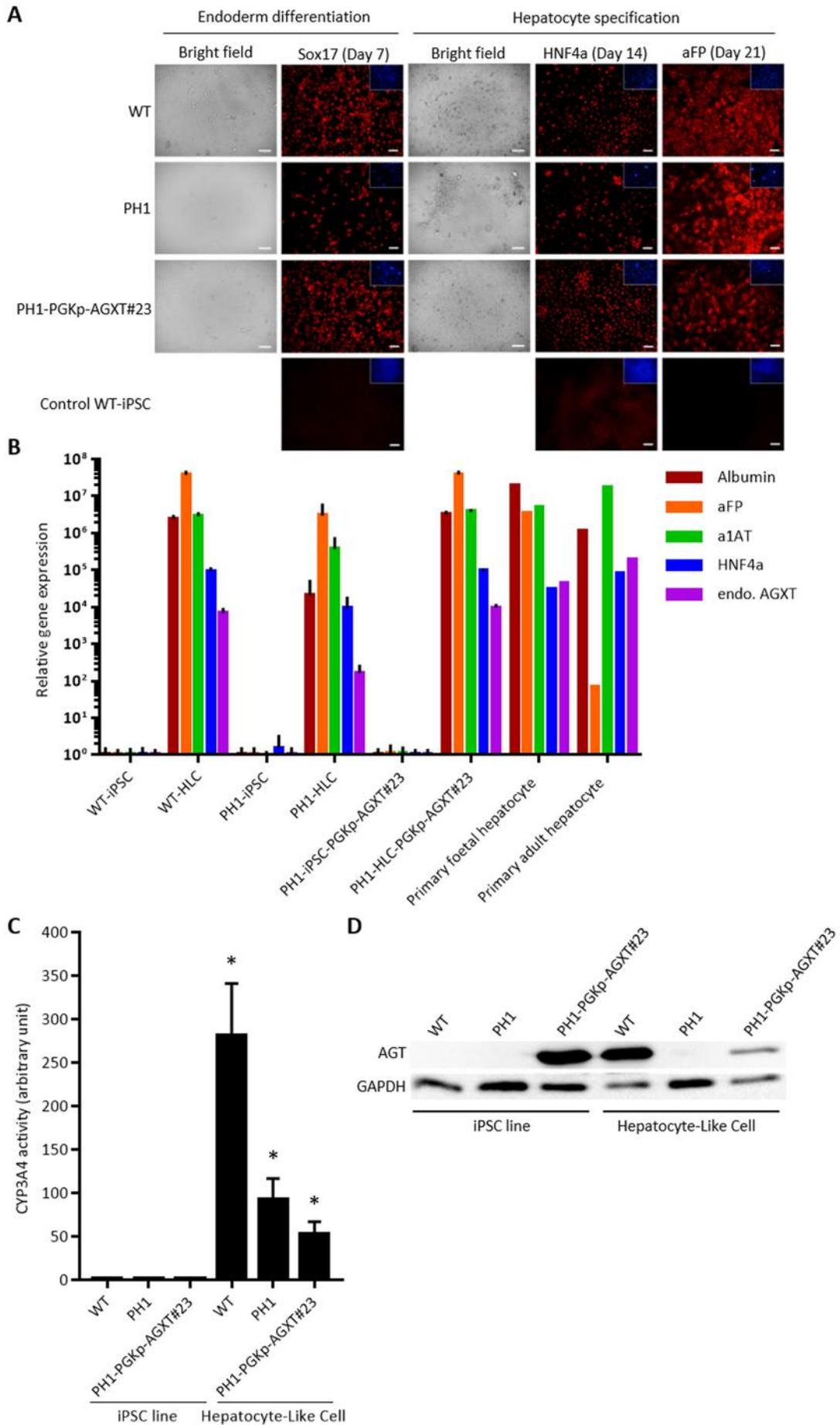


Figure 2. Characterization of iPSC-derived hepatocyte-like cells (HLCs) and analysis of AGT expression rescue. (A) Bright field pictures of DEC and HLCs; immunofluorescence staining of endodermic (SOX17) and hepatic (HNF4a and aFP) markers throughout hepatocyte differentiation. Nuclei were localized by DAPI (blue). Scale bars, 100 μ m. Magnification, 100X. (B) RT-qPCR analysis of hepatic gene markers and endogenous *AGXT* expression in HLCs at day 31 of hepatocyte differentiation, and corresponding iPSCs. Gene expression was normalized to the endogenous *HuP0* gene and data are means \pm SD of four independent experiments. (C) CYP3A4 activity analysis in HLCs at day 31 of differentiation, as compared with respective iPSC lines. Data are means \pm SD of three independent experiments; *, $p < 0,05$. (D) Western blotting analysis of AGT protein expression in HLCs and corresponding iPSCs. Abbreviations: aFP, alpha-fetoprotein; a1AT, alpha-1 antitrypsin; endo., endogenous.

Location	Clone	Sequence	Indel
WT AAVS1 locus	PH1-iPSC	GGGGCCACTAGGGACAGGAT TGG	Ref.
chr19:55115749-55115771	PH1-iPSC-PGKp-AGXT#23	GGGGCCACTAGGGACAG-ATTGG	-1
Off-target 1	PH1-iPSC	GGGGCT TTCTA AGGACAGGAT GGG	Ref.
chr19:16064180-16064199	PH1-iPSC-PGKp-AGXT#23	GGGGCTTCTAAGGACAGGATGGG	0
Off-target 2	PH1-iPSC	GGGGCA ACTAG AGACAGGA AGG	Ref.
chr8:22778068-22778090	PH1-iPSC-PGKp-AGXT#23	GGGGCAACTAGAGACAGGAAGGG	0
Off-target 3	PH1-iPSC	GGGGCC CTG GGGACAG AATGG	Ref.
chr21:41521015-41521037	PH1-iPSC-PGKp-AGXT#23	GGGGCCCCTGGGGACAGAATGGG	0
Off-target 4	PH1-iPSC	GGGGCCA GTG GGGACAGGA AGG	Ref.
chr2:231959830-231959852	PH1-iPSC-PGKp-AGXT#23	GGGGCCAGTGGGGACAGGAAGGG	0
Off-target 5	PH1-iPSC	GGT GCCAC CAGGGAGAGGAT GGG	Ref.
chr22:44303218-44303240	PH1-iPSC-PGKp-AGXT#23	GGTCCACCAGGGAGAGGATGGG	0

Table 1. Analysis of WT AAVS1 locus and predicted sgRNA-T2 off-target sites. Genomic sites were PCR-amplified from both PH1-iPSC and PH1-iPSC-PGKp-AGXT#23 lines and analysed by Sanger sequencing. PAM sequences and nucleotides that differ from the original genomic sequences are respectively indicated in blue and red.

Supplementary data

Target	Sequence	Amplicon (bp)	Application
AAVS1-targeting sgRNA-T2	F: 5' caccgGGGGCCACTAGGGACAGGAT 3' R: 5' aaacATCCTGTCCCTAGTGGCCCCc 3'	NA	sgRNA-T2 cloning
5' AAVS1 junction	F: 5' CCGGAACTCTGCCCTCTAAC 3' R: 5' GGTGGATGTGGAATGTGTG 3'	1043	PCR, homologous recombination screening
3' AAVS1 junction	F: 5' TCCGGGGGACAAGACATC 3' R: 5' CCAGAGACAGTGACCAACCATC 3'	1441	
WT AAVS1 locus	F: 5' TCGACTTCCCCTCTTCCGATG 3' R: 5' CTCAGTTCTGGGAGAGGGTAG 3'	1391	
Off-target locus #1	F: 5' ATTGGTTGTCTTGCCCCACT 3' R: 5' CAGGTGGAGGCTGCCATTTA 3'	230	PCR and sanger sequencing, indel evaluation into potential off-target cutting sites
Off-target locus #2	F: 5' GGGGCACCGGGAAATGTTAT 3' R: 5' ACTAAGTGGGGCATCTCCG 3'	674	
Off-target locus #3	F: 5' TAGGAGATGGGCAGCTGAGT 3' R: 5' CCCATCCTAGACACAGGGGA 3'	318	
Off-target locus #4	F: 5' TCAGCCCTACTTCTCTGCT 3' R: 5' ATCTGCAGTACCTGCCACAC 3'	705	
Off-target locus #5	F: 5' GTGTAACAGCGTCGTCTCC 3' R: 5' ACCAGGCTCCACATGAGAGG 3'	628	
WT AAVS1 locus	F: 5' CCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGC 3'	NA	Sanger sequencing, AAVS1 locus genotyping
<i>Endogenous</i> <i>AGXT</i>	F: 5' TACCCGCTGGCTATGACTG 3' R: 5' CGCCCAAGTGGACTGTTT 3'	412	RT-qPCR, hepatocyte-like cell characterization
<i>HNF4a</i>	F: 5' AAGCCGTCCAGAATGAGC 3' R: 5' GAATGTCGCCGTTGATCC 3'	147	
<i>a1AT</i>	F: 5' CCTCCGTACCCTCAACCA 3' R: 5' GGTCTCTCCATTTGCCTT 3'	294	
<i>aFP</i>	F: 5' CAAACAAAGGCAGCAACAGT 3' R: 5' GCAGACAATCCAGCACATCT 3'	229	
<i>Albumin</i>	F: 5' GTGCTGCTGCTGAGACTTG 3' R: 5' TGCTGCCCACTTTTCTAG 3'	277	
<i>HuPO</i>	F: 5' TGGAGGGTGTCCGCAATGTT 3' R: 5' GAAGGCCTTGACCTTTTCAG 3'	158	

Supplementary Table 1. Specific forward (F) and reverse (R) guide and primer sequences used in the study.

References

- 1 Hoppe B, Beck BB, Milliner D. The Primary Hyperoxalurias. *Kidney Int* 2009;75:1264–1271.
- 2 Mesa-Torres N, Yunta C, Fabelo-Rosa I, et al. The consensus-based approach for gene/enzyme replacement therapies and crystallization strategies: the case of human alanine–glyoxylate aminotransferase. *Biochemical Journal* 2014;462:453–463.
- 3 Cochat P, Fargue S, Harambat J. Primary hyperoxaluria type 1: strategy for organ transplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation* 2010;15:590–593.
- 4 Mc Kiernan PJ. Recent advances in liver transplantation for metabolic disease. *J Inherit Metab Dis* 2017;40:491–495.
- 5 Squires JE, Soltys KA, McKiernan P, et al. Clinical Hepatocyte Transplantation: What Is Next? *Curr Transplant Rep* 2017;4:280–289.
- 6 Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, et al. Highly Efficient Generation of Human Hepatocyte–like Cells from Induced Pluripotent Stem Cells. *Hepatology* 2010;51:297–305.
- 7 Rashid ST, Corbineau S, Hannan N, et al. Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. *J Clin Invest* 2010;120:3127–3136.
- 8 Hannan NR., Segeritz C-P, Touboul T, et al. Production of hepatocyte like cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 2013;8:430–437.
- 9 Estève J, Blouin J-M, Lalanne M, et al. AGXT expression rescue in hepatocyte-like cells derived from Primary Hyperoxaluria type 1 induced pluripotent stem cells using liver-specific lentiviral vector. *Stem Cell Res Submitted* 2018.
- 10 Naldini L. Ex vivo gene transfer and correction for cell-based therapies. *Nat Rev Genet* 2011;12:301–315.
- 11 Carroll D. Genome engineering with targetable nucleases. *Annu Rev Biochem* 2014;83:409–439.
- 12 Smith JR, Maguire S, Davis LA, et al. Robust, persistent transgene expression in human embryonic stem cells is achieved with AAVS1-targeted integration. *Stem Cells* 2008;26:496–504.
- 13 Ocegüera-Yanez F, Kim S-I, Matsumoto T, et al. Engineering the AAVS1 locus for consistent and scalable transgene expression in human iPSCs and their differentiated derivatives. *Methods* 2016;101:43–55.
- 14 Asplund A, Pradip A, Giezen M van, et al. One Standardized Differentiation Procedure Robustly Generates Homogenous Hepatocyte Cultures Displaying Metabolic Diversity from a Large Panel of Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rev and Rep* 2016;12:90–104.
- 15 Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science* 2013;339:823–826.
- 16 Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, et al. Genetic screens in human cells using the CRISPR/Cas9 system. *Science* 2014;343:80–84.
- 17 Bolukbasi MF, Gupta A, Wolfe SA. Creating and evaluating accurate CRISPR-Cas9 scalpels for genomic surgery. *Nature Methods* 2016;13:41–50.
- 18 Samulski RJ, Zhu X, Xiao X, et al. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J* 1991;10:3941–3950.
- 19 DeKaveler RC, Choi VM, Moehle EA, et al. Functional genomics, proteomics, and regulatory DNA analysis in isogenic settings using zinc finger nuclease-driven transgenesis into a safe harbor locus in the human genome. *Genome Res* 2010;20:1133–1142.
- 20 van Rensburg R, Beyer I, Yao X-Y, et al. Chromatin structure of two genomic sites for targeted transgene integration in induced pluripotent stem cells and hematopoietic stem cells. *Gene Ther* 2013;20:201–214.

- 21 Lombardo A, Cesana D, Genovese P, et al. Site-specific integration and tailoring of cassette design for sustainable gene transfer. *Nat Methods* 2011;8:861–869.
- 22 Martin F, Sánchez-Hernández S, Gutiérrez-Guerrero A, et al. Biased and Unbiased Methods for the Detection of Off-Target Cleavage by CRISPR/Cas9: An Overview. *Int J Mol Sci* 2016;17.
- 23 Baxter M, Withey S, Harrison S, 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.
- 24 Guengerich FP. CYTOCHROME P-450 3A4: Regulation and Role in Drug Metabolism. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1999;39:1–17.
- 25 Waring JF, Ciurlionis R, Jolly RA, et al. Isolated human hepatocytes in culture display markedly different gene expression patterns depending on attachment status. *Toxicology in Vitro* 2003;17:693–701.
- 26 Madan A, Graham RA, Carroll KM, et al. Effects of Prototypical Microsomal Enzyme Inducers on Cytochrome P450 Expression in Cultured Human Hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2003;31:421–431.
- 27 Santana A, Salido E, Torres A, et al. Primary hyperoxaluria type 1 in the Canary Islands: A conformational disease due to I244T mutation in the P11L-containing alanine:glyoxylate aminotransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:7277–7282.
- 28 Ordovás L, Boon R, Pistoni M, 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.
- 29 Salido EC, Li XM, Lu Y, et al. Alanine–glyoxylate aminotransferase-deficient mice, a model for primary hyperoxaluria that responds to adenoviral gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:18249–18254.
- 30 Ramaswamy S, Tonnu N, Menon T, et al. Autologous and Heterologous Cell Therapy for Hemophilia B toward Functional Restoration of Factor IX. *Cell Rep* 2018;23:1565–1580.

Résultats 3

Correction génique ponctuelle de la mutation c.731T>C du gène *AGXT* dans la lignée HEK293T

Dans le cadre de ce projet, nous avons envisagé de développer une approche de correction de la mutation c.731T>C au locus *AGXT*, dans l'objectif d'obtenir une restauration de la séquence sauvage de ce gène dans nos iPSCs sans intégration de séquence additionnelle. Pour cela, nous avons choisi de mettre en place un protocole de recombinaison homologue ciblée impliquant le système CRISPR/Cas9 nickase (mutation D10A) et une matrice polynucléotidique simple brin, qui semblait le plus propice à cette application d'après l'expérience du laboratoire. Ce type d'approche étant complexe à mettre en œuvre, et son efficacité très dépendante des loci ciblés, nous avons souhaité tester et optimiser l'efficacité de nos outils de recombinaison au sein d'une lignée HEK293T, dont l'entretien et la manipulation génique sont plus simples que ceux des iPSCs. L'ensemble des outils développés dans ce projet ainsi que les résultats de modification génomique obtenus seront détaillés dans les paragraphes suivants.

I- Evaluation de l'efficacité de ciblage des ARN guides

L'emploi du système CRISPR/Cas9 de type nickase pour générer les cassures double-brin de l'ADN implique l'hybridation de deux ARN guides sur des segments génomiques différents, de part et d'autre de la cible à recombiner. Nous avons procédé à l'identification des ARN guides les plus performants pour cibler l'exon 7 du gène *AGXT* (E7AGXT) à l'aide du programme CHOPCHOP⁴⁰⁹ (Tableau 6).

Guide RNA	Sequence
#24	5'-GGGAGTACATCTTCTTTCTG-3'
#25	5'-AGGAGAAGGGCTTCGTCTTG-3'
#26	5'-GACGACCAGCCCAGGATGTG-3'

Tableau 6. Séquences des ARN guides ciblant l'exon 7 du gène *AGXT*. Les ARN guides 24 et 25 s'hybrident en 5' de la mutation c.731T>C, tandis que l'ARN guide 26 s'hybride en 3'. Les numéros correspondent à des références attribuées par le programme CHOPCHOP.

L'efficacité de ciblage des ARN guides, qui consiste en leur capacité à guider la protéine Cas9 vers une région génomique déterminée, a ensuite été évaluée par l'intermédiaire de l'apparition d'indels résultant de la réparation des cassures double-brin de l'ADN par NHEJ. Nous avons pour cela imaginé un système rapporteur, intégré dans une lignée HEK293T, permettant de détecter les décalages du cadre de lecture provoqués par la création d'indels au niveau de l'exon 7 du gène *AGXT* via l'arrêt de la synthèse de la protéine eGFP (Figure 38). Grâce à ce système, une simple analyse cytométrique de fluorescence permet d'extrapoler la capacité des ARN guides à mener la protéine Cas9 au site cible de clivage. Il faut noter que dans cette étude, la nécessité d'évaluer la performance individuelle de chaque ARN guide implique l'utilisation d'une nucléase pour réaliser les cassures double-brin de l'ADN.

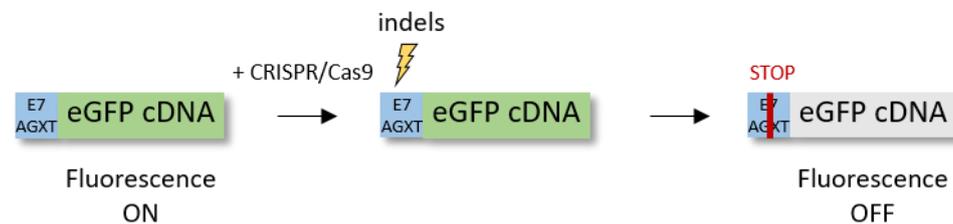


Figure 38. Représentation schématique du fonctionnement du système rapporteur destiné à l'évaluation de l'efficacité de ciblage des ARN guides sur l'exon 7 du gène *AGXT*. La mise en fusion de la cible E7AGXT avec la séquence d'ADN complémentaire de l'eGFP (séquence E7AGXTeGFP) implique une corrélation directe entre la synthèse de cette protéine et l'intégrité du cadre de lecture de l'exon 7 du gène *AGXT*. Après clivage de la cible E7AGXT par le système CRISPR/Cas9 nucléase, la survenue d'un décalage du cadre de lecture suite à une réparation non fidèle de la cassure se traduit par un arrêt de la synthèse de l'eGFP détectable par cytométrie en flux. Abréviations : Cas, *CRISPR-associated protein* ; cDNA, ADN complémentaire ; CRISPR, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* ; eGFP, *enhanced Green Fluorescent Protein* ; E7 AGXT, exon 7 du gène *AGXT* ; indels, insertions/délétions.

Pour créer le système rapporteur, nous avons développé deux outils distincts : un vecteur d'expression de la Cas9 nucléase et des ARN guides, et une lignée cellulaire HEK293T exprimant la cassette de fusion E7AGXTeGFP.

Le vecteur d'expression du système CRISPR/Cas9 nucléase correspond au plasmide pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (pX330) (#42230, Addgene), au sein duquel ont été insérés les ARN guides à tester (une séquence par plasmide) ainsi que le gène de résistance à la puromycine dérivé du vecteur pSpCas9n(BB)-2A-Puro V2.0 (pX462) (#62987, Addgene).

La lignée cellulaire HEK293T exprimant la séquence E7AGXTeGFP a été générée selon les étapes suivantes :

1) la séquence de fusion E7AGXTeGFP a été créée par une succession d'amplifications génomiques par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) et introduite à l'aide

des enzymes BamHI et Sall en remplacement de la séquence d'expression de l'eGFP sauvage dans le plasmide de transfert lentiviral « p16 » développé par la plateforme de vectorologie de l'Université de Bordeaux (Figure 39),

2) un vecteur lentiviral exprimant la séquence de fusion E7AGXTeGFP (LV-E7AGXTeGFP) a été produit par transfection de cellules HEK293T au phosphate de calcium en présence du plasmide de transfert p16, et des plasmides d'emballage (porteur des gènes *GAG* et *POL*) et d'enveloppe (porteur de la séquence *VSV-G* exprimant la glycoprotéine d'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire),

3) le vecteur LV-E7AGXTeGFP produit a finalement été employé pour transduire de nouvelles cellules HEK293T de façon à intégrer une copie de vecteur par cellule (lignée HEK-E7AGXTeGFP).



Figure 39. Représentation schématique de la structure du plasmide de transfert lentiviral p16 exprimant la cassette de fusion E7AGXTeGFP. Seule la partie intégrée dans les cellules HEK293T a été représentée. Abréviations : cDNA, ADN complémentaire ; eGFP, *enhanced Green Fluorescent Protein* ; E7 AGXT, exon 7 du gène *AGXT* ; LTR, *Long Terminal Repeats* ; MNDp, promoteur ubiquitaire MND ; WPRE, *Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element*.

Dans l'objectif de nous assurer de l'homogénéité des résultats obtenus, nous avons réalisé un sous-clonage de la lignée HEK-E7AGXTeGFP, et nous avons sélectionné un clone présentant une fluorescence eGFP maximale. 500 000 cellules de ce clone ont été transfectées au phosphate de calcium avec 5 µg de plasmide pX330 exprimant la Cas9 nucléase seule ou associée à un ARN guide. Les cellules transfectées ont été sélectionnées en présence de puromycine et leur fluorescence a été analysée par cytométrie en flux (Figure 40).

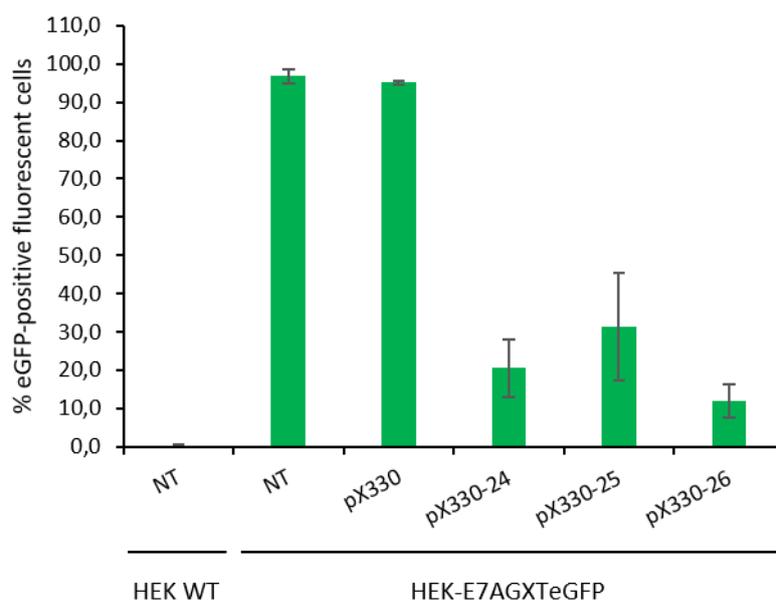


Figure 40. Analyse de la fluorescence des cellules HEK293T par cytométrie en flux. La condition « pX330 » correspond à l'expression de la Cas9 nucléase seule, tandis que les conditions « pX330-24, -25 et -26 » correspondent à l'expression de la Cas9 nucléase associée aux ARN guides 24, 25 et 26 respectivement. Ce graphique est le résultat de trois analyses indépendantes. Abréviations : eGFP, *enhanced Green Fluorescent Protein* ; E7 AGXT, exon 7 du gène *AGXT* ; HEK, *Human Embryonic Kidney* ; NT, *Non-Transfected*; WT, *Wild-Type*.

Les analyses réalisées par cytométrie en flux montrent une efficacité de ciblage satisfaisante des trois ARN guides étudiés, s'illustrant par une diminution de 70 à 90% de la fluorescence des cellules transfectées. Ces résultats sont en outre potentiellement sous-estimés par l'incapacité du système rapporteur à détecter les événements de clivage réparés de façon fidèle à la séquence d'origine ou n'entraînant pas de décalage du cadre de lecture. Dans ces conditions, nous avons choisi de conserver l'ensemble des ARN guides testés pour la poursuite de nos expériences de recombinaison.

II- Expériences de correction ponctuelle de la mutation c.731T>C

Dans l'objectif d'évaluer l'efficacité de notre approche de modification génique ciblée, nous avons développé un second système rapporteur, permettant d'estimer le taux de recombinaison obtenu au niveau de l'exon 7 du gène *AGXT* *via* la restauration de la fluorescence de la protéine eGFP (Figure 41). Pour cela, nous avons créé une cassette de fusion (appelée E7AGXTSTOPeGFP) entre la séquence d'expression de l'eGFP et la séquence E7AGXT porteuse d'une mutation non-sens (séquence appelée E7AGXTSTOP). Cette mutation correspond à la substitution c.732C>G, introduite en position adjacente à celle de la mutation c.731T>C, afin que l'extrapolation des

résultats obtenus avec le système rapporteur vers la situation du patient hyperoxalurique soit optimale.

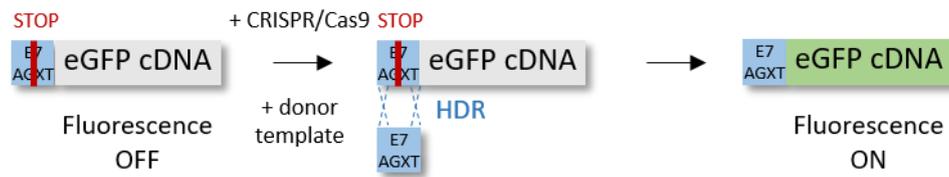


Figure 41. Représentation schématique du fonctionnement du système rapporteur destiné à l'évaluation de l'efficacité de la recombinaison homologue au niveau de l'exon 7 du gène AGXT. La mutation non-sens présente dans la séquence E7AGXTSTOP inhibe l'expression de la protéine eGFP. La survenue d'un événement de recombinaison homologue en présence du système CRISPR/Cas9 et de la séquence sauvage E7AGXT conduit à la réversion de la mutation non-sens portée par la séquence E7AGXTSTOP, ce qui se traduit par un rétablissement de l'expression de la protéine eGFP. Abréviations : Cas, *CRISPR-associated protein* ; cDNA, ADN complémentaire ; CRISPR, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* ; eGFP, *enhanced Green Fluorescent Protein* ; E7 AGXT, exon 7 du gène AGXT ; HDR, *Homology-Directed Recombination*.

Pour ce projet, trois lignées HEK293T transgéniques monoclonales ont été développées, chacune exprimant le gène de structure de la Tomato (protéine fluorescente rouge témoin de l'intégration du transgène dans les cellules) seul ou en association avec la cassette de fusion E7AGXTeGFP ou E7AGXTSTOPeGFP (Figure 42). Ces trois lignées ont été employées de la façon suivante : HEK-Tomato, témoin positif de fluorescence rouge nécessaire au réglage des paramètres des analyses de cytométrie en flux ; HEK-E7AGXTeGFP-Tomato, témoin positif de fluorescence verte et rouge ; HEK-E7AGXTSTOPeGFP-Tomato, lignée cible de recombinaison. Les lignées ont été produites selon un mode opératoire identique à celui employé pour la création de la lignée HEK-E7AGXTeGFP, à l'exception du plasmide de transfert, qui correspond au plasmide p252 développé par la plateforme de vectorologie de l'Université de Bordeaux (pourvu du gène de structure de la Tomato), et des enzymes de clonage des séquences transgéniques au sein du p252, qui consistent en NheI et PacI.

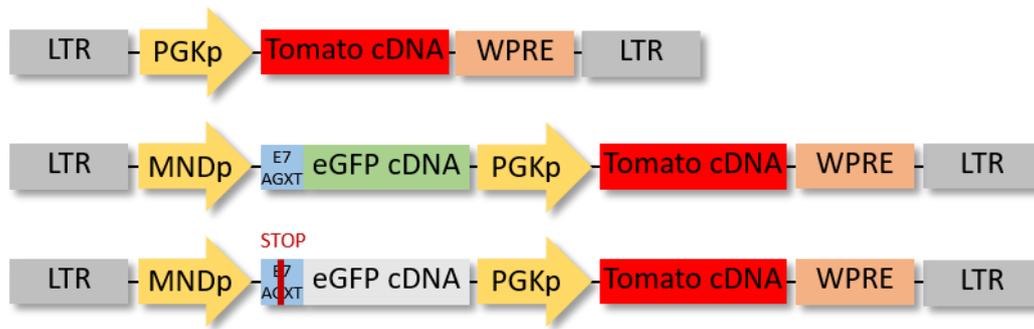


Figure 42. Représentation schématique de la structure des plasmides de transfert employés dans les expériences de correction ponctuelle. Les séquences correspondent, de haut en bas, aux dénominations Tomato (équivalente à la structure du p252 non modifiée), E7AGXTeGFP-Tomato et E7AGXTSTOPeGFP-Tomato. Seules les parties intégrées dans les cellules HEK293T ont été représentées. Abréviations : cDNA, ADN complémentaire ; eGFP, *enhanced Green Fluorescent Protein* ; E7 AGXT, exon 7 du gène *AGXT* ; LTR, *Long Terminal Repeats* ; MNDp, promoteur ubiquitaire MND ; PGKp, promoteur ubiquitaire de la phosphoglycérate kinase ; WPRE, *Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element*.

Pour exprimer le système CRISPR/Cas9 nickase au sein de la lignée HEK-E7AGXTSTOPeGFP-Tomato, nous avons employé le vecteur plasmidique pSpCas9n(BB)-2A-Puro V2.0 (pX462) (#62987, Addgene), au sein duquel nous avons cloné les couples d'ARN guides 24-26 et 25-26 (un couple par plasmide).

En ce qui concerne les matrices, nous avons développé deux types de séquences polynucléotidiques simple-brin homologues à la cible E7AGXTSTOP, différant par l'existence ou non de mutations au niveau des séquences PAM (*Protospacer Adjacent Motif*). La présence de ces mutations est destinée à augmenter le taux de la recombinaison homologue par diminution du risque de clivage multiple réalisé par la Cas9, qui ne peut plus reconnaître les PAMs après intégration de la matrice mutée dans le génome cellulaire (Figure 43).



Figure 43. Séquence E7AGXTSTOP représentée en parallèle des matrices polynucléotidiques simple brin de recombinaison homologue. (A) Séquence E7AGXTSTOP, dont la partie exonique est représentée en majuscules, tandis que les séquences introniques flanquantes sont indiquées en minuscules. Le nucléotide T rouge indique l'emplacement de la mutation faux-sens c.731T>C portée par le patient, bien que la cassette transgénique ait été créée selon la version sauvage. Le nucléotide G surligné en jaune indique la substitution c.732C>G générée dans la séquence E7AGXT pour aboutir à la formation du codon stop TGA. Les séquences surlignées en bleu, vert et rose correspondent aux sites reconnus par les ARN guides 24, 25 et 26 respectivement. (B) Matrice de recombinaison non mutée au niveau des PAMs. Le nucléotide C surligné en jaune correspond à la version sauvage de l'emplacement c.732 du gène *AGXT*. (C) Matrice de recombinaison mutée au niveau des PAMs. Les nucléotides a, T et t surlignés en rouge indiquent, de 5' vers 3', les mutations c.675c>a, c.696C>T (silencieuse) et c.782g>t réalisées au sein des PAMs reconnus par la Cas9 associée aux ARN guides 24, 25 et 26 respectivement. Le choix des mutations générées a été effectué en tenant compte de la redondance du code génétique et de la fréquence d'utilisation des codons. Dans le cas des mutations introniques des PAMs, nous avons procédé au remplacement des purines par les pyrimidines et inversement, afin de réduire au maximum l'interaction de la Cas9 avec les PAMs correspondants.

Une fois le développement des outils achevé, nous avons procédé aux expériences de correction génique ponctuelle dans la lignée HEK-E7AGXTSTOPeGFP-Tomato, selon trois protocoles différents :

1) lipofection de 100 000 cellules à l'aide de Lipofectamine® 2000 (ThermoScientific), avec 0,1 µg de plasmide pX462 exprimant les ARN guides 24 et 26 (pX462-24-26) ou les ARN guides 25 et 26 (pX462-25-26), seul ou en présence de 0,3 µg ou 0,6 µg de matrice polynucléotidique simple brin mutée (mut. PAM) ou non mutée (non mut. PAM) au niveau des séquences PAM ; le ratio µg ADN:µL lipofectamine employé est équivalent à 1:2.

2) électroporation de 1 million de cellules à l'aide du Nucleofector™ 2b (Lonza) en présence de 1 µg de plasmide pX462-25-26 et 3 µg de matrice mut. PAM, selon deux programmes différents : Q001, caractérisé par une faible efficacité de transfection et une forte viabilité cellulaire, et T016, caractérisé par une forte efficacité de transfection

et une faible viabilité cellulaire (si l'on considère une application de ces programmes aux cellules HEK293T).

3) transfection de 500 000 cellules à l'aide de phosphate de calcium, avec 0,5 µg de plasmide pX462-24-26 ou pX462-25-26, seul ou en présence de 1,5 µg ou 3 µg de matrice mut. PAM ou de 1,5 µg de matrice non mut. PAM.

Les cellules transfectées ont été sélectionnées en présence de puromycine et leur fluorescence a été analysée par cytométrie en flux. La figure 44 présente un graphique représentatif des résultats obtenus pour chacun des trois protocoles mis en œuvre.

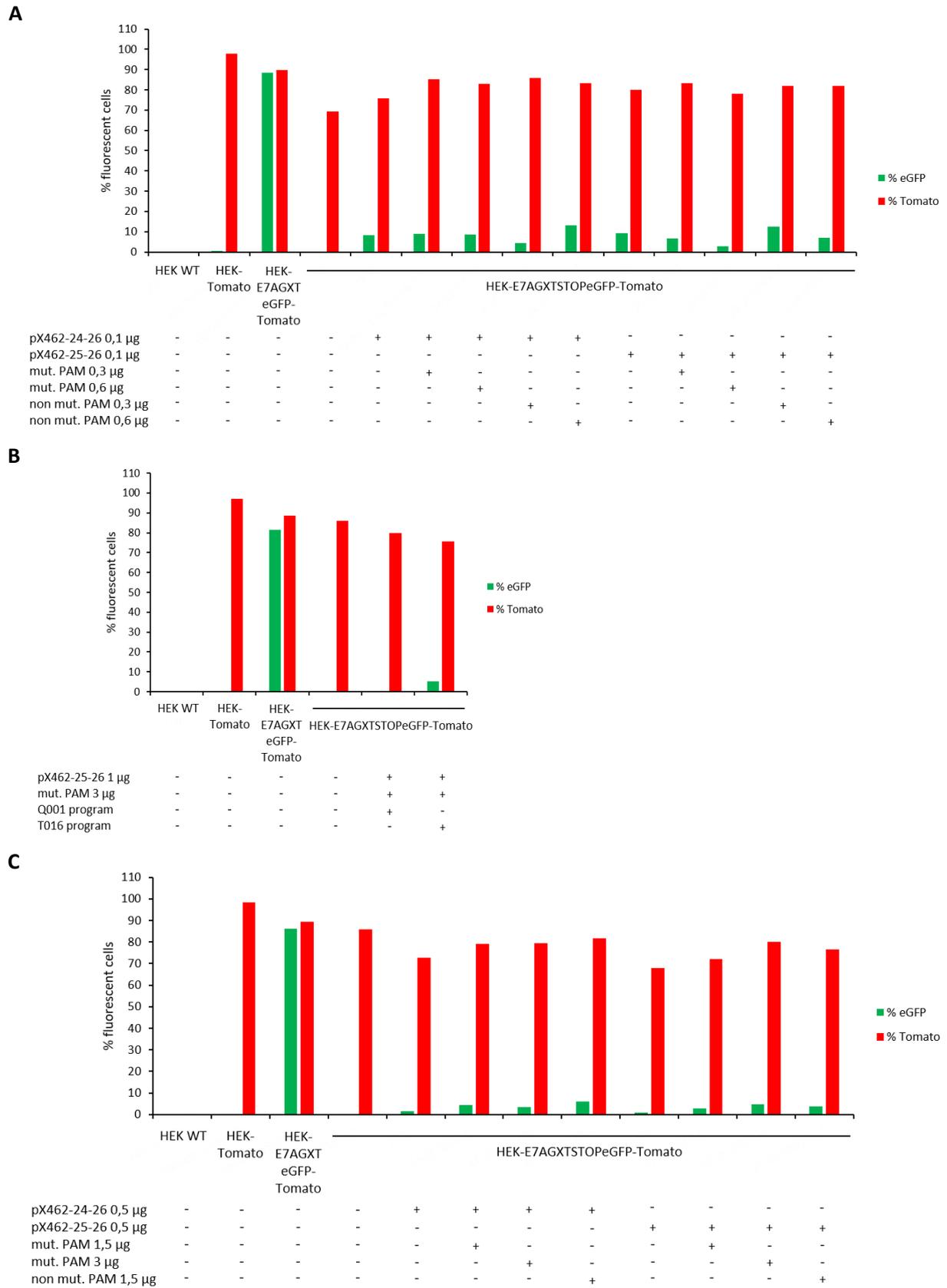


Figure 44. Analyse de la fluorescence des cellules HEK293T par cytométrie en flux. (A) Cellules lipofectées avec la Lipofectamine® 2000. (B) Cellules électroporées avec le Nucleofector™ 2b. (C) Cellules transfectées au phosphate de calcium. Chaque graphique est le résultat d'une expérience de

transfection. Abréviations : eGFP, *enhanced Green Fluorescent Protein* ; E7 AGXT, exon 7 du gène AGXT ; HEK, *Human Embryonic Kidney* ; mut. PAM et non mut. PAM, matrices polynucléotidiques simple brin mutée et non mutée au niveau des PAMs, respectivement ; NT, non transfecté ; pX462-24-26 et pX462-25-26, plasmide pX462 exprimant les couples d'ARN guides 24-26 et 25-26, respectivement ; WT, *Wild-Type*.

La figure 44 montre que les expériences de correction ponctuelle que nous avons mises en œuvre se sont traduites par une restauration de l'expression de la protéine eGFP dans des proportions de 3 à 14% chez les cellules HEK-E7AGXTSTOPeGFP-Tomato. Le type de procédé de transfection et le couple d'ARN guides employés, de même que la quantité de matrice et la présence ou non de mutations au niveau des séquences PAMs ne paraissent pas déterminants dans le résultat des expériences.

La corrélation entre la fluorescence des cellules et le taux de recombinaison de la cible E7AGXTSTOP est à considérer avec prudence, au vu de la fluorescence verte affichée par les cellules transfectées uniquement avec les plasmides pX462-24-26 ou PX462-25-26, qui atteint un taux de 9% dans les expériences de lipofection. D'après ce résultat, il semble que la restauration de l'expression de la protéine eGFP consécutive à la transfection du système CRISPR/Cas9 puisse être liée à la délétion d'un fragment de la séquence E7AGXT incluant le codon stop, suite à la réparation des coupures de l'ADN par le mécanisme de NHEJ. Notre système rapporteur ne permettant pas de discriminer l'implication des mécanismes HDR et NHEJ dans l'expression de l'eGFP, il nous est impossible, en l'état de nos résultats, de conclure au taux d'édition génique ayant réellement eu lieu dans le génome des cellules transfectées avec les matrices de recombinaison associées au système CRISPR/Cas9. En outre, même en considérant une implication exclusive du mécanisme HDR dans les conditions citées ci-dessus, le taux de recombinaison maximal reste faible (<15%) et rendra difficile la transposition des protocoles aux cellules iPSCs, qui sont moins permissives que les HEK aux expériences d'édition et chez lesquelles la mise en place du système rapporteur fluorescent est inenvisageable dans une perspective de correction ponctuelle, ce qui rend très complexe l'identification d'événements rares de recombinaison.

Pour mener ce projet jusqu'aux iPSCs, il sera nécessaire de mettre en place une stratégie d'identification précise du taux de recombinaison homologue, en suivant par exemple le modèle de système rapporteur développé par Flynn *et al.* selon lequel l'expression de la protéine bleue fluorescente est éteinte par introduction d'indels, tandis qu'elle est convertie en protéine verte fluorescente par HDR⁴¹⁰. De la fiabilité de ce système dépendra la pertinence de l'optimisation des protocoles de correction ponctuelle, cette optimisation (évoquée dans la partie Discussion et Perspectives de ce mémoire) étant nécessaire à l'obtention de taux de recombinaison plus satisfaisants, à la hauteur des 45% déjà rapportés chez les iPSCs dans la littérature⁴¹¹.

**DISCUSSION
ET
PERSPECTIVES**

Dans le cadre de ce projet de thèse, nous avons développé des approches de médecine régénérative pour le traitement de l'hyperoxalurie primitive de type 1, consistant en une restauration de l'expression de la protéine AGT sauvage par thérapie génique *ex vivo* au sein d'hépatocytes-like autologues dérivés d'iPSCs. Dans la perspective d'un transfert de ces approches dans le domaine clinique pour une application chez les patients, il sera nécessaire de produire, dans les conditions des bonnes pratiques de fabrication inhérentes aux médicaments à usage humain, des populations de cellules stables (génotypiquement et phénotypiquement), modifiées de façon efficace et sécuritaire, homogènes, représentatives des hépatocytes primaires humains et capables de procéder au repeuplement du foie. La satisfaction de ces critères nécessite la mise en place d'optimisations à chaque étape du processus de génération des cellules, qui seront discutées dans cette partie.

I- Génération des cellules souches pluripotentes induites

La première étape de ce projet de recherche a consisté en la reprogrammation non intégrative de fibroblastes humains en iPSCs, à l'aide de vecteurs Sendaï. La culture des iPSCs a été essentiellement réalisée en présence d'un milieu et d'un stroma de composition définie, selon un mode de croissance unicellulaire. Ces conditions de culture nous ont permis d'obtenir une grande quantité de cellules pluripotentes homogènes en termes de capacité de prolifération et de morphologie, dépourvues de toute expression de facteurs de reprogrammation exogènes, et caractérisées par une parfaite intégrité chromosomique.

Cependant, il est nécessaire de considérer que la culture bidimensionnelle est très éloignée du mode de croissance physiologique des cellules souches pluripotentes au sein de la masse cellulaire interne du blastocyste : en culture, les iPSCs sont contraintes de modifier leur cytosquelette et d'adopter une morphologie aplatie, ce qui affecte leurs contacts avec la matrice extracellulaire et les cellules environnantes, réduit leur polarisation et modifie les voies de signalisation cellulaire, l'ensemble pouvant résulter en une altération de leur pluripotence et de leurs capacités de différenciation⁴¹². Ces obstacles peuvent être surmontés par la mise en place d'approches de culture cellulaire en trois dimensions (Figure 45), qui présentent en outre la capacité de fournir des quantités de cellules considérables, compatibles avec les besoins des applications cliniques.

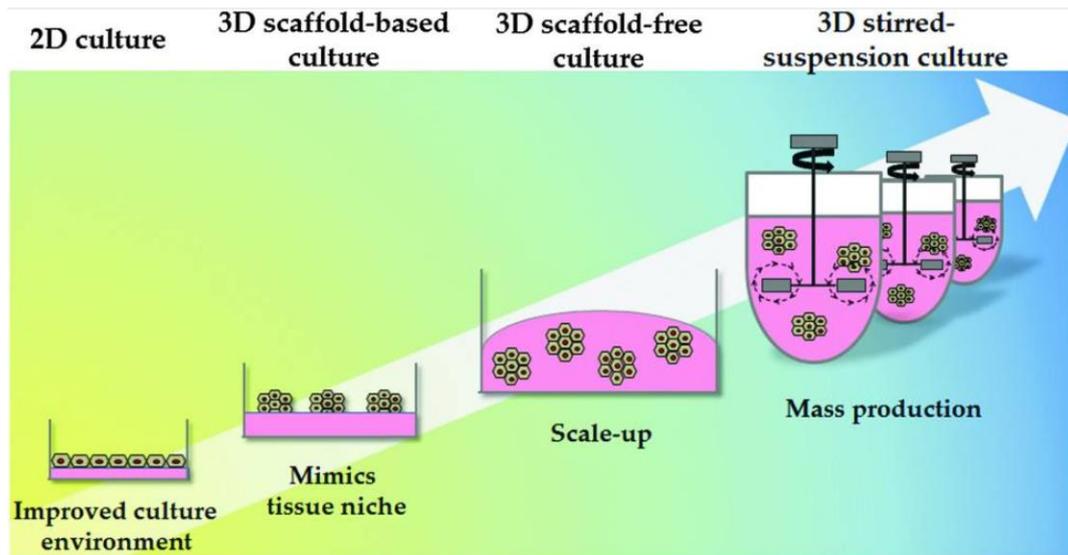


Figure 45. Evolution des propriétés physiques des systèmes de culture d'iPSCs (d'après Lucendo-Villarin *et al.*, 2016)³¹¹. Les systèmes de culture en deux dimensions (2D) ne reproduisent pas avec précision l'environnement cellulaire *in vivo* et résultent fréquemment en une altération des caractéristiques biologiques des cellules. Une reproduction plus fidèle de cet environnement est conférée par les technologies en trois dimensions (3D), dont la plus haute avancée consiste en un système avec agitation incorporée, ce qui permet d'exposer les cellules de façon homogène aux différents facteurs présents dans le milieu de culture.

Les systèmes de culture cellulaire en trois dimensions peuvent reposer ou non sur l'emploi d'une structure matricielle (« *scaffold* »). Les approches matricielles consistent principalement en la présence de polymères naturels ou synthétiques sous forme d'hydrogel fournissant un support pour l'attachement des cellules. Ces systèmes permettent la production et l'organisation des cellules *in vitro* de façon contrôlée et reproductible, ce qui est indispensable à une utilisation en routine et à grande échelle³¹¹. Cependant, il a été montré que la diffusion des nutriments à l'intérieur des structures en hydrogels était limitée, restreignant alors la possibilité de culture à long terme des cellules⁴¹³. Cette limitation peut être dépassée par l'utilisation de systèmes non matriciels, qui reposent uniquement sur les capacités d'auto-agrégation des cellules pour maintenir une architecture 3D ; les approches les plus performantes font appel à la technologie des bioréacteurs, qui comprennent des systèmes de rotation et/ou d'agitation permettant de créer un environnement cellulaire uniforme et dynamique^{414,415}.

Quel que soit le mode de culture adopté, avant de procéder aux étapes de manipulation et de différenciation des cellules à destination des patients, il sera nécessaire de mettre en place un contrôle approfondi de l'intégrité de leur génome. Il est en effet reconnu que les iPSCs cultivées *in vitro* ont tendance à acquérir des

anomalies génomiques, à l'échelle du chromosome comme du nucléotide, qui peuvent entraîner une modification de l'expression des gènes et conduire à la transformation maligne des cellules. Ces altérations peuvent correspondre à des aberrations chromosomiques ou sub-chromosomiques (duplications et délétions de chromosomes ou de régions chromosomiques) ainsi qu'à des variations du nombre de copies de gènes ou de nucléotides isolés⁴¹⁶. L'épigénome est également la cible de modifications, qui consistent notamment en des anomalies de méthylation de régions génomiques^{417,418}.

Au cours de nos projets expérimentaux, nous avons procédé à une analyse du caryotype des iPSCs, que nous avons estimée suffisante au reflet de leur intégrité génomique dans le cadre d'une étude *in vitro*. Cependant, la résolution de ce type d'analyse est faible et, dans la perspective d'une application clinique, il sera préférable de l'associer à des techniques d'étude de l'ADN à l'échelle du nucléotide (telles que le séquençage approfondi du génome ou le génotypage de polymorphismes nucléotidiques) complétées par des études transcriptomiques (par PCR en temps réel ou séquençage à haut débit de type *RNA-seq*)⁴¹⁶. Ces analyses seront à renouveler à chaque étape de modification des cellules.

II- Modification du génome cellulaire

Au cours des trois projets de thérapie génique entrepris lors de cette thèse, nous avons progressivement évolué vers une amélioration de la sécurité des protocoles, à travers une augmentation du contrôle de l'intégration des séquences thérapeutiques et une minimisation de l'impact des manipulations exécutées sur le génome. Il semble en effet raisonnable de considérer que les approches les plus bénéfiques aux patients correspondent à celles qui sont le moins susceptibles de perturber l'intégrité du génome cellulaire, ce qui laisse entrevoir un avenir prometteur aux pratiques de modification ciblée de l'ADN, dont en premier lieu celles employant le système CRISPR/Cas9.

Cependant, l'intégration génomique de séquences médiée par la technologie CRISPR/Cas9 se caractérise par deux obstacles majeurs à surmonter pour un transfert dans le domaine clinique, qui correspondent à une spécificité et une efficacité insuffisantes^{366,419}. Conscients de l'existence de ces barrières, nous avons intégré dans nos protocoles de recombinaison plusieurs approches destinées à les dépasser : emploi de séquences d'ARN guides peu susceptibles de s'hybrider en-dehors de la cible ; limitation de la durée d'expression de l'enzyme Cas9 *via* son utilisation sous forme d'ARN messenger pour réduire le risque de clivage erroné (Résultats 2) ; optimisation de la structure des matrices pour favoriser le processus de recombinaison, par l'adaptation de la taille des zones d'homologie à celle de la séquence à intégrer et par la mutation des séquences PAM pour éviter les clivages multiples des séquences

intégrées (Résultats 3). Cependant, ces mesures n'ont pas été suffisantes, au regard des intégrations hors cible *AAVS1* que nous constatées, et des difficultés que nous avons rencontrées dans la réalisation de la correction ponctuelle de l'exon 7 du gène *AGXT*. Il reste néanmoins plusieurs pistes à explorer pour optimiser nos protocoles, qui seront présentées dans les paragraphes suivants.

A. Optimisation et vérification de la spécificité du clivage médié par le système CRISPR/Cas9

L'emploi d'une technologie de clivage de l'ADN caractérisée par une spécificité insuffisante peut conduire à l'introduction d'indels et/ou de séquences de recombinaison exogènes au sein de régions hors-cibles du génome, l'ensemble étant potentiellement responsable de l'inactivation de gènes ou de la dérégulation de l'expression de séquences. Pour optimiser la spécificité du clivage, il est envisageable de recourir à l'utilisation d'ARN guides « tronqués » de 2 à 3 nucléotides en position 5' pour diminuer la stabilité du complexe Cas9-ARN guide et ainsi restreindre le clivage aux régions parfaitement homologues au spacer du guide⁴²⁰. En ce qui concerne la Cas9, il est possible de réduire davantage sa fenêtre d'action en employant directement la forme protéique de l'enzyme^{421,422}, tandis que l'emploi de variants présentant une diminution d'affinité avec l'ADN⁴²³ peut également contribuer à une meilleure spécificité de clivage. Enfin, l'emploi de matrices de recombinaison simple brin ou double brin linéaires semble préférable à l'utilisation de plasmides, qui présentent une tendance naturelle à l'intégration aléatoire dans le génome⁴⁰¹.

Pour une sécurité optimale, il sera également nécessaire de détecter l'ensemble des événements de clivage et d'intégration, y compris les plus rares et les moins prédictibles, ce qui ne peut être réalisé qu'en employant des méthodes d'analyse exhaustives telles que la LAM-PCR et le Southern blotting (qui permettent d'identifier les événements d'intégration) ou le séquençage complet du génome (qui détecte l'ensemble des modifications géniques, quelle que soit leur nature)⁴¹⁹.

B. Amélioration de l'efficacité du processus de recombinaison

La fréquence de la survenue des événements de recombinaison homologue facilités par le système CRISPR/Cas9 peut être améliorée suite à l'optimisation des deux paramètres fondamentaux du processus, qui correspondent au clivage de la cible génomique par la Cas9 et à la réparation de cette cassure par la voie HDR.

Plusieurs études ont montré que la fixation de la Cas9 sur sa cible est dépendante de l'environnement génomique de cette dernière : le statut « ouvert » (favorable à l'expression des gènes) de la structure de la chromatine et de l'épigénome semblent ainsi indispensables à l'action de l'enzyme^{424,425}. De la même façon que pour le

processus de reprogrammation des iPSCs, il est donc envisageable d'optimiser le clivage de l'ADN par la Cas9 *via* une modulation de l'environnement du génome à l'aide d'inhibiteurs de la méthylation de l'ADN (5-azacytidine) et des histones (BIX-01294), ou de petites molécules inhibitrices d'histones désacétylases tels que le butyrate de sodium⁴²⁶. La mise en place de ce type de procédé sera en outre favorable à l'expression des transgènes intégrés.

Quant à l'optimisation de la réparation par la voie HDR, l'approche la plus étudiée correspond à une inhibition de la voie NHEJ pour augmenter le ratio HDR/NHEJ. Ce processus peut être effectué en utilisant de petites molécules inhibitrices des protéines impliquées dans le mécanisme de NHEJ, telles que le SCR7 (inhibiteur de l'ADN ligase IV)⁴²⁷ ou le NU7441 et le KU-0060648 (inhibiteurs de protéines kinases dépendantes de l'ADN)⁴²⁸. Ces méthodes permettent d'augmenter efficacement le taux d'HDR (des augmentations de 5 à 19 fois ont été rapportées)^{429,430} tout en réduisant la réparation par NHEJ (jusqu'à la rendre indétectable)⁴²⁸, mais il est nécessaire de prendre en considération le risque d'induction de l'apoptose lié à une inhibition excessive du mécanisme majoritaire de réparation des cassures de l'ADN³⁶⁶. Dans un autre registre, il a été montré que l'emploi de matrices polynucléotidiques simple-brin chimiquement modifiées par ajout de molécules de phosphorothioate était capable d'augmenter significativement le processus de recombinaison, par stabilisation des séquences et réduction de leur sensibilité à la dégradation exonucléasique⁴³¹.

III- Production d'hépatocytes-*like* fonctionnels

Le protocole de différenciation hépatocytaire que nous avons employé lors de nos études nous a permis d'obtenir en quelques semaines des HLCs présentant un profil d'expression génique et une activité fonctionnelle caractéristiques des hépatocytes primaires. Cependant, nous avons pu constater que, à l'instar des résultats rapportés dans la littérature^{122,330}, le degré de maturation des cellules obtenues était plus proche des hépatocytes fœtaux que du phénotype adulte, ce qui s'est illustré par la persistance de l'expression de l'alpha-fœtoprotéine et a probablement constitué un frein à l'expression du promoteur de la transthyrétine (Résultats 1). Or, l'application d'une approche de médecine régénérative aux patients atteints de PH1 implique le remplacement de la grande majorité des hépatocytes par les cellules thérapeutiques, ce qui impose la génération de populations matures capables de remplir l'ensemble des fonctions des hépatocytes primaires adultes. Pour garantir le traitement des patients, les cellules doivent également faire preuve d'un métabolisme efficace du glyoxylate. Dans les paragraphes suivants, nous évoquerons des solutions permettant d'augmenter le degré de maturation des HLCs, ainsi que des méthodes d'évaluation de la restauration de la voie métabolique du glyoxylate applicables à la culture *in vitro*.

A. Modulation des voies de signalisation cellulaire

L'expression de nombreux gènes hépato-spécifiques est régulée à la hausse durant le développement post-natal, suite à la modulation des voies de signalisation cellulaire. Il a été proposé que la différence d'exposition aux signaux nucléaires existant entre les hépatocytes induits *in vitro* et ceux issus du développement physiologique pouvait constituer l'une des raisons de la maturation incomplète des HLCs⁴³². A titre d'exemple, le récepteur nucléaire PXR (*nuclear Pregnane X Receptor*) présente un rôle critique dans l'induction de l'expression de protéines impliquées dans la détoxification, qui constitue l'une des fonctions essentielles des hépatocytes matures⁴³³. Après la naissance, lorsque la nutrition placentaire laisse place à la nutrition entérale, le tractus intestinal du nouveau-né est colonisé par des bactéries responsables, entre autres, de la synthèse d'acide lithocholique (acide biliaire secondaire issu du catabolisme du cholestérol) et de ménaquinone-4 (homologue de la vitamine K₂), qui sont des activateurs du PXR. Il a ainsi été montré qu'une exposition des HLCs à ces deux molécules lors de la dernière étape de maturation des cellules permettait de stimuler l'expression de PXR et favorisait sa localisation nucléaire ainsi que l'expression de ses cibles CYP2C9 et CYP3A4⁴³².

De façon plus générale, des études ont révélé que l'induction de l'expression cellulaire des facteurs de transcription Sox17⁴³⁴ (impliqué dans la régulation du développement embryonnaire) et HNF4 α ⁴³⁵ (impliqué dans la régulation de la synthèse de protéines hépatiques telles que l' α -1 antitrypsine et la transthyrétine) permettait d'augmenter la proportion et l'activité fonctionnelle des cellules obtenues à chaque étape de différenciation endodermique et hépatocytaire, respectivement.

B. Culture des cellules en trois dimensions

Au sein du foie, les hépatocytes sont organisés en travées tridimensionnelles, dans lesquelles ils sont connectés avec les hépatocytes adjacents par des jonctions cellulaires, l'ensemble se situant au proche voisinage des cellules non-parenchymateuses telles que les cellules endothéliales des sinusoides hépatiques, les cellules stellaires (impliquées dans la synthèse de vitamine A et de composés de la matrice extracellulaire) et les cellules de Kupffer (responsables de la phagocytose des hématies et de la dégradation de l'hémoglobine)³⁴⁶. La matrice extracellulaire, les cellules environnantes et les molécules solubles fournies par le sang portal coopèrent pour maintenir la viabilité et le profil d'expression génique caractéristique des hépatocytes primaires. L'environnement minimaliste constitué par la culture *in vitro* bidimensionnelle, comparé à la complexité des conditions physiologiques, semble donc peu propice à l'acquisition et au maintien d'un phénotype mature par les HLCs.

De ce fait, depuis plusieurs années, des efforts ont été réalisés pour rapprocher le mode de culture des HLCs de l'organisation spatiale du foie.

De façon similaire aux iPSCs, des méthodes de culture hépatocytaire matricielle tridimensionnelles ont été développées, sous forme de microsphéroïdes (constitués d'agarose, le plus souvent) et de bioréacteurs à systèmes capillaires (Figure 46). Les microsphéroïdes sont générés par auto-agrégation des cellules en différenciation au sommet d'une surface recouverte d'agarose, tandis que la culture en bioréacteurs s'effectue en présence d'un stroma de Matrigel™ permettant l'attachement des iPSCs et des hépatocytes-like qui en sont dérivés. Les iPSCs différenciées au sein de ces systèmes peuvent être cultivées seules^{342,436,437} ou en association avec des cellules endothéliales et/ou des cellules stromales telles que les fibroblastes^{438,439}. Les études de différenciation réalisées en systèmes à trois dimensions rapportent, quel que soit le type de stratégie utilisée, une maturation des HLCs obtenues plus importante que lors de leur culture en deux dimensions. Cela se traduit par la diminution de l'expression de l'alpha-foetoprotéine et le développement des activités hépatocytaires matures (sécrétion d'albumine et d' α -1 antitrypsine, expression du facteur HNF4 α et des isotypes 1A2 et 3A4 du cytochrome P450), bien que le stade de maturation des hépatocytes primaires adultes ne soit pas atteint^{436,439}. Le choix de l'utilisation des sphéroïdes ou des bioréacteurs est principalement guidé par les applications destinées à ces systèmes : les bioréacteurs permettent une meilleure maîtrise des conditions de culture et favorisent l'amplification de cellules à haute densité, ce qui est en faveur d'une utilisation de ces systèmes à grande échelle pour une application en médecine régénérative⁴⁴⁰, tandis que la simplicité et le faible coût de mise en œuvre des sphéroïdes sont adaptés au criblage rapide d'un grand nombre de drogues⁴³⁶.

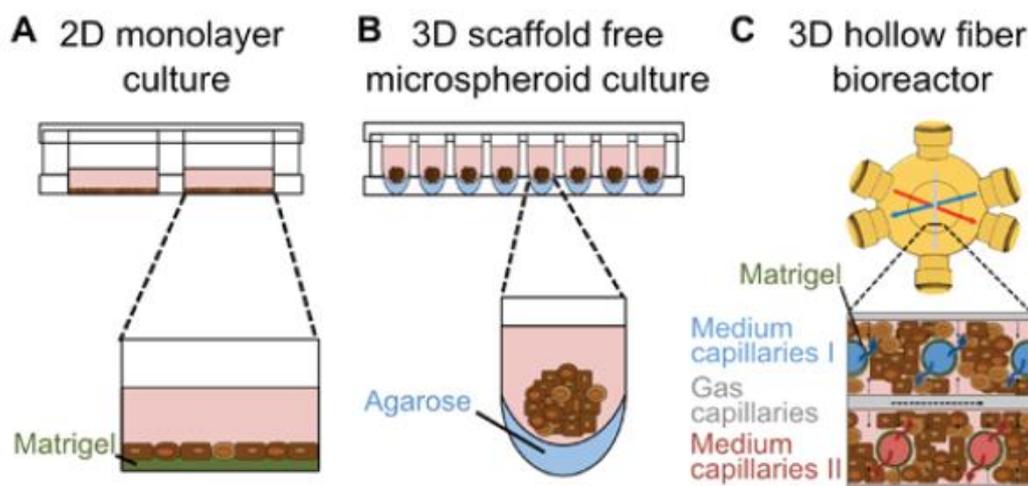


Figure 46. Evolution des systèmes de culture employés pour la différenciation hépatocytaire des iPSCs (d'après Meier *et al.*, 2017)⁴³⁶. Dans chaque cas, les iPSCs en différenciation sont représentées par des disques marrons. (A) Différenciation « classique » en deux dimensions au sein de plaques 24 puits, sur une matrice composée de Matrigel™. (B) Différenciation des cellules en plaques 96 puits, sous forme

de microsphéroïdes formés en surface d'une couche d'agarose. (C) Différenciation hépatocytaire des iPSCs dans l'espace extra-capillaire d'un bioréacteur, dont la surface est recouverte de Matrigel™. Les capillaires permettent le renouvellement du milieu et de l'oxygène.

Dans l'objectif de se rapprocher d'une culture en conditions physiologiques, une autre technique récemment développée consiste à utiliser la structure de la matrice extracellulaire issue de foies humains⁴⁴¹ ou de rats⁴⁴² décellularisés par perfusion de détergent, en tant que support de la différenciation hépatocytaire des iPSCs. L'emploi de cette approche s'est illustré par une augmentation des capacités de prolifération et du degré de maturation des HLCs dérivées d'iPSCs humaines, en comparaison de la culture en deux dimensions. Cependant, la nécessité du recours à des organes hépatiques (en particulier humains) pose à nouveau la question de la disponibilité des donneurs, et semble incompatible avec la reproduction à grande échelle de cette technique.

Cet obstacle peut être dépassé par la mise en œuvre de la technique de culture « spatiale » de HLCs la plus évoluée en termes de mimétisme de l'organe hépatique, qui consiste en la formation de structures cellulaires tridimensionnelles organisées appelées organoïdes. Les organoïdes hépatiques sont obtenus à partir de cellules endodermiques dérivées d'iPSCs, qui sont placées en culture en présence de cellules endothéliales dérivées de veines ombilicales humaines (HUVEC) et de cellules souches mésenchymateuses (MSC)^{339,443-445}. Ces différentes catégories de cellules sont capables, avec ou sans l'aide d'un support tridimensionnel, de s'organiser pour former des « bourgeons » de cellules interagissant les unes avec les autres (Figure 47).

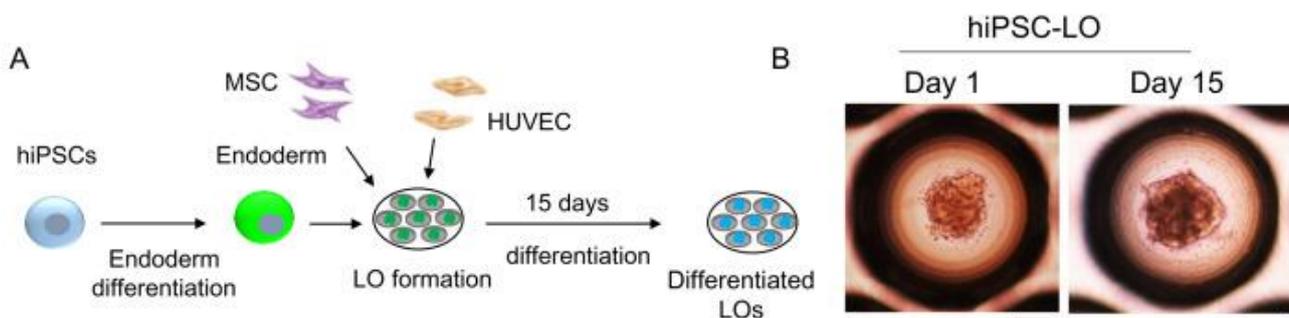


Figure 47. Génération d'organoïdes hépatiques fonctionnels à partir d'iPSCs humaines (d'après Nie *et al.*, 2018)⁴⁴⁴. (A) Représentation schématique du protocole de formation des organoïdes. Dans un premier temps, les hiPSCs sont différenciées en cellules endodermiques hépatiques, puis ces dernières sont co-cultivées avec des cellules souches mésenchymateuses et des cellules endothéliales dérivées de veines ombilicales humaines pour permettre la formation d'organoïdes et la maturation parallèle des cellules endodermiques en HLCs. (B) Morphologie des organoïdes hépatiques à J1 et J15 de la co-culture. Barres d'échelle = 100 μ m. Abréviations : hiPSC, *human induced Pluripotent Stem Cell* ; HUVEC, *Human Umbilical Vein Endothelial Cell* ; LO, *Liver Organoid* ; MSC, *Mesenchymal Stem Cell*.

Les organoïdes ainsi formés se caractérisent par des fonctions hépatocytaires plus matures que celles des HLCs cultivées en deux dimensions, notamment en termes de sécrétion protéique (augmentation de la sécrétion d'albumine et d'urée), d'expression et d'activité des enzymes de détoxification (augmentation de plusieurs logs de ces paramètres pour le CYP3A4) et de profil d'expression des marqueurs protéiques hépatocytaires adultes (augmentation du HNF4 α et diminution de l'alpha-foetoprotéine). En outre, il a été montré que la transplantation de ces organoïdes au sein de souris immunodéficientes conduisait à leur vascularisation par connexion au système vasculaire de l'hôte, et permettait en parallèle un accroissement du degré de maturation des HLCs, se rapprochant alors de celui des hépatocytes primaires adultes³³⁹.

C. Evaluation de la correction phénotypique des cellules thérapeutiques

Dans le cadre de nos projets expérimentaux, nous avons démontré que les deux protocoles de thérapie génique additive que nous avons mis en œuvre dans les iPSCs dérivées du patient atteint de PH1 ont permis de restaurer l'expression de la protéine AGT sauvage au sein des HLCs correspondantes. Ce résultat, bien que satisfaisant, n'est pas représentatif de la restauration du métabolisme du glyoxylate dans les cellules, qui doit être évaluée pour une application clinique.

L'évaluation exhaustive de ce paramètre comprend la mesure de l'activité enzymatique de la protéine AGT, l'identification de sa localisation intracellulaire et l'analyse de la synthèse de l'oxalate, qui constitue l'indicateur le plus représentatif. Plusieurs études ont déjà rapporté la réalisation de ces expériences *in vitro* à l'aide de techniques de spectrophotométrie³⁶, de microscopie confocale^{199,200} et de spectrométrie de masse²⁰⁰, respectivement. Cependant, dans ces études, les modèles cellulaires utilisés correspondent à des lignées CHO surexprimant à la fois la protéine glycolate oxydase et des variants morbides de la protéine AGT, l'ensemble résultant en une expression protéique et une accumulation d'oxalate suffisamment importantes pour être analysées, ce qui n'est pas le cas chez les populations de HLCs que nous avons produites. Nous pouvons néanmoins espérer que la mise en œuvre des protocoles de culture optimisée des HLCs précédemment décrits fournira les conditions nécessaires à la réalisation de ces expériences.

IV- Greffe des hépatocytes-*like* chez les patients

Dans la perspective d'une application clinique des approches de médecine régénérative développées au cours de cette thèse, il est nécessaire de considérer la transplantation des cellules génétiquement modifiées chez les patients souffrant de

PH1. Au vu des défis représentés par les caractéristiques de cette pathologie, dont le traitement nécessite le repeuplement de la majorité du foie par des cellules thérapeutiques dépourvues de tout avantage sélectif par rapport aux cellules pathologiques, il semble indispensable d'optimiser les processus de prise de greffe et de repeuplement du foie receveur pour assurer le succès de la thérapie. Les expériences de transplantation présentées dans les paragraphes suivants ont été réalisées en présence d'hépatocytes primaires, mais elles devraient être applicables sans difficulté à la greffe de HLCs.

A. Amélioration de l'efficacité de la prise de greffe

Le processus de prise de greffe fait face à trois obstacles majeurs : l'induction de réactions inflammatoires et vaso-occlusives délétères pour les cellules, le franchissement de la barrière endothéliale séparant les sinusoides du parenchyme hépatique et l'intégration des cellules transplantées au sein du parenchyme¹¹⁵. La modulation de ces étapes est indispensable à l'optimisation de la prise de greffe.

Dans cet objectif, des études menées chez le rat ont montré que l'administration de drogues inhibitrices des voies pro-inflammatoires telles que le naproxen et le célécoxib (inhibiteurs de la synthèse des prostaglandines), le darusentan (inhibiteur du récepteur A de l'endothéline 1) et l'éta nercept (inhibiteur du facteur de nécrose tumorale α ou TNF α) était favorable à la prise de greffe : cela s'est illustré par une augmentation du nombre d'hépatocytes implantés au sein du parenchyme hépatique d'un facteur 1,5 à 3 en comparaison des rats non traités⁴⁴⁶⁻⁴⁴⁸. En outre, il a été montré que l'administration de naproxen ou de célécoxib était capable d'induire l'activation des cellules hépatiques étoilées, ces cellules exprimant alors le facteur de croissance hépatocytaire (HGF), le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF, facteur pro-angiogénique entraînant une augmentation de la perméabilité vasculaire) ainsi que des métalloprotéases responsables du remaniement de la matrice extracellulaire, l'ensemble étant favorable au franchissement de la barrière endothéliale et à l'intégration des cellules transplantées au sein du parenchyme hépatique⁴⁴⁸. Une autre piste à explorer correspond à l'infusion intraportale de polymères similaires à la fibronectine, qui interagissent avec les intégrines de la membrane cellulaire et favorisent ainsi l'adhésion des cellules à la veine porte et le passage transendothélial : une étude menée chez le rat a en effet révélé une augmentation significative de la prise de greffe d'hépatocytes primaires chez les sujets traités, se traduisant par des aires occupées par les transplants 13 fois plus nombreuses et 8 fois plus larges que chez les animaux contrôles⁴⁴⁹.

B. Optimisation du repeuplement du foie receveur

Dans l'objectif d'augmenter la capacité des cellules thérapeutiques à repeupler le foie receveur, deux approches ont été principalement étudiées, consistant 1) à induire des lésions hépatiques destinées à détruire une partie du tissu endogène et à créer un environnement stimulant la prolifération cellulaire, et 2) à conférer un avantage sélectif aux greffons. Les lésions hépatiques préparatoires à la greffe peuvent être réalisées, à titre d'exemple, en associant une procédure d'ischémie-reperfusion portale à une irradiation hépatique partielle⁴⁵⁰, ou *via* l'administration de drogues telles que la monocrotaline, qui crée des lésions de l'endothélium sinusoidal⁴⁵¹. Bien que ces méthodes aient conduit à une repopulation hépatique significativement supérieure chez les rongeurs (repopulation x5, 12 semaines post-greffe après ischémie-reperfusion et irradiation, et repopulation x3, 1 semaine post-greffe après administration de monocrotaline), elles semblent difficilement applicables à l'Homme, au regard des considérations éthiques. En ce qui concerne l'attribution d'un avantage sélectif aux greffons, les principaux mécanismes étudiés consistent à inactiver des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire, tels que la protéine p27⁴⁵² et la voie de signalisation Hippo⁴⁵³. Cependant, les résultats obtenus sont variables (repopulation de 2% à 86% du foie à 2 mois post-greffe chez des souris transplantées par des hépatocytes murins présentant une inactivation de la protéine p27), et ces approches présentent un risque non négligeable de tumorigenèse.

Les pistes présentées ci-dessus sont encourageantes, mais difficilement applicables au domaine clinique. Un espoir réside cependant dans l'application d'une technique alternative, qui consiste à réaliser une embolie réversible d'une partie des branches de la veine porte à l'aide de matériaux absorbables. Des études réalisées chez le lapin⁴⁵⁴ et le singe⁴⁵⁵ ont en effet montré que l'occlusion temporaire d'une partie des lobes hépatiques conduisait à la stimulation de la régénération du foie, se manifestant par une hypertrophie du ou des lobes non traités, et se révélant bénéfique à la prolifération de transplants hépatocytaires (repeuplement observé jusqu'à 7,5% chez le singe). Si le taux de repeuplement obtenu est insuffisant au traitement de la PH1, la technique de l'embolie partielle constitue cependant une piste d'exploration prometteuse.

REFERENCES

1. Lepoutre, C. Calculs multiples chez un enfant: Infiltration du parenchyme rénal par des dépôts cristallins. *J Urol* (1925).
2. Cochat, P. & Rumsby, G. Primary Hyperoxaluria. *New England Journal of Medicine* **369**, 649–658 (2013).
3. Bouzidi, H., Majdoub, A., Daudon, M. & Najjar, M. F. Hyperoxalurie primitive : une revue de la littérature. *Néphrologie & Thérapeutique* **12**, 431–436 (2016).
4. Hoppe, B., Beck, B. B. & Milliner, D. The Primary Hyperoxalurias. *Kidney Int* **75**, 1264–1271 (2009).
5. Salido, E., Pey, A. L., Rodriguez, R. & Lorenzo, V. Primary hyperoxalurias: Disorders of glyoxylate detoxification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1822**, 1453–1464 (2012).
6. Knight, J. & Holmes, R. P. Mitochondrial Hydroxyproline Metabolism: Implications for Primary Hyperoxaluria. *AJN* **25**, 171–175 (2005).
7. Cellini, B., Bertoldi, M., Montioli, R., Paiardini, A. & Borri Voltattorni, C. Human wild-type alanine: glyoxylate aminotransferase and its naturally occurring G82E variant: functional properties and physiological implications. *Biochemical Journal* **408**, 39–50 (2007).
8. Martin-Higueras, C., Torres, A. & Salido, E. Molecular therapy of primary hyperoxaluria. *J Inherit Metab Dis* **40**, 481–489 (2017).
9. Rokka, A. *et al.* Pxmp2 Is a Channel-Forming Protein in Mammalian Peroxisomal Membrane. *PLOS ONE* **4**, e5090 (2009).
10. Leumann, E. & Hoppe, B. The Primary Hyperoxalurias. *JASN* **12**, 1986–1993 (2001).
11. Harambat, J., Fargue, S., Bacchetta, J., Acquaviva, C. & Cochat, P. Primary Hyperoxaluria. *Int J Nephrol* **2011**, (2011).
12. Dhondup, T., Lorenz, E. C., Milliner, D. S. & Lieske, J. C. Combined Liver–Kidney Transplantation for Primary Hyperoxaluria Type 2: A Case Report. *American Journal of Transplantation* **18**, 253–257 (2018).
13. Naderi, G., Latif, A., Tabassomi, F. & Esfahani, S. T. Failure of isolated kidney transplantation in a pediatric patient with primary hyperoxaluria type 2. *Pediatr Transplant* **18**, E69-73 (2014).
14. Rumsby, G. & Hulton, S.-A. Primary Hyperoxaluria Type 2. in *GeneReviews*® (eds. Adam, M. P. *et al.*) (University of Washington, Seattle, 1993).
15. Hopp, K. *et al.* Phenotype-Genotype Correlations and Estimated Carrier Frequencies of Primary Hyperoxaluria. *J Am Soc Nephrol* **26**, 2559–2570 (2015).
16. Riedel, T. J. *et al.* Structural and Biochemical Studies of Human 4-hydroxy-2-oxoglutarate Aldolase: Implications for Hydroxyproline Metabolism in Primary Hyperoxaluria. *PLoS One* **6**, (2011).
17. Riedel, T. J. *et al.* 4-Hydroxy-2-oxoglutarate Aldolase Inactivity in Primary Hyperoxaluria Type 3 and Glyoxylate Reductase Inhibition. *Biochim Biophys Acta* **1822**, 1544–1552 (2012).
18. Cochat, P. *et al.* Epidemiology of primary hyperoxaluria type 1. Société de Néphrologie and the Société de Néphrologie Pédiatrique. *Nephrol. Dial. Transplant.* **10 Suppl 8**, 3–7 (1995).
19. van Woerden, C., Groothoff, J., Wanders, R., Davin, J.-C. & Wijburg, F. Primary hyperoxaluria type 1 in The Netherlands: prevalence and outcome. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **18**, 273–9 (2003).
20. Harambat, J. *et al.* Characteristics and Outcomes of Children with Primary Oxalosis Requiring Renal Replacement Therapy. *CJASN* **7**, 458–465 (2012).

21. al-eisa, A., Samhan, M. & Naseef, M. End-stage renal disease in Kuwaiti children: An 8-year experience. *Transplantation proceedings* **36**, 1788–91 (2004).
22. Kamoun, A. & Lakhoua, R. End-stage renal disease of the Tunisian child: Epidemiology, etiologies, and outcome. *Pediatr. Nephrol.* **10**, 479–482 (1996).
23. Rhuma, N. R., Fituri, O. A. & Sabei, L. T. Mutational analysis of AGXT gene in Libyan children with primary hyperoxaluria type 1 at Tripoli Children Hospital. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation* **29**, 30 (2018).
24. Lorenzo, V. *et al.* Presentation and role of transplantation in adult patients with type 1 primary hyperoxaluria and the I244T AGXT mutation: Single-center experience. *Kidney International* **70**, 1115–1119 (2006).
25. Mandrile, G. *et al.* Data from a large European study indicate that the outcome of primary hyperoxaluria type 1 correlates with the AGXT mutation type. *Kidney International* **86**, 1197–1204 (2014).
26. van der Hoeven, S. M., van Woerden, C. S. & Groothoff, J. W. Primary hyperoxaluria Type 1, a too often missed diagnosis and potentially treatable cause of end-stage renal disease in adults: results of the Dutch cohort. *Nephrol Dial Transplant* **27**, 3855–3862 (2012).
27. Woerden, C. S. van *et al.* Primary Hyperoxaluria Remains Undiagnosed in Patients with Hyperoxaluria and Recurrent Urolithiasis. *Clinical Chemistry* **53**, 1553–1555 (2007).
28. Marangella, M. *et al.* Bony content of oxalate in patients with primary hyperoxaluria or oxalosis-unrelated renal failure. *Kidney International* **48**, 182–187 (1995).
29. Schnitzler, C. M. *et al.* Skeletal manifestations of primary oxalosis. *Pediatr. Nephrol.* **5**, 193–199 (1991).
30. Toussaint, C. *et al.* Radiological and histological improvement of oxalate osteopathy after combined liver-kidney transplantation in primary hyperoxaluria type 1. *Am. J. Kidney Dis.* **21**, 54–63 (1993).
31. Cochat, P. *et al.* Primary hyperoxaluria Type 1: indications for screening and guidance for diagnosis and treatment. *Nephrol Dial Transplant* **27**, 1729–1736 (2012).
32. Berini, S. E. *et al.* Progressive polyradiculoneuropathy due to intraneural oxalate deposition in type 1 primary hyperoxaluria. *Muscle Nerve* **51**, 449–454 (2015).
33. Danpure C.J. & Jennings P.R. Peroxisomal alanine:glyoxylate aminotransferase deficiency in primary hyperoxaluria type I. *FEBS Letters* **201**, 20–34 (2001).
34. Kamoda, N. *et al.* The organ distribution of human alanine-2-oxoglutarate aminotransferase and alanine-glyoxylate aminotransferase. *Biochem Med.* 25–34 (1980).
35. Oppici, E., Montioli, R. & Cellini, B. Liver peroxisomal alanine:glyoxylate aminotransferase and the effects of mutations associated with Primary Hyperoxaluria Type I: An overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1854**, 1212–1219 (2015).
36. Dindo, M., Oppici, E., Dell’Orco, D., Montone, R. & Cellini, B. Correlation between the molecular effects of mutations at the dimer interface of alanine-glyoxylate aminotransferase leading to primary hyperoxaluria type I and the cellular response to vitamin B₆. *J Inherit Metab Dis* **41**, 263–275 (2018).
37. Zhang, X. *et al.* Crystal Structure of Alanine:Glyoxylate Aminotransferase and the Relationship Between Genotype and Enzymatic Phenotype in Primary Hyperoxaluria Type 1. *Journal of Molecular Biology* **331**, 643–652 (2003).

38. Cellini, B., Montioli, R., Oppici, E., Astegno, A. & Borri Voltattorni, C. The chaperone role of the pyridoxal 5'-phosphate and its implications for rare diseases involving B6-dependent enzymes. *Clinical Biochemistry* **47**, 158–165 (2014).
39. Huber, P. A. J. *et al.* Peroxisomal Import of Human Alanine:glyoxylate Aminotransferase Requires Ancillary Targeting Information Remote from Its C Terminus. *J. Biol. Chem.* **280**, 27111–27120 (2005).
40. Motley, A. *et al.* Mammalian alanine/glyoxylate aminotransferase 1 is imported into peroxisomes via the PTS1 translocation pathway. Increased degeneracy and context specificity of the mammalian PTS1 motif and implications for the peroxisome-to-mitochondrion mistargeting of AGT in primary hyperoxaluria type 1. *J Cell Biol.* 95–109 (1995).
41. Montioli, R. *et al.* The N-terminal extension is essential for the formation of the active dimeric structure of liver peroxisomal alanine:glyoxylate aminotransferase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **44**, 536–546 (2012).
42. Pubchem. Lysine. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5962>. (Accessed: 9th August 2018)
43. Pubchem. Pyridoxal phosphate anhydrous. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1051>. (Accessed: 9th August 2018)
44. Purdue, P. E. *et al.* Characterization and chromosomal mapping of a genomic clone encoding human alanine:Glyoxylate aminotransferase. *Genomics* **10**, 34–42 (1991).
45. Purdue, P. E., Allsop, J., Isaya, G., Rosenberg, L. E. & Danpure, C. J. Mistargeting of peroxisomal L-alanine:glyoxylate aminotransferase to mitochondria in primary hyperoxaluria patients depends upon activation of a cryptic mitochondrial targeting sequence by a point mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10900–10904 (1991).
46. Purdue, P. E., Takada, Y. & Danpure, C. J. Identification of mutations associated with peroxisome-to-mitochondrion mistargeting of alanine/glyoxylate aminotransferase in primary hyperoxaluria type 1. *The Journal of Cell Biology* **111**, 2341–2351 (1990).
47. Danpure, C. J., Jennings, P. R., Fryer, P., Purdue, P. E. & Allsop, J. Primary hyperoxaluria type 1: genotypic and phenotypic heterogeneity. *J. Inherit. Metab. Dis.* **17**, 487–499 (1994).
48. Tarn, A. C., von Schnakenburg, C. & Rumsby, G. Primary hyperoxaluria type 1: diagnostic relevance of mutations and polymorphisms in the alanine:glyoxylate aminotransferase gene (AGXT). *J. Inherit. Metab. Dis.* **20**, 689–696 (1997).
49. Lumb, M. J. & Danpure, C. J. Functional Synergism between the Most Common Polymorphism in Human Alanine:Glyoxylate Aminotransferase and Four of the Most Common Disease-causing Mutations. *J. Biol. Chem.* **275**, 36415–36422 (2000).
50. Cellini, B., Lorenzetto, A., Montioli, R., Oppici, E. & Voltattorni, C. B. Human liver peroxisomal alanine:glyoxylate aminotransferase: Different stability under chemical stress of the major allele, the minor allele, and its pathogenic G170R variant. *Biochimie* **92**, 1801–1811 (2010).
51. Hopper, E. D., Pittman, A. M. C., Fitzgerald, M. C. & Tucker, C. L. In Vivo and in Vitro Examination of Stability of Primary Hyperoxaluria-associated Human Alanine:Glyoxylate Aminotransferase. *J Biol Chem* **283**, 30493–30502 (2008).
52. Pey, A. L., Salido, E. & Sanchez-Ruiz, J. M. Role of low native state kinetic stability and interaction of partially unfolded states with molecular chaperones in the mitochondrial protein mistargeting associated with primary hyperoxaluria. *Amino Acids* **41**, 1233–1245 (2011).
53. Williams Emma L. *et al.* Primary hyperoxaluria type 1: update and additional mutation analysis of the AGXT gene. *Human Mutation* **30**, 910–917 (2009).

54. Coulter-Mackie, M. B. & Lian, Q. Partial trypsin digestion as an indicator of mis-folding of mutant alanine:glyoxylate aminotransferase and chaperone effects of specific ligands. Study of a spectrum of missense mutants. *MGM* **94**, 368–374 (2008).
55. Coulter-Mackie, M. B. & Lian, Q. Consequences of missense mutations for dimerization and turnover of alanine:glyoxylate aminotransferase: Study of a spectrum of mutations. *MGM* **89**, 349–359 (2006).
56. Montioli, R. *et al.* S81L and G170R mutations causing Primary Hyperoxaluria type I in homozygosis and heterozygosis: an example of positive interallelic complementation. *Hum Mol Genet* **23**, 5998–6007 (2014).
57. Cellini, B., Montioli, R., Paiardini, A., Lorenzetto, A. & Voltattorni, C. B. Molecular Insight into the Synergism between the Minor Allele of Human Liver Peroxisomal Alanine:Glyoxylate Aminotransferase and the F152I Mutation. *J Biol Chem* **284**, 8349–8358 (2009).
58. Oppici, E. *et al.* Biochemical analyses are instrumental in identifying the impact of mutations on holo and/or apo-forms and on the region(s) of alanine:glyoxylate aminotransferase variants associated with Primary Hyperoxaluria Type I. *Mol Genet Metab* **105**, 132–140 (2012).
59. Mesa-Torres, N. *et al.* The Role of Protein Denaturation Energetics and Molecular Chaperones in the Aggregation and Mistargeting of Mutants Causing Primary Hyperoxaluria Type I. *PLoS One* **8**, (2013).
60. Oppici, E. *et al.* Crystal structure of the S187F variant of human liver alanine: Aminotransferase associated with primary hyperoxaluria type I and its functional implications. *Proteins* **81**, 1457–1465 (2013).
61. Cellini, B. *et al.* Molecular defects of the glycine 41 variants of alanine glyoxylate aminotransferase associated with primary hyperoxaluria type I. *PNAS* **107**, 2896–2901 (2010).
62. Fargue, S., Lewin, J., Rumsby, G. & Danpure, C. J. Four of the Most Common Mutations in Primary Hyperoxaluria Type 1 Unmask the Cryptic Mitochondrial Targeting Sequence of Alanine:glyoxylate Aminotransferase Encoded by the Polymorphic Minor Allele. *J Biol Chem* **288**, 2475–2484 (2013).
63. Santana, A., Salido, E., Torres, A. & Shapiro, L. J. Primary hyperoxaluria type 1 in the Canary Islands: A conformational disease due to I244T mutation in the P11L-containing alanine:glyoxylate aminotransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7277–7282 (2003).
64. Oppici, E., Roncador, A., Montioli, R., Bianconi, S. & Cellini, B. Gly161 mutations associated with Primary Hyperoxaluria Type I induce the cytosolic aggregation and the intracellular degradation of the apo-form of alanine:glyoxylate aminotransferase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1832**, 2277–2288 (2013).
65. Danpure, C. J., Cooper, P., Wise, P. & Jennings, P. R. An enzyme trafficking defect in two patients with primary hyperoxaluria type 1: peroxisomal alanine/glyoxylate aminotransferase rerouted to mitochondria. *J Cell Biol* **108**, 1345–1352 (1989).
66. Lieske, J. C. *et al.* International Registry for Primary Hyperoxaluria. *AJN* **25**, 290–296 (2005).
67. Harambat, J. *et al.* Genotype–phenotype correlation in primary hyperoxaluria type 1: the p.Gly170Arg AGXT mutation is associated with a better outcome. *Kidney International* **77**, 443–449 (2010).
68. Monico, C. G., Olson, J. B. & Milliner, D. S. Implications of Genotype and Enzyme Phenotype in Pyridoxine Response of Patients with Type I Primary Hyperoxaluria. *AJN* **25**, 183–188 (2005).
69. Rumsby, G., Williams, E. & Coulter-Mackie, M. Evaluation of mutation screening as a first line test for the diagnosis of the primary hyperoxalurias1. *Kidney International* **66**, 959–963 (2004).

70. Frishberg, Y. *et al.* Intra-Familial Clinical Heterogeneity: Absence of Genotype-Phenotype Correlation in Primary Hyperoxaluria Type 1 in Israel. *AJN* **25**, 269–275 (2005).
71. Edvardsson, V. O. *et al.* Hereditary Causes of Kidney Stones and Chronic Kidney Disease. *Pediatr Nephrol* **28**, 1923–1942 (2013).
72. Perinbam, M. *et al.* Plasma oxalate in relation to eGFR in patients with primary hyperoxaluria, enteric hyperoxaluria and urinary stone disease. *Clinical Biochemistry* **50**, 1014–1019 (2017).
73. Anders, H.-J. *et al.* The macrophage phenotype and inflammasome component NLRP3 contributes to nephrocalcinosis-related chronic kidney disease independent from IL-1-mediated tissue injury. *Kidney International* **93**, 656–669 (2018).
74. Rumsby, G., Weir, T. & Samuel, C. T. A Semiautomated Alanine: Glyoxylate Aminotransferase Assay for the Tissue Diagnosis of Primary Hyperoxaluria Type 1. *Ann Clin Biochem* **34**, 400–404 (1997).
75. Borghi, L. *et al.* Urinary Volume, Water and Recurrences in Idiopathic Calcium Nephrolithiasis: A 5-year Randomized Prospective Study. *The Journal of Urology* **155**, 839–843 (1996).
76. Sikora, P. *et al.* [¹³C₂]oxalate absorption in children with idiopathic calcium oxalate urolithiasis or primary hyperoxaluria. *Kidney International* **73**, 1181–1186 (2008).
77. Siener, R., Hoppe, B., Löhr, P., Müller, S. C. & Latz, S. Metabolic profile and impact of diet in patients with primary hyperoxaluria. *Int Urol Nephrol* 1–7 (2018). doi:10.1007/s11255-018-1939-1
78. Holmes, R. P., Goodman, H. O. & Assimos, D. G. Contribution of dietary oxalate to urinary oxalate excretion. *Kidney International* **59**, 270–276 (2001).
79. Unruh, G. E. von, Voss, S., Sauerbruch, T. & Hesse, A. Dependence of Oxalate Absorption on the Daily Calcium Intake. *JASN* **15**, 1567–1573 (2004).
80. Leumann, E., Hoppe, B. & Neuhaus, T. Management of primary hyperoxaluria: efficacy of oral citrate administration. *Pediatr. Nephrol.* **7**, 207–211 (1993).
81. Pak, C. Y. C. *et al.* Prevention of Stone Formation and Bone Loss In Absorptive Hypercalciuria by Combined Dietary and Pharmacological Interventions. *The Journal of Urology* **169**, 465–469 (2003).
82. Zimmermann, D. J., Voss, S., Unruh, G. E. von & Hesse, A. Importance of Magnesium in Absorption and Excretion of Oxalate. *UIN* **74**, 262–267 (2005).
83. Lorenzo, V., Torres, A. & Salido, E. Primary hyperoxaluria. *Nefrologia* **34**, 398–412 (2014).
84. Gibbs, D. & Watts, R. The action of pyridoxine in primary hyperoxaluria. *Clin Sci.* 277–286 (1970).
85. Watts, R. W. E., Veall, N., Purkiss, P., Mansell, M. A. & Haywood, E. F. The effect of Pyridoxine on Oxalate Dynamics in three Cases of Primary Hyperoxaluria (with Glycollic Aciduria). *Clinical Science* **69**, 87–90 (1985).
86. Hoyer-Kuhn, H. *et al.* Vitamin B6 in Primary Hyperoxaluria I: First Prospective Trial after 40 Years of Practice. *Clin J Am Soc Nephrol* **9**, 468–477 (2014).
87. Monico, C. G., Rossetti, S., Olson, J. B. & Milliner, D. S. Pyridoxine effect in type I primary hyperoxaluria is associated with the most common mutant allele. *Kidney International* **67**, 1704–1709 (2005).
88. Woerden, C. S. V. *et al.* Clinical implications of mutation analysis in primary hyperoxaluria type 1. *Kidney International* **66**, 746–752 (2004).
89. Fargue, S., Rumsby, G. & Danpure, C. J. Multiple mechanisms of action of pyridoxine in primary hyperoxaluria type 1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1832**, 1776–1783 (2013).

90. Fargue, S. *et al.* Effect of conservative treatment on the renal outcome of children with primary hyperoxaluria type 1. *Kidney International* **76**, 767–773 (2009).
91. Straub, M., Gschwend, J. & Zorn, C. Pediatric urolithiasis: the current surgical management. *Pediatr Nephrol* **25**, 1239–1244 (2010).
92. Kerbl, K. & Clayman, R. V. Endourologic treatment of nephrocalcinosis. *Urology* **56**, 508 (2000).
93. Boddy, S. A., Duffy, P. G., Barratt, T. M. & Whitfield, H. N. Hyperoxaluria and renal calculi in children: the role of extracorporeal shock wave lithotripsy. *J R Soc Med* **81**, 604–605 (1988).
94. Illies, F., Bonzel, K.-E., Wingen, A.-M., Latta, K. & Hoyer, P. F. Clearance and removal of oxalate in children on intensified dialysis for primary hyperoxaluria type 1. *Kidney International* **70**, 1642–1648 (2006).
95. Marangella, M., Petrarulo, M., Cosseddu, D., Vitale, C. & Linari, F. Oxalate balance studies in patients on hemodialysis for type I primary hyperoxaluria. *Am. J. Kidney Dis.* **19**, 546–553 (1992).
96. Cochat, P. *et al.* Primary hyperoxaluria type 1: still challenging! *Pediatr Nephrol* **21**, 1075–1081 (2006).
97. Scheinman, J. I., Najarian, J. S. & Mauer, S. M. Successful strategies for renal transplantation in primary oxalosis. *Kidney Int.* **25**, 804–811 (1984).
98. Bergstralh, E. J. *et al.* Transplantation outcomes in primary hyperoxaluria. *Am. J. Transplant.* **10**, 2493–2501 (2010).
99. Bello, A. D., Cointault, O., Delas, A. & Kamar, N. Recurrence of oxalate nephropathy after isolated kidney transplantation for primary hyperoxaluria type 2. *American Journal of Transplantation* **18**, 525–526 (2018).
100. Brinkert, F. *et al.* Transplantation procedures in children with primary hyperoxaluria type 1: outcome and longitudinal growth. *Transplantation* **87**, 1415–1421 (2009).
101. Perera, M. T. P. R. *et al.* Pre-emptive liver transplantation for primary hyperoxaluria (PH-I) arrests long-term renal function deterioration. *Nephrol. Dial. Transplant.* **26**, 354–359 (2011).
102. Jamieson, N. V. & European PHI Transplantation Study Group. A 20-year experience of combined liver/kidney transplantation for primary hyperoxaluria (PH1): the European PH1 transplant registry experience 1984–2004. *Am. J. Nephrol.* **25**, 282–289 (2005).
103. Compagnon, P. *et al.* Long-term results of combined liver-kidney transplantation for primary hyperoxaluria type 1: The French Experience. *Liver Transplantation* **20**, 1475–1485 (2014).
104. Malla, I. *et al.* Two-step transplantation for primary hyperoxaluria: cadaveric liver followed by living donor related kidney transplantation. *Pediatr Transplant* **13**, 782–784 (2009).
105. Kemper, M. J. The role of preemptive liver transplantation in primary hyperoxaluria type 1. *Urol Res* **33**, 376–379 (2005).
106. Chen, G.-Y. *et al.* Left Lateral Sectionectomy of the Native Liver and Combined Living-Related Liver–Kidney Transplantation for Primary Hyperoxaluria Type 1. *Medicine (Baltimore)* **94**, (2015).
107. Milliner, D. S., Harris, P. C., Cogal, A. G. & Lieske, J. C. Primary Hyperoxaluria Type 1. in *GeneReviews*[®] (eds. Adam, M. P. *et al.*) (University of Washington, Seattle, 2017).
108. Salido, E. *et al.* Phenotypic Correction of a Mouse Model for Primary Hyperoxaluria With Adeno-associated Virus Gene Transfer. *Mol Ther* **19**, 870–875 (2011).
109. Castello, R. *et al.* Helper-dependent adenoviral vectors for liver-directed gene therapy of primary hyperoxaluria type 1. *Gene Ther* **23**, 129–134 (2016).
110. Borrel, M. & Maslo, P. *MA BIBLE DU CORPS HUMAIN Le guide santé de référence sur le fonctionnement de votre corps.* (2015).

111. Thérapie cellulaire. *Inserm* Available at: <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/therapie-cellulaire>. (Accessed: 27th August 2018)
112. (PDF) Development of a new microfluidic platform in order to study intestinal and hepatic first pass effects. Available at: https://www.researchgate.net/publication/286085050_Development_of_a_new_microfluidic_platform_in_order_to_study_intestinal_and_hepatic_first_pass_effects. (Accessed: 8th September 2018)
113. Anatomie du foie - Cancer du foie. Available at: <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-foie/Anatomie-du-foie>. (Accessed: 8th September 2018)
114. Logan, G. J., de Alencastro, G., Alexander, I. E. & Yeoh, G. C. Exploiting the unique regenerative capacity of the liver to underpin cell and gene therapy strategies for genetic and acquired liver disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **56**, 141–152 (2014).
115. Forbes, S. J., Gupta, S. & Dhawan, A. Cell therapy for liver disease: From liver transplantation to cell factory. *Journal of Hepatology* **62**, S157–S169 (2015).
116. Salido, E. C. *et al.* Alanine–glyoxylate aminotransferase-deficient mice, a model for primary hyperoxaluria that responds to adenoviral gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 18249–18254 (2006).
117. Guha, C. *et al.* Feasibility of Hepatocyte Transplantation-Based Therapies for Primary Hyperoxalurias. *AJN* **25**, 161–170 (2005).
118. Jiang, J. *et al.* Correction of Hyperoxaluria by Liver Repopulation With Hepatocytes in a Mouse Model of Primary Hyperoxaluria Type-1. *Transplantation* **85**, 1253–1260 (2008).
119. Beck, B. B. *et al.* Liver cell transplantation in severe infantile oxalosis—a potential bridging procedure to orthotopic liver transplantation? *Nephrol Dial Transplant* **27**, 2984–2989 (2012).
120. Khan, A. A. *et al.* Peritoneal transplantation of human fetal hepatocytes for the treatment of acute fatty liver of pregnancy: a case report. *Trop Gastroenterol* **25**, 141–143 (2004).
121. Habibullah, C. M., Syed, I. H., Qamar, A. & Taher-Uz, Z. Human fetal hepatocyte transplantation in patients with fulminant hepatic failure. *Transplantation* **58**, 951–952 (1994).
122. 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).
123. Haridass, D. *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* **175**, 1483–1492 (2009).
124. Bird, T. G., Lorenzini, S. & Forbes, S. J. Activation of stem cells in hepatic diseases. *Cell Tissue Res* **331**, 283–300 (2008).
125. Li, J. *et al.* Human hepatic progenitor cells express hematopoietic cell markers CD45 and CD109. *Int J Med Sci* **11**, 65–79 (2014).
126. Yanger, K. *et al.* Adult Hepatocytes Are Generated by Self-Duplication Rather than Stem Cell Differentiation. *Cell Stem Cell* **15**, 340–349 (2014).
127. Tarlow, B. D. *et al.* Bipotential adult liver progenitors are derived from chronically injured mature hepatocytes. *Cell Stem Cell* **15**, 605–618 (2014).
128. Huang, P. *et al.* Direct Reprogramming of Human Fibroblasts to Functional and Expandable Hepatocytes. *Cell Stem Cell* **14**, 370–384 (2014).
129. Du, Y. *et al.* Human Hepatocytes with Drug Metabolic Function Induced from Fibroblasts by Lineage Reprogramming. *Cell Stem Cell* **14**, 394–403 (2014).

130. Kim, J. *et al.* Generation of integration-free induced hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts. *Sci Rep* **5**, (2015).
131. Takahashi, K. *et al.* Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **131**, 861–872 (2007).
132. Jones, C. H., Hill, A., Chen, M. & Pfeifer, B. A. Contemporary Approaches for Nonviral Gene Therapy. *Discovery Medicine* **19**, 447–454 (2015).
133. Thérapie génique. *Inserm* Available at: <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/therapie-genique>. (Accessed: 27th August 2018)
134. Baruteau, J., Waddington, S. N., Alexander, I. E. & Gissen, P. Gene therapy for monogenic liver diseases: clinical successes, current challenges and future prospects. *J Inherit Metab Dis* **40**, 497–517 (2017).
135. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide. Available at: <http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>. (Accessed: 27th August 2018)
136. Fischer, A., Hacein-Bey-Abina, S. & Cavazzana-Calvo, M. Thérapie génique du déficit immunitaire combiné sévère lié à l’X - Efficacité et complications. *Med Sci (Paris)* **20**, 115–117 (2004).
137. Konvalinka, J., Kräusslich, H.-G. & Müller, B. Retroviral proteases and their roles in virion maturation. *Virology* **479–480**, 403–417 (2015).
138. Dufait, I. *et al.* Lentiviral Vectors in Immunotherapy. *Gene Therapy - Tools and Potential Applications* (2013). doi:10.5772/50717
139. Retroviral Vector | Gene Therapy Review. Available at: <http://www.genetherapyreview.com/gene-transfer/retroviral-vector>. (Accessed: 1st October 2018)
140. *The Retroviridae*. (Springer US, 1995).
141. Wayengera, M. On the general theory of the origins of retroviruses. *Theor Biol Med Model* **7**, 5 (2010).
142. Blaese, R. M. *et al.* T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* **270**, 475–480 (1995).
143. Cavazzana-Calvo, M. *et al.* Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **288**, 669–672 (2000).
144. Cavazzana-Calvo, M. & Fischer, A. Gene therapy for severe combined immunodeficiency: are we there yet? *J Clin Invest* **117**, 1456–1465 (2007).
145. Koontz, L. Explanatory chapter: introducing exogenous DNA into cells. *Meth. Enzymol.* **529**, 29–34 (2013).
146. Nguyen, T. H. *et al.* Therapeutic Lentivirus-Mediated Neonatal in Vivo Gene Therapy in Hyperbilirubinemic Gunn Rats. *Molecular Therapy* **12**, 852–859 (2005).
147. Li, M., Yuan, Y., Hu, B. & Wu, L. Study on Lentivirus-Mediated ABCA7 Improves Neurocognitive Function and Related Mechanisms in the C57BL/6 Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *J. Mol. Neurosci.* **61**, 489–497 (2017).
148. Nienhuis, A. W., Dunbar, C. E. & Sorrentino, B. P. Genotoxicity of retroviral integration in hematopoietic cells. *Mol. Ther.* **13**, 1031–1049 (2006).
149. Clar, J. *et al.* Hepatic lentiviral gene transfer prevents the long-term onset of hepatic tumours of glycogen storage disease type 1a in mice. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 2287–2296 (2015).

150. Urbinati, F. *et al.* Potentially therapeutic levels of anti-sickling globin gene expression following lentivirus-mediated gene transfer in sickle cell disease bone marrow CD34+ cells. *Exp. Hematol.* **43**, 346–351 (2015).
151. Cantore, A. *et al.* Liver-Directed Lentiviral Gene Therapy in a Dog Model of Hemophilia B. *Sci Transl Med* **7**, 277ra28 (2015).
152. Schmitt, F. *et al.* Lentiviral Vectors That Express UGT1A1 in Liver and Contain miR-142 Target Sequences Normalize Hyperbilirubinemia in Gunn Rats. *Gastroenterology* **139**, 999-1007.e2 (2010).
153. Birraux, J. *et al.* A Step Toward Liver Gene Therapy: Efficient Correction of the Genetic Defect of Hepatocytes Isolated From a Patient With Crigler-Najjar Syndrome Type 1 With Lentiviral Vectors. *Transplantation* **87**, 1006 (2009).
154. Echevarría, L., Aupy, P. & Goyenvalle, A. Exon-skipping advances for Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* **27**, R163–R172 (2018).
155. He, X. *et al.* Functional repair of p53 mutation in colorectal cancer cells using trans-splicing. *Oncotarget* **6**, 2034–2045 (2015).
156. He, X. *et al.* Trans-splicing repair of mutant p53 suppresses the growth of hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *Sci Rep* **5**, (2015).
157. Tockner, B. *et al.* Construction and validation of an RNA *trans*-splicing molecule suitable to repair a large number of *COL7A1* mutations. *Gene Therapy* **23**, 775–784 (2016).
158. Sinclair, R. G., Jones, E. L. & Gerba, C. P. Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 1769–1780 (2009).
159. Alba, R., Bosch, A. & Chillon, M. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Therapy* **12**, S18–S27 (2005).
160. Pearson, S., Jia, H. & Kandachi, K. China approves first gene therapy. *Nat. Biotechnol.* **22**, 3–4 (2004).
161. Nayak, S. & Herzog, R. W. Progress and Prospects: Immune Responses to Viral Vectors. *Gene Ther* **17**, 295–304 (2010).
162. Daya, S. & Berns, K. I. Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors. *Clin Microbiol Rev* **21**, 583–593 (2008).
163. Hüser, D., Weger, S. & Heilbronn, R. Kinetics and Frequency of Adeno-Associated Virus Site-Specific Integration into Human Chromosome 19 Monitored by Quantitative Real-Time PCR. *J Virol* **76**, 7554–7559 (2002).
164. Kotin, R. M., Linden, R. M. & Berns, K. I. Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *EMBO J* **11**, 5071–5078 (1992).
165. Hollinger, K. & Chamberlain, J. S. Viral vector-mediated gene therapies. *Curr. Opin. Neurol.* **28**, 522–527 (2015).
166. Wierzbicki, A. S. & Viljoen, A. Alipogene tiparvovec: gene therapy for lipoprotein lipase deficiency. *Expert Opin Biol Ther* **13**, 7–10 (2013).
167. Children’s Medical Research Institute. Available at: <http://www.cmri.org.au/>. (Accessed: 28th August 2018)
168. Dasouki, M. *et al.* Pompe Disease: Literature Review and Case Series. *Neurologic Clinics* **32**, 751–776 (2014).

169. Frishberg, Y., Zeharia, A., Lyakhovetsky, R., Bargal, R. & Belostotsky, R. Mutations in HAO1 encoding glycolate oxidase cause isolated glycolic aciduria. *Journal of Medical Genetics* **51**, 526–529 (2014).
170. Martin-Higueras, C., Luis-Lima, S. & Salido, E. Glycolate Oxidase Is a Safe and Efficient Target for Substrate Reduction Therapy in a Mouse Model of Primary Hyperoxaluria Type I. *Mol Ther* **24**, 719–725 (2016).
171. Dutta, C. *et al.* Inhibition of Glycolate Oxidase With Dicer-substrate siRNA Reduces Calcium Oxalate Deposition in a Mouse Model of Primary Hyperoxaluria Type 1. *Mol Ther* **24**, 770–778 (2016).
172. Liebow, A. *et al.* An Investigational RNAi Therapeutic Targeting Glycolate Oxidase Reduces Oxalate Production in Models of Primary Hyperoxaluria. *J Am Soc Nephrol* **28**, 494–503 (2017).
173. Study of ALN-GO1 in Healthy Adult Subjects and Patients With Primary Hyperoxaluria Type 1 - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02706886>. (Accessed: 11th October 2018)
174. An Extension Study of an Investigational Drug, ALN-GO1, in Patients With Primary Hyperoxaluria Type 1 - No Study Results Posted - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT03350451>. (Accessed: 15th August 2018)
175. A Study to Evaluate Lumasiran in Children and Adults With Primary Hyperoxaluria Type 1 - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03681184>. (Accessed: 11th October 2018)
176. Bobbin, M. L. & Rossi, J. J. RNA Interference (RNAi)-Based Therapeutics: Delivering on the Promise? *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **56**, 103–122 (2016).
177. Markert, C. L., Shaklee, J. B. & Whitt, G. S. Evolution of a gene. Multiple genes for LDH isozymes provide a model of the evolution of gene structure, function and regulation. *Science* **189**, 102–114 (1975).
178. Doherty, J. R. & Cleveland, J. L. Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *J. Clin. Invest.* **123**, 3685–3692 (2013).
179. Yoshikuni, K., Tagami, H., Yamada, M., Sudo, K. & Kanno, T. Erythemasquamous Skin Lesions in Hereditary Lactate Dehydrogenase M-Subunit Deficiency. *Arch Dermatol* **122**, 1420–1424 (1986).
180. Takayasu, S., Fujiwara, S. & Waki, T. Hereditary lactate dehydrogenase M-subunit deficiency: Lactate dehydrogenase activity in skin lesions and in hair follicles. *Journal of the American Academy of Dermatology* **24**, 339–342 (1991).
181. Kanno, T. *et al.* Lactate dehydrogenase M-subunit deficiency: a new type of hereditary exertional myopathy. *Clin. Chim. Acta* **173**, 89–98 (1988).
182. Lai, C. *et al.* Specific Inhibition of Hepatic Lactate Dehydrogenase Reduces Oxalate Production in Mouse Models of Primary Hyperoxaluria. *Molecular Therapy* **26**, 1983–1995 (2018).
183. Knight, J., Holmes, R. P., Cramer, S. D., Takayama, T. & Salido, E. Hydroxyproline metabolism in mouse models of primary hyperoxaluria. *Am J Physiol Renal Physiol* **302**, F688–F693 (2012).
184. Study of DCR-PHXC-101 in Normal Healthy Volunteers and Patients With Primary Hyperoxaluria - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03392896>. (Accessed: 11th October 2018)
185. Novel Investigational Drug for PH: DCR-PHXC. *Dicerna Pharmaceuticals* Available at: <http://dicerna.com/pipeline/novel-investigational-drug-ph-dcr-phxc/>. (Accessed: 11th October 2018)

186. Ohashi, T. Enzyme replacement therapy for lysosomal storage diseases. *Pediatr Endocrinol Rev* **10 Suppl 1**, 26–34 (2012).
187. Landis, J. L., Hyland, H., Kindel, S. J., Punnoose, A. & Geddes, G. C. Pompe disease treatment with twice a week high dose alglucoside alfa in a patient with severe dilated cardiomyopathy. *Mol Genet Metab Rep* **16**, 1–4 (2018).
188. Mesa-Torres, N., Tomic, N., Albert, A., Salido, E. & Pey, A. L. Molecular Recognition of PTS-1 Cargo Proteins by Pex5p: Implications for Protein Mistargeting in Primary Hyperoxaluria. *Biomolecules* **5**, 121–141 (2015).
189. Roncador, A. *et al.* Use of polymer conjugates for the intraperoxisomal delivery of engineered human alanine:glyoxylate aminotransferase as a protein therapy for primary hyperoxaluria type I. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **13**, 897–907 (2017).
190. Mesa-Torres, N. *et al.* The consensus-based approach for gene/enzyme replacement therapies and crystallization strategies: the case of human alanine–glyoxylate aminotransferase. *Biochemical Journal* **462**, 453–463 (2014).
191. Hu, J., Liu, J., Yang, D. & Yin, M. L. and J. Physiological Roles of Asialoglycoprotein Receptors (ASGPRs) Variants and Recent Advances in Hepatic-Targeted Delivery of Therapeutic Molecules Via ASGPRs. *Protein & Peptide Letters* (2014). Available at: <http://www.eurekaselect.com/122948/article>. (Accessed: 14th August 2018)
192. Yabe, Y., Nishikawa, M., Tamada, A., Takakura, Y. & Hashida, M. Targeted Delivery and Improved Therapeutic Potential of Catalase by Chemical Modification: Combination with Superoxide Dismutase Derivatives. *J Pharmacol Exp Ther* **289**, 1176–1184 (1999).
193. Terlecky, S. R. & Koepke, J. I. Drug delivery to peroxisomes: Employing unique trafficking mechanisms to target protein therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* **59**, 739–747 (2007).
194. Liou, J.-S. *et al.* Protein transduction in human cells is enhanced by cell-penetrating peptides fused with an endosomolytic HA2 sequence. *Peptides* **37**, 273–284 (2012).
195. Saibil, H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 630–642 (2013).
196. Pey, A. L., Albert, A. & Salido, E. Protein Homeostasis Defects of Alanine-Glyoxylate Aminotransferase: New Therapeutic Strategies in Primary Hyperoxaluria Type I. *Biomed Res Int* **2013**, (2013).
197. Madoux, F. *et al.* Development of a Phenotypic High-Content Assay to Identify Pharmacoperone Drugs for the Treatment of Primary Hyperoxaluria Type 1 by High-Throughput Screening. *ASSAY and Drug Development Technologies* **13**, 16–24 (2015).
198. Hou, S. *et al.* Drug Library Screening for the Identification of Ionophores That Correct the Mistrafficking Disorder Associated with Oxalosis Kidney Disease. *SLAS DISCOVERY: Advancing Life Sciences R&D* **22**, 887–896 (2017).
199. Miyata, N. *et al.* Pharmacologic rescue of an enzyme-trafficking defect in primary hyperoxaluria 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 14406–14411 (2014).
200. Belostotsky, R. *et al.* Translation inhibition corrects aberrant localization of mutant alanine-glyoxylate aminotransferase: possible therapeutic approach for hyperoxaluria. *J Mol Med* **96**, 621–630 (2018).
201. Meriin, A. B. *et al.* A Novel Approach to Recovery of Function of Mutant Proteins by Slowing Down Translation. *J Biol Chem* **287**, 34264–34272 (2012).

202. Allison, M. J., Dawson, K. A., Mayberry, W. R. & Foss, J. G. *Oxalobacter formigenes* gen. nov., sp. nov.: oxalate-degrading anaerobes that inhabit the gastrointestinal tract. *Arch. Microbiol.* **141**, 1–7 (1985).
203. Hatch, M., Gjymishka, A., Salido, E. C., Allison, M. J. & Freel, R. W. Enteric oxalate elimination is induced and oxalate is normalized in a mouse model of primary hyperoxaluria following intestinal colonization with *Oxalobacter*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **300**, G461–G469 (2011).
204. Hatch, M. *et al.* *Oxalobacter* sp. reduces urinary oxalate excretion by promoting enteric oxalate secretion. *Kidney International* **69**, 691–698 (2006).
205. Hatch, M. & Freel, R. W. A Human Strain of *Oxalobacter* (HC-1) Promotes Enteric Oxalate Secretion in the Small Intestine of Mice and Reduces Urinary Oxalate Excretion. *Urolithiasis* **41**, (2013).
206. Stewart, C. S., Duncan, S. H. & Cave, D. R. *Oxalobacter formigenes* and its role in oxalate metabolism in the human gut. *FEMS Microbiology Letters* **230**, 1–7 (2004).
207. Kelly, J. P., Curhan, G. C., Cave, D. R., Anderson, T. E. & Kaufman, D. W. Factors Related to Colonization with *Oxalobacter formigenes* in U.S. Adults. *J Endourol* **25**, 673–679 (2011).
208. Kaufman, D. W. *et al.* *Oxalobacter formigenes* May Reduce the Risk of Calcium Oxalate Kidney Stones. *J Am Soc Nephrol* **19**, 1197–1203 (2008).
209. Siener, R. *et al.* The role of *Oxalobacter formigenes* colonization in calcium oxalate stone disease. *Kidney International* **83**, 1144–1149 (2013).
210. Kwak, C., Kim, H. K., Kim, E. C., Choi, M. S. & Kim, H. H. Urinary Oxalate Levels and the Enteric Bacterium *Oxalobacter formigenes* in Patients with Calcium Oxalate Urolithiasis. *European Urology* **44**, 475–481 (2003).
211. Troxel, S. A., Sidhu, H., Kaul, P. & Low, R. K. Intestinal *Oxalobacter formigenes* Colonization in Calcium Oxalate Stone Formers and Its Relation to Urinary Oxalate. *Journal of Endourology* **17**, 173–176 (2003).
212. Mikami, K. *et al.* Association of absence of intestinal oxalate degrading bacteria with urinary calcium oxalate stone formation. *International Journal of Urology* **10**, 293–296 (2003).
213. Duncan, S. H. *et al.* *Oxalobacter formigenes* and Its Potential Role in Human Health. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3841–3847 (2002).
214. Hoppe, B. *et al.* Efficacy and safety of *Oxalobacter formigenes* to reduce urinary oxalate in primary hyperoxaluria. *Nephrol Dial Transplant* **26**, 3609–3615 (2011).
215. Milliner, D., Hoppe, B. & Groothoff, J. A randomised Phase II/III study to evaluate the efficacy and safety of orally administered *Oxalobacter formigenes* to treat primary hyperoxaluria. *Urolithiasis* **46**, 313–323 (2018).
216. A Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Oxabact in Patients With Primary Hyperoxaluria - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03116685>. (Accessed: 20th August 2018)
217. Just, V. J. *et al.* A Closed Conformation of *Bacillus subtilis* Oxalate Decarboxylase OxdC Provides Evidence for the True Identity of the Active Site. *J. Biol. Chem.* **279**, 19867–19874 (2004).
218. Grujic, D. *et al.* Hyperoxaluria Is Reduced and Nephrocalcinosis Prevented with an Oxalate-Degrading Enzyme in Mice with Hyperoxaluria. *AJN* **29**, 86–93 (2009).
219. Langman, C. B. *et al.* A Double-Blind, Placebo Controlled, Randomized Phase 1 Cross-Over Study with ALLN-177, an Orally Administered Oxalate Degrading Enzyme. *AJN* **44**, 150–158 (2016).

220. Study of ALLN-177 in Patients Aged 12 Years or Older With Enteric or Primary Hyperoxaluria and Hyperoxalemia - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03391804>. (Accessed: 15th August 2018)
221. Reloxaliase | Allena. Available at: <https://www.allenapharma.com/reloxaliase>. (Accessed: 11th October 2018)
222. Waddington, C. H. *The strategy of the genes: a discussion of some aspects of theoretical biology*. (Allen & Unwin, 1957).
223. Gurdon, J. B. The Developmental Capacity of Nuclei taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles. *Development* **10**, 622–640 (1962).
224. Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. & Campbell, K. H. S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385**, 810–813 (1997).
225. Davis, R. L., Weintraub, H. & Lassar, A. B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51**, 987–1000 (1987).
226. Ohnuki, M. & Takahashi, K. Present and future challenges of induced pluripotent stem cells. *Phil. Trans. R. Soc. B* **370**, 20140367 (2015).
227. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
228. Omole, A. E. & Fakoya, A. O. J. Ten years of progress and promise of induced pluripotent stem cells: historical origins, characteristics, mechanisms, limitations, and potential applications. *PeerJ* **6**, (2018).
229. Thomson, J. A. *et al.* Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* **282**, 1145–1147 (1998).
230. Wu, Z. *et al.* Generation of Pig Induced Pluripotent Stem Cells with a Drug-Inducible System. *J Mol Cell Biol* **1**, 46–54 (2009).
231. Liu, H. *et al.* Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Adult Rhesus Monkey Fibroblasts. *Cell Stem Cell* **3**, 587–590 (2008).
232. Aasen, T. *et al.* Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1276–1284 (2008).
233. Aoi, T. *et al.* Generation of Pluripotent Stem Cells from Adult Mouse Liver and Stomach Cells. *Science* **321**, 699–702 (2008).
234. Hanna, J. *et al.* Direct Reprogramming of Terminally Differentiated Mature B Lymphocytes To Pluripotency. *Cell* **133**, 250–264 (2008).
235. Stadtfeld, M., Brennand, K. & Hochedlinger, K. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr. Biol.* **18**, 890–894 (2008).
236. Kim, J. B. *et al.* Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* **454**, 646–650 (2008).
237. Utikal, J., Maherali, N., Kulalert, W. & Hochedlinger, K. Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *J. Cell. Sci.* **122**, 3502–3510 (2009).
238. Sun, N. *et al.* Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 15720–15725 (2009).
239. Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**, 313–317 (2007).
240. Lowry, W. E. *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 2883–2888 (2008).

241. Yu, J. *et al.* Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science* **318**, 1917–1920 (2007).
242. Nichols, J. *et al.* Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* **95**, 379–391 (1998).
243. Masui, S. *et al.* Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 625–635 (2007).
244. Rodda, D. J. *et al.* Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J. Biol. Chem.* **280**, 24731–24737 (2005).
245. Chambers, I. *et al.* Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* **450**, 1230–1234 (2007).
246. Mitsui, K. *et al.* The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* **113**, 631–642 (2003).
247. Dang, D. T., Pevsner, J. & Yang, V. W. The biology of the mammalian Krüppel-like family of transcription factors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**, 1103–1121 (2000).
248. Nakatake, Y. *et al.* Klf4 cooperates with Oct3/4 and Sox2 to activate the Lefty1 core promoter in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 7772–7782 (2006).
249. Dang, C. V. *et al.* The c-Myc target gene network. *Semin. Cancer Biol.* **16**, 253–264 (2006).
250. Lemaitre, J. M., Buckle, R. S. & Méchali, M. c-Myc in the control of cell proliferation and embryonic development. *Adv. Cancer Res.* **70**, 95–144 (1996).
251. Wang, Y. *et al.* Endogenous miRNA sponge lincRNA-RoR regulates Oct4, Nanog, and Sox2 in human embryonic stem cell self-renewal. *Dev. Cell* **25**, 69–80 (2013).
252. Loewer, S. *et al.* Large intergenic non-coding RNA-RoR modulates reprogramming of human induced pluripotent stem cells. *Nat. Genet.* **42**, 1113–1117 (2010).
253. Worringer, K. A. *et al.* The let-7/LIN-41 Pathway Regulates Reprogramming to Human Induced Pluripotent Stem Cells by Controlling Expression of Prodifferentiation Genes. *Cell Stem Cell* **14**, 40–52 (2014).
254. Anokye-Danso, F. *et al.* Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* **8**, 376–388 (2011).
255. Hong, H. *et al.* Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* **460**, 1132–1135 (2009).
256. Banito, A. *et al.* Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes Dev.* **23**, 2134–2139 (2009).
257. Edel, M. J. *et al.* Rem2 GTPase maintains survival of human embryonic stem cells as well as enhancing reprogramming by regulating p53 and cyclin D1. *Genes Dev.* **24**, 561–573 (2010).
258. Mali, P. *et al.* Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. *Stem Cells* **26**, 1998–2005 (2008).
259. Lapasset, L. *et al.* Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes Dev* **25**, 2248–2253 (2011).
260. Shi, Y. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell* **3**, 568–574 (2008).
261. Huangfu, D. *et al.* Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat. Biotechnol.* **26**, 795–797 (2008).
262. Chung, T.-L. *et al.* Vitamin C promotes widespread yet specific DNA demethylation of the epigenome in human embryonic stem cells. *Stem Cells* **28**, 1848–1855 (2010).

263. Wang, T. *et al.* The histone demethylases Jhdm1a/1b enhance somatic cell reprogramming in a vitamin-C-dependent manner. *Cell Stem Cell* **9**, 575–587 (2011).
264. Huangfu, D. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1269–1275 (2008).
265. Blelloch, R., Venere, M., Yen, J. & Ramalho-Santos, M. Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. *Cell Stem Cell* **1**, 245–247 (2007).
266. Nakagawa, M. *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* **26**, 101–106 (2008).
267. Rodríguez-Pizà, I. *et al.* Reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells under xeno-free conditions. *Stem Cells* **28**, 36–44 (2010).
268. Carey, B. W. *et al.* Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 157–162 (2009).
269. Sommer, C. A. *et al.* Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells* **27**, 543–549 (2009).
270. Soldner, F. *et al.* Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* **136**, 964–977 (2009).
271. Maherali, N. *et al.* A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **3**, 340–345 (2008).
272. Staerk, J. *et al.* Reprogramming of peripheral blood cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **7**, 20–24 (2010).
273. Bernal, J. A. RNA-Based Tools for Nuclear Reprogramming and Lineage-Conversion: Towards Clinical Applications. *J Cardiovasc Transl Res* **6**, 956–968 (2013).
274. Woltjen, K. *et al.* piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* **458**, 766–770 (2009).
275. Kaji, K. *et al.* Virus free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* **458**, 771–775 (2009).
276. Ivics, Z., Hackett, P. B., Plasterk, R. H. & Izsvák, Z. Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell* **91**, 501–510 (1997).
277. Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G. & Hochedlinger, K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* **322**, 945–949 (2008).
278. Zhou, W. & Freed, C. R. Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* **27**, 2667–2674 (2009).
279. Masaki, I. *et al.* Recombinant Sendai virus-mediated gene transfer to vasculature: a new class of efficient gene transfer vector to the vascular system. *FASEB J.* **15**, 1294–1296 (2001).
280. Yonemitsu, Y. *et al.* Efficient gene transfer to airway epithelium using recombinant Sendai virus. *Nat. Biotechnol.* **18**, 970–973 (2000).
281. Murakami, Y. *et al.* Newly-developed Sendai virus vector for retinal gene transfer: reduction of innate immune response via deletion of all envelope-related genes. *J Gene Med* **10**, 165–176 (2008).
282. Nishimura, K. *et al.* Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. *J. Biol. Chem.* **286**, 4760–4771 (2011).
283. Li, H.-O. *et al.* A Cytoplasmic RNA Vector Derived from Nontransmissible Sendai Virus with Efficient Gene Transfer and Expression. *J Virol* **74**, 6564–6569 (2000).

284. Lamb, R. A. & Kolakofsky, D. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. in *Fields virology*. 1177–1204 (Fields BN, Knipe D M, Howley P M, 1996).
285. Inoue, M. *et al.* Nontransmissible virus-like particle formation by F-deficient sendai virus is temperature sensitive and reduced by mutations in M and HN proteins. *J. Virol.* **77**, 3238–3246 (2003).
286. 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).
287. Nishishita, N., Takenaka, C., Fusaki, N. & Kawamata, S. Generation of human induced pluripotent stem cells from cord blood cells. *J Stem Cells* **6**, 101–108 (2011).
288. Seki, T., Yuasa, S. & Fukuda, K. Generation of induced pluripotent stem cells from a small amount of human peripheral blood using a combination of activated T cells and Sendai virus. *Nat Protoc* **7**, 718–728 (2012).
289. Seki, T. *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell* **7**, 11–14 (2010).
290. 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).
291. Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* **322**, 949–953 (2008).
292. Yu, J. *et al.* Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* **324**, 797–801 (2009).
293. Jia, F. *et al.* A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat. Methods* **7**, 197–199 (2010).
294. Narsinh, K. H. *et al.* Generation of adult human induced pluripotent stem cells using nonviral minicircle DNA vectors. *Nat Protoc* **6**, 78–88 (2011).
295. Roitsch, T. & Lehle, L. Requirements for efficient in vitro transcription and translation: a study using yeast invertase as a probe. *Biochim. Biophys. Acta* **1009**, 19–26 (1989).
296. Grudzien-Nogalska, E. *et al.* Synthetic mRNAs with superior translation and stability properties. *Methods Mol. Biol.* **969**, 55–72 (2013).
297. Jemielity, J. *et al.* Novel ‘anti-reverse’ cap analogs with superior translational properties. *RNA* **9**, 1108–1122 (2003).
298. Karikó, K. *et al.* Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol. Ther.* **16**, 1833–1840 (2008).
299. Karikó, K., Buckstein, M., Ni, H. & Weissman, D. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity* **23**, 165–175 (2005).
300. Hornung, V. *et al.* 5′-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**, 994–997 (2006).
301. Warren, L. *et al.* Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* **7**, 618–630 (2010).
302. Mandal, P. K. & Rossi, D. J. Reprogramming human fibroblasts to pluripotency using modified mRNA. *Nat Protoc* **8**, 568–582 (2013).
303. Warren, L., Ni, Y., Wang, J. & Guo, X. Feeder-Free Derivation of Human Induced Pluripotent Stem Cells with Messenger RNA. *Sci Rep* **2**, (2012).

304. Zhou, H. *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* **4**, 381–384 (2009).
305. Kim, D. *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* **4**, 472–476 (2009).
306. Hongisto, H. *et al.* Laminin-511 expression is associated with the functionality of feeder cells in human embryonic stem cell culture. *Stem Cell Research* **8**, 97–108 (2012).
307. Eiselleova, L. *et al.* Comparative study of mouse and human feeder cells for human embryonic stem cells. *Int. J. Dev. Biol.* **52**, 353–363 (2008).
308. Rottem, S. & Barile, M. F. Beware of mycoplasmas. *Trends Biotechnol.* **11**, 143–151 (1993).
309. Stacey, G. N. *et al.* The development of ‘feeder’ cells for the preparation of clinical grade hES cell lines: challenges and solutions. *J. Biotechnol.* **125**, 583–588 (2006).
310. Villa-Diaz, L. G., Ross, A. M., Lahann, J. & Krebsbach, P. H. The evolution of human pluripotent stem cell culture: from feeder cells to synthetic coatings. *Stem Cells* **31**, 1–7 (2013).
311. 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).
312. Kleinman, H. K. *et al.* Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* **21**, 6188–6193 (1982).
313. Nagaoka, M., Si-Tayeb, K., Akaike, T. & Duncan, S. A. Culture of human pluripotent stem cells using completely defined conditions on a recombinant E-cadherin substratum. *BMC Dev. Biol.* **10**, 60 (2010).
314. Chen, G. *et al.* Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat. Methods* **8**, 424–429 (2011).
315. Brafman, D. A. *et al.* Long-term human pluripotent stem cell self-renewal on synthetic polymer surfaces. *Biomaterials* **31**, 9135–9144 (2010).
316. Villa-Diaz, L. G. *et al.* Derivation of mesenchymal stem cells from human induced pluripotent stem cells cultured on synthetic substrates. *Stem Cells* **30**, 1174–1181 (2012).
317. Bergström, R., Ström, S., Holm, F., Feki, A. & Hovatta, O. Xeno-free culture of human pluripotent stem cells. *Methods Mol. Biol.* **767**, 125–136 (2011).
318. Boreström, C. *et al.* Footprint-Free Human Induced Pluripotent Stem Cells From Articular Cartilage With Redifferentiation Capacity: A First Step Toward a Clinical-Grade Cell Source. *Stem Cells Transl Med* **3**, 433–447 (2014).
319. Asplund, A. *et al.* One Standardized Differentiation Procedure Robustly Generates Homogenous Hepatocyte Cultures Displaying Metabolic Diversity from a Large Panel of Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rev and Rep* **12**, 90–104 (2016).
320. iPSC Nantes - Plate-forme de cellules souches pluripotentes | Biogenouest. Available at: <https://www.biogenouest.org/iPSC>. (Accessed: 7th September 2018)
321. SAFE-iPS - CHU de Montpellier. Available at: <http://www.chu-montpellier.fr/fr/chercheurs/plateformes/les-plateformes-recherche/safe-ips/>. (Accessed: 7th September 2018)
322. 12 plateformes technologiques. Available at: <http://www.institutimagine.org/fr/la-recherche/8-plateformes-technologiques/148-ips-platform.html>. (Accessed: 7th September 2018)
323. Ilic, D., Devito, L., Miere, C. & Codognotto, S. Human embryonic and induced pluripotent stem cells in clinical trials. *Br Med Bull* **116**, 19–27 (2015).

324. Cellules souches : un nouvel essai chez l'homme. Available at: <https://www.larecherche.fr/biologie-médecine/cellules-souches-un-nouvel-essai-chez-l'homme>. (Accessed: 10th October 2018)
325. Normile Jul. 30, D., 2018 & Pm, 3:35. First-of-its-kind clinical trial will use reprogrammed adult stem cells to treat Parkinson's. *Science / AAAS* (2018). Available at: <http://www.sciencemag.org/news/2018/07/first-its-kind-clinical-trial-will-use-reprogrammed-adult-stem-cells-treat-parkinson-s>. (Accessed: 15th September 2018)
326. Knoepfler, P. Japan conditionally approves new IPS cell-based heart study. *The Niche* (2018). Available at: <https://ipscell.com/2018/05/japan-conditionally-approves-new-ips-cell-based-heart-study/>. (Accessed: 15th September 2018)
327. Irion, S., Nostro, M. C., Kattman, S. J. & Keller, G. M. Directed differentiation of pluripotent stem cells: from developmental biology to therapeutic applications. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **73**, 101–110 (2008).
328. Han, S. *et al.* Generation of functional hepatic cells from pluripotent stem cells. *J Stem Cell Res Ther Suppl* **10**, 1–7 (2012).
329. Hannan, N. R. ., Segeritz, C.-P., Touboul, T. & Vallier, L. Production of hepatocyte like cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* **8**, 430–437 (2013).
330. 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).
331. Norrman, K., Strömbeck, A., Semb, H. & Ståhlberg, A. Distinct gene expression signatures in human embryonic stem cells differentiated towards definitive endoderm at single-cell level. *Methods* **59**, 59–70 (2013).
332. 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).
333. Schmidt, C. *et al.* Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* **373**, 699–702 (1995).
334. 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).
335. Gualdi, R. *et al.* Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control. *Genes Dev.* **10**, 1670–1682 (1996).
336. 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).
337. Mallanna, S. K. & Duncan, S. A. Differentiation of hepatocytes from pluripotent stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol* **26**, 1G.4.1-1G.4.13 (2013).
338. Si-Tayeb, K. *et al.* Highly Efficient Generation of Human Hepatocyte-like Cells from Induced Pluripotent Stem Cells. *Hepatology* **51**, 297–305 (2010).
339. Takebe, T. *et al.* Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* **499**, 481–484 (2013).
340. Sullivan, G. J. *et al.* Generation of functional human hepatic endoderm from human induced pluripotent stem cells. *Hepatology* **51**, 329–335 (2010).
341. 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).
342. Takayama, K. *et al.* 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials* **34**, 1781–1789 (2013).

343. Asgari, S. *et al.* Induced pluripotent stem cells: a new era for hepatology. *J. Hepatol.* **53**, 738–751 (2010).
344. Rowland, T. J. *et al.* Roles of integrins in human induced pluripotent stem cell growth on Matrigel and vitronectin. *Stem Cells Dev.* **19**, 1231–1240 (2010).
345. Schwartz, R. E., Fleming, H. E., Khetani, S. R. & Bhatia, S. N. Pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells. *Biotechnol. Adv.* **32**, 504–513 (2014).
346. Roy-Chowdhury, N., Wang, X., Guha, C. & Roy-Chowdhury, J. Hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells. *Hepatol Int* **11**, 54–69 (2017).
347. Ware, B. R., Berger, D. R. & Khetani, S. R. Prediction of Drug-Induced Liver Injury in Micropatterned Co-cultures Containing iPSC-Derived Human Hepatocytes. *Toxicol. Sci.* **145**, 252–262 (2015).
348. Holmgren, G. *et al.* Long-term chronic toxicity testing using human pluripotent stem cell-derived hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* **42**, 1401–1406 (2014).
349. Takayama, K. *et al.* Prediction of interindividual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPSC-derived hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 16772–16777 (2014).
350. Choi, S. M. *et al.* Efficient drug screening and gene correction for treating liver disease using patient-specific stem cells. *Hepatology* **57**, 2458–2468 (2013).
351. Strittmatter, S. M. Old drugs learn new tricks. *Nat Med* **20**, 590–591 (2014).
352. Cayo, M. A. *et al.* A drug screen using human iPSC-derived hepatocyte-like cells identifies cardiac glycosides as a potential treatment for hypercholesterolemia. *Cell Stem Cell* **20**, 478–489.e5 (2017).
353. Tafaleng, E. N. *et al.* Induced pluripotent stem cells model personalized variations in liver disease resulting from α 1-antitrypsin deficiency. *Hepatology* **62**, 147–157 (2015).
354. Peyrard, T. *et al.* Banking of pluripotent adult stem cells as an unlimited source for red blood cell production: potential applications for alloimmunized patients and rare blood challenges. *Transfus Med Rev* **25**, 206–216 (2011).
355. Turner, M. *et al.* Toward the Development of a Global Induced Pluripotent Stem Cell Library. *Cell Stem Cell* **13**, 382–384 (2013).
356. Roy-Chowdhury, N., Wang, X., Guha, C. & Roy-Chowdhury, J. Hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells. *Hepatol Int* **11**, 54–69 (2017).
357. Chen, Y. *et al.* Amelioration of Hyperbilirubinemia in Gunn Rats after Transplantation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatocytes. *Stem Cell Reports* **5**, 22–30 (2015).
358. 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).
359. Yusa, K. *et al.* Targeted gene correction of α 1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature* **478**, 391–394 (2011).
360. Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A. & Gorbunova, V. DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle* **7**, 2902–2906 (2008).
361. Lemarchandel, V. & Montagutelli, X. La recombinaison homologue : de nouvelles perspectives pour la transgénèse chez les mammifères. *M/S. Médecine sciences [revue papier, ISSN : 0767-0974], 1990, Vol. 6, N° 1; p.18-29 (1990). doi:10.4267/10608/4058*

362. Doetschman, T. *et al.* Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* **330**, 576–578 (1987).
363. Donoho, G., Jasin, M. & Berg, P. Analysis of gene targeting and intrachromosomal homologous recombination stimulated by genomic double-strand breaks in mouse embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 4070–4078 (1998).
364. Porteus, M. H. & Baltimore, D. Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. *Science* **300**, 763 (2003).
365. Symington, L. S. & Gautier, J. Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu. Rev. Genet.* **45**, 247–271 (2011).
366. 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).
367. Chevalier, B. S. *et al.* Design, activity, and structure of a highly specific artificial endonuclease. *Mol. Cell* **10**, 895–905 (2002).
368. Connelly, J. P., Barker, J. C., Pruett-Miller, S. & Porteus, M. H. Gene correction by homologous recombination with zinc finger nucleases in primary cells from a mouse model of a generic recessive genetic disease. *Mol. Ther.* **18**, 1103–1110 (2010).
369. Tebas, P. *et al.* Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N. Engl. J. Med.* **370**, 901–910 (2014).
370. Mussolino, C., Mlambo, T. & Cathomen, T. Proven and novel strategies for efficient editing of the human genome. *Curr Opin Pharmacol* **24**, 105–112 (2015).
371. Mussolino, C. & Cathomen, T. TALE nucleases: tailored genome engineering made easy. *Curr. Opin. Biotechnol.* **23**, 644–650 (2012).
372. FDA Grants Collectis IND Approval for UCART22 in B-ALL | Collectis. Available at: <http://www.collectis.com/en/press/fda-grants-collectis-ind-approval-for-ucart22-in-b-all>. (Accessed: 19th September 2018)
373. Cermak, T. *et al.* Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res.* **39**, e82 (2011).
374. Fineran, P. C. & Charpentier, E. Memory of viral infections by CRISPR-Cas adaptive immune systems: Acquisition of new information. *Virology* **434**, 202–209 (2012).
375. Horvath, P. & Barrangou, R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* **327**, 167–170 (2010).
376. Jinek, M. *et al.* A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* **337**, 816–821 (2012).
377. Pu, J., Frescas, D., Zhang, B. & Feng, J. Utilization of TALEN and CRISPR/Cas9 technologies for gene targeting and modification. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **240**, 1065–1070 (2015).
378. Haft, D. H., Selengut, J., Mongodin, E. F. & Nelson, K. E. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput. Biol.* **1**, e60 (2005).
379. Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A. & Jinek, M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature* **513**, 569–573 (2014).
380. 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).
381. Ran, F. A. *et al.* Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* **154**, 1380–1389 (2013).

382. Xu, S. & Gupta, Y. K. Natural zinc ribbon HNH endonucleases and engineered zinc finger nicking endonuclease. *Nucleic Acids Res.* **41**, 378–390 (2013).
383. Shah, R., Cosstick, R. & West, S. C. The RuvC protein dimer resolves Holliday junctions by a dual incision mechanism that involves base-specific contacts. *EMBO J.* **16**, 1464–1472 (1997).
384. Reis, A., Hornblower, B., Robb, B. & Tzertzinis, G. CRISPR/Cas9 & Targeted Genome Editing: New Era in Molecular Biology. (2014).
385. Fu, Y. *et al.* High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat. Biotechnol.* **31**, 822–826 (2013).
386. Shen, B. *et al.* Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat. Methods* **11**, 399–402 (2014).
387. Sander, J. D. & Joung, J. K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat. Biotechnol.* **32**, 347–355 (2014).
388. NY-ESO-1-redirected CRISPR (TCRendo and PD1) Edited T Cells (NYCE T Cells) - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03399448>. (Accessed: 26th September 2018)
389. Study of CRISPR-Cas9 Mediated PD-1 and TCR Gene-knocked Out Mesothelin-directed CAR-T Cells in Patients With Mesothelin Positive Multiple Solid Tumors. - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03545815>. (Accessed: 26th September 2018)
390. A Safety and Efficacy Study Evaluating CTX001 in Subjects With Transfusion-Dependent β -Thalassemia - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03655678>. (Accessed: 26th September 2018)
391. Seidah, N. G., Awan, Z., Chrétien, M. & Mbikay, M. PCSK9: a key modulator of cardiovascular health. *Circ. Res.* **114**, 1022–1036 (2014).
392. Wang, X. *et al.* CRISPR-Cas9 Targeting of PCSK9 in Human Hepatocytes In Vivo-Brief Report. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **36**, 783–786 (2016).
393. Ran, F. A. *et al.* In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* **520**, 186–191 (2015).
394. Ibraheim, R. *et al.* All-in-one adeno-associated virus delivery and genome editing by *Neisseria meningitidis* Cas9 in vivo. *Genome Biol.* **19**, 137 (2018).
395. Jarrett, K. E. *et al.* Somatic genome editing with CRISPR/Cas9 generates and corrects a metabolic disease. *Sci Rep* **7**, 44624 (2017).
396. Zhang, L. *et al.* Efficient liver repopulation of transplanted hepatocyte prevents cirrhosis in a rat model of hereditary tyrosinemia type I. *Sci Rep* **6**, 31460 (2016).
397. Pankowicz, F. P. *et al.* Reprogramming metabolic pathways in vivo with CRISPR/Cas9 genome editing to treat hereditary tyrosinaemia. *Nat Commun* **7**, 12642 (2016).
398. Papapetrou, E. P. & Schambach, A. Gene Insertion Into Genomic Safe Harbors for Human Gene Therapy. *Mol Ther* **24**, 678–684 (2016).
399. DeKolver, R. C. *et al.* Functional genomics, proteomics, and regulatory DNA analysis in isogenic settings using zinc finger nuclease-driven transgenesis into a safe harbor locus in the human genome. *Genome Res* **20**, 1133–1142 (2010).
400. Ogata, T., Kozuka, T. & Kanda, T. Identification of an insulator in AAVS1, a preferred region for integration of adeno-associated virus DNA. *J. Virol.* **77**, 9000–9007 (2003).
401. Oceguera-Yanez, F. *et al.* Engineering the AAVS1 locus for consistent and scalable transgene expression in human iPSCs and their differentiated derivatives. *Methods* **101**, 43–55 (2016).

402. Lyu, C. *et al.* Targeted genome engineering in human induced pluripotent stem cells from patients with hemophilia B using the CRISPR-Cas9 system. *Stem Cell Res Ther* **9**, (2018).
403. 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).
404. Guan, Y. *et al.* CRISPR/Cas9-mediated somatic correction of a novel coagulator factor IX gene mutation ameliorates hemophilia in mouse. *EMBO Mol Med* **8**, 477–488 (2016).
405. Yin, H. *et al.* Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat. Biotechnol.* **32**, 551–553 (2014).
406. 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).
407. Omer, L. *et al.* CRISPR correction of a homozygous low-density lipoprotein receptor mutation in familial hypercholesterolemia induced pluripotent stem cells. *Hepatol Commun* **1**, 886–898 (2017).
408. Zapata-Linares, N. *et al.* Generation and characterization of human iPSC lines derived from a Primary Hyperoxaluria Type I patient with p.I244T mutation. *Stem Cell Research* **16**, 116–119 (2016).
409. Montague, T. G., Cruz, J. M., Gagnon, J. A., Church, G. M. & Valen, E. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Res.* **42**, W401–407 (2014).
410. Flynn, R. *et al.* CRISPR-mediated genotypic and phenotypic correction of a chronic granulomatous disease mutation in human iPSCs. *Exp Hematol* **43**, 838–848.e3 (2015).
411. Liang, X., Potter, J., Kumar, S., Ravinder, N. & Chesnut, J. D. Enhanced CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing by improved design and delivery of gRNA, Cas9 nuclease, and donor DNA. *Journal of Biotechnology* **241**, 136–146 (2017).
412. Chen, K. G., Mallon, B. S., McKay, R. D. G. & Robey, P. G. Human pluripotent stem cell culture: considerations for maintenance, expansion, and therapeutics. *Cell Stem Cell* **14**, 13–26 (2014).
413. Kraehenbuehl, T. P., Langer, R. & Ferreira, L. S. Three-dimensional biomaterials for the study of human pluripotent stem cells. *Nat. Methods* **8**, 731–736 (2011).
414. Amit, M. *et al.* Suspension culture of undifferentiated human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev* **6**, 248–259 (2010).
415. Vosough, M. *et al.* Generation of functional hepatocyte-like cells from human pluripotent stem cells in a scalable suspension culture. *Stem Cells Dev.* **22**, 2693–2705 (2013).
416. Weissbein, U., Benvenisty, N. & Ben-David, U. Genome maintenance in pluripotent stem cells. *J Cell Biol* **204**, 153–163 (2014).
417. Weissbein, U., Plotnik, O., Vershkov, D. & Benvenisty, N. Culture-induced recurrent epigenetic aberrations in human pluripotent stem cells. *PLoS Genet* **13**, (2017).
418. Nishino, K. *et al.* Defining hypo-methylated regions of stem cell-specific promoters in human iPSCs derived from extra-embryonic amnions and lung fibroblasts. *PLoS ONE* **5**, e13017 (2010).
419. Bolukbasi, M. F., Gupta, A. & Wolfe, S. A. Creating and evaluating accurate CRISPR-Cas9 scalpels for genomic surgery. *Nature Methods* **13**, 41–50 (2016).
420. Josephs, E. A. *et al.* Structure and specificity of the RNA-guided endonuclease Cas9 during DNA interrogation, target binding and cleavage. *Nucleic Acids Res* **43**, 8924–8941 (2015).
421. Ramakrishna, S. *et al.* Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome Res.* **24**, 1020–1027 (2014).

422. Kim, S., Kim, D., Cho, S. W., Kim, J. & Kim, J.-S. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res.* **24**, 1012–1019 (2014).
423. Slaymaker, I. M. *et al.* Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science* **351**, 84–88 (2016).
424. Daer, R., Barrett, C. & Haynes, K. Enhancing Cas9 Activity in Heterochromatin. *bioRxiv* 228601 (2017). doi:10.1101/228601
425. Daer, R. M., Cutts, J. P., Brafman, D. A. & Haynes, K. A. The Impact of Chromatin Dynamics on Cas9-Mediated Genome Editing in Human Cells. *ACS Synth Biol* **6**, 428–438 (2017).
426. Tiricz, H. *et al.* Relaxed chromatin induced by histone deacetylase inhibitors improves the oligonucleotide-directed gene editing in plant cells. *J. Plant Res.* **131**, 179–189 (2018).
427. Vartak, S. V. & Raghavan, S. C. Inhibition of nonhomologous end joining to increase the specificity of CRISPR/Cas9 genome editing. *FEBS J.* **282**, 4289–4294 (2015).
428. Robert, F., Barbeau, M., Éthier, S., Dostie, J. & Pelletier, J. Pharmacological inhibition of DNA-PK stimulates Cas9-mediated genome editing. *Genome Med* **7**, (2015).
429. Maruyama, T. *et al.* Inhibition of non-homologous end joining increases the efficiency of CRISPR/Cas9-mediated precise [TM: inserted] genome editing. *Nat Biotechnol* **33**, 538–542 (2015).
430. Chu, V. T. *et al.* Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nature Biotechnology* **33**, 543–548 (2015).
431. Renaud, J.-B. *et al.* Improved Genome Editing Efficiency and Flexibility Using Modified Oligonucleotides with TALEN and CRISPR-Cas9 Nucleases. *Cell Reports* **14**, 2263–2272 (2016).
432. Avior, Y. *et al.* Microbial-derived lithocholic acid and vitamin K2 drive the metabolic maturation of pluripotent stem cells-derived and fetal hepatocytes. *Hepatology* **62**, 265–278 (2015).
433. Wang, Y.-M., Chai, S. C., Brewer, C. T. & Chen, T. Pregnane X receptor and drug-induced liver injury. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **10**, 1521–1532 (2014).
434. Takayama, K. *et al.* Efficient and directive generation of two distinct endoderm lineages from human ESCs and iPSCs by differentiation stage-specific SOX17 transduction. *PLoS ONE* **6**, e21780 (2011).
435. Takayama, K. *et al.* Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4 α transduction. *Mol. Ther.* **20**, 127–137 (2012).
436. Meier, F. *et al.* Hepatic differentiation of human iPSCs in different 3D models: A comparative study. *Int J Mol Med* **40**, 1759–1771 (2017).
437. Gieseck III, R. L. *et al.* Maturation of Induced Pluripotent Stem Cell Derived Hepatocytes by 3D-Culture. *PLoS One* **9**, (2014).
438. Stevens, K. *et al.* InVERT molding for scalable control of tissue microarchitecture. *Nat Commun* **4**, 1847 (2013).
439. Kehtari, M., Zeynali, B., Soleimani, M., Kabiri, M. & Seyedjafari, E. Fabrication of a co-culture micro-bioreactor device for efficient hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* **0**, 1–10 (2018).
440. Yamashita, T., Takayama, K., Sakurai, F. & Mizuguchi, H. Billion-scale production of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **496**, 1269–1275 (2018).

441. Jaramillo, M., Yeh, H., Yarmush, M. L. & Uygun, B. E. Decellularized human liver extracellular matrix (hDLM)-mediated hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells (iPSCs). *J Tissue Eng Regen Med* **12**, e1962–e1973 (2018).
442. Wang, B. *et al.* Functional Maturation of Induced Pluripotent Stem Cell Hepatocytes in Extracellular Matrix—A Comparative Analysis of Bioartificial Liver Microenvironments. *Stem Cells Transl Med* **5**, 1257–1267 (2016).
443. Takebe, T. *et al.* Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nat Protoc* **9**, 396–409 (2014).
444. Nie, Y.-Z. *et al.* Recapitulation of hepatitis B virus–host interactions in liver organoids from human induced pluripotent stem cells. *EBioMedicine* **0**, (2018).
445. Ng, S. S. *et al.* Human iPSC derived progenitors bioengineered into liver organoids using an inverted colloidal crystal poly (ethylene glycol) scaffold. *Biomaterials* **182**, 299–311 (2018).
446. Viswanathan, P., Kapoor, S., Kumaran, V., Joseph, B. & Gupta, S. Etanercept blocks inflammatory responses orchestrated by TNF- α to promote transplanted cell engraftment and proliferation in rat liver. *Hepatology* **60**, 1378–1388 (2014).
447. Bahde, R., Kapoor, S., Viswanathan, P., Spiegel, H.-U. & Gupta, S. Endothelin-1 receptor A blocker darusentan decreased hepatic changes and improved liver repopulation after cell transplantation in rats. *Hepatology* **59**, 1107–1117 (2014).
448. Enami, Y. *et al.* Hepatic stellate cells promote hepatocyte engraftment in rat liver after prostaglandin-endoperoxide synthase inhibition. *Gastroenterology* **136**, 2356–2364 (2009).
449. Kumaran, V., Joseph, B., Benten, D. & Gupta, S. Integrin and Extracellular Matrix Interactions Regulate Engraftment of Transplanted Hepatocytes in the Rat Liver. *Gastroenterology* **129**, 1643–1653 (2005).
450. Koenig, S. *et al.* Regional Transient Portal Ischemia and Irradiation as Preparative Regimen for Hepatocyte Transplantation. *Cell Transplant* **20**, 303–312 (2011).
451. Wu, Y.-M., Joseph, B., Berishvili, E., Kumaran, V. & Gupta, S. Hepatocyte transplantation and drug-induced perturbations in liver cell compartments. *Hepatology* **47**, 279–287 (2008).
452. Karnezis, A. N., Dorokhov, M., Grompe, M. & Zhu, L. Loss of p27Kip1 enhances the transplantation efficiency of hepatocytes transferred into diseased livers. *J Clin Invest* **108**, 383–390 (2001).
453. Yimlamai, D. *et al.* Hippo Pathway Activity Influences Liver Cell Fate. *Cell* **157**, 1324–1338 (2014).
454. 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).
455. Dagher, I. *et al.* Efficient hepatocyte engraftment and long-term transgene expression after reversible portal embolization in nonhuman primates. *Hepatology* **49**, 950–959 (2009).

**COMMUNICATIONS
SCIENTIFIQUES
ET
FORMATIONS**

Publications scientifiques

Blouin JM, Bernardo-Seisdedos, Sasso E, **Esteve J**, Ged C, Lalanne M, Sanz-Parra A, Urquiza P, de Verneuil H, Millet O, Richard E; Missense UROS mutations causing congenital erythropoietic porphyria reduce UROS homeostasis that can be rescued by proteasome inhibition.; *Hum Mol Genet.* 2017 Apr 15;26(8):1565-1576.

Estève J, Blouin JM, Lalanne M, Azzi-Martin L, Dubus P, Bidet A, Harambat J, Llanas B, Moranvillier I, Bedel A, Moreau-Gaudry F, Richard E; AGXT expression rescue in hepatocyte-like cells derived from Primary Hyperoxaluria type 1 induced pluripotent stem cells using liver-specific lentiviral vector.; *Stem Cell Res* Soumis 2018.

Estève J, Blouin JM, Lalanne M, Azzi-Martin L, Dubus P, Bidet A, Harambat J, Llanas B, Moranvillier I, Bedel A, Moreau-Gaudry F, Richard E; Targeted gene therapy in human induced pluripotent stem cells from a patient with primary hyperoxaluria type 1 using the CRISPR/Cas9 technology.; *BBRC* en préparation.

Communication orale

Estève J, Blouin JM, Lalanne M, Azzi-Martin L, Dubus P, Bidet A, Harambat J, Llanas B, Moranvillier I, Bedel A, Moreau-Gaudry F, Richard E; Gene therapy for phenotypic correction of Primary Hyperoxaluria type 1; Journée Scientifique de l'École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé; 04/18/2018, Bordeaux, France.

Poster

Estève J, Blouin JM, Lalanne M, Guyonnet-Dupérat V, Dubus P, Bidet A, Rousseau B, Pitard V, Llanas B, Harambat J, de Verneuil H, Richard E; Targeted gene editing for phenotypic correction of Primary Hyperoxaluria type 1; 25th Anniversary Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy; 17-20 October 2017, Berlin, Germany.

Congrès et formations

25th Anniversary Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy; 17-20 October 2017, Berlin, Germany.

INGESTEM (Infrastructure nationale d'ingénierie des cellules souches pluripotentes) Congress 2015; 19-20 November 2015, Paris, France.

Formation "De la recherche d'emploi à l'élaboration des lettres de motivation" (Université de Bordeaux); 05/10/2016, Bordeaux, France.

Formation “Concevoir une stratégie de veille : collecter, classer, sauvegarder et diffuser ses données” (Urfist); 03/31/2016-04/01/2016, Bordeaux, France.

Formation “Du diagnostic des traces numériques à l'élaboration d'une stratégie de présence” (Urfist); 03/07/2016, Bordeaux, France.

Formation “From research to communication” (Université de Bordeaux); 08-09 February 2016, Bordeaux, France.

Formation “L'industrie pharmaceutique : perspectives pour les jeunes chercheurs” (BrainEducation); 03-04 November 2015, Gradignan, France.