



Génération de progéniteurs hépatiques dérivés de cellules souches : application à l'hypercholestérolémie familiale

Sébastien Corbineau

► To cite this version:

Sébastien Corbineau. Génération de progéniteurs hépatiques dérivés de cellules souches : application à l'hypercholestérolémie familiale. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA114821 . tel-00684386

HAL Id: tel-00684386

<https://theses.hal.science/tel-00684386>

Submitted on 2 Apr 2012

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

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



UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

DISCIPLINE :

PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

ANNÉE 2010 - 2011

SÉRIE DOCTORAT N° 1126

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 05/10/2011

par

Sébastien CORBINEAU

Génération de progéniteurs hépatiques dérivés de cellules
souches : application à l'hypercholestérolémie familiale

Directeur de thèse : Anne WEBER Docteur (Le Kremlin-Bicêtre)

Composition du jury :

Président du jury : Christian POÛS Professeur (Chatenay-Malabry)

Rapporteurs : Christiane GUILLOUZO Docteur (Rennes)

Michel PUCEAT Docteur (Evry)

Examineurs : Laure COULOMBEL Docteur (Villejuif)

Philippe LEBOULCH Professeur (Fontenay-Aux-Roses)

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord le Docteur Christiane Guillouzo et le Docteur Michel Pucéat d'avoir accepté de consacrer un peu de leur temps pour évaluer ce manuscrit.

Je remercie le Professeur Christian Poüs de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury mais aussi pour sa grande disponibilité en tant que responsable de mon pôle scientifique à l'école doctorale.

Merci également au Professeur Philippe Leboulch ainsi qu'au Docteur Laure Coulombel d'avoir accepté de prendre part au jury malgré un emploi du temps bien rempli.

Anne Weber, un grand merci pour m'avoir accueilli au sein de l'unité U804, devenue, durant mon exil anglais, U972 même si à l'époque je maîtrisais beaucoup plus le broyage de cerveau de souris que la culture des cellules souches. Vous m'avez offert un sujet d'étude novateur et très enrichissant en lien avec ce qui me passionne depuis plusieurs années déjà (depuis un soir de décembre 1993 en regardant le Téléthon), la thérapie cellulaire et génique. Vous m'avez également offert une opportunité, jalouée par de nombreux doctorants, de vivre l'aventure de la recherche à la sauce anglo-saxonne, un joli cadeau !

Merci également à Anne Dubart et Georges Uzan ainsi qu'à l'ensemble de l'unité 972 aussi bien du Kremlin-Bicêtre que de Paul Brousse pour leur soutien ainsi que leurs précieux conseils.

Ludovic Vallier, celui chez qui j'ai rencontré pour la première fois mes fidèles compagnonnes de route pour ce doctorat : les cellules ES! Merci de m'avoir accueilli une première fois pour me former à la culture de ces « petites princesses » ; puis une deuxième fois pour 4 mois...heu non 6...bon, en fait, plutôt 18 mois pour travailler avec les petites dernières de la famille des cellules pluripotentes, les iPS (encore plus capricieuses ; surtout les RLDL^{-/-}!). Merci pour ta patience mais aussi pour m'avoir fait découvrir ce lieu de haute renommée « The Master Mariner » et ces 3-4 clients habituels n'ayant pas trop compris qu'un petit groupe d'énergumènes soit venu demander à voir un étrange spectacle à la tv « la ligue 1 et le fameux OL-OM ». Je vous souhaite, à toi et ton équipe, beaucoup de succès.

Un petit mot pour mes proches collaborateurs de Cambridge, Nick et Tamir. Cela a été un plaisir de travailler avec vous et de partager les nombreuses discussions scientifiques et moins scientifiques en pièce de culture. Par contre, Tamir, tu aurais pu me laisser quelques points au squash !!! Nick, le congrès de Barcelone, dont les bars sur la plage jusqu'à 2h, reste un très bon souvenir tout comme le festival de la bière à Cambridge. Garde-moi une place pour ma prochaine visite.

Merci également à l'ensemble du personnel du LRM (de longue ou courte durée) ainsi qu'à mes colocataires Dan et Daniel pour leur accueil et leur bonne humeur. J'ai beaucoup appris auprès de vous (au niveau des langues notamment). Vous avez rendu mon passage à Cambridge inoubliable mais Daniel, s'il te plaît, efface la vidéo du golf !

Retour en France pour saluer les piliers de l'unité U972, c'est-à-dire Sylvie et Marie-Thé. Sylvie, la reine de la bio moléculaire, je te remercie pour avoir tenté, avec un certain succès, d'apporter une réponse à la moindre de mes questions même quand je m'interrogeais sur les limites de la théorie des manips. Marie-Thé, je t'aurais fait voyager pour ces fibros de singe. Au moins, tu as pu apprécier Nantes (bon point !!). Merci pour ta patience, ton partage du savoir et, comme le jour approche, je te souhaite une agréable retraite.

Marie et Sonia, les deux gestionnaires que j'aurais le plus fait souffrir avec des demandes urgentes, un grand merci pour votre aide précieuse et votre sourire malgré les galères.

Un mot aux petits jeunes que j'ai vus démarrer et aux moins jeunes mais néanmoins nouveaux dans le labo. J'étais le rescapé d'une vague d'étudiants qui avait ses cachettes dans le labo donc, à votre arrivée, j'ai vite été questionné. Maintenant, j'espère que vous avez repéré tous les produits et que vous n'aurez plus besoin de moi pour les trouver. Bon courage pour la suite de vos études/projets et je vous souhaite plein de papiers! Un petit merci également aux membres de l'équipe Melki pour ces petits moments de détente lors des pauses déjeuner.

Un petit mot supplémentaire également pour Noushin, pour sa douceur et sa grande patience dans le bureau pendant mes petites crises de folie, d'agacement..., un grand désolé.

Clara, la petite dernière, mais aussi un grand potentiel dans l'imitation, qui a eu la joie de partager avec moi la garde des cellules de simiennes... et du coup me subir plus longtemps que les autres chaque jour, un grand « danke schön » pour ta joie de vivre et ta petite folie combinées à un grand sens de l'organisation.

A Thomas, le Gangsta rappeur de San Diego et supporter de l'OM (personne n'est parfait!!!), mon maître (Yoda par la taille et la chevelure!!) de la culture des ES, tu es celui qui m'a initié aux caprices des ES et à la différenciation hépatique (ainsi qu'à la culture anglosaxonne avec une première soirée pub, en compagnie de ta supportrice des Springboxes, pour la finale Angleterre-Afrique du Sud). Un grand merci pour ton aide lors de mes premiers pas à Cambridge, nos discussions en pièce culture aux sujets très variés (no comment !!). Montre aux ricains ce que valent les frenchies!

Clémence, la petite jeune qu'on a vue arriver au labo toute timide et discrète et qui, 2 ans après, avait révélé tout son caractère/sa poigne pour maintenir une certaine organisation au labo. Tu as aussi été mon point de repère lorsque j'étais un peu déphasé, à mon retour sur Paris. Il y a eu un vide au labo lors de ton départ pour de nouvelles aventures. Un grand merci pour ta rigueur scientifique, ta gentillesse mais également pour ton aide et tes coups de boost. Je te souhaite bon courage pour la suite de tes études et plein de réussite pour ta carrière.

Une petite pensée à mes amis, ou peut-être victimes privilégiées de mes histoires scientifiques ou, comme me l'a indiqué Clara, mes histoires de « beek », Marc, Lise, Audrey et Florence. Courage, ce n'est que le début !!! Merci de m'avoir permis de m'évader du labo et m'avoir fait couper le cordon de temps à autre avec mes cellules mangeuses de temps.

Enfin, à mes parents, merci pour vos encouragements, votre soutien sans égal à travers toutes ces années d'études, et votre intérêt pour mon travail même si je vous donne souvent mal au crâne lorsque je vous en parle.

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS	p 9
INTRODUCTION	p 12
Chapitre 1 : Le foie : cellules et développement embryonnaire du foie	p 12
1- Le foie adulte	p 12
1.1 Structure et populations cellulaires	p 12
a) <i>Cholangiocytes</i>	p 12
b) <i>Cellules endothéliales</i>	p 13
c) <i>Cellules de Küpffer</i>	p 13
d) <i>Lymphocytes et cellules dendritiques</i>	p 13
e) <i>Cellules étoilées</i>	p 13
f) <i>Hépatocytes</i>	p 14
1.2 Fonctions métaboliques	p 14
2- Développement embryonnaire du foie	p 16
2.1 Premières étapes	p 16
a) <i>Formation du blastocyste</i>	p 16
b) <i>Gastrulation</i>	p 17
c) <i>Formation de l'endoderme</i>	p 17
2.2 Formation de l'endoderme	p 19
a) <i>Les TGFβs, Nodal</i>	p 19
b) <i>Induction de Nodal</i>	p 19
c) <i>Facteurs de transcription impliqués</i>	p 21
2.3 Développement du foie	p 24
a) <i>Spécification de l'endoderme en tube intestinal antérieur</i>	p 25
b) <i>Compétence hépatique</i>	p 25
c) <i>Induction hépatique</i>	p 27
d) <i>Formation du bourgeon hépatique</i>	p 27
e) <i>Croissance du bourgeon hépatique</i>	p 29
f) <i>Ségrégation des lignages hépatocytique et biliaire</i>	p 29
g) <i>Les cellules souches hépatiques et progéniteurs bipotents hépatiques humains in vitro</i>	p 32
3- Cellules souches embryonnaires	p 34
3.1 Origine	p 34
3.2 Propriétés	p 35
a) <i>Propriétés moléculaires</i>	p 35
b) <i>Pluripotence</i>	p 37
3.3 Différenciation endodermique de cellules ES	p 38
a) <i>Différenciation spontanée</i>	p 38
b) <i>Différenciation endodermique</i>	p 39

c) Différenciation hépatique	p 40
Chapitre 2: L'hypercholestérolémie familiale	p 43
1- Généralités	p 43
1.1 Historique	p 43
1.2 Clinique	p 44
2- Métabolisme du cholestérol	p 46
2.1 Cycle du récepteur aux LDLs	p 46
2.2 Gène du récepteur aux LDLs	p 48
3- Mutations impliquées dans l'hypercholestérolémie familiale	p 51
3.1 Mutations du gène RLDL	p 51
a) Mutations de classe 1	p 51
b) Mutations de classe 2	p 51
c) Mutations de classe 3	p 52
d) Mutations de classe 4	p 53
e) Mutations de classe 5	p 53
3.2 Mutations du gène Apo B	p 53
3.3 Mutations du gène PCSK9	p 54
3.4 Mutations du gène LDLRAP1	p 54
4- Traitements de l'hypercholestérolémie familiale	p 55
4.1 Patients hétérozygotes	p 55
4.2 Patients homozygotes	p 57
Chapitre 3: Les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs)	p 59
1- Historique	p 59
1.1 Transfert nucléaire	p 61
1.2 Fusion cellulaire	p 62
1.3 Transduction de facteurs de transcription	p 62
1.4 Comparaison des approches	p 63
2- Génération de cellules pluripotentes induites à l'aide de facteurs de transcription	p 64
2.1 Les facteurs	p 64
a) Oct4 et substituts	p 65
b) Sox2 et substituts	p 66
c) Klf4 et substituts	p 67
d) c-Myc et substituts	p 68
e) Nanog et Lin28	p 68
f) Petites molécules	p 69
g) MicroARNs miR302/367	p 71
h) Facteurs complémentaires	p 72
2.2 Les vecteurs	p 72
a) Vecteurs intégratifs	p 73

b) Vecteurs non-intégratifs	p 74
c) Vecteurs excisables	p 76
d) Absence de vecteur	p 77
2.3 Les types de cellules somatiques	p 80
a) Cellules du mésoderme	p 80
b) Cellules de l'ectoderme	p 83
c) Cellules de l'endoderme	p 84
d) Cellules du tissu extra-embryonnaire	p 84
2.4 Les espèces	p 84
2.5 Comparaison des cellules souches pluripotentes induites et embryonnaires	p 85
2.6 Applications pratiques des iPSCs	p 87
a) Modèles animaux de maladies	p 87
b) Modélisation des maladies <i>in vitro</i> à partir de cellules humaines et drug screening	p 92
Chapitre 4: Transplantation d'hépatocytes	p 98
1- Les hépatocytes adultes	p 100
2- La transplantation d'hépatocytes dans les modèles animaux	p 102
3- Les sources alternatives aux hépatocytes adultes	p 104
3.1 Les progéniteurs fœtaux	p 104
3.2 Les cellules souches du foie adulte	p 105
3.3 Les cellules souches mésenchymateuses (MSCs)	p 107
OBJECTIFS	p 110
RESULTATS	p 111
1- Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions that recapitulate liver development.	p 111
présentation de l'article	p 111
article	p 113
2-Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells.	p 125
présentation de l'article	p 125
article	p 129
résultats supplémentaires	p 139

3- Non-integrating lentivector mediated purification of embryonic stem cell-derived hepatic progenitors	p 148
présentation de l'article	p 148
article	p 151
4- Génération de progéniteurs hépatiques dérivés de cellules iPS de primate non-humain	p 175
1- Génération de cellules iPS simiennes	p 175
a) <i>Vecteurs rétroviraux contenant les facteurs de reprogrammation humains</i>	p 175
b) <i>Vecteurs rétroviraux contenant les facteurs de reprogrammation simiens</i>	p 176
c) <i>Vecteurs lentiviraux contenant les facteurs de reprogrammation humains</i>	p 177
2- Différenciation en endoderme de cellules ES simiennes	p 177
3- Différenciation en endoderme de cellules iPS simiennes	p 182
DISCUSSION	p 183
BIBLIOGRAPHIE	p 192
ABREVIATIONS	p 220

AVANT-PROPOS

Une grande majorité des maladies métaboliques du foie a pour unique traitement efficace, à l'heure actuelle, la transplantation orthotopique du foie. Néanmoins, le nombre important de patients en attente de cette intervention fait face à un manque de donneurs d'organes, sans compter les risques de mortalité ou de complications post-opératoires. Pour ces raisons, la transplantation d'hépatocytes, génétiquement modifiés ou non, est envisagée depuis plusieurs années comme alternative. Il existe deux approches : l'allogreffe (cellules issues d'un autre individu de la même espèce) et la transplantation autologue (cellules issues du patient lui-même). Depuis 1995, une trentaine de transplantations allogéniques d'hépatocytes ont été réalisées afin de corriger des maladies métaboliques avec, d'ailleurs, un résultat mitigé. Cette stratégie est limitée par le manque de donneurs et par le fait que les hépatocytes isolés soient sensibles à la congélation et ne puissent être amplifiés *in vitro*.

Le foie est l'organe majeur d'élimination des xénobiotiques et, de ce fait, joue un rôle déterminant en pharmacocinétique et en toxicologie. Cependant, les modèles animaux comme les lignées d'hépatomes utilisés jusqu'à présent par l'industrie pharmaceutique sont souvent insuffisamment représentatifs de la cinétique *in vivo* chez l'Homme car les niveaux d'expression des enzymes de phase I et II métabolisant les xénobiotiques et leur spécificité vis-à-vis des substrats sont différents de ceux des hépatocytes primaires humains.

Face à ces différentes limites des hépatocytes, tant sur le plan de la médecine régénérative que de la pharmacotoxicologie, il était devenu nécessaire d'explorer le potentiel d'autres sources de cellules hépatiques humaines. Les cellules souches représentent une source idéale puisqu'elles peuvent être isolées, amplifiées et différenciées *in vitro* en différents types cellulaires.

Ainsi, des cellules progénitrices hépatiques humaines se sont avérées fonctionnelles après transplantation dans un foie murin. Néanmoins, ces cellules restent difficiles d'accès et leur amplification *in vitro* non encore réalisée, sera très probablement restreinte.

Au cours de ces dernières années, les cellules souches pluripotentes, aussi bien les cellules souches embryonnaires (ES) que les cellules souches pluripotentes induites

(iPS) ont été envisagées comme nouvelles sources de cellules hépatiques. Différentes études ont démontré la capacité des cellules ES à se différencier dans des types cellulaires représentatifs des trois feuillets embryonnaires que ce soit *in vivo* ou *in vitro*. De plus, ces cellules ont l'avantage de pouvoir proliférer indéfiniment en culture. Elles restent la référence des cellules souches pluripotentes. Néanmoins, la production d'hépatocytes humains fonctionnels à partir de cellules ES dans des conditions transposables à la clinique reste à réaliser.

Durant ces quatre dernières années, les progrès dans la reprogrammation cellulaire ont montré que l'expression ectopique de facteurs de transcription définis permettait de générer des cellules à un état de pluripotence à partir de cellules somatiques adultes humaines. Ces cellules reprogrammées induites ont, en théorie, le même potentiel prolifératif et la même capacité à se différencier en un grand nombre de types cellulaires que les cellules ES. Elles ne soulèvent pas les problèmes éthiques liés aux cellules embryonnaires et peuvent être produites via une petite biopsie de peau ou une prise de sang, des procédures non-invasives pour le patient. De ce fait, ces cellules iPS représentent une source idéale pour générer des cellules spécifiques de patients et spécifiques de maladies. Elles représentent aussi un excellent modèle pour établir la preuve de concept que les maladies génétiques monogéniques peuvent être corrigées *in vitro* par des vecteurs thérapeutiques exprimant la fonction manquante.

L'hypercholestérolémie familiale de type IIA est un exemple de maladie métabolique mortelle. Cette maladie autosomale dominante est due à des mutations sur le gène codant pour le récepteur aux LDLs et est caractérisée par des concentrations élevées de cholestérol dans la circulation sanguine, ce qui cause une athérosclérose précoce dès l'enfance et entraîne une mort prématurée.

Dans ce manuscrit, nous nous sommes appliqués à faire une revue détaillée de la structure, du rôle et des cellules présentes dans cet organe mais également de son développement embryonnaire des cellules souches embryonnaires à la différenciation hépatique. Nous présentons également une description de l'hypercholestérolémie familiale incluant ses conséquences cliniques, le métabolisme du cholestérol ainsi que les mutations impliquées dans le dysfonctionnement de celui-ci et les traitements employés, à l'heure actuelle, pour y remédier. Ensuite, nous détaillerons l'historique de la reprogrammation cellulaire ainsi que les

différentes stratégies et les différents outils employés pour générer les cellules souches pluripotentes induites à l'aide de facteurs de transcription. Les premiers résultats de leur application thérapeutique ou de leur utilisation dans la modélisation de maladies géniques y sont également mis en avant. Enfin, le dernier chapitre décrit les avancées dans la transplantation d'hépatocytes incluant les approches explorées, les modèles animaux utilisés et les différentes sources alternatives d'hépatocytes.

INTRODUCTION

Chapitre 1: Le foie : cellules et développement embryonnaire du foie

1. Le foie adulte

1.1 Structure et populations cellulaires

Le foie adulte chez l'homme est un organe assymétrique composé de deux lobes qui, de par ses différentes fonctions, contribue au maintien de l'homéostasie de l'organisme. Il synthétise diverses molécules essentielles et permet d'extraire et métaboliser les nutriments et xénobiotiques introduits dans l'organisme en partie via le système digestif. Le parenchyme (tissu fonctionnel) est composé de sept types cellulaires : les hépatocytes, les cholangiocytes, les cellules endothéliales sinusoïdales, les cellules de Küpffer, les lymphocytes, les cellules dendritiques et les cellules étoilées. Leur agencement favorise leurs interactions et elles se rassemblent dans le lobule hépatique qui comprend une veinule centrolobulaire autour de laquelle le parenchyme hépatique se répartit de façon polygonale avec les angles constitués d'espaces portes. Ces derniers sont constitués d'une veinule porte, d'une artériole hépatique et d'un canalicule biliaire (**Figure 1**).

a) Cholangiocytes

Les cholangiocytes représentent environ 1% des cellules du parenchyme. Ils sont localisés dans les canaux biliaires (Benedetti et al., 1996). Les canaux de Hering sont formés par les connections de ces canaux avec la plaque hépatique et correspondent aux branches proximales de l'arbre biliaire intrahépatique (connections entre les canalicules biliaires et les canaux biliaires interlobulaires) (Saxena et Theise, 2004). Les cellules souches hépatiques, pouvant générer des hépatocytes et des cholangiocytes, sont localisées au niveau des canaux de Hering (Kuwahara et al., 2008, Schmelzer et al., 2007). Les cholangiocytes possèdent un important cytosquelette sous forme d'un réseau de cytokératines 7 et 19. Par leur sécrétion, elles modifient la composition de la bile en altérant le contenu en eau et solutés.

b) *Cellules endothéliales*

Les cellules endothéliales des sinusoides représentent 3% de la masse du parenchyme. Elles forment des veines ramifiées en petits capillaires, appelés sinusoides, qui envahissent le parenchyme hépatique. Elles peuvent contracter leur cytosquelette et contrôler les échanges entre le sang et l'espace périsinusoïdal sous l'influence d'hormones et de neurotransmetteurs (Arias, 1990). Les cellules endothéliales contribuent au transport, la coagulation, la fibrinolyse, l'inflammation, la réponse immune, la régulation de la pression sanguine, l'angiogénèse, le métabolisme des lipides ou encore la synthèse de composants stromaux.

c) *Cellules de Küpffer*

Les cellules de Küpffer représentent 2% de la masse du parenchyme hépatique. Ces macrophages sont situés dans la lumière des sinusoides, attachés à l'endothélium sinusoïdal (Smedsrod *et al.*, 1994). Leur rôle est de recevoir le matériel usagé, altéré ou étranger. Elles sécrètent, après activation, différents produits comme des protéases et des cytokines qui auront une influence sur les cellules parenchymateuses et sinusoïdales. Elles interviennent également dans la réponse immune en coopération avec les cellules dendritiques.

d) *Lymphocytes et cellules dendritiques*

On dénombre environ 10^{10} lymphocytes dans le foie et plus précisément localisés le long des sinusoides. Le foie centralise une importante partie de la réponse innée et une partie des éléments impliqués dans la réponse acquise (Parker et Picut, 2005). Notamment, il prend part à la neutralisation et l'élimination d'antigènes étrangers de type bactéries (réponse innée). Lors de la régénération hépatique, ces cellules jouent un rôle clé dans la régulation des mécanismes de réparation du foie (Strick-Marchand *et al.*, 2008).

e) *Cellules étoilées*

Les cellules étoilées, ou cellules de Ito, représentent 1,5% de la masse du parenchyme et sont situées dans l'espace de Disse autour des sinusoides. Elles participent, entre autres, au métabolisme de stockage de la vitamine A et à la synthèse, la sécrétion et la dégradation des composants de la matrice extracellulaire périsinusoïdale comme les collagènes de type I, III, IV, V, VI, les laminines, les

protéoglycanes et le collagène non fibrillaire de type XVIII (Friedman, 2008). Cette matrice permet le maintien de la fonction des hépatocytes et des cellules bordant les sinusoides. Les cellules de Ito peuvent être activées en myofibroblastes et exprimer la desmine et l' α -actine, ce qui leur permet de contrôler la tonicité microvasculaire et de participer à la réponse fibrotique.

f) Hépatocytes

Les hépatocytes représentent environ 60% des cellules du parenchyme et sont impliqués dans la majorité des fonctions métaboliques et de synthèse hépatique (Blouin *et al.*, 1977). Il s'agit de larges cellules polygonales de 25-30 μ m. A la naissance, les cellules du parenchyme s'organisent en travées larges de deux cellules, appelées *muralium duplex*. Vers l'âge de 5 ans, on parle de *muralium simplex* qui consiste en des travées larges d'une cellule. Le parenchyme est donc structuré en réseau de travées encadrées par les sinusoides favorisant ainsi les interactions entre le sang et les cellules hépatiques (Weibel *et al.*, 1969). Les hépatocytes comprennent un grand nombre d'organelles comme le réticulum (15% du volume cellulaire), un cytosquelette bien organisé (Feldman, 1989), une centaine de mitochondries, trois cent lysosomes, trois cent péroxysomes et environ cinquante appareils de Golgi nécessaires au bon fonctionnement de la machinerie cellulaire (Weibel *et al.*, 1969). La membrane plasmique se décompose en trois zones, l'une basale ou sinusoidale (77%) favorisant les échanges d'hormones et autres métabolites entre le sang et l'hépatocyte, une autre latérale (15%) impliquée dans les communications intracellulaires de type desmosomes, jonctions gap ou jonctions serrées, et enfin une apicale ou canaliculaire (8%) où se produit la sécrétion biliaire. Les fonctions métaboliques excrétoires se déroulent à la surface des cellules faisant face aux sinusoides.

1.2 Fonctions métaboliques

L'unité fonctionnelle hépatique, appelée acinus, comporte en son sein l'espace porte (Rappaport *et al.*, 1954) favorisant un flux sanguin unidirectionnel de cet espace vers les veines centrolobulaires. Les hépatocytes sont très hétérogènes suivant l'axe porto-central concernant leur ultrastructure, leurs activités enzymatiques, leur sensibilité aux drogues, leur prolifération et le gradient de pression vasculaire (Gumucio *et al.*, 1994) et de pression en oxygène. Une compartimentalisation des

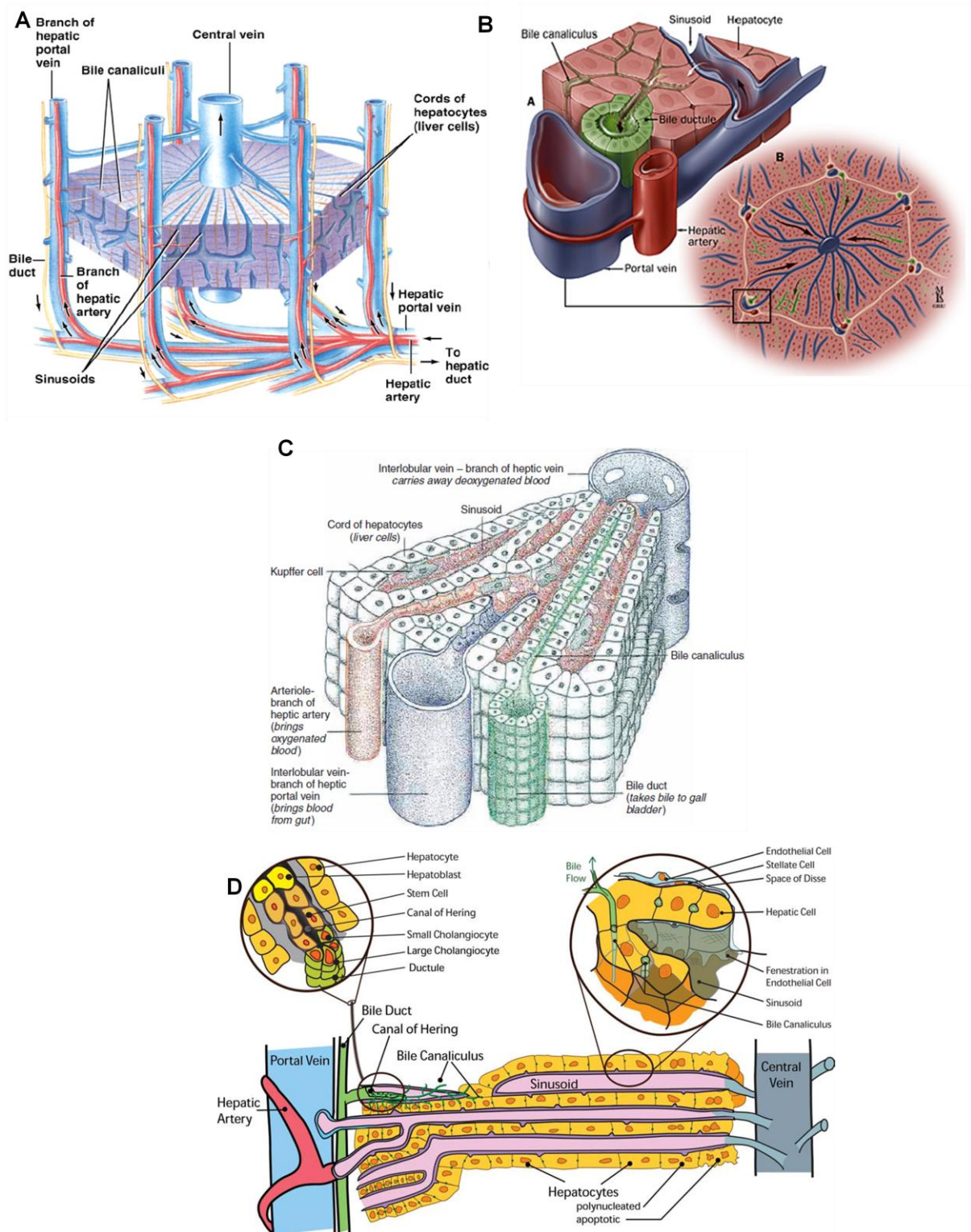


Figure 1. Structure du foie. (A) Organisation d'un lobule hépatique. (B) Schéma de l'organisation de l'espace porte hépatique. (C) Organisation veine centrolobulaire/veine porte (D'après Cheng, Yao et Reid, *Hepatic Stem Cells: Lineage Biology and Pluripotency*, 2007). (D) Schéma de la maturation intrahépatique des différents types cellulaires (Turner *et al.*, *Hepatology*, 2011).

fonctions métaboliques des différents lobes du foie s'établit au moment de la naissance. Dans un lobe, on distingue une zone périportale et une zone péricentrale par l'expression de gènes liés au métabolisme. Cette régulation semble contrôlée par l'expression de HNF4 qui recrute une histone déacétylase de type 1 (HDAC1) modifiant ainsi le statut de la chromatine pour bloquer le recrutement de facteurs de transcription. La voie Wnt, et notamment la β -caténine et l'APC (Adenomatous Polyposis Coli ; inhibiteur de la voie), joue également un rôle dans cette régulation. La β -caténine est exprimée dans la zone péricentrale alors que l'APC est localisé dans la zone périportale (Burke *et al.*, 2009, Colletti *et al.*, 2009). En effet, la perte de la protéine APC entraîne l'expression *de novo* des gènes cibles de la β -caténine, trouvés dans les hépatocytes péricentraux et la suppression des gènes exprimés dans les cellules périportales (Benhamouche *et al.*, 2006). Ce concept de « zonation » permet d'expliquer que des fonctions métaboliques comme la gluconéogénèse et la glycolyse soient effectuées respectivement par les hépatocytes périportaux et péricentraux simultanément. Les hépatocytes périportaux sont diploïdes et localisés dans une région de larges fenestrations de l'endothélium et où la pression en oxygène est importante. Ils sont principalement impliqués dans la gluconéogénèse donc, mais aussi l'uréogénèse, la β -oxydation des acides gras, la dégradation des acides aminés, la formation de bile et la synthèse d'albumine et de cholestérol. Les hépatocytes péricentraux sont tétraploïdes (Rajvanshi *et al.*, 1998) et situés dans des zones à faible pression en oxygène et où les fenestrations de l'endothélium sont plus étroites. Ils sont spécialisés dans la captation du glucose, la glycolyse, le métabolisme des xénobiotiques (détoxification), la lipogénèse, la synthèse de glutamine et la cytogénèse (**Figure 2**).

2- Développement embryonnaire du foie

2.1 Premières étapes

a) Formation du blastocyste

Dans les 24 heures suivant la fertilisation, l'oocyte subit une première division. Les cellules se divisent lentement et avec un asynchronisme jusqu'à l'obtention du blastomère (huit cellules espacées). Ensuite, les cellules deviennent plus denses pour former une masse compacte. Les molécules peuvent alors diffuser entre les

cellules via les jonctions GAP. Ensuite, les huit cellules se divisent pour obtenir seize cellules formant la morula. Cette structure se compose d'un groupe de cellules externe et d'un autre groupe interne. Les cellules situées à l'extérieur donneront majoritairement les cellules du trophoctoderme qui participent ensuite à la formation des structures extra-embryonnaires comme le chorion ou le placenta permettant l'attachement de l'embryon à la cavité utérine. Des cellules issues du stade seize cellules ainsi que des cellules du trophoblaste vont continuer de se diviser pour constituer, au stade soixante-quatre cellules, les cellules de la masse interne (CMI). Il s'agit ici de la première spécification au cours du développement dans la mesure où les CMI se distinguent des cellules du trophoblaste. Le trophoblaste sécrète un fluide dans la morula, créant alors le blastocœle et permettant le positionnement des cellules de la masse interne d'un côté des cellules du trophoblaste qui forment un anneau (**Figures 2 et 3**). L'ensemble de ces trois structures compose le blastocyste qui s'implante à la paroi utérine, initialisant ainsi la gastrulation.

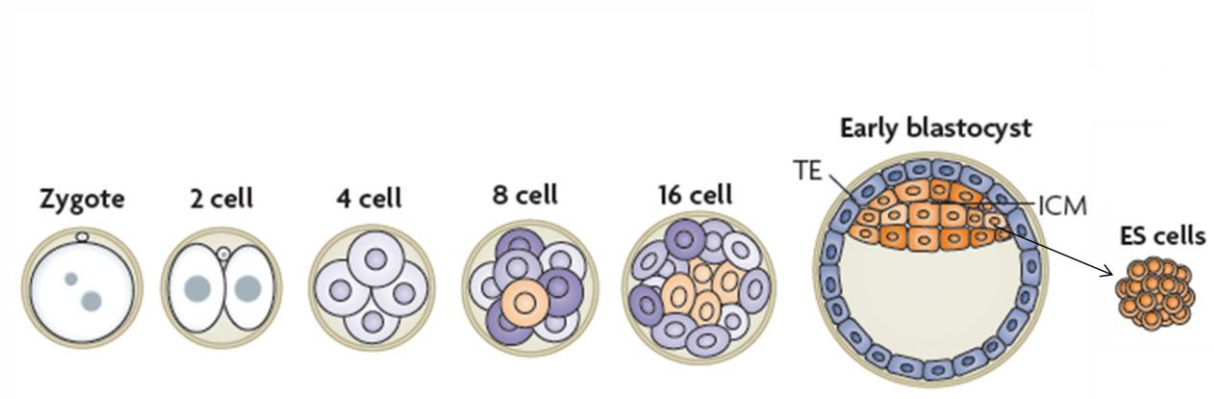
b) Gastrulation

Cette phase correspond à la formation des trois feuillets embryonnaires à l'origine de l'ensemble des tissus de l'organisme, c'est-à-dire l'endoderme, le mésoderme et le neur ectoderme. Tout d'abord, les cellules de la masse interne se différencient en deux groupes distincts que sont l'hypoblaste ou endoderme primitif et l'épiblaste. Les cellules de l'hypoblaste quittent la région où est localisée la masse interne et recouvrent la cavité du blastocœle. Elles forment ensuite l'endoderme extra-embryonnaire qui donnera le sac vitellin. Les cellules de l'épiblaste se décomposent en deux groupes. L'un d'eux formera la cavité amniotique alors que le second correspond aux cellules pluripotentes qui sont à l'origine de l'embryon. La gastrulation débute dans la partie postérieure de l'embryon, au niveau du site de formation du nœud de Hensen. La ligne primitive s'établit et, dans le même temps, l'expression de l'E-cadhérine s'éteint dans les cellules de l'épiblaste qui se détachent les unes des autres pour migrer au travers de la ligne primitive (**Figure 3**).

c) Formation de l'endoderme

Selon les travaux de Lawson *et al.*, les cellules situées dans la partie antérieure de la ligne primitive sont à l'origine de l'endoderme (Lawson *et al.*, 1991). Celles-ci migrent au travers de la ligne primitive et s'intercalent entre l'endoderme viscéral. La

A



B

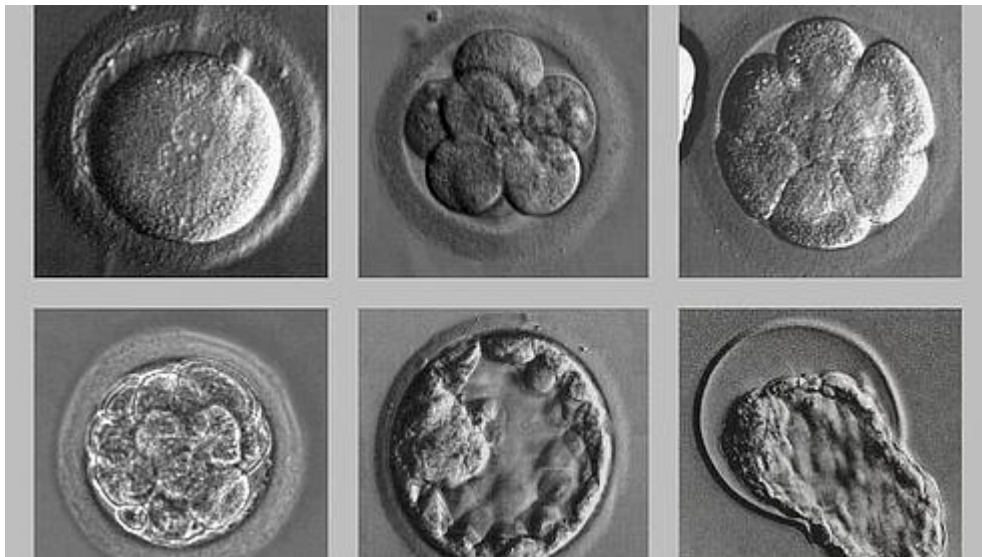


Figure 2. Les différentes étapes de la formation du blastocyste. (A) Schéma représentatif des différentes divisions de l'œuf fécondé au blastocyste avec la masse cellulaire interne, à l'origine des cellules ES (D'après Hemberger et al., Nature review molecular cell biology 2009). ICM : Inner Cell Mass ; TE : Trophectoderm. (B) Développement *in vitro* d'un embryon humain avec de gauche à droite en haut : Œuf fécondé - stade huit cellules – Adhésion cellulaire ; et de gauche à droite en bas : stade morula – blastocyste – Éclosion de la zone pellucide.

spécification de l'endoderme a lieu 6 à 6,5 jours après fécondation. Les cellules de l'endoderme migrent alors dans une direction antérieure et contribuent à l'endoderme antérieur. Les cellules migrant de la ligne primitive ultérieurement donneront l'endoderme postérieur (Wells et Melton, 1999).

L'endoderme et le mésoderme dérivent d'un précurseur commun comme l'indique la co-expression de marqueurs endodermiques et mésodermiques dans la partie antérieure de la ligne primitive. Des travaux chez la souris ont d'ailleurs mis en évidence l'existence de cellules embryonnaires exprimant à la fois Goosecoid, l'E-cadhérine et le récepteur au PDGF α (Tada *et al.*, 2005). Ces cellules ont la capacité de se différencier en dérivés endodermiques et mésodermiques. La première structure formée par l'endoderme en coopération avec le mésoderme de la plaque latérale, le tube digestif, est à l'origine du foie et du pancréas (**Figure 4**).

2.2 Formation de l'endoderme

L'endoderme est à l'origine notamment du foie, du pancréas, de la vésicule biliaire, du tube digestif et ses dérivés, du larynx et des poumons. Chez les mammifères, l'induction de l'endoderme est due à des facteurs solubles. Voici les principaux facteurs impliqués (**Figure 5**).

a) Les TGF β s, Nodal

Des travaux chez la souris indiquent, en effet, que Nodal induit à la fois le mésoderme et l'endoderme (Brennan *et al.*, 2001 ; Conlon *et al.*, 1994 ; Zhou *et al.*, 1993). Néanmoins, chez les embryons porteurs d'un allèle hypomorphique de Nodal ou lors d'une dérégulation de l'activité des protéines Smads 2/3, la population endodermique est perdue (Ben-Haim *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, 2004 ; Lowe *et al.*, 2001). En inhibant Lefty, un antagoniste de Nodal, Meno *et al.* ont montré un excès de formation de l'endoderme (Meno *et al.*, 1999).

b) Induction de Nodal

La voie Wnt joue un rôle important sur l'activation de Nodal lors de la gastrulation. En effet, les embryons déficients en β -caténine ou Nodal sont dans l'impossibilité de former la ligne primitive (Conlon *et al.*, 1994 ; Huelsken *et al.*, 2000). Wnt3a semble notamment primordial dans la formation du mésendoderme (Liu *et al.*, 1999). Son expression est détectée dans la zone de l'épiblaste où se situent les cellules

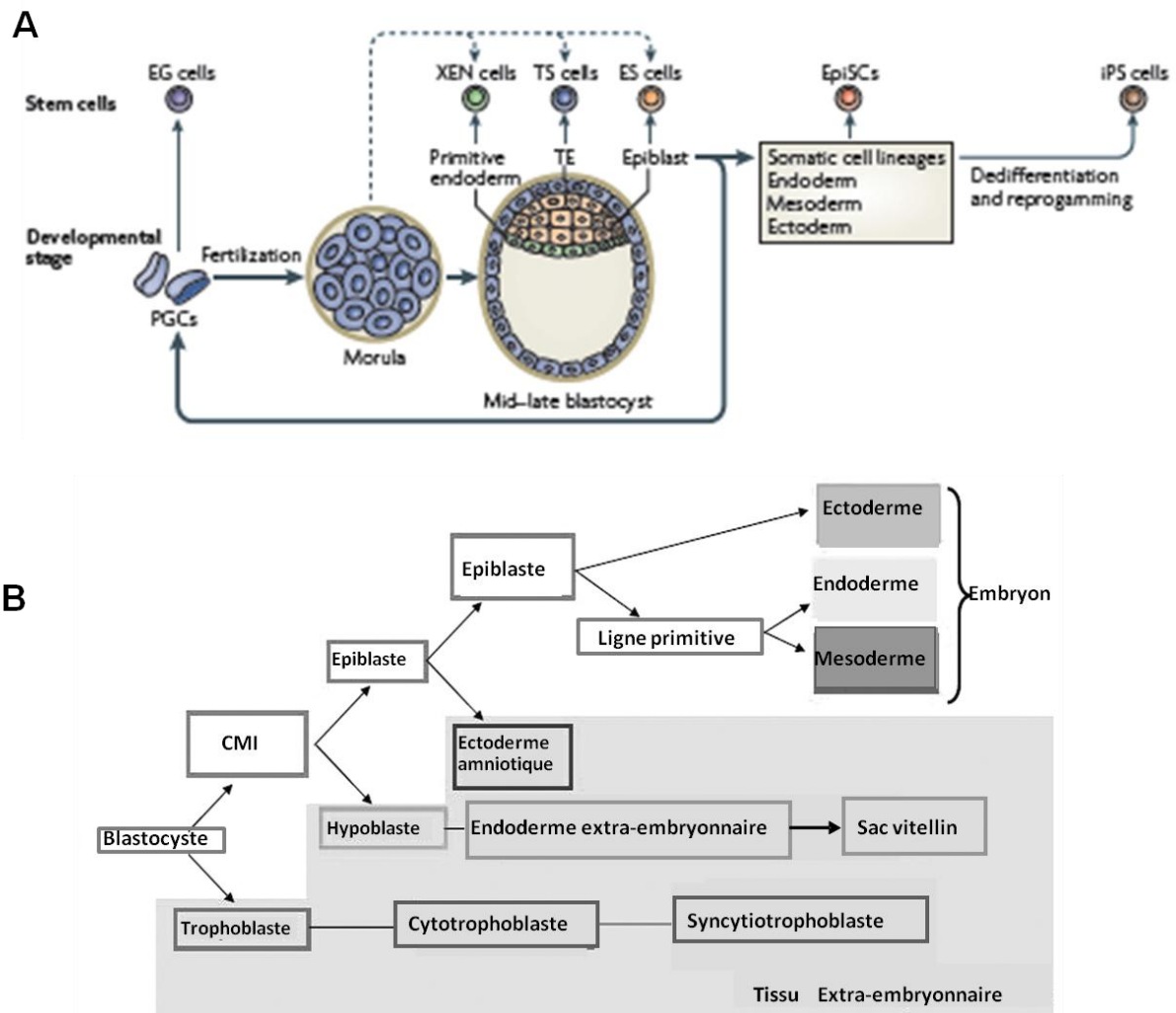


Figure 3. Les principales étapes du développement embryonnaires. (A) L'orientation de la différenciation des cellules se produit au stade blastocyste où l'on a, d'un côté, formation du trophoctoderme (TE) et, de l'autre, la masse cellulaire interne (CMI) qui est à l'origine de l'épiblaste et délimitée par une couche d'endoderme primitif. Les trois lignages (trophoctoderme, endoderme primitif et épiblaste) donnent respectivement naissance à différents types de cellules souches : cellules souches du trophoctoderme (TS), cellules souches de l'endoderme extraembryonnaire (XEN) et cellules souches embryonnaires (ES). Immédiatement après l'implantation, l'épiblaste est à l'origine d'une autre population de cellules souches, les cellules souches de l'épiblaste (epiSCs). Les cellules germinales primordiales (PGCs) proviennent d'une population de cellules mésodermiques à l'extrémité postérieure de l'épiblaste. Les cellules germinales embryonnaires (EG) peuvent être dérivées des cellules germinales primordiales à un stade précoce (entre J8,5 et J11). Les cellules souches pluripotentes induites (iPS) sont générées à partir de cellules somatiques complètement différenciées. (D'après Hemberger *et al.*, Nature review molecular cell biology 2009). **(B)** Origine des différents tissus embryonnaires et extra-embryonnaires. Les tissus qui contribuent à l'embryon sont issus de l'épiblaste (sources personnelles).

mésendodermiques qui migrent au travers de la ligne primitive. Durant ce processus, Wnt3a et Nodal s'activent mutuellement (Ben-Haim *et al.*, 2006 ; Brennan *et al.*, 2001 ; Liu *et al.*, 1999). La voie Wnt n'est pas l'unique voie activant l'expression de Nodal comme le prouve l'activité persistante de Nodal dans les embryons déficients en β -caténine.

Parmi les autres modes d'activation de Nodal, on trouve notamment une boucle d'autorégulation faisant intervenir FoxH1 qui se fixe sur la région régulatrice FAST de Nodal. (Hoodless *et al.*, 2001 ; Yamamoto *et al.*, 2001), mais aussi la protéine Cripto, une glycoprotéine membranaire de la famille des EGF-CFC comportant une ancre GPI. Cripto intervient dans l'autorégulation de Nodal en s'associant à Nodal et au récepteur Alk4 (Activin receptor-like kinase 4) afin d'accroître le signal Nodal (Reissmann *et al.*, 2001 ; Yeo et Whitman, 2001). Cripto est également reliée à la voie Wnt et notamment Wnt11, activant ainsi la β -caténine. De plus, Wnt3 active la transcription de Cripto renforçant ainsi la signalisation de Nodal (Morkel *et al.*, 2003). Le facteur de transcription T-Box Eomesodermine, exprimé dans le trophoctoderme, est également requis pour la spécification de l'endoderme car il est un autre activateur de Nodal (Teo *et al.*, 2011).

c) Facteurs de transcriptions impliqués

Les voies décrites précédemment activent de nombreux facteurs de transcription dont une partie va être décrite ci-dessous même si l'ensemble des mécanismes impliqués est loin d'être connu.

Plusieurs facteurs de la famille des facteurs GATA (facteurs de transcription capables de se lier à la séquence ADN « GATA ») sont exprimés dans l'endoderme et le mésoderme. GATA-4 et GATA-6 plus particulièrement ont un rôle important dans le développement endodermique comme le montrent certaines expériences de knock out chez la souris (Jacobsen *et al.*, 2002 ; Koutsourakis *et al.*, 1999). Les facteurs GATA participent également, par la suite, à la spécification des cellules issues de l'endoderme et à l'activation de gènes de fonctionnalité.

Les gènes de la famille FoxA (Forkhead box protein A) sont également exprimés dans l'endoderme et leur inactivation, via les knock out, perturbe le développement de certaines parties du tube digestif plutôt que le développement endodermique. Par exemple, le facteur FoxA2, également connu sous le nom de HNF3 β , a un rôle dans la formation des parties antérieure et abdominale du tube (Ang *et al.*, 1993 ; Sasaki

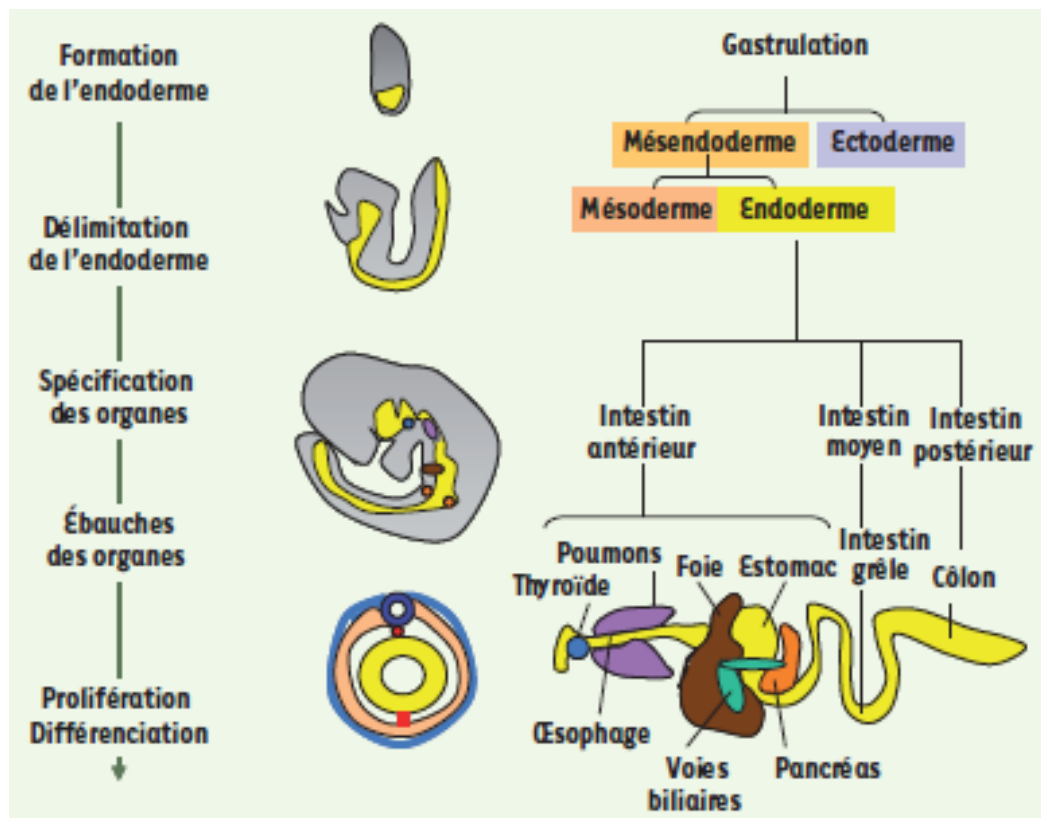


Figure 4. Origine et formation de l'endoderme. A gauche : Résumé des étapes de la formation de l'endoderme également caractérisée par le changement de morphologie de l'embryon de souris. L'endoderme est représenté en jaune. A Droite : Différents lignages dérivés de l'endoderme projeté sur une représentation du tractus gastrointestinal. L'endoderme et le mésoderme dérivent d'un progéniteur commun (D'après AM Zorn et JM Wells-Annu Rev Cell Dev Biol.- 2009).

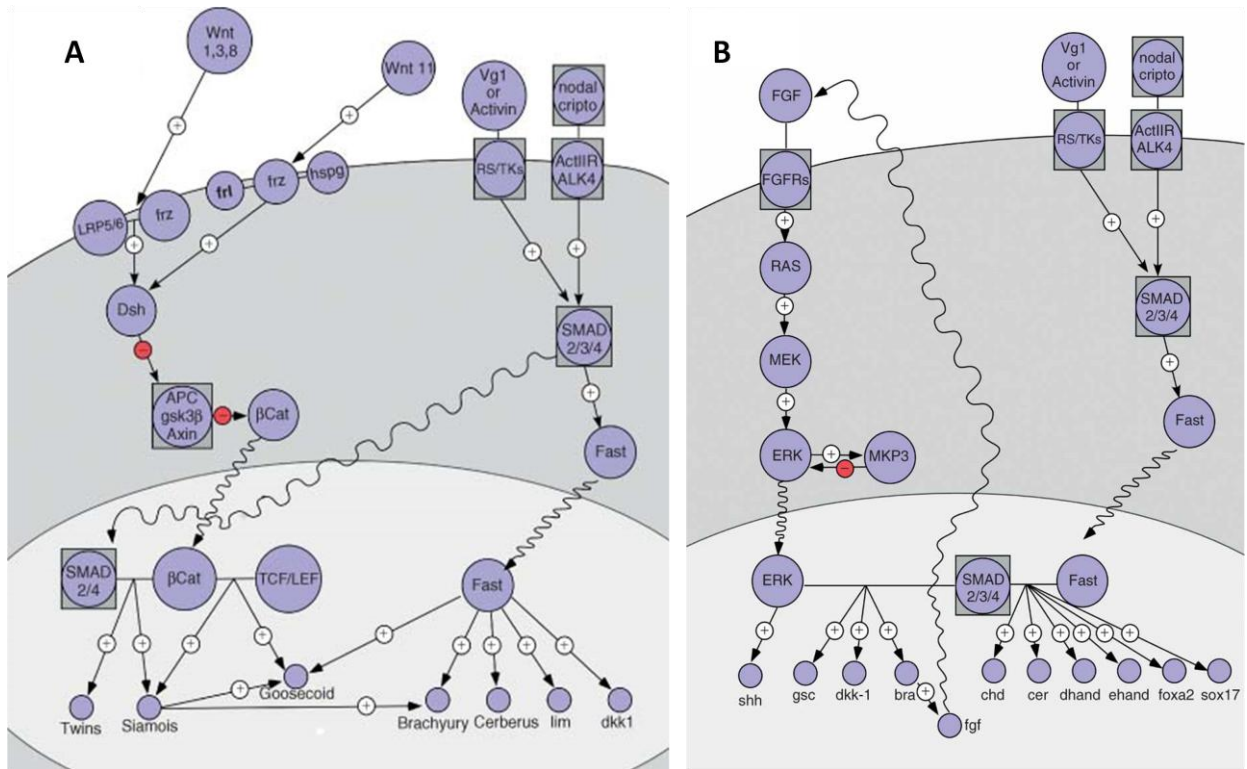


Figure 5. Interactions entre les voies de signalisation impliquées dans la différenciation en endoderme. (A) La voie Wnt est essentielle dans la formation du mésendoderme en favorisant l'établissement de l'expression de marqueurs comme Goosecoid et en activant la voie Nodal. Nodal et les autres membres de la famille des TGFβs favorisent, quant à eux, l'expression de marqueurs du mésendoderme comme brachyury et cerberus. (B) Les membres de la famille des TGFβs favorisent, par la suite, l'expression de marqueurs de l'endoderme comme Sox17 et FoxA2 (Ann Foley, Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med. 2009).

et Hogan, 1999).

Le facteur Sox17 (sex determining region Y box 17) joue, quant à lui, un rôle primordial dans la transcription du signal induit par Nodal. Des études chez la souris indiquent qu'en plus d'être détecté dans une zone de l'endoderme viscéral, il est exprimé dans l'endoderme définitif en formation à partir de 7,5 jours après fécondation (Kanai-Azuma *et al.*, 2002). Son expression est, ensuite, maintenue dans la partie postérieure du tube digestif jusqu'à 8,5 jours post-fécondation mais diminue dans la partie antérieure dès le huitième jour. Le knock out de Sox17 chez la souris entraîne une importante réduction de l'endoderme définitif qui est alors remplacé dans les parties postérieure et latérale par l'endoderme viscéral. On observe également, par la suite, une apoptose conséquente conduisant à une diminution importante de la partie antérieure. Ces résultats indiquent l'importance de Sox17 dans le maintien de l'endoderme. Des études chez le Xénope révèlent que les TGFβs (Vg1 ou Nodal) régulent directement Sox17 par fixation à son promoteur mais également que Sox17 s'autoactive en se fixant à son promoteur (Howard *et al.*, 2007). Le facteur Mixer et les facteurs GATA participent aussi à la régulation de l'expression de Sox17 (Sinner *et al.*, 2006). Sox 17 régule directement la transcription des gènes endodermiques et des gènes de spécification comme FoxA1 (HNF3α), FoxA2 et HNF1β, parfois en collaboration avec la voie β-caténine ou encore avec Mixl1 (Ahmed *et al.*, 2004 ; Sinner *et al.*, 2004).

Mixl1 (Mix1 homeobox-like 1) est exprimé dans l'endoderme viscéral puis dans la ligne primitive. Un déficit en Mixl1, chez la souris, engendre un endoderme définitif réduit ainsi que des perturbations de l'agencement des différentes régions du tube digestif (Tam *et al.*, 2007). Mixl1 semble aussi contribuer à la régulation de Nodal comme le montre une expression plus étendue de Nodal après la surexpression de Mixl1 (Howell *et al.*, 1999). Une étude de Zhang *et al.* a également démontré le rôle de Mixl1 dans l'activation de Goosecoid (Zhang *et al.*, 2009).

2.3 Développement du foie

L'embryogénèse du foie est la conséquence d'interactions réciproques entre l'endoderme et le mésoderme (Zaret, 2008 ; Zhao et Duncan, 2005). Les hépatocytes, le type cellulaire majoritaire du foie, et les cholangiocytes (cellules biliaires) dérivent de l'endoderme alors que les cellules stromales, les cellules de Küppfer, les cellules étoilées ou encore les cellules endothéliales bordant les

vaisseaux sanguins dérivent du mésoderme. Des études chez la souris, le poisson zèbre et l'embryon de poulet ont permis de montrer l'importance de variations dans la concentration et la chronologie de signaux cellulaires sur la régulation des facteurs de transcription qui orchestrent la transition des cellules progénitrices en cellules matures (Lemaigre, 2009).

a) Spécification de l'endoderme en tube intestinal antérieur

Au commencement de la spécification de l'endoderme, les cellules migrent au travers de la ligne primitive pour, plus tard, former l'endoderme définitif. Cette antériorisation est due à une plus importante activation de la voie Nodal entraînant, par conséquent, l'expression de FoxA2 en comparaison à l'endoderme postérieur. L'endoderme se positionne alors au contact du mésoderme et contribue à l'orientation antéro-postérieure via la sécrétion de facteurs par le mésoderme. Le tube digestif se compose de trois domaines : un domaine antérieur qui est marqué par l'expression de Hhex (Hematopoietically-expressed homeobox protein), un thoracique où Pdx1 (Pancreatic and duodenal homeobox 1) est détecté et un postérieur où s'exprime Cdx (Caudal type homeobox transcription factor). Les précurseurs communs au foie, au pancréas, au poumon et à la vésicule biliaire sont localisés dans la partie antérieure. Parmi les régulateurs sécrétés par le mésoderme, on retrouve des membres de la famille des FGFs (Fibroblast Growth Factor), Wnt (Wingless-type MMTV integration site family), des membres de la famille des BMPs (Bone Marrow Protein) ou encore l'acide rétinoïque comme le prouvent des études sur le Xénope où FGF4 et Wnt semblent réprimés dans la région antérieure. De plus, l'inhibition de la voie Wnt dans la partie postérieure induit l'expression de Hhex et la formation du bourgeon hépatique (**Figure 6**).

b) Compétence hépatique

Il s'agit de l'état d'une cellule lorsqu'elle n'est pas encore engagée dans la voie hépatique et dont l'état de la chromatine lui permet de répondre aux signaux de différenciation. Dans l'endoderme de souris, l'albumine est liée par les facteurs FoxA et GATA au niveau de ses enhancers permettant alors à des facteurs de transcription dont NF1 (Nuclear Factor 1) et C/EBP β (CCAAT-enhancer binding protein) d'accéder à la chromatine des cellules endodermiques (Bossard et Zaret, 1998). La délétion des facteurs FoxA1 et FoxA2 bloque la différenciation hépatique et entraîne la

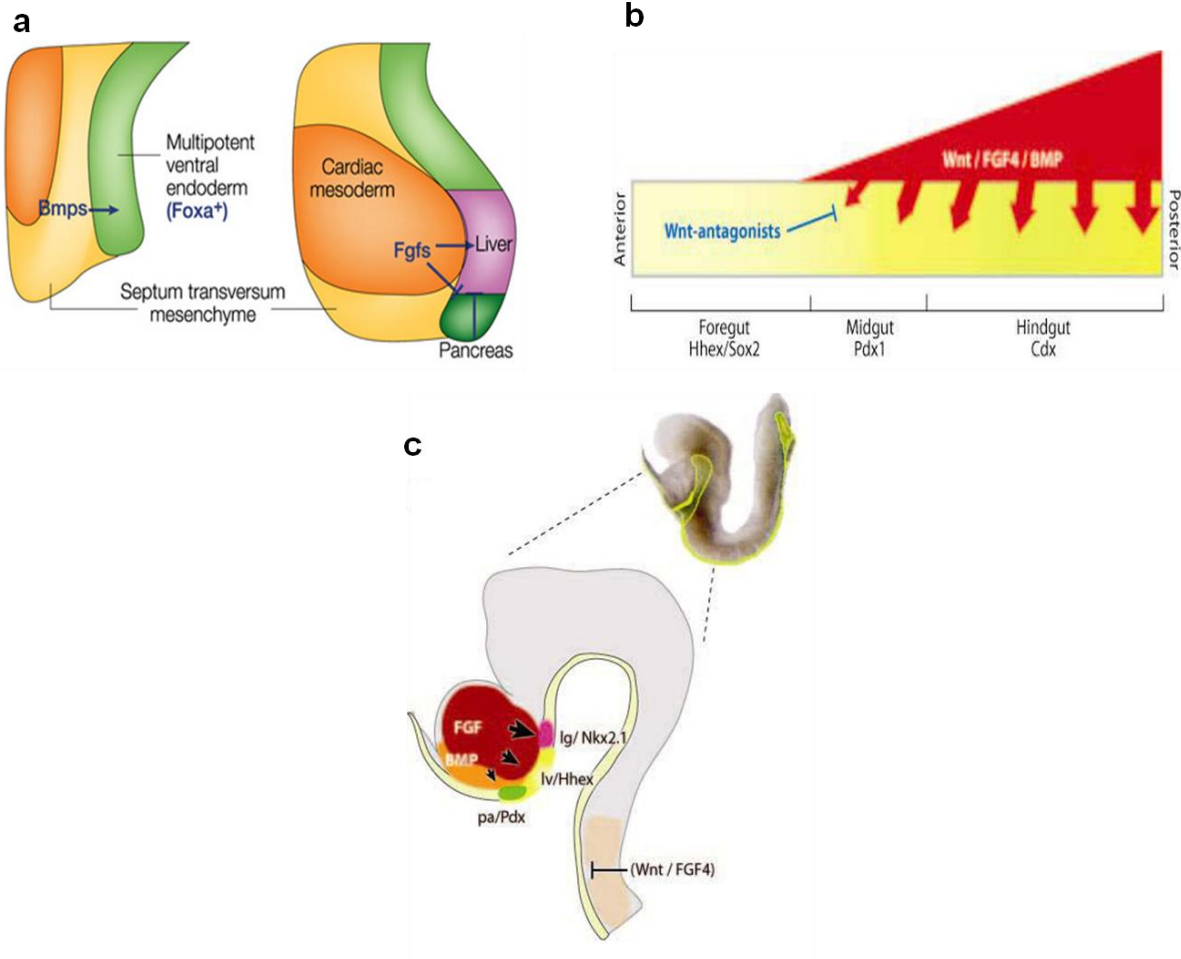


Figure 6. Développement de l'endoderme hépatique. (a) Signaux impliqués: Les protéines BMPs du septum transversum favorisent le développement en de multiples tissus de l'endoderme de l'intestin antérieur. Lors de la spécification, les signaux FGFs provenant du mésoderme cardiaque et BMPs initient la formation du foie (D'après Zaret, Nat Rev Genet, 2002). **(b) Rôle des facteurs Wnt/FGF4/BMP4 dans la spécification antéro/postérieure de l'endoderme.** **(c) Représentation schématique d'un embryon de souris à 8,25 jours.** La spécification des organes, sous l'effet de signaux extracellulaires, est marquée par l'expression de facteurs de transcription (Pdx dans le pancréas, Hhex dans le foie, Nkx2.1 dans le poumon) (D'après AM Zorn et JM Wells-Annu Rev Cell Dev Biol.- 2009).

disparition de l'expression d'AFP (Alpha-FetoProtein) (Lee *et al.*, 2005). En absence de HNF1 β (Hepatocyte Nuclear Factor 1 β), on constate le même effet que dans l'étude précédente, ce qui indique qu'il contribue à l'activation de FoxA1 et FoxA2 dans le tube digestif antérieur (Lokmane *et al.*, 2008).

c) Induction hépatique

L'induction hépatique débute sous l'impulsion de signaux liés aux FGFs (FGF 1, 2 et 8) sécrétés par le mésoderme cardiaque et aux BMPs (BMP2, 4) provenant du septum transversum (Gualdi *et al.*, 1996 ; Jung *et al.*, 1999 ; Rossi *et al.*, 2001) favorisant ainsi l'expression d'albumine. FGF intervient avant BMP dans ce processus comme le montrent les travaux de Rossi *et al.* qui indiquent que la présence de FGF1 et FGF2 dans la culture d'explants de tube digestif antérieur favorise l'expression d'albumine en se substituant au mésoderme cardiaque. Il n'en est pas de même pour les BMPs. Néanmoins, BMP4 est primordial pour le maintien de l'expression des facteurs GATA-4 et GATA-6. Le FGF active la voie des MAP kinases (Mitogen-activated protein kinases) qui régule alors les gènes hépatiques. FGF régule également la voie des PI3 kinases qui est impliquée dans la croissance hépatique (Calmont *et al.*, 2006). Serls *et al.* ont montré l'importance du niveau d'exposition aux FGFs dans l'induction hépatique (Serls *et al.*, 2005). En effet, en cas d'exposition élevée, la région intestinale censée générer le foie est plutôt différenciée en poumon. Les mouvements morphogénétiques sont donc capitaux car, en se glissant entre le mésoderme cardiaque et l'endoderme, le septum transversum permet une exposition plus faible de l'endoderme aux FGFs (**Figure 6**).

d) Formation du bourgeon hépatique

Les cellules souches hépatiques commencent à exprimer les marqueurs hépatiques comme HNF4 et initient la formation du diverticulum hépatique au vingt-deuxième jour de développement chez l'homme. Les cellules, qui avaient jusque là une forme cuboïde, passent à un épithélium de type stratifié (Bort *et al.*, 2006). Ainsi, les cellules du diverticulum, initialement entourées d'une membrane riche en laminine, collagène IV, fibronectine, nidogène et protéoglycanes, migrent au travers de cette membrane pour former ensuite le bourgeon hépatique (Margagliotti *et al.*, 2008). Les cellules ayant migré perdent alors l'expression de l'E-cadhérine, ce qui assimile cette étape à une transition épithélio-mésenchymateuse. Différents facteurs de

transcription et signaux provenant des cellules endothéliales sont requis dans ce processus.

L'expression de Hhex et GATA augmente dans l'endoderme hépatique et subsiste durant le développement des cellules hépatobiliaires (Hunter *et al.*, 2007). En l'absence de Hhex, le foie, la vésicule biliaire ou encore le bourgeon pancréatique antérieur ne se forment pas (Keng *et al.*, 2000 ; Martinez Barbera *et al.*, 2000) et le changement de morphologie des cellules ne se produit pas. Ceci indique que Hhex participe à la transition épithélio-mésenchymateuse au cours de la formation du bourgeon hépatique. Watt et Zhao ont montré un phénotype similaire dans le cas d'un déficit en GATA-4 ou GATA-6 indiquant ainsi l'implication des facteurs GATA dans la formation du bourgeon hépatique (Watt *et al.*, 2007 ; Zhao *et al.*, 2005).

Prox1 (Prospero-related homeobox 1) et les facteurs de transcription de la famille Onecut (ou HNF6) interviennent peu de temps après Hhex et GATA. Un déficit en Prox1 empêche la migration des cellules qui restent groupées dans le bourgeon hépatique en raison d'une surexpression de l'E-cadhérine qui rend les contacts intercellulaires trop importants. (Sosa-Pineda *et al.*, 2000). Le même phénotype est constaté chez des embryons déficitaires en facteur TBX3 (T-Box transcription factor 3) indiquant que TBX3 induit l'expression de Prox1 (Ludtke *et al.*, 2009). Les facteurs Onecut 1 (OC1 ou HNF6 α) et Onecut 2 (OC2 ou HNF6 β) ont également un rôle important dans le développement du bourgeon hépatique comme le montre l'étude d'embryons déficitaires pour les 2 facteurs qui ont le même phénotype que ceux déficitaires en Prox1 (Margagliotti *et al.*, 2007).

Le bon déroulement de la migration des cellules implique également les interactions entre les hépatoblastes, les cellules endothéliales et la matrice extracellulaire (Si-Tayeb *et al.*, 2010). Ainsi les hépatoblastes régulent la composition de la matrice et synthétisent des MMPs (métalloprotéases matricielles) qui permettent la digestion de la matrice. (Margagliotti *et al.*, 2007 ; Medico *et al.*, 2001 ; Papoutis *et al.*, 2007). La migration des cellules s'avère bloquée lorsque les MMPs sont inhibées. (Margagliotti *et al.*, 2008). Ces interactions se font via la sous-unité β 1 de l'intégrine et la laminine de la matrice et un déficit en cette sous-unité β 1 bloque la colonisation du septum transversum (Fassler et Meyer, 1995).

e) Croissance du bourgeon hépatique

Les facteurs de croissance HGF (Hepatocyte Growth Factor), FGF, BMP, Wnt, TGF β et acide rétinoïque sont sécrétés par le mésenchyme hépatique et le septum transversum et jouent un rôle clé sur la prolifération et la migration des hépatoblastes. Les FGFs via la PI3 Kinase et la voie des BMPs induisent notamment la prolifération. Le HGF, de par sa fixation à son récepteur cMet, favorise également la prolifération des hépatoblastes et des hépatocytes (Birchmeier *et al.*, 2003) ainsi que la migration des cellules via l'activation de la petite GTPase Arf6 (ADP ribosylation factor 6) (Suzuki *et al.*, 2006). La voie Wnt/ β -caténine favorise cette fois la croissance hépatique (McLin *et al.*, 2007 ; Tan *et al.*, 2008). Leur action est localisée à la périphérie du foie. Les acteurs de la voie TGF β (Smad2/3, Elf5 [E74-like factor 5] et le récepteur TGF β III) sont également impliqués dans le développement hépatique. En effet, leur déficit entraîne une hypoplasie du foie (Weinstein *et al.*, 2001 ; Tang *et al.*, 2003 ; Stenvers *et al.*, 2003). L'acide rétinoïque, qui est exprimé dans les cellules étoilées et le septum transversum, sous l'effet du facteur de transcription WT1 (Wilm's Tumor suppressor), contrôle la croissance du bourgeon hépatique (Ijpenberg *et al.*, 2007 ; Lemaigre, 2009).

f) Ségrégation des lignages hépatocytique et biliaire

La détermination hépatocytique ou biliaire des hépatoblastes a lieu au stade fœtal. En effet, les hépatoblastes sont des cellules bipotentes à la fois à l'origine des hépatocytes exprimant HNF4 α et des cholangiocytes exprimant les cytokératines 7 et 19 (CK7 et CK19). Les protéines p19^{arf} et TBX3 semblent jouer un rôle dans cette spécification dans la mesure où un déficit en TBX3, qui réprime p19^{arf}, entraîne la diminution de l'expression de HNF4 α et favorise la différenciation biliaire en augmentant l'expression de HNF6 et HNF1 β (Ludtke *et al.*, 2009 ; Suzuki *et al.*, 2008) (**Figures 7 et 8**). Une fois orientées dans le lignage hépatique, les cellules poursuivent la différenciation hépatocytaire via des signaux extracellulaires.

Avant leur migration dans la moelle osseuse, les cellules hématopoïétiques sont localisées dans le foie où elles favorisent la maturation des hépatoblastes via la sécrétion de l'OSM (Oncostatine M) et de protéines liées à l'IL6 (interleukine 6). L'OSM, en se liant au récepteur GP130, induit la voie de signalisation JAK/STAT3 et active ainsi des gènes de fonction métabolique comme la glucose-6-phosphatase (G6P ; enzyme de la glucogénèse) et la phosphoénolpyruvate carboxykinase

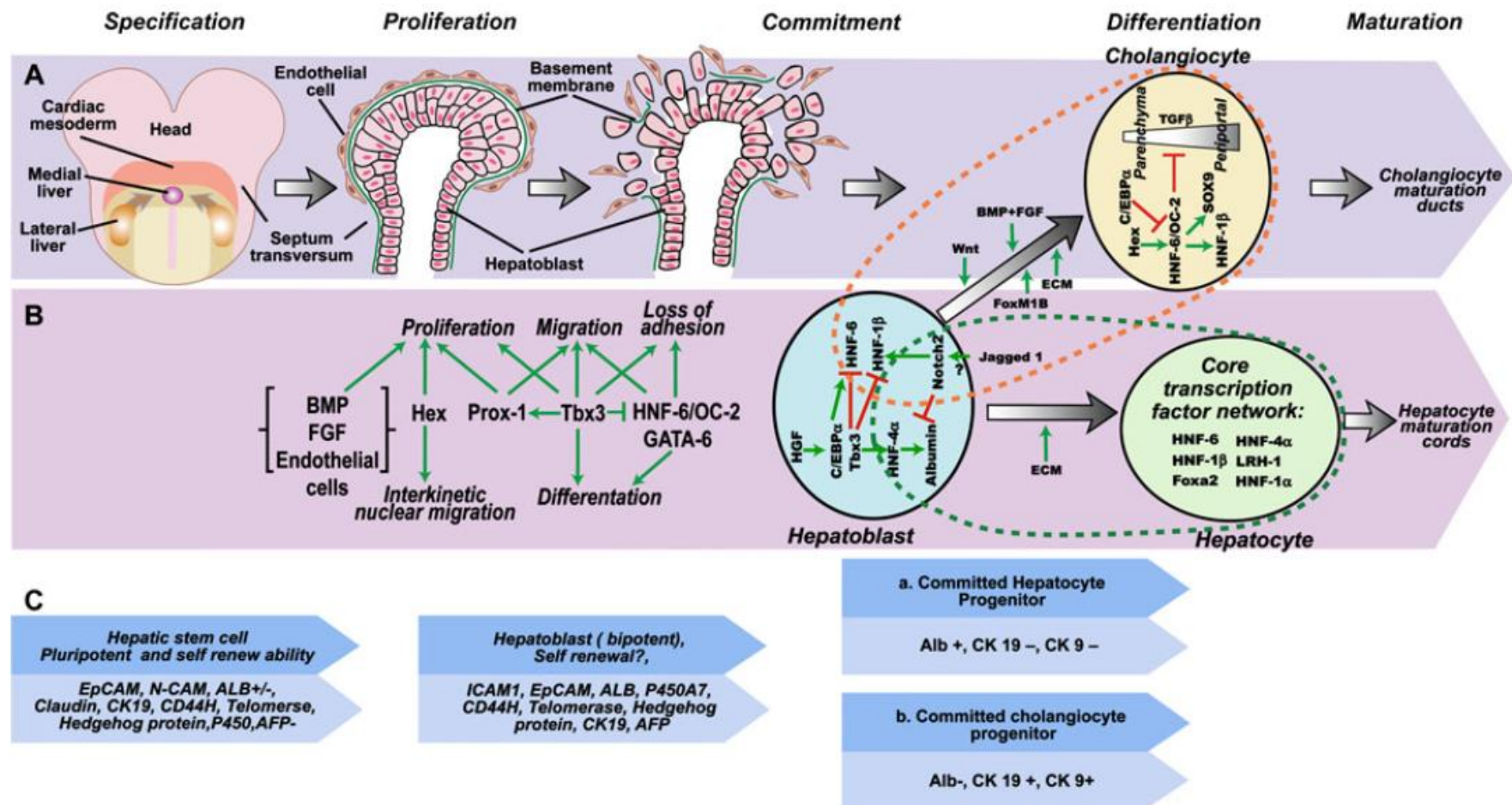


Figure 7. Mécanismes impliqués dans le développement du foie foetal. (A) Premières étapes du développement du foie et formation du bourgeon hépatique. (B) Facteurs de transcription impliqués dans le développement hépatique. Les hépatoblastes sont des cellules bipotentes pouvant donner naissance aux hépatocytes (vert) et aux cholangiocytes (orange). TBX3 et HNF4 α sont déterminants dans la différenciation hépatocytaire alors que HNF6 et HNF1 β sont essentiels pour la détermination biliaire. (C) Quelques marqueurs connus pour les différentes étapes du développement (D'après Behbahan *et al.*, Stem Cell Rev & Rep 2011).

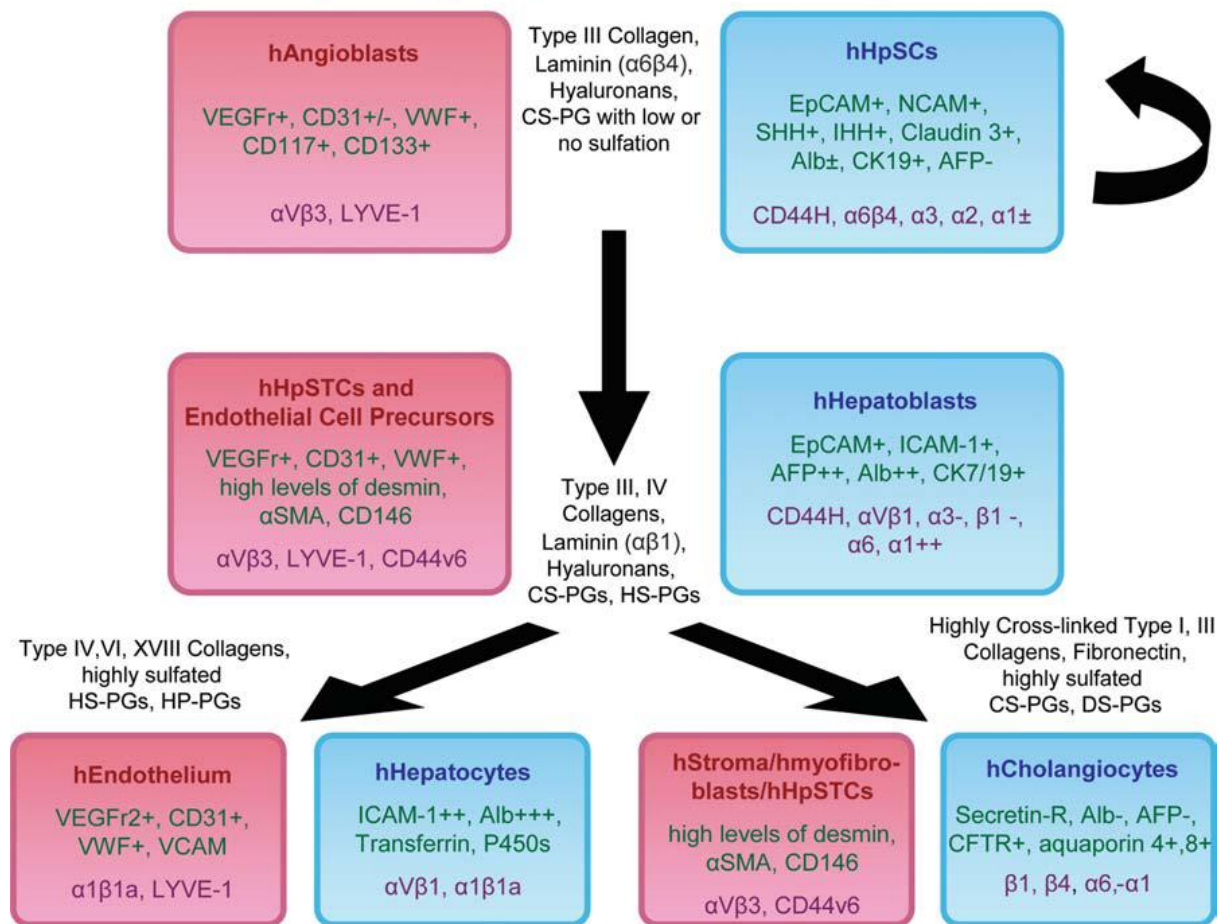


Figure 8. Maturation des cellules du parenchyme (en bleu) et de leurs partenaires du mésenchyme (en rouge) (Turner *et al.*, Hepatology 2011). Les cellules souches hépatiques qui expriment la molécule d'adhésion EpCAM se différencient en hépatoblastes, exprimant fortement l'AFP, qui sont à l'origine des hépatocytes (forte expression d'albumine) et des cholangiocytes. Les caractéristiques antigéniques des différents types cellulaires sont en vert et leurs récepteurs de la matrice en violet.

(PEPCK ; enzyme de la gluconéogénèse) (Ito *et al.*, 2003 ; Kamiya *et al.*, 1999). De plus, l'OSM coopère avec HGF et Wnt (Kamiya *et al.*, 2001 ; Suzuki *et al.*, 2003) et induit K-ras et l'E-cadhérine permettant aux hépatocytes de constituer un épithélium polarisé (Imamura *et al.*, 2007 ; Matsui *et al.*, 2002). De son côté, TNF α (Tumor Necrosis Factor) favorise le maintien de la prolifération et, par conséquent, la croissance du foie (Kamiya et Gonzales, 2004).

Ces facteurs régulent un grand nombre de facteurs de transcription clés dans le programme génétique hépatique (**Figure 7**) dont C/EBP α , HNF1 α , HNF4, FoxA1, FoxA2 et FoxA3 (HNF3 α , β et γ), le récepteur nucléaire aux hormones LRH (Liver Receptor Homolog). C/EBP α , exprimé également dans le foie adulte, régule l'expression des gènes impliqués dans l'homéostasie glucidique et lipidique du foie (Wang *et al.*, 1995) et contrôle négativement la prolifération des hépatocytes (Timchenko *et al.*, 1997). HNF4 α contrôle l'expression de gènes codant pour des protéines d'adhésion cellulaire ou de jonction, de gènes du métabolisme glucidique (gluconéogénèse et synthèse du glycogène) et est également impliqué dans la polarisation des hépatocytes (Parviz *et al.*, 2003). HNF1 α est impliqué dans le contrôle de gènes de fonctionnalité alors que FoxA2, en synergie avec HNF6, permet de contrôler des gènes hépatiques et de stimuler les voies de synthèse des acides biliaires. Le récepteur nucléaire LRH, quant à lui, contrôle le métabolisme des acides biliaires et du cholestérol.

Une fois la ségrégation des lignages hépatocytaire et biliaire établie, les deux types cellulaires poursuivent leur maturation y compris au-delà de la naissance. Cette phase entraîne l'acquisition des fonctions physiologiques et morphologiques du foie.

g) Les cellules souches hépatiques et progéniteurs bipotents hépatiques humains in vitro (Figure 8)

L'équipe de Lola Reid a pu isoler les sous-populations cellulaires, aussi bien dans des foies fœtaux (18-22 semaines de gestation), de nouveaux-nés, d'enfants et d'adultes. Les cellules souches hépatiques sont multipotentes et sont situées dans les canaux de Hering dans les foies pédiatriques et adultes. Ces canaux se sont avérés être issus des plaques ductales des foies fœtaux ou nouveaux-nés. Elles représentent 0,5% à 2% des cellules du parenchyme du foie à tout âge. Leur diamètre est de 7-9 μ m et elles ont un ratio nucléus/cytoplasme élevé. Elles expriment EpCAM (Epithelial Cell-Adhesion Molecule), NCAM(Neural Cell-Adhesion

Molecule), CD133, CXCR4, Sox9, Sox17, FoxA2, claudin 3, MDR1, les protéines Hedgehog (Sonic, Indian) et les cytokératines CK8, CK18 et CK19. Les cellules expriment très peu les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et n'expriment pas d'AFP (alpha-fetoprotein), ICAM (Intercellular Adhesion Molecule), ni les marqueurs hématopoïétiques, endothéliaux ou mésenchymaux (Zhang *et al.*, 2008). En culture, les cellules souches hépatiques forment des colonies capables d'auto-renouvellement et de se différencier en cellules matures. Elles sont amplifiées en étant placées en coculture avec les angioblastes ou sur des substrats de collagène III purifiés (Wang *et al.*, 2010). Elles sont notamment à l'origine des hépatoblastes.

Les hépatoblastes sont des cellules diploïdes et bipotentes à l'origine des lignages hépatocytiques et cholangiocytiques en association avec les précurseurs des cellules endothéliales et des cellules étoilées *in vivo*. Ils résident dans le parenchyme des foies fœtaux et de nouveau-nés et en petits groupes de cellules ou en cellules individualisées aux extrémités des canaux de Hering dans les foies pédiatriques et adultes. Leur proportion varie de 80% du parenchyme dans le foie fœtal à moins de 0,01% dans le foie adulte. En culture, ils peuvent être amplifiés en coculture avec de précurseurs de cellules étoilées ou sur des substrats de collagène IV, laminine et hyaluronanes (Wang *et al.*, 2010). Les hépatoblastes ont un diamètre de 10-12µm avec un ratio nucléus/cytoplasme plus faible. Tout comme les cellules souches hépatiques, ils expriment CXCR4, CD133, Sox17, MDR1, les protéines Hedgehog, CK8, CK18, CK19 et quelques cytochromes p450 spécifiques comme le Cyp3A7 mais pas les marqueurs hématopoïétiques, endothéliaux ou mésenchymaux. Les hépatoblastes expriment aussi ICAM-1, CK7, l'AFP mais plus NCAM (Zhang *et al.*, 2008).

Lola Reid considère qu'il existe également des progéniteurs plus engagés dans la différenciation qui sont diploïdes et unipotents avec un diamètre de 12-15µm. Ils ont perdu l'expression des marqueurs des cellules souches comme NCAM et les protéines Hedgehog et expriment soit des marqueurs hépatocytiques soit des marqueurs biliaires. Ils sont abondants dans les foies fœtaux et néo-nataux ainsi qu'au cours de maladies chroniques du foie mais pas dans les foies adultes sains. Les progéniteurs hépatocytiques expriment l'albumine, les enzymes associées à la synthèse du glycogène mais n'expriment pas les marqueurs biliaires comme CK19 ni l'AFP. Ils sont associés aux précurseurs des cellules endothéliales. Les progéniteurs

cholangiocytiques, ou petits cholangiocytes, sont des cellules biliaires diploïdes de 6-8µm de diamètre et avec une forme cuboïde. Ils ont un rapport nucléus/cytoplasme élevé et sont associés aux précurseurs des cellules étoilées. Ils sont localisés dans le même compartiment que les cellules souches au niveau des canaux de Hering. Ils expriment l'annexine V, bcl2 (B-cell lymphoma 2 protein), les récepteurs d'endothéline de type A (EDNRA) et B (EDNRB), l'insuline, l'histamine, l'acétylcholine, les agonistes α -1-adrénérergiques et l'aquaporine 4 (Turner *et al.*, 2011). Ces cellules seraient les précurseurs directs des hépatocytes et cholangiocytes fœtaux.

Il existe une régulation entre les cellules du parenchyme et du mésenchyme par signalisation paracrine (Wang *et al.*, 2010). La maturation de ces deux populations cellulaires est coordonnée et donne lieu à des gradients de signalisation paracrine lignage dépendant qui gouvernent les réponses biologiques des cellules à chaque étape de la maturation. La niche intrahépatique souche, où sont localisées les cellules souches hépatiques et les angioblastes, contient du collagène de type III, la forme de laminine capable de se lier à l'intégrine α 6 β 4, des hyaluronanes, un protéoglycane chondroïtine sulfate (CS-PG) faiblement sulfaté. La transition vers les hépatoblastes associés aux cellules endothéliales et aux précurseurs des cellules étoilées est due à des changements au niveau de ces molécules. Ainsi, ce compartiment cellulaire contient du collagène de type IV, la forme de laminine capable de se lier à l'intégrine α V β 1, des hyaluronanes, des CS-PGs d'avantage sulfatés ainsi que des protéoglycanes héparane sulfate (HS-PG). Les hépatocytes et leurs partenaires endothéliaux sont associés au réseau de collagènes (types IV et VI) et à des formes fortement sulfatées d'HS-PGs voire même d'HP-PGs (Heparin-PGs). Les cholangiocytes et les cellules étoilées sont, quant à eux, associés aux collagènes fibrillaires (types I et III) et à des CS-PGs hautement sulfatés comme les DS-PGs (Dermatan Sulfate-PGs) .

3- Cellules souches embryonnaires

3.1 Origine

Les cellules souches embryonnaires sont dérivées à partir de la masse interne du blastocyste d'embryons âgés d'environ cinq jours et initialement destinés à la

fécondation *in vitro*. A ce stade, l'embryon est sous la forme de blastocyste qui se compose de trois structures :

- La masse cellulaire interne située à une extrémité du blastocyste dont les cellules, les cellules embryonnaires souches, formeront l'ensemble des tissus de l'embryon ;
- Le blastocœle qui constitue une cavité au sein du blastocyste ;
- Le trophoblaste, une couche de cellules entourant le blastocœle et la masse cellulaire interne.

C'est donc à partir des cellules de la masse cellulaire interne que la première lignée de cellules souches embryonnaires (ES) humaines a été dérivée (**Figure 9**) par Thomson en 1998 (Thomson *et al.*, 1998). En culture, les cellules ES forment des colonies avec un rapport nucléus/cytoplasme élevé.

3.2 Propriétés

a) Propriétés moléculaires

Les premières lignées ont été dérivées à partir d'embryons ayant des caryotypes XX (H7, H9) ou XY (H1, H13, H14) normaux. Une de leurs principales caractéristiques est de pouvoir proliférer indéfiniment en raison d'une forte activité de la télomérase. Cette ribonucléoprotéine catalyse l'addition de courtes séquences répétées des centaines ou milliers de fois aux extrémités des chromosomes, les télomères. L'activité de la télomérase, combinée à d'autres mécanismes moléculaires, permet de maintenir les télomères à une longueur stable lors de divisions répétées (Zeng et Rao, 2007). La perte de cette activité entraîne la diminution des télomères causant ainsi la sénescence dans les cellules en division.

Les cellules ES humaines expriment des marqueurs de surface spécifiques du stade embryonnaire comme SSEA-3, SSEA-4 (Stage Specific Embryonic Antigen ; antigènes glycolipidiques), TRA1-60, TRA1-81 (Tumor Rejection Antigen 1 ; kératane sulfate antigènes) ou encore la phosphatase alcaline mais également des facteurs de transcription directement impliqués dans le maintien de la pluripotence tels que Oct4, Nanog et Sox2 qui seront abordés plus tard dans le chapitre des cellules souches pluripotentes induites.

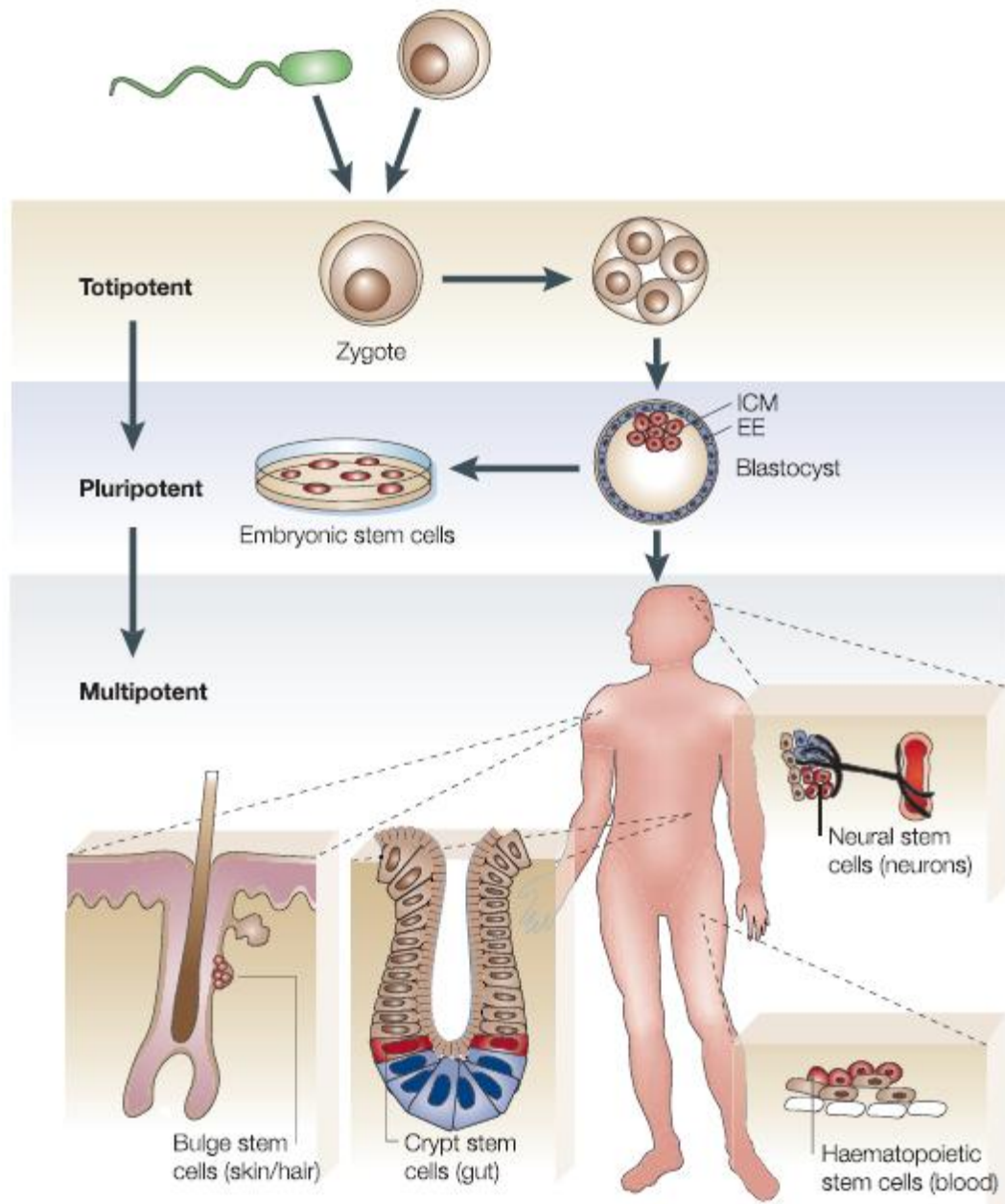


Figure 9. Les cellules souches embryonnaires humaines sont issues de la masse interne du blastocyste au quatrième ou cinquième jour de développement embryonnaire. En culture, elles ont le potentiel d'auto-renouvellement et la capacité de générer tous les types cellulaires issus des trois feuillets embryonnaires (Eckfeldt et al., 2005).

b) Pluripotence

Les cellules embryonnaires souches ont pour caractéristique d'être pluripotentes, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de générer l'ensemble des types cellulaires issus des trois feuillets primitifs (Thomson *et al.*, 1998) :

- l'ectoderme dont dérivent l'épiderme et le système nerveux ;
- l'endoderme dont dérivent le tube digestif et ses glandes annexes ;
- le mésoderme dont dérivent les muscles, le squelette, les vaisseaux sanguins.

Pour évaluer ce potentiel, les cellules ES sont transplantées dans les testicules de souris immunodéficientes afin d'observer, plusieurs semaines plus tard, la formation de tératocarcinomes. Il s'agit de tumeurs contenant des cellules dérivées des trois feuillets embryonnaires (Thomson *et al.*, 1998). On peut également cultiver ces cellules en présence de sérum et en suspension, sous forme de corps embryoides, sur une période de 2-3 semaines favorisant alors une différenciation spontanée en différents types cellulaires issus des 3 feuillets embryonnaires.

Il est important de bien comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le maintien de cet état indifférencié et de pluripotence des cellules de la masse interne *in vivo* afin d'établir les conditions de culture *in vitro* optimales. Notamment, le maintien de la pluripotence est en partie dû aux voies activine A/Nodal/TGF β , membres de la famille des *Transforming Growth Factors β* (TGF β) (Vallier *et al.*, 2009 ; Chng *et al.*, 2011). Les facteurs TGF β s se fixent à un complexe formé de récepteurs de type I et II qui, activé, phosphoryle les protéines Smad2/3 (mothers against decapentaplegic). Celles-ci se fixent ensuite à Smad 4 pour former un complexe alors transloqué dans le noyau afin de contrôler la transcription (Miyazawa *et al.* 2002). Il faut noter que cette voie de signalisation est également impliquée dans la différenciation en mésoderme ou endoderme confirmant le pléiotropisme de ces facteurs (D'amour *et al.*, 2005).

Un autre facteur est important en conditions de culture en l'absence de sérum : le FGF2 qui appartient à la famille des *Fibroblast Growth Factors* (FGFs). La voie de signalisation des FGFs interagit en effet avec d'autres voies importantes dans les cellules ES comme la voie TGF β , par la phosphorylation des Smads, on encore la voie Wnt, en contrôlant la phosphorylation de GSK3 β (Glycogen synthase kinase 3 β) par la PI3 kinase (Dailey *et al.*, 2005). Tout comme les TGF β s, les FGFs sont impliqués dans divers processus biologiques comme la prolifération, la différenciation

et l'apoptose. Le rôle de FGF2 sur la pluripotence est indirect en bloquant l'action de BMP4 qui réduit la capacité d'auto-renouvellement des cellules (Xu *et al.*, 2005).

La voie Wnt est également impliquée dans la régulation des cellules souches de par son rôle dans le contrôle de la transcription des gènes via son action sur la β -caténine. Il semblerait, néanmoins, que cette voie agisse d'avantage sur la prolifération cellulaire que sur la pluripotence (Dravid *et al.*, 2005). On peut également noter le rôle de la voie insuline sur l'autorenouvellement de par l'interaction du récepteur IGF1 avec les voies de signalisation EGF et FGF (Bendall *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2007).

3.3 Différenciation endodermique de cellules ES

Des études ont montré la possibilité d'établir la différenciation ectodermique, c'est-à-dire en épiderme (kératinocytes [Guenou *et al.*, 2009]) ou cellules du système nerveux (précurseurs neuronaux [Reubinoff *et al.*, 2001 ; Roy *et al.*, 2006 ; Cooper *et al.*, 2010]), à partir de cellules ES. De même, pour la différenciation mésodermique, des travaux ont révélé la possibilité de différencier *in vitro* les cellules ES vers la voie hématopoïétique (précurseurs hématopoïétiques [Cerdan *et al.*, 2004], lignage lymphoïde T [Galic *et al.*, 2006]) ou cardiaque (progéniteurs cardiaques [Tomescot *et al.*, 2007]). Nous allons nous attarder d'avantage sur la différenciation endodermique.

a) Différenciation spontanée

Les premiers travaux de différenciation hépatique utilisaient la culture en présence de sérum (Shirahashi *et al.*, 2004), la formation de corps embryonnaires (EBs : Embryoid Bodies) ou la combinaison des deux stratégies (Baharvand *et al.*, 2006). Les cellules des EBs étaient ensuite dissociées etensemencées sur divers supports, dont notamment le collagène de type I et la gélatine, pour poursuivre la différenciation hépatique. Le problème majeur de cette technique réside dans l'obtention de populations cellulaires très hétérogènes. Il est possible de le contourner en purifiant la population voulue à l'aide de gènes rapporteurs mais avec de faibles rendements. (Chiao *et al.*, 2008, Lavone *et al.*, 2004). Afin d'améliorer la différenciation, il semble primordial de reproduire les étapes du développement *in vivo* c'est-à-dire différencier les cellules ES en cellules hépatiques via la génération de cellules de l'endoderme définitif.

b) Différenciation endodermique

En 2005, D'Amour *et al.* ont établi un protocole de différenciation en endoderme définitif des cellules ES humaines en deux dimensions, sans passer par le stade de corps embryonnaire (D'Amour *et al.*, 2005). Les cellules souches étaient donc différenciées pendant cinq jours en présence d'activine A avec, comme résultat, 70-80% de cellules exprimant CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4) ainsi que des marqueurs endodermiques tels que Sox17 et Goosecoid. Au cours de cette différenciation, une diminution de l'expression de l'E-cadhérine combinée à une augmentation de l'expression de la N-cadhérine dans les cellules indiquaient une transition épithélio-mésenchymateuse. L'année suivante, la même équipe a apporté des modifications à ce protocole. Ainsi, pour obtenir des cellules de l'endoderme, les cellules souches étaient mises en présence de fortes doses d'activine A pendant trois jours avec une exposition au Wnt3a pendant vingt-quatre heures (D'Amour *et al.*, 2006). Il est bon de noter que, jusqu'ici, ces protocoles étaient réalisés en présence de sérum. Le protocole reproduit le développement embryonnaire dans la mesure où les cellules passent par une phase mésendodermique avant de se différencier en cellules de l'endoderme définitif comme l'atteste l'expression de marqueurs tels que Sox17, Mixl1, Goosecoid et CXCR4. Un autre groupe a induit la différenciation des cellules ES humaines en endoderme par la surexpression inducible de Sox17 amené aux cellules par un plasmide (Seguin *et al.*, 2008).

Si quelques études ont induit la différenciation endodermique des cellules ES humaines à l'aide de la combinaison de FGF1 et FGF4 (Baharvand *et al.*, 2008), la majorité des protocoles mettent les cellules souches en présence d'activine pendant trois à cinq jours (Agarwal *et al.*, 2008 ; Basma *et al.*, 2009 ; Cai *et al.*, 2007 ; Hay *et al.*, 2008a ; Hay *et al.*, 2008b ; Si-Tayeb *et al.*, 2010). Néanmoins, il existe des variations entre les différents protocoles, notamment au niveau de l'utilisation du sérum (variation de la concentration ou utilisation du SR [D'Amour *et al.*, 2006 ; Agarwal *et al.* 2008 ; Basma *et al.*, 2009], milieu enrichi en BSA [Cai *et al.*, 2007], supplément B27 [Si-Tayeb *et al.*, 2010 ; Hay *et al.*, 2008]). On note également l'ajout de molécules dans le but d'orienter les cellules d'endoderme obtenues vers la voie hépatique comme le facteur de croissance Wnt3a (Hay *et al.*, 2008a), un agent pouvant remodeler la chromatine de façon spécifique, le sodium butyrate (Hay *et al.*, 2008b).

c) Différenciation hépatique (**Figure 8**)

Une fois l'endoderme définitif obtenu, les cellules sont engagées dans la voie hépatique généralement en présence de HGF (Hepatocyte Growth Factor) (Agarwal *et al.*, 2008 ; Basma *et al.*, 2009 ; Hay *et al.*, 2008). Certains protocoles passent par une étape intermédiaire de spécification en endoderme hépatique en cultivant les cellules en présence de FGF2 et BMP4 (Cai *et al.*, 2007 ; Si-Tayeb *et al.*, 2010), pouvant ainsi améliorer la qualité des cellules hépatiques générées. Les cellules obtenues en fin de protocole expriment des marqueurs hépatiques comme l'AFP ou HNF4 α . De même, elles répondent positivement à des tests de fonctionnalité hépatique comme le stockage du glycogène (test de l'acide périodique de Schiff), l'internalisation du Dil-LDL (où le Dil, une molécule fluorescente, est couplé au LDL et alors capté et internalisé par le récepteur aux LDLs dans la cellule hépatique). Dans certaines de ces études, les cellules sont également capables de sécréter de l'albumine, de l'alpha-1-antitrypsine ou encore du fibrinogène même si les taux de sécrétion restent faibles en comparaison avec des hépatocytes primaires.

Récemment, une étude réalisée par Inamura *et al.* a démontré que la surexpression de hHex par transduction adénovirale dans des cellules de l'endoderme définitif issues des cellules ES pouvait promouvoir la génération d'hépatoblastes. Ainsi les cellules obtenues exprimaient l'AFP au neuvième jour de différenciation, CK7 (marqueur des cholangiocytes) ensuite, indiquant le début des différenciations hépatocytaire et biliaire. Les auteurs ont poursuivi la différenciation et les cellules exprimaient des marqueurs plus matures comme l'albumine, CK18, Cyp7A1, Cyp3A4. De plus, les cellules différenciées avaient une activité Cyp3A4. Néanmoins, l'expression de ces marqueurs dans les cellules obtenues s'est avérée inférieure à celle détectée dans le foie fœtal (Inamura *et al.*, 2011).

De leur côté, Ishii *et al.* ont transplanté des cellules AFP-positives dérivées de cellules ES humaines dans la rate de souris et ont prouvé la prise de greffe autour de la veine porte de celles-ci sept jours après transplantation et leur prolifération dans le foie hôte après trente-cinq jours, représentant alors 33% de ce dernier (Ishii *et al.*, 2007). Dans cette étude, des tératomes (tumeurs incluant des cellules issues des trois feuilletts embryonnaires : épithélium squameux, muscle, épithélium intestinal) ont également été observés dans la rate des souris soixante et quatre-vingt-dix jours après transplantation.

Le groupe de SA Duncan a aussi observé la prise de greffe sept jours après transplantation de cellules différenciées dans le lobe latéral droit du foie de souris nouveaux-nés (Si-Tayeb *et al.*, 2010). Des cellules positives pour l'albumine humaine ont en effet été retrouvées dans le lobe injecté mais pas dans les autres.

Enfin, de rares groupes ont également démontré une prise de greffe des cellules différenciées à court terme chez la souris après une injection par voie splénique. Tout d'abord, le groupe de IJ Fox a transplanté des cellules différenciées dans la rate de souris NOD/SCID ayant subi une hépatectomie partielle de 50% (Basma *et al.*, 2009). Les auteurs ont constaté la présence d'albumine et d'AAT humaines dans le sérum des souris trois semaines après transplantation. Néanmoins, la formation de tératomes a été constatée dans le foie, la rate et la cavité péritonéale en raison de la présence de cellules faiblement différenciées. Pour remédier à ce problème, les auteurs ont voulu isoler une population hépatocytaire exprimant le récepteur à l'asialoglycoprotéine (ASGPR) par cytométrie de flux. Ces cellules ont alors été transplantées dans des souris Alb-uPA SCID ou dans des rats immunodéficients. Là encore, soixante-quinze jours après transplantation, l'albumine et l'AAT humaines ont été détectées dans le sang des souris. Si aucune tumeur ne s'est formée dans le foie, des adénocarcinomes ont été constatés dans la cavité péritonéale des animaux .

En 2007, Cerec *et al.* ont obtenu une population hépatocytaire à partir de cellules HepaRG, des cellules issues d'hépatome humain. En effet, après avoir mis les cellules HepaRG en présence d'insuline et de corticostéroïdes, les auteurs ont généré des cellules indifférenciées exprimant, entre autres, NCAM, ABCG2 , CK18 et CK19, proliférant activement durant quelques jours pour ensuite être engagées dans les différenciations hépatocytaire et biliaire. Ces cellules ont alors été mises en culture en présence d'insuline et de corticostéroïdes et de 2% de diméthylsulfoxyde (DMSO) durant deux semaines afin d'obtenir des cellules « hepatocyte-like », exprimant CYP3A4, CK18, HNF1 α , HNF4 α et l' α 1 intégrine, et capables de se comporter, à forte densité, comme des hépatocytes normaux lors de la régénération du foie, et des cellules « biliary-like », exprimant notamment CK19 et l' α 6 intégrine. Les cellules HepaRG obtenues, que ce soit au stade progéniteurs ou cellules différenciées hépatocytiques et biliaires ont été transplantées dans la rate de souris uPA/SCID (5.10^5 cellules) et ont montré une certaine capacité à repeupler le foie endommagé de ces souris avec une différenciation préférentiellement hépatocytaire des cellules transplantées (Cerec *et al.*, 2007).

Dans une optique thérapeutique, il est important de préciser que les protocoles établis ne sont pas dénués de produits animaux mais également que les cellules générées ne sont pas des hépatocytes matures comme le prouve l'expression de l'AFP (présente dans les hépatoblastes et s'atténuant au cours de la maturation des hépatocytes).

Chapitre 2: L'hypercholestérolémie familiale

1- Généralités

L'hypercholestérolémie familiale est une maladie métabolique du foie à transmission autosomale dominante due à une mutation affectant la structure et la fonction d'un récepteur situé à la surface cellulaire et qui permet l'internalisation des LDLs (Low Density Lipoproteins: lipoprotéines à faible densité) de la circulation sanguine. Par conséquent, la maladie résulte en une concentration élevée permanente du cholestérol lié aux LDLs dans le sang. Cela conduit à des maladies coronariennes prématurées, des dépôts de cholestérol formant des xanthomes, des plaques d'athérosclérose ou des gérontoxons (arcs séniles de la cornée). Il existe deux formes d'hypercholestérolémie familiale : la forme hétérozygote (un allèle muté) avec une prévalence d'un cas sur cinq cent naissances et la forme homozygote (deux allèles mutés avec mutations identiques [vrais homozygotes] ou différentes [mutations mixtes] sur les deux allèles du gène) dont la prévalence est d'un cas sur un million. Chez les patients homozygotes, la maladie s'avère plus sévère que chez les patients hétérozygotes (Goldstein *et al.*, 2001).

1.1 Historique

Si le diagnostic combiné de xanthomes au niveau des tendons et d'atéromes dans les artères était décrit avant 1900, ce n'est que dans les années 1930 que Müller et Thannhauser ont suggéré une cause génétique à l'hypercholestérolémie et ses symptômes (Müller, 1938 ; Thannhauser et Magendantz, 1938). Dans les années 1960, les études de Khachadurian, au Liban, ont permis pour la première fois de prouver que la maladie était due au déficit d'un seul gène et également d'identifier les différences entre les patients hétérozygotes et homozygotes (Khachadurian, 1964). Au cours des années 1950, Gofman et ses collègues ont démontré, à l'aide de l'ultracentrifugation analytique, que l'hypercholestérolémie familiale était due à une augmentation sélective de la concentration d'une lipoprotéine, le LDL, dans le plasma (Gofman *et al.*, 1954). Dans les années 1960, Fredrickson, Levy et Lees ont suggéré que l'hypercholestérolémie familiale impliquait à la fois le métabolisme de l'apoprotéine et du cholestérol composant le LDL (Fredrickson *et al.*, 1967). Goldstein

et Brown ont découvert, dans les années 1970, l'existence du récepteur aux LDLs à la surface de fibroblastes de patients atteints de la forme homozygote de l'hypercholestérolémie familiale. Ils ont également démontré que la maladie était due à des mutations dans la séquence codant pour le gène de ce récepteur (Goldstein et Brown, 1974). La protéine de ce récepteur, une glycoprotéine acide de 164 000 Daltons de poids moléculaire, a été purifiée en 1982 (Schneider *et al.*, 1982). Son ADN complémentaire a été cloné chez le bovin en 1983 (Russel *et al.*, 1983) et le gène a été isolé et caractérisé en 1985 (Südhof *et al.*, 1985). L'étude de la protéine et notamment de son module de liaison au ligand ainsi que de sa régulation par rétroaction, impliquant le clivage protéolytique régulé par des stérols de facteurs de transcription liés à la membrane appelés SREBPs (Sterol Regulatory Element Binding Proteins) a été réalisé en 1997 (Brown et Goldstein, 1997).

1.2 Clinique

Chez les patients atteints de la forme hétérozygote de l'hypercholestérolémie familiale, la première et la seule manifestation clinique de la première décennie est l'hypercholestérolémie qui survient dès la naissance avec une concentration moyenne de cholestérol dans la circulation de 350mg/dL (contre environ 150mg/dL chez les individus sains). Les xanthomes du tendon et les gérontoxons apparaissent à la fin de la deuxième décennie alors que les symptômes de maladies coronariennes débutent durant la quatrième décennie (5% des cas à trente ans, 51% à cinquante ans et 85% à soixante ans). Chez les patients homozygotes, l'hypercholestérolémie présente à la naissance est plus sévère avec une concentration moyenne de 600 à 1200mg/dL de cholestérol, et plus précisément de LDLs, dans le sang circulant ainsi que des dépôts lipidiques dans les cellules stromales (dans le thymus, la rate, la peau, les reins) (Buja *et al.*, 1979). Des xanthomes cutanés de couleur jaune-orange, présents dès la naissance, se développent chez pratiquement tous les homozygotes à l'âge de quatre ans. Les xanthomes au niveau des tendons, les gérontoxons et une athérosclérose généralisée surviennent dès l'enfance alors que la mort prématurée due à un infarctus du myocarde se produit généralement avant les trente ans (Kwiterovich *et al.*, 1974 ; Goldstein *et al.*, 2001). Les patients homozygotes sont divisés en 3 groupes selon le pourcentage d'activité des récepteurs aux LDLs. Cette activité est inférieure

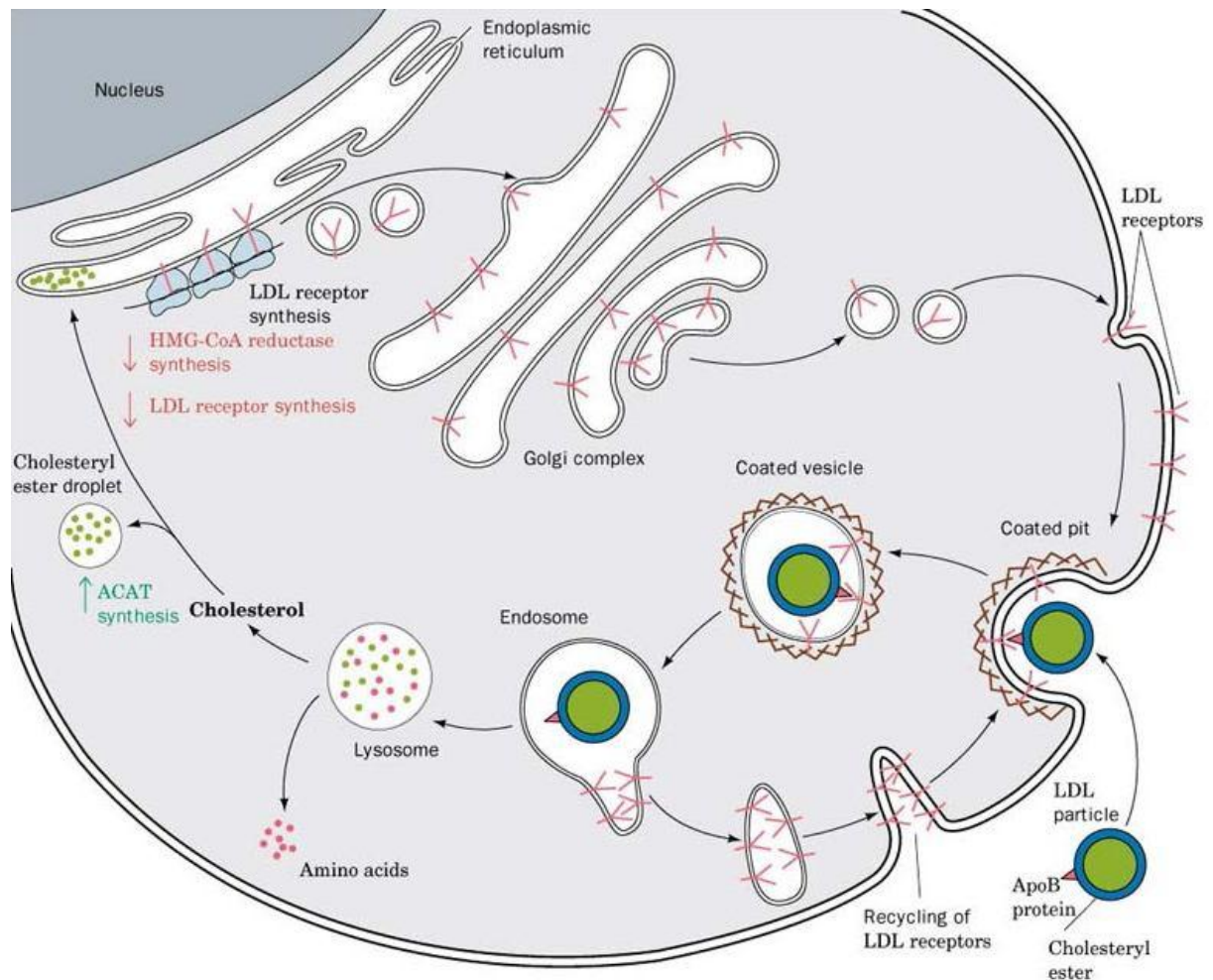


Figure 10. Cycle du récepteur aux LDLs dans les cellules mammifères. Le récepteur est synthétisé dans le réticulum endoplasmique à partir duquel il migre vers l'appareil de Golgi, la surface, les vésicules enveloppées, l'endosome et retourne à la surface.

à 2 % de la normale pour le premier groupe , comprise entre 2 et 10% pour le deuxième groupe et enfin supérieure à 10% pour le dernier groupe. On note que le premier groupe est d'avantage prédisposé à une mort coronaire à un âge jeune (35% de patients morts précocément dont la moitié avant quinze ans). Cette prédisposition est plus réduite dans le second groupe (environ 20% de patients morts précocément dont le tiers avant quinze ans) alors que dans le troisième groupe, on dénombre peu de patients morts précocément (5%) et aucune mort très précoce (avant quinze ans) (Goldstein *et al.*, 2001).

2- Métabolisme du cholestérol

Joseph Goldstein et Michael Brown ont été récompensés en 1985 par un prix Nobel de Physiologie/Médecine pour leur travaux sur la régulation du métabolisme du cholestérol. Pour leur étude, ils ont utilisé des fibroblastes humains en culture. Les cellules de mammifère nécessitent l'acquisition de cholestérol pour survivre en culture *in vitro*, que ce soit de source exogène ou encore provenant de la reprise de la synthèse par les cellules (en présence de sérum animal). Le cholestérol est un élément indispensable de la membrane plasmique de la cellule où il module la fluidité de la bicouche phospholipidique. Il est également impliqué dans la régénération hépatique par sa contribution dans la production et la réparation des membranes cellulaires. En cas de concentration trop importante de cholestérol au sein de la cellule, le surplus est estérifié avec un acide gras à longues chaînes et emmagasiné dans le cytoplasme sous forme de gouttelettes d'ester de cholestérol (Goldstein et Brown, 1977). Les cellules cultivées *in vitro* utilisent préférentiellement le cholestérol lié aux LDLs présents dans le sérum contenu dans le milieu de culture. Les cellules doivent donc internaliser les LDLs et ceci est permis par un récepteur de surface se liant aux LDLs par interaction avec l'apoprotéine B-100 de ceux-ci (Brown et Goldstein, 1983).

2.1 Cycle du récepteur aux LDLs

Le récepteur aux LDLs (RLDL) humain est une glycoprotéine de 839 acides aminés contenant deux chaînes complexes d'oligosaccharides liées à l'asparagine (N-linked) et environ dix-huit chaînes d'oligosaccharides liées à la sérine ou à la thréonine (O-

linked) (Schneider *et al.*, 1982 ; Cummings *et al.*, 1983). Deux tiers des sucres O-linked sont regroupés dans la région attenante à la membrane plasmique. Il existe deux ligands protéiques au RLDL : l'apoprotéine B-100 (Apo B-100 ; 514kDa), qui est l'unique composante protéique des LDLs, et l'apoprotéine E (Apo E ; 34kDa), que l'on trouve en multiples exemplaires dans les VLDLs (Very Low Density Lipoproteins/lipoprotéines de très basse densité ; responsables du transfert des lipides endogènes de leur lieu de synthèse, le foie, vers les tissus), les IDLs (Intermediate Density Lipoproteins/lipoprotéines de densité intermédiaire ; responsables du transport de molécules de cholestérol, libre ou estérifié, et de triglycérides dans le sang) et une sous-classe de HDLs (High Density lipoproteins/lipoprotéines de haute densité ; responsables du transport du cholestérol vers le foie où il peut être éliminé). En raison de leurs nombreuses copies de Apo E, ces lipoprotéines se lient au RLDL avec une affinité jusqu'à vingt fois plus importante que les LDLs avec leur unique copie de Apo B-100.

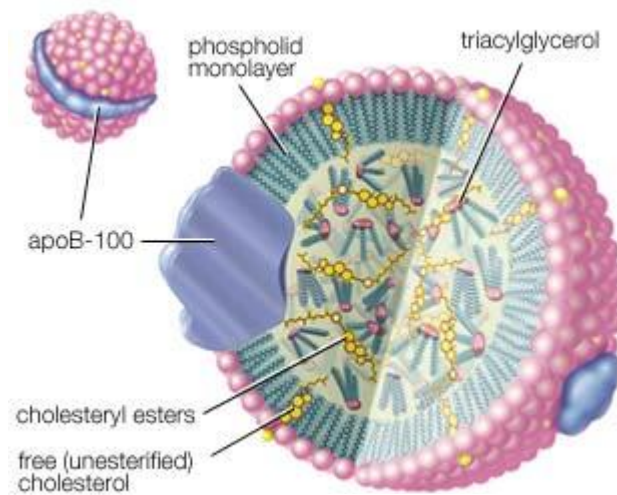
Le RLDL est synthétisé dans le réticulum endoplasmique rugueux sous forme de précurseur de 120kDa contenant des chaînes glucidiques N-linked à haute teneur en mannose et le sucre de base des chaînes O-linked (N-acétylgalactosamine) (**Figure 10**). Ce sucre est ajouté avant les résidus mannose c'est-à-dire quand le récepteur est encore sensible à l'endoglycosidase H. Le précurseur transite par l'appareil de Golgi et augmente en poids moléculaire (160 kDa), ce qui coïncide avec la conversion des chaînes oligosaccharidiques N-linked en un complexe résistant à l'endoglycosidase H ainsi qu'à l'addition d'un galactose et d'un ou deux résidus d'acide sialique allongeant les chaînes O-linked qui entraîne un changement de conformation de la protéine. Quarante-cinq minutes après leur synthèse, les récepteurs aux LDLs apparaissent à la surface cellulaire où ils se rassemblent dans des vésicules à manteau de clathrine, des zones où la membrane plasmique est doublée par une protéine fibreuse ubiquitaire, la clathrine, à la surface cytoplasmique. C'est dans ces régions que les RLDL peuvent capter leur ligands. Dans les cinq minutes suivant leur formation, ces vésicules s'invaginent pour former des vésicules endocytiques enveloppées. Très rapidement, le manteau de clathrine se dissocie et de nombreuses vésicules fusionnent en de larges sacs aux contours irréguliers appelés endosomes. Le pH de ces compartiments cellulaires devient acide ce qui permet la dissociation des LDLs du récepteur. Les RLDL se regroupent alors dans une vésicule de recyclage, formée par le pincement d'un segment de la membrane

de l'endosome, afin de retourner à la surface cellulaire et se lier de nouveau à des LDLs. Ce cycle dure dix minutes et se répète continuellement, que le récepteur se soit lié ou non à son ligand. De leur côté, les LDLs internalisés sont délivrés dans le lysosome après la fusion des membranes de l'endosome et du lysosome formant l'endolysosome. Les LDLs y sont dégradés par des enzymes hydrolytiques acides. L'apoprotéine est ainsi hydrolysée en acides aminés par des protéases tandis que les esters de cholestérol sont hydrolysés par une lipase acide. Le cholestérol obtenu traverse la membrane lysosomale, aidé par la protéine membranaire NPC1 (Niemann-Pick disease type C1), pour être utilisé dans la synthèse membranaire ainsi qu'en tant que régulateur de l'homéostasie intracellulaire du cholestérol. En effet, ce cholestérol inhibe l'activité de la 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA réductase (HMG-CoA réductase), une enzyme contrôlant la biosynthèse du cholestérol, réduisant donc la synthèse du cholestérol au sein de la cellule. De plus, le cholestérol active l'acyl-coenzyme A : cholesterol acyltransférase (ACAT), une enzyme estérifiant le cholestérol, de sorte que l'excès de cholestérol puisse être stocké sous forme d'esters de cholestérol. Enfin, la synthèse des récepteurs aux LDLs est également interrompue afin de prévenir l'entrée de LDLs en protection des cellules contre une surcharge de cholestérol. Ce système permet donc de coordonner les sources intracellulaires et extracellulaires de cholestérol dans le but de maintenir un niveau constant de cholestérol dans la cellule face aux fluctuations dans l'approvisionnement des lipoprotéines. Un grand nombre de cellules de mammifères, dont les fibroblastes humains sont capables de se développer en l'absence des LDLs grâce à leur capacité à synthétiser le cholestérol à partir d'acétyl-CoA. Néanmoins, lorsque les LDLs sont disponibles, les cellules utilisent préférentiellement le cycle du RLDL comme source de cholestérol et répriment leur propre système de synthèse (Goldstein et Brown., 1985 ; Goldstein *et al.*, 2001).

2.2 Gène du récepteur aux LDLs

Le gène du RLDL humain est situé à l'extrémité distale du petit bras du chromosome 19 (p13.1-p13.3) et s'étend sur 45kb divisés en dix-huit exons et dix-sept introns. Le premier exon correspond à une courte séquence non traduite en 5' et 21 acides aminés hydrophobes constituant la séquence signal. Cette séquence est dissociée de la protéine mature de 839 acides aminés durant la translocation dans le réticulum endothélial. Les exons 2 à 6 codent pour le domaine de liaison au ligand (292

A



B

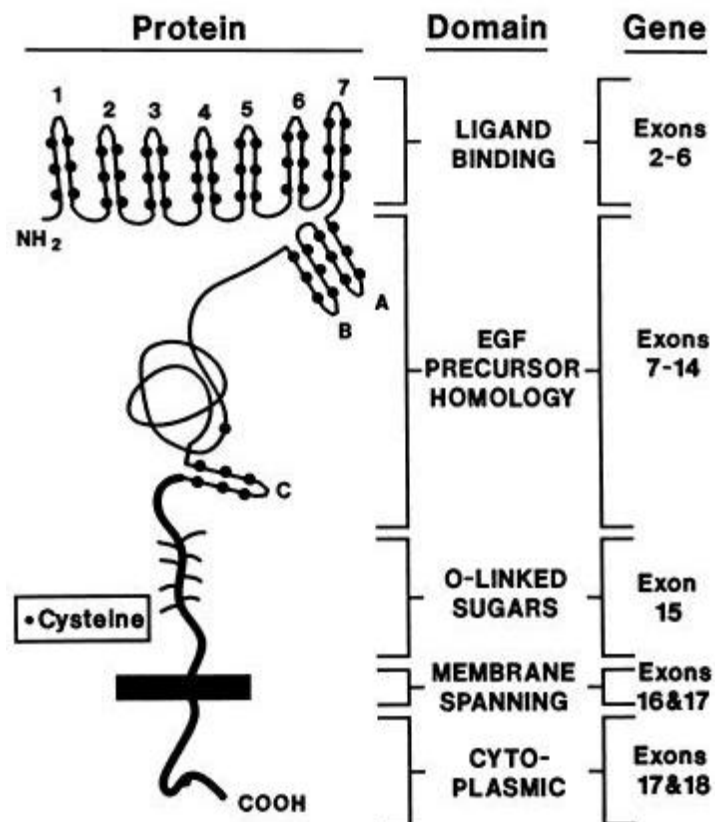


Figure 11. Les LDLs et leur récepteur. (A) Structure des LDLs. (B) Corrélation entre les exons du gène LDLR (à droite) et les domaines fonctionnels de la protéine mature (à gauche). L'exon 1, non indiqué ici, code pour une séquence signal de 21 acides aminés qui est clivée lors de la synthèse dans le réticulum endoplasmique (D'après Hobbs *et al.*, 1990).

acides aminés) qui se constitue de 7 répétitions en tandem d'environ 40 acides aminés et contenant six résidus cystéine qui forment trois ponts dissulfures chacun. Un groupe d'acides aminés chargés négativement (Asp-X-Ser-Asp-Glu : DxSDE) se trouve à l'extrémité C-terminale de ces répétitions. En parallèle, Apo B-100 et Apo E possèdent de courtes séquences riches en acides aminés basiques contenant le site de liaison au RLDL. En effet, ces régions chargées positivement se lient aux groupements DxSDE chargés négativement par interactions ioniques. Chacune de ces sept régions riches en cystéines est codée par un seul exon sauf les répétitions 3, 4 et 5 (**Figure 11**) qui sont codées par l'exon 4. La délétion d'une des répétitions en tandem 2 à 6 entraîne une perte de la liaison aux LDLs de 95%.

Les exons 7 à 14 correspondent à une séquence de 400 acides aminés ayant 33% d'homologie avec une portion du précurseur de l'EGF (Epidermal Growth Factor) humain. Cette homologie est nécessaire à la dissociation acide-dépendante entre les lipoprotéines et le récepteur dans l'endosome durant le recyclage du RLDL, ainsi qu'au bon positionnement du domaine de liaison au ligand pour qu'il puisse se lier aux LDLs à la surface cellulaire.

L'exon 15 code pour 58 acides aminés riches en résidus sérine et thréonine dont un grand nombre sert de site d'attachement aux chaînes glucidiques O-linked. L'exon 16 et la partie 5' de l'exon 17 correspondent à 22 acides aminés hydrophobes comprenant le domaine transmembranaire qui permet à la protéine de s'ancrer dans la membrane cellulaire. Le reste de l'exon 17 ainsi que la partie 5' de l'exon 18 codent pour 50 acides aminés qui forment le domaine cytoplasmique contenant à la fois un signal favorisant la localisation du RLDL dans les vésicules à clathrine et un signal ciblant le RLDL à la surface sinusoïdale des hépatocytes polarisés. Le reste de l'exon 18 représente la région 3' non traduite de l'ARN messager (2,6kb) (Hobbs *et al.*, 1990).

La région flanquante en 5' est impliquée dans la régulation de l'expression du gène via les stéroïdes par les séquences cis qu'elle contient. En effet, elle comporte trois répétitions directes de seize paires de bases chacune, deux TATA-boxes (séquences riches en adénine/thymine) et un groupe de sites d'initiation de l'ARNm, tous impliqués dans la transcription. Deux des répétitions directes (la 1 et la 3) interagissent avec le facteur de transcription Sp1 (Specificity protein 1) pour promouvoir la transcription du gène RLDL grâce à la contribution de l'autre répétition qui contient le site SRE-1 (Sterol Regulatory Element 1, 10pb). Ce site permet la

liaison de la forme active des protéines SREBPs (SRE Binding Proteins) en absence de stérols (Brown et Goldstein, 1997).

3- Mutations impliquées dans l'hypercholestérolémie familiale

3.1 Mutations du gène RLDL

La grande majorité des mutations impliquées dans l'hypercholestérolémie familiale touche le gène du RLDL (environ 70% des formes dominantes). Il existe plus de mille mutations connues de ce gène (<http://www.ucl.ac.uk/fh/>). On trouve principalement des substitutions de bases (environ 75%), mais aussi des délétions (environ 20%) et des insertions (environ 5%). Ces mutations sont classées en cinq classes selon leur effet phénotypique sur la protéine. 20% des mutations du gène RLDL touchent l'exon 4. A l'inverse, les mutations touchant l'exon 15 sont rares. On trouve également de rares mutations du promoteur du gène au niveau du site de reconnaissance de Sp1, délétions ou substitutions de bases, entraînant ainsi une production de RLDL équivalente à 5-10% de la production normale (Brown et Goldstein, 2001).

a) Mutations de classe 1

Les mutations de classe 1 empêchent la production de protéine (allèles nuls). En effet, la capacité de liaison, d'internalisation et de dégradation des LDLs est inférieure à 2% de la capacité normale. Le LDL ne réprime donc pas l'activité de la HMG-CoA réductase ni la synthèse de cholestérol et n'active pas la formation d'esters de cholestérol. De multiples défauts moléculaires peuvent être à l'origine d'allèles nuls comme les délétions du promoteurs qui ne produisent pas d'ARNm ou encore des mutations non sens, des mutations déphasantes (décalage du cadre de lecture), ou encore des mutations altérant l'épissage.

b) Mutations de classe 2

Les mutations de classe 2 entraînent la production de protéines bloquées complètement (classe 2A) ou partiellement (classe 2B) dans le transport entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (allèles transport-déficients). Comme il a été mentionné précédemment, normalement, le RLDL est synthétisé dans le

réticulum endoplasmique sous forme de précurseur de 120kb et rejoint ensuite l'appareil de Golgi où le récepteur prend sa forme active de 160kb durant l'heure qui suit sa synthèse. Dans le cas de mutations de classe 2 du gène RLDL, le transport entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi est retardé ou aboli et le récepteur reste sous forme de précurseur. Le récepteur est même dégradé sans avoir atteint la surface cellulaire. Les mutations de classe 2B, pour lesquelles le récepteur atteint l'appareil de Golgi en faible quantité et ensuite la surface cellulaire, sont les plus fréquentes. Au contraire, les mutations de classe 2A (20% des mutations de classe 2) empêchent complètement le transit du récepteur vers l'appareil de Golgi et donc sa maturation. Les mutations de classe 2 englobent des mutations non sens ou des délétions au sein du cadre de lecture qui bouleversent partiellement ou complètement la conformation du récepteur. Une grande partie de ces mutations se produisent dans les exons codant pour le domaine de liaison au ligand (classe 2B) ce qui, en plus du faible taux de récepteurs matures atteignant la surface cellulaire, bloque la liaison aux LDLs. Le reste des mutations de classe 2 sont situées dans la région d'homologie au précurseur de l'EGF (classe 2A).

c) Mutations de classe 3

Les mutations de classe 3 entraînent la production de protéines transportées à la surface cellulaire mais dans l'impossibilité de se lier aux LDLs normalement (allèles liaison-déficients). Certaines mutations de classe 3 entraînent un transport intracellulaire normal malgré le déficit de liaison au ligand. Celles-ci sont, pour la plupart, dues à des réarrangements dans le cadre de lecture et plus précisément au niveau des répétitions riches en cystéines du site de liaison au ligand ou encore dans le domaine d'homologie au précurseur de l'EGF. La délétion d'une de ces régions modifie la capacité de liaison aux LDLs et la délétion de l'ensemble de ces régions rend l'attachement impossible. Ceci indique donc que cette région est impliquée dans l'accession des LDLs au site de liaison du ligand en plus de son rôle dans le recyclage du récepteur. Les insertions dans le domaine de liaison aux LDLs font aussi partie des mutations de classe 3 et n'ont aucune conséquence sur la production du récepteur, ni son internalisation ou son recyclage, mais réduit sa capacité de liaison aux LDLs.

d) Mutations de classe 4

Les mutations de classe 4 entraînent la production de protéines transportées à la surface cellulaire, se liant normalement aux LDLs mais ne pouvant pas se regrouper dans les vésicules à clathrine et donc internaliser les LDLs (allèles internalisation-déficients). Au lieu de cela, les RLDL sont distribués sur l'ensemble de la surface cellulaire. Ces mutations rares altèrent le domaine cytoplasmique du récepteur et se divisent en deux classes. Lorsque les mutations ne touchent que le domaine cytoplasmique, il s'agit de la classe 4A alors que les mutations influant sur le domaine cytoplasmique et le domaine transmembranaire sont regroupées dans la classe 4B pour laquelle la plupart des récepteurs se retrouvent sécrétés.

e) Mutations de classe 5

Les mutations de classe 5 entraînent la production de récepteurs pouvant se lier aux LDLs et les internaliser dans les vésicules à clathrine mais incapables de libérer le ligand dans l'endosome et d'être recyclés à la surface cellulaire (allèles recyclage-déficients). Les mutations en cause sont principalement des mutations qui touchent le domaine d'homologie au précurseur d'EGF qui, en plus de son rôle dans la liaison récepteur-ligand, sert de médiateur dans la dissociation acide dépendante du récepteur et du ligand dans l'endosome. Les récepteurs se trouvent donc dégradés avec les LDLs au lieu d'être recyclés et réexpédiés vers la surface membranaire.

3.2 Mutations du gène Apo B

Une maladie, la déficience familiale en Apo B (FDB : Familial Defective Apolipoprotein B-100) (autosomale dominante), est la conséquence de mutations sur le gène Apo B et a des manifestations cliniques comparables à celles de l'hypercholestérolémie familiale. En effet, l'Apo B est le principal ligand du RLDL sous sa forme Apo B-100 qui constitue la partie protéique des LDLs. Son gène (43kb, 29 exons) est localisé sur le petit bras du chromosome 2 (p2.23-p2.24). La mutation la plus fréquente touchant ce gène est une mutation qui consiste en la substitution d'une arginine par une glutamine en position 3500 (R3500Q, exon 26) dans le domaine de liaison au récepteur (Soria *et al.*, 1989). L'attachement entre le LDL et le RLDL est donc réduit (10% de l'activité normale) tout comme l'internalisation du ligand (environ 30% de l'activité normale) (Innerarity *et al.*, 1990).

D'autres mutations (substitutions), également situées dans l'exon 26, ont été répertoriées (Varret *et al.*, 2008).

3.3 Mutations du gène PCSK9

Le gène PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) est également impliqué dans l'hypercholestérolémie familiale (Abifadel *et al.*, 2003). Il est situé sur le petit bras du chromosome 1 (p1.32) et comporte douze exons. PCSK9 est une proprotéine convertase de la sous-famille des protéinases K exprimée dans le foie et l'épithélium intestinal de façon prédominante, puis dans les reins et les neurones. Au niveau du foie, PCSK9 est impliquée dans la régénération hépatique (Seidah *et al.*, 2003). Concernant le métabolisme du cholestérol, PCSK9 inhibe l'expression du LDLR en se liant au domaine extracellulaire de ce dernier et en induisant sa dégradation intracellulaire dans les lysosomes. La régulation de PCSK9 au niveau transcriptionnel par les stérols est médiée par la voie de signalisation des SREBPs et plus précisément par SREBP2 via les régions SRE (Sterol Response Elements) contenues dans son promoteur mais aussi par HNF1 (Li *et al.*, 2009). Les rares mutations connues (forme autosomale dominante) sont dues à des substitutions ponctuelles avec, pour conséquence, une surexpression du gène entraînant un retard de 30% du catabolisme des LDLs (Ouguerram *et al.*, 2004).

3.4 Mutations du gène LDLRAP1

Les mutations dans le gène LDLRAP1 (Low Density Lipoprotein Receptor Adapter Protein 1) sont impliquées dans une forme autosomale récessive d'hypercholestérolémie (Kachadurian et Uthman, 1973). Ce gène est localisé sur le petit bras du chromosome 1 (p1.35-p1.36). Ce gène code pour une protéine cytosolique contenant un domaine se liant aux phosphotyrosines (PTD) identifié pour interagir avec la queue cytoplasmique du récepteur aux LDLs mais également pouvant se lier aux clathrines et donc servir de modulateur à l'endocytose en ancrant les récepteurs dans les vésicules à clathrine (Gotthardt *et al.*, 2000). Quasiment toutes les mutations connues de ce gène modifient le cadre de lecture empêchant ainsi la synthèse de la protéine (mutations nulles) (Arca *et al.*, 2002).

4- Traitements de l'hypercholestérolémie familiale

4.1 Patients hétérozygotes

Un régime diététique peut limiter la concentration de LDLs dans le sang lorsque celle-ci est peu élevée. En effet, dans le cadre d'une alimentation pauvre en graisses (maximum 7% de l'apport calorique total), riche en hydrates de carbone et n'excédant pas 150mg de cholestérol par jour, une diminution de 10 à 20% de la concentration de cholestérol lié aux LDLs dans le sang a été constatée (Daniels et Greer, 2008). On commence par mettre en place ce type de régime diététique combiné à une augmentation de l'activité sportive mais, au-delà d'un seuil de 3-3,5g/L de cholestérol associé aux LDLs dans le sang, les traitements pharmacologiques détaillés ci-dessous doivent être mis en place.

Afin de réduire le taux de cholestérol dans la circulation sanguine, il est intéressant d'accroître la production de RLDL fonctionnels. Chez les patients hétérozygotes, il est possible d'exploiter le système de régulation qui contrôle la transcription de la copie fonctionnelle du gène. Les premiers médicaments offrant cette opportunité sont la cholestyramine (Questran), le colestipol et le colesevelam qui permettent une réduction d'environ 20% de la concentration de cholestérol lié aux LDLs dans le sang circulant (Hashim et Vanitallie, 1965 ; Bays *et al.*, 2006). Il s'agit de résines échangeuses d'anions se liant aux acides biliaires dans la lumière intestinale bloquant ainsi leur absorption par l'iléum. L'excrétion accrue d'acides biliaires induit une augmentation de la conversion de cholestérol en acides biliaires dans le foie. Ceci a pour conséquence d'intensifier la production de RLDL en réponse à la carence en cholestérol engendrée (Rudling *et al.*, 1990). Néanmoins, leur efficacité est limitée car la diminution du taux de cholestérol est également compensée par une hausse de la synthèse du cholestérol dans le foie.

Pour inhiber la synthèse de cholestérol, la médecine a recours aux statines (naturelles : lovastatine, pravastatine, simvastatine ; synthétiques : fluvastatine, cerivastatine, atorvastatine) qui inhibent l'HMG-CoA réductase, une enzyme impliquée dans la biosynthèse du cholestérol (Brorholt-Petersen *et al.*, 2001). Leur action a deux réponses compensatoires : une augmentation de la synthèse d'HMG-CoA réductase par les hépatocytes, ramenant leur concentration à un niveau normal, et une augmentation de la synthèse de récepteurs aux LDLs. Après ce traitement, on

observe donc une réduction du taux de cholestérol associé aux LDLs dans la circulation sanguine de l'ordre de 50-60% sans carence en cholestérol comme précédemment avec les chélateurs d'acides biliaires (Goldberg *et al.*, 1990 ; Wiegman *et al.* 2004). Afin d'amplifier d'avantage la production de RLDL, le traitement aux statines est efficace seul mais peut parfois être combiné aux résines comme la cholestyramine, ou la niacine (acide nicotinique ; connu pour réduire le taux de cholestérol, de triglycérides, de VLDLs et LDLs et pour accroître le taux de HDLs) (Mabuchi *et al.*, 1983 ; Guyton *et al.*, 2007), les fénofibrates (activation du PPAR α [Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α], réduction du taux de LDLs) (Rosenson, 2007) ou encore l'ézétimibe (un inhibiteur sélectif de l'absorption de cholestérol se liant à NPC1 au niveau de l'intestin) (Bruckert, 2003 ; Rader *et al.*, 2003). Il est bon de noter que, dans le cadre d'une mutation de classe 1 du gène RLDL, la réponse aux statines est très faible (Chaves *et al.*, 2001).

L'ensemble de ces traitements médicamenteux peut causer des effets secondaires. Ainsi, les résines séquestrant les acides biliaires, en se liant de façon non-spécifique aux anions, peuvent interférer avec l'absorption de toute substance anionique au pH intestinal ce qui inclut un grand nombre de drogues comme, par exemple, les statines, les fénofibrates et des corticostéroïdes. Cela implique qu'en cas de traitement combiné, l'administration de ces résines doit précéder celle des autres drogues d'au moins quatre heures (Jacobson *et al.*, 2007). De plus, leur utilisation induit également une production accrue de VLDLs pouvant conduire à une hypertriglycémie (Beil *et al.*, 1982).

Les statines ont également des effets secondaires qui sont variables selon les individus. Elles peuvent notamment causer une élévation du taux de transaminases hépatiques dans le sang en cas d'importantes doses de statines ou encore des myalgies et une augmentation du taux de créatine kinase dans le sang (risque de rhabdomyolyse) (Bradford *et al.*, 1991 ; Jone et Davidson, 2005). Les statines semblent également avoir un effet sur le métabolisme des HDLs et notamment sur leur taille (Soedamah-Muthu *et al.*, 2003). En effet, en diminuant la concentration de cholestérol dans le foie, elles induisent une diminution du cholestérol quittant le foie à travers ABCA1 (ATP-binding cassette sub-family A transporter 1), également connu sous le nom CERP (cholesterol efflux regulatory protein). Cela induit la production de particules HDLs suffisamment volumineuses pour ne pas pouvoir être filtrées dans le glomérule rénal et donc bloquer le catabolisme rénal avec, pour conséquence, une

réduction du cholestérol lié aux HDLs. Les statines peuvent également causer une diminution de la production de VLDLs, d'Apo B et de triglycérides mais aussi, via l'induction de l'expression de SREBP, une augmentation de la synthèse de l'HMG-CoA réductase (contrariant ainsi l'objectif des statines) (Charlton-Menys et Durrington, 2008).

4.2 Patients homozygotes

Les traitements ci-dessus permettent, chez les patients hétérozygotes, d'agir sur le système de régulation de la copie fonctionnelle du gène et sont donc inopérants chez les patients homozygotes (Uauy *et al.*, 1988).

Le shunt porto-cave, en reliant la veine porte à la veine cave, permet au sang de l'intestin de contourner le foie. Cette intervention chirurgicale réduit la synthèse du cholestérol dans l'ensemble du corps, le taux de LDLs dans le sang ainsi que la synthèse d'acides biliaires (Bilheimer, 1989). L'effet de cette procédure reste néanmoins insuffisant pour constituer un traitement unique.

Jusqu'à présent, le seul traitement ayant une certaine efficacité pour les patients homozygotes, mais également pour certains patients hétérozygotes, est l'aphérèse qui a remplacé l'échange de plasma. En 1967, DeGennes avait mis en place la plasmaphérèse qui entraînait une réduction du taux de cholestérol dans le sang d'environ 50% sur le long terme en substituant le plasma du patient par celui d'individu sain ou encore par de l'albumine (Postiglione et Thompson, 1985). L'aphérèse consiste à faire circuler le sang hors du corps via des colonnes d'héparine-agarose (ou encore des colonnes où l'agarose est associé à l'anticorps anti-LDL) ou contenant une matrice de cellulose liée à du dextran sulfate qui bloque les lipoprotéines contenant l'Apo B-100 (VLDL, IDL, LDL) et laisse passer les autres protéines du sang. Des enfants ayant eu recours à l'aphérèse chaque semaine pendant deux à trois heures ont montré une réduction du taux de LDLs dans le sang de 71% (Zwiener *et al.*, 1995 ; Szczepiokowski *et al.*, 2010). Néanmoins, ce traitement est très lourd et contraignant car il est nécessaire que les patients passent une demi-journée toutes les une ou deux semaines à l'hôpital pour subir cette intervention. C'est toutefois le traitement de référence couramment utilisé dans le service du Professeur Bruckert avec lequel notre laboratoire collabore.

La transplantation orthotopique de foie est le seul traitement thérapeutique pour les cas les plus sévères d'hypercholestérolémie familiale. La première patiente à avoir

été transplantée (à la fois du cœur et du foie) a vu son taux de cholestérol dans le sang passer de 1100mg/dL à 200-300mg/dL après opération. Le foie transplanté a donc apporté des RLDL fonctionnels qui ont pu internaliser les LDLs. Par la suite, la patiente a pu, grâce à la présence de ces récepteurs fonctionnels, être traitée à la lovastatine et avoir un taux de cholestérol sanguin de l'ordre de 150-200mg/dL (Starzl *et al.*, 1984). Néanmoins, il faut prendre en compte, pour cette procédure, le risque de rejet immunitaire. De plus, les patients ne sont, en règle générale, pas transplantés du fait de la pénurie croissante de donneurs d'organes ainsi que des risques associés à l'intervention chirurgicale.

Pour pallier au manque de donneurs de foie, la recherche médicale s'est intéressée à la thérapie génique et plus précisément à la thérapie génique *ex vivo*. La première tentative a consisté à réaliser une hépatectomie sur le patient, transduire les cellules hépatiques avec un vecteur rétroviral contenant le gène RLDL et réintroduire ces cellules dans le foie via la veine porte trois jours après la première intervention. Le cholestérol sanguin chez la patiente a diminué de 16% en un mois (Grossman *et al.*, 1994).

Chapitre 3: Les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs)

1- Historique

Malgré le potentiel indéniable des cellules souches embryonnaires pour des approches thérapeutiques, leur utilisation, aussi bien pour la recherche fondamentale que pour le développement de thérapies cellulaires, fait face à des problèmes d'ordre éthico-moral en particulier en France (Fagniez, 2006) et dans certains autres pays comme l'Irlande et l'Autriche.

Les cellules souches pluripotentes induites (iPS), étant générées à partir de cellules somatiques adultes, permettent d'envisager une thérapie génique *ex vivo* pour les patients atteints de déficits génétiques en utilisant donc des cellules du Soi ce qui réduit les risques de rejet immunitaire. Si une thérapie de médecine personnalisée semble non réalisable à court terme, les cellules souches dérivées de cellules de patients peuvent être collectées dans des banques et favoriser l'étude de la pathologie au cours du développement mais également permettre de tester des traitements médicamenteux *in vitro*. Plus précisément, dans le cadre de nos travaux, les hépatocytes issus des iPSCs pourront être utilisés pour ces études toxicologiques et analyses fonctionnelles en comparaison à la lignée HepaRG, une lignée cellulaire issue d'hépatome humain proche des hépatocytes, mise en place par l'équipe de C. Guillouzo qui est en cours de validation européenne (Guillouzo *et al.*, 2007 ; Guguen-Guillouzo *et al.*, 2010).

De plus, les iPSCs issues de patients sains pourraient être une alternative à l'utilisation des cellules souches embryonnaires dans le cadre d'une transplantation allogénique. La compatibilité entre donneur et receveur dépendant de la présence et de l'expression des marqueurs HLA (antigènes du système majeur d'histocompatibilité) à la surface des cellules greffées, cette procédure requiert l'utilisation d'un traitement immunosuppresseur.

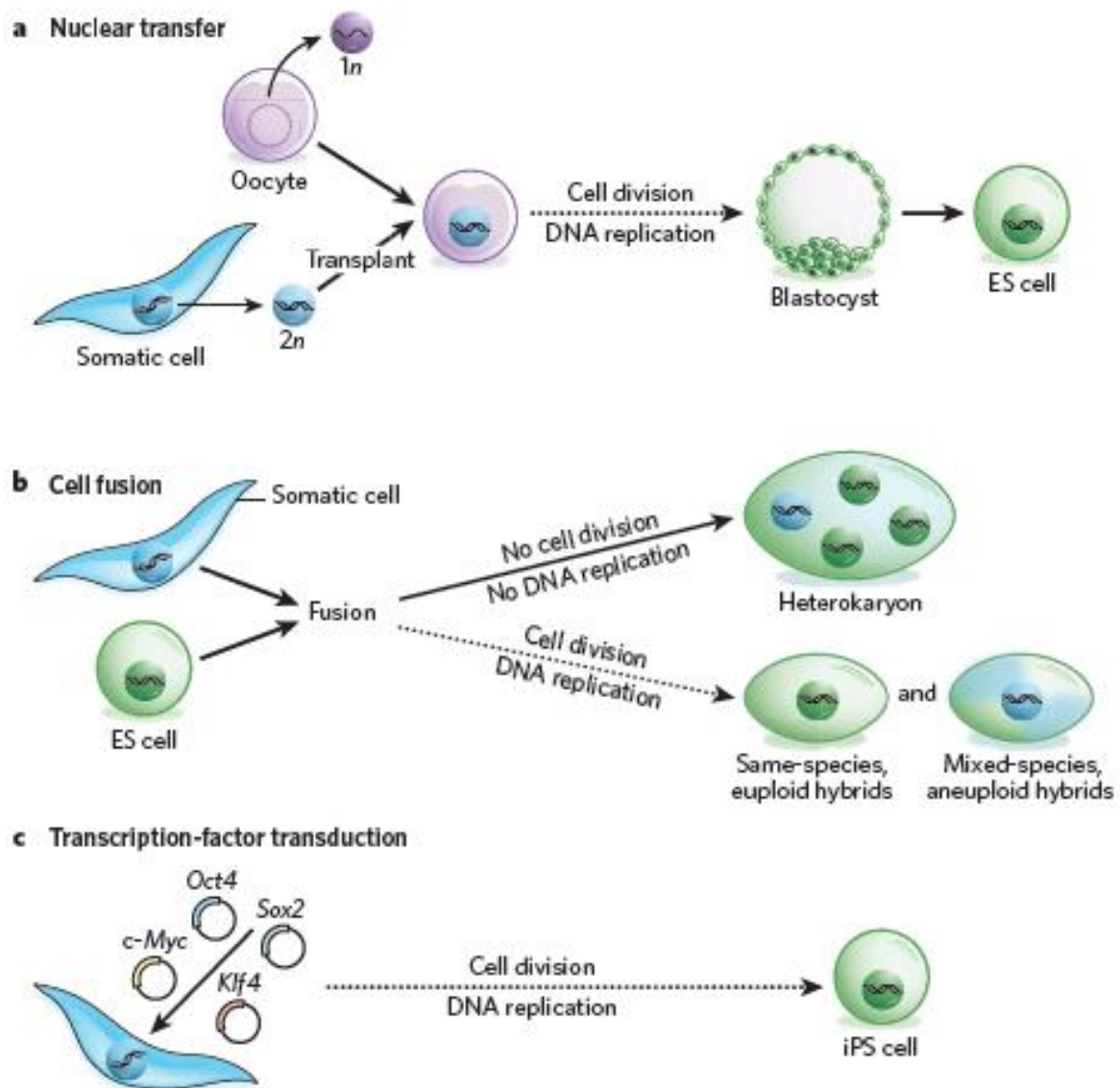


Figure 12: Les différentes techniques de reprogrammation cellulaire. (a) Le transfert nucléaire : Le noyau d'une cellule somatique est transplanté dans un ovocyte énucléé. Dans l'ovocyte, le noyau va être reprogrammé et ainsi pouvoir développer un organisme clone. (b) La fusion cellulaire : Le noyau d'une cellule somatique est fusionné avec celui d'une cellule souche embryonnaire générant soit un hétérocaryon qui ne peut pas se diviser soit une cellule hybride capable de se diviser. (c) La transduction de facteurs de transcription : Des facteurs de transcription sont transduits dans des cellules somatiques qui, après plusieurs jours, sont reprogrammées en cellules pluripotentes (Yamanaka et Blau, 2010).

Depuis les années 1950, différentes méthodes ont été définies afin de générer ces cellules souches induites dont trois principales :

- le transfert nucléaire
- la fusion cellulaire
- la transduction de facteurs de transcription.

1.1 Transfert nucléaire (Figure 12)

Pour cette approche (SCNT : Somatic Cell Nuclear Transfert), le noyau d'une cellule embryonnaire ou somatique diploïde est transplanté dans un ovocyte préalablement énucléé. Dans l'environnement de l'ovocyte, le noyau donneur est alors reprogrammé et les cellules générées sont pluripotentes. Un blastocyste peut en être dérivé et conduire à la formation d'un organisme complet, clone du donneur du noyau transplanté.

En 1952, Briggs et King ont obtenu pour la première fois des têtards en transplantant le noyau d'une cellule embryonnaire au stade blastula dans un œuf énucléé de grenouille (Briggs et King, 1952). La première expérience réalisée sur un mammifère date de 1975. Une cellule d'un embryon de lapin au stade morula a été transférée par microinjection dans un œuf énucléé (Bromhall, 1975).

C'est également par cette méthode que Campbell et Wilmut en 1996 ont cloné des brebis, tout d'abord, en transférant le noyau de cellules issues d'un embryon de 9 jours dans des œufs énucléés de brebis, puis, l'année suivante, en utilisant le noyau de cellules de glande mammaire en culture générant ainsi Dolly (Wilmut *et al.*, 1997). Néanmoins, cette technique a ses limites. En effet, le clonage reste peu efficace et entraîne l'apparition de nombreuses anomalies aux différents stades du développement de l'organisme généré comme une expression aberrante de gènes chez l'embryon, l'élongation des télomères, un système immunitaire moins efficace, un risque accru de développer un cancer et une mort prématurée (Thuan *et al.*, 2010). Ces anomalies suggèrent donc une reprogrammation incomplète du noyau donneur et notamment concernant la « mémoire épigénétique ». De plus, différents textes de lois, à travers le monde, interdisent l'utilisation de cette technologie. Ainsi, le parlement européen, dans la résolution B4-209, 213, 214, 225, 242/97, considère le clonage reproductif comme « une violation des droits fondamentaux de l'homme, une offense à la dignité de l'être humain [...] » et a demandé son interdiction à l'échelle mondiale et en particulier dans les Etats membres de l'Union Européenne.

En France, la loi bioéthique de 2004 interdit formellement le clonage reproductif et thérapeutique.

1.2 Fusion cellulaire (Figure 12)

Cette approche consiste à fusionner, par électrofusion ou à l'aide d'un agent chimique comme le polyéthylène glycol, deux types cellulaires différents tels qu'une cellule souche embryonnaire et une cellule somatique afin de générer une entité unique. Celle-ci peut être de deux formes :

- Hétérocaryon
- Hybride.

Les hétérocaryons sont multinucléés car les nucléi des deux types cellulaires restent intacts et distincts. Il ne peuvent pas se diviser et leur durée de vie est limitée. A l'inverse, si les cellules fusionnées peuvent se diviser et donc proliférer, elles deviennent hybrides. Dans ce cas, les nucléi des deux types cellulaires fusionnent et sont alors polyploïdes.

Cette technique peut être employée pour fusionner des cellules issues d'une même espèce ou même d'espèces différentes néanmoins, dans ce dernier cas, les chromosomes des cellules générées sont réarrangés voire parfois perdus (aneuploïdie). Comme mentionné précédemment, cette méthode a pour limites de générer des cellules polyploïdes mais également un faible taux de fusion.

Cette approche a notamment permis, en 1976, à Miller et Ruddle de générer des hybrides pluripotents à partir de cellules pluripotentes d'un tératocarcinome et des thymocytes primaires chez la souris (Miller et Ruddle, 1976). Ces hybrides partagent les caractéristiques des cellules de carcinome comme la capacité d'induire des tumeurs montrant ainsi que le phénotype des cellules parentales les moins différenciées est dominant comparé à celui du partenaire de fusion le plus différencié.

1.3 Transduction de facteurs de transcription (Figure 12)

En 1987, Schneuwly *et al.* ont démontré que la surexpression ectopique du gène *Antennapedia*, via un système de vecteur inductible par choc thermique, induisait l'expression d'un grand nombre de gènes spécifiques de différents types cellulaires entraînant ainsi la transformation des antennes en pattes, ou encore d'une région de la tête en structures du mésothorax dorsal (Schneuwly *et al.*, 1987). La même année, une étude a montré que la surexpression de MyoD dans des fibroblastes d'embryon

de souris était suffisante pour convertir ces derniers de façon stable en myoblastes (Davis *et al.*, 1987). Ces travaux nous montrent donc l'efficacité de la surexpression de facteurs de transcription à convertir des cellules différenciées en d'autres cellules différenciées.

Pour la première fois en 2006, l'équipe de Shinya Yamanaka a réussi à générer des cellules pluripotentes, comparables aux cellules souches embryonnaires à partir de fibroblastes embryonnaires et adultes par l'introduction de quatre facteurs de transcription (Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc) à l'aide de vecteurs rétroviraux (Takahashi et Yamanaka, 2006). Nous détaillerons leur approche par la suite.

1.4 Comparaison des approches

Ces deux dernières approches ont des caractéristiques communes dont bien sûr l'activation d'un grand nombre de gènes spécifiques des cellules souches embryonnaires comme Oct4 et Nanog, mais aussi un « rajeunissement » des cellules mis en évidence par l'allongement des télomères et une activité de la télomérase accrue (Mario *et al.*, 2009).

Néanmoins, il existe également des différences entre les techniques notamment en terme de difficulté technique, de rendement, du temps nécessaire à la reprogrammation. Par exemple, la fusion cellulaire génère des cellules pluripotentes très rapidement (deux jours environ) alors que la transduction de facteurs de transcription requiert environ trois semaines. L'efficacité de reprogrammation est importante avec la fusion cellulaire (70% environ) quand elle est très faible via la transduction de facteurs (0,01-10%). Concernant les cellules générées, elles se divisent sur une longue durée lors d'une reprogrammation à l'aide de facteurs de transcription et ne se divisent pas au cours de la fusion. Ainsi, ces techniques sont utilisées à des fins différentes. Pour étudier les mécanismes de la reprogrammation en cellules pluripotentes et la chronologie d'activation des différents gènes spécifiques, la fusion cellulaire est privilégiée de par sa simplicité et sa rapidité de reprogrammation. Par contre, la reprogrammation via des facteurs de transcription est l'approche la plus intéressante dans l'optique de modélisation de maladies génétiques à partir de cellules somatiques de patients.

2- Génération de cellules pluripotentes induites à l'aide de facteurs de transcription

Jusqu'en 2006, la reprogrammation des cellules à un état pluripotent était considérée comme très complexe et nécessitait un très grand nombre de facteurs. Takahashi et Yamanaka ont alors réussi à reprogrammer des fibroblastes murins embryonnaires et adultes en cellules pluripotentes (iPSCs) par l'expression ectopique de quatre facteurs (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*) (Takahashi et Yamanaka, 2006).

Fin 2007, Takahashi *et al.* ont généré avec succès des cellules pluripotentes induites humaines en transduisant les cellules somatiques à l'aide de vecteurs rétroviraux contenant les quatre mêmes gènes (Takahashi *et al.*, 2007). Dans le même temps, Yu *et al.* ont également généré des hiPSCs grâce à une autre combinaison de gènes (*Oct4*, *Sox2*, *Nanog* et *Lin28*) (Yu *et al.*, 2007). Ces travaux ont offert un nouvel outil pour des applications pratiques. Néanmoins, il reste encore beaucoup d'améliorations à y apporter avant d'envisager un essai clinique chez l'homme basé sur la génération d'iPSCs. En effet, il est important de trouver une alternative aux vecteurs viraux intégratifs, d'améliorer l'efficacité de reprogrammation qui reste faible ou encore de trouver le protocole de reprogrammation le moins complexe et le plus rapide possible. Il est également intéressant de générer des iPSCs chez l'animal afin de constituer des modèles nécessaires à l'étude des approches thérapeutiques. Dans cette partie, nous abordons les différents paramètres modulables de la technique, c'est-à-dire les différentes combinaisons de facteurs de reprogrammation, les différents types de vecteurs, les différents types cellulaires utilisés jusqu'à présent dans les travaux sur la génération d'iPSCs mais également les espèces dans lesquelles cela a été réalisé.

2.1 Les facteurs

Pour arriver à la reprogrammation grâce à une combinaison de quatre facteurs, Takahashi *et al.* ont choisi vingt-quatre gènes ayant un rôle supposé dans la maintenance des cellules souches embryonnaires et ils ont mis en place un système d'étude dans lequel l'induction de la pluripotence est combinée à la résistance à un antibiotique. Les facteurs choisis ont alors été transduits dans les cellules de souris par transduction rétrovirale. Les premiers résultats ont indiqué que, transduit

séparément, aucun des vingt-quatre gènes n'était suffisant pour générer des cellules pluripotentes alors que la transduction de l'ensemble de ces gènes permettait la reprogrammation des fibroblastes. Ils ont alors recherché la combinaison minimale de gènes indispensables à l'induction de la pluripotence. Pour cela, ils ont retiré chacun des vingt-quatre gènes tour à tour du mélange utilisé pour la transduction et ils ont observé l'absence de colonies résistantes à l'antibiotique pour dix gènes (*Fbxo15*, *Nanog*, *ERas*, *Dppa2*, *Oct4*, *Sox2*, *Tcl1*, *Klf4*, β -*catenin*, *c-Myc*) prouvant le rôle clé de ceux-ci pour la reprogrammation. De plus, la combinaison de ces dix gènes s'est avérée plus efficace que celle des vingt-quatre gènes. Ils ont alors, de nouveau, retiré tour à tour chacun des dix gènes de la combinaison et ont constaté l'absence ou la forte réduction du nombre de cellules résistantes à l'antibiotique et similaires aux cellules souches embryonnaires pour quatre gènes : *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*. A l'inverse, le retrait des autres gènes de la combinaison n'a pas induit de différence significative. La combinaison des quatre gènes précédemment cités a généré des résultats comparables à ceux de la combinaison de dix gènes. En tentant de soustraire un des gènes de la combinaison, ils n'ont pu obtenir de colonies résistantes à l'antibiotique et similaires aux cellules souches embryonnaires (Takahashi et Yamanaka, 2006 ; Takahashi *et al.* 2007).

Les facteurs de reprogrammation dits de Yamanaka (*Oct4*, *Klf4*, *Sox2* et *c-Myc* : OKSM), ont permis de dériver avec succès de nombreux types cellulaires dans les différentes espèces énumérées ultérieurement. Dans la plupart des protocoles établis, *Sox2* et surtout *Oct4* sont les facteurs de transcription clés pour induire la pluripotence alors que *Klf4* et *c-Myc* ont plutôt pour but d'augmenter l'efficacité d'*Oct4* et *Sox2* (Boyer *et al.*, 2005 ; Loh *et al.*, 2006).

a) *Oct4* et substituts

Oct4 (octamer-binding transcription factor 4), ou POU5F1 (POU domain, class 5, homeobox 1), fait partie de la famille des facteurs de transcription se liant à la séquence octamère «ATTTGCAT». Il joue un rôle majeur dans la maintenance de la pluripotence des cellules souches embryonnaires ainsi que dans leur potentiel à se différencier, ce qui le rend indispensable à la reprogrammation. Dans certains cas, notamment chez les cellules souches neuronales qui ont déjà une forte expression endogénique de *Sox2*, *Klf4* et *c-Myc*, sa seule expression ectopique est suffisante pour induire la génération de cellules pluripotentes (Kim *et al.*, 2009). En 2010, Heng

et al. ont réussi à générer des cellules souches pluripotentes induites à partir de fibroblastes murins en remplaçant Oct4 par le récepteur nucléaire Nr5a2 également connu sous le nom de liver-receptor homologue-1 (LRH1) dans la combinaison de facteurs de reprogrammation avec une efficacité de reprogrammation toutefois dix fois inférieure (Heng *et al.*, 2010). Il est crucial de s'assurer de l'extinction de l'expression ectopique d'Oct4 dans les cellules générées. En effet, Oct4 dicte le potentiel oncogénique des cellules ES de manière dose dépendante (Gidekel *et al.*, 2003 ; Shoenhals *et al.*, 2009) et la surexpression de ce facteur est détectée dans 25% des tumeurs solides.

b) Sox2 et substituts

Sox2 (Sex determining region Y-related high mobility group-box gene 2) est associé à la maintenance de la pluripotence. Contrairement à Oct4, qui est exclusivement exprimé dans les cellules souches pluripotentes, les gènes Sox sont également exprimés dans les cellules souches multipotentes. En tant que facteur de transcription au cours de l'embryogénèse, Sox2 est impliqué dans divers processus biologiques comme la neurogénèse, la formation de l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme (Boyer *et al.*, 2005). Sox2 agit sous forme de complexe avec Oct4 et Nanog et forme, notamment, avec Oct4 un hétérodimère qui se lie à l'ADN pour réguler la transcription de Nanog (facteur de transcription impliqué dans l'auto-renouvellement des cellules souches embryonnaires) (Rodda *et al.*, 2005). Toutefois, tout comme pour Oct4, la surexpression de Sox2 est détectée dans 20% des tumeurs solides suggérant un rôle dans l'oncogénèse (Shoenhals *et al.*, 2009 ; Gangemi *et al.*, 2009).

Nakagawa *et al.* ont prouvé chez la souris qu'il était possible de remplacer Sox2 par Sox1 ou Sox3 dans la combinaison de facteurs de reprogrammation (Nakagawa *et al.*, 2008). Ichida *et al.* ont également montré que l'on pouvait remplacer Sox2 par des petites molécules (Ichida *et al.*, 2009). Pour observer le succès de la reprogrammation, ils ont mis en place un système utilisant le gène reporteur GFP sous le contrôle du promoteur du gène Oct4. Les cellules reprogrammées, exprimant Oct4, étaient par conséquent fluorescentes. Ils ont donc testé un à un jusqu'à huit cent composés associés à la combinaison Oct4, Klf4, c-Myc et en présence d'acide valproïque (VPA). Après seize jours de reprogrammation des fibroblastes embryonnaires murins, des colonies de cellules pluripotentes fluorescentes ont été

générees pour trois des huit cent composés : deux inhibiteurs de la transforming growth factor- β receptor 1 (TGF β r1) kinase (E-616452 et E-616451) ainsi qu'un inhibiteur de la Src-family tyrosine kinase (EI-275 ; permettant de bloquer la prolifération des cellules somatiques [Hanke *et al.*, 1996]). En absence de VPA, seul E-616452, également connu sous le nom RepSox (Remplacement de Sox2), a permis de générer des iPSCs, en présence mais également en absence de c-Myc, de façon comparable à Sox2. RepSox étant un inhibiteur de la TGF β r1 kinase, il était intéressant de savoir si d'autres inhibiteurs de la voie de signalisation TGF β pouvaient également remplacer Sox2 et c-Myc pour la reprogrammation. Pour cela, ils ont testé la petite molécule SB431542, des anticorps neutralisant les ligands de TGF β r1 ou TGF β II et ont généré avec succès des iPSCs. Ces composés favorisent donc la reprogrammation par l'inhibition de la voie de signalisation TGF β induisant ainsi l'expression de Nanog (Chambers *et al.*, 2007 ; Vallier *et al.*, 2009). RepSox remplace efficacement c-Myc lorsqu'il est utilisé sur la population de cellules somatiques en induisant l'expression de l-Myc. Il se substitue de façon optimale à Sox2 lorsqu'il est ajouté aux dixième et onzième jours post-transduction des facteurs Oct4, Klf4 et c-Myc.

c) *Klf4 et substituts*

Klf4 ([gut-enriched] Krüppel-like factor 4) est un facteur de transcription largement exprimé et impliqué dans un grand nombre de processus physiologiques incluant le développement, la différenciation et la maintenance de l'homéostasie des tissus. Différents rôles ont été suggérés pour Klf4 dans la génération des iPSCs à partir de cellules somatiques comme, par exemple, la régulation positive de Nanog et la modification de la structure chromatinienne, facilitant ainsi l'association d'Oct4 et Sox2 aux séquences d'ADN cibles (Yamanaka, 2007). Néanmoins, là encore, Klf4 agit en combinaison avec des protéines de signalisation oncogènes afin de stimuler la prolifération cellulaire, suggérant ainsi que Klf4 lui-même est un facteur oncogène (Rowland *et al.*, 2005).

Feng *et al.* ont proposé de remplacer Klf4 dans la combinaison de facteurs en testant Klf2, Klf5 ainsi que le récepteur nucléaire estrogen-related receptor β (Esrrb) avec succès. Il est à noter que, pour ce dernier, la fréquence des cellules reprogrammées est réduite par rapport aux conditions utilisant Klf4. Tout comme pour la combinaison Oct4, Sox2 et Klf4, la combinaison Oct4, Sox2 et Esrrb, en l'absence de c-Myc, est

suffisante à la reprogrammation (Feng *et al.*, 2009). Nakagawa *et al.* ont également prouvé chez la souris qu'il était possible de remplacer Klf4 par Klf1, Klf2 ou Klf5 dans la combinaison de facteurs de reprogrammation (Nakagawa *et al.*, 2008).

d) c-Myc et substituts

c-Myc est un proto-oncogène, que l'on trouve surexprimé dans les cancers, stimulant la prolifération cellulaire et ayant un rôle dans la régulation de la croissance cellulaire, l'apoptose, la différenciation cellulaire et l'auto-recrudescence des cellules souches (Okita *et al.*, 2007 ; Schoenhals *et al.*, 2009). C'est un facteur de transcription qui régule l'expression d'une part importante des gènes en se liant aux séquences Enhancer Box et en recrutant les histones acétyltransférases pouvant ainsi faciliter l'association de Sox2 et Oct4 à leurs loci cibles spécifiques (Yamanaka, 2007). c-Myc accroît aussi l'activité de la télomérase, ce qui est intéressant pour la reprogrammation notamment avec les cellules somatiques dont les télomères sont courts. Nakagawa *et al.* ont généré chez la souris des cellules souches pluripotentes induites en remplaçant c-Myc par n-Myc ou l-Myc dans la combinaison de facteurs de reprogrammation (Nakagawa *et al.*, 2008).

Des iPSCs ont été générés sans c-Myc. Dans ces conditions, l'induction de la pluripotence semble plus spécifique, générant moins de cellules partiellement reprogrammées, mais la reprogrammation en l'absence de c-Myc s'avère moins efficace et plus lente (Nakagawa *et al.*, 2008).

e) Nanog et Lin28

En 2007, Yu *et al.* ont généré des iPSCs humaines à partir de fibroblastes fœtaux grâce à la combinaison de quatre facteurs de reprogrammation : Oct4, Sox2, Nanog et Lin28 (OSNL) (Yu *et al.*, 2007). Pour arriver à ces conditions et, notamment, à cette combinaison de facteurs, les auteurs se sont intéressés à une liste de quatre-vingt-dix-sept gènes dont l'expression est enrichie chez les cellules souches embryonnaires humaines en comparaison avec des cellules somatiques (précurseurs myéloïdes). Dans cette liste, les gènes connus pour être impliqués dans l'établissement et le maintien de la pluripotence ont été privilégiés pour la suite, réduisant ainsi à quatorze le nombre de gènes candidats : Oct4, Sox2, Nanog, FoxD3, Utf1, Stella, Rex1, Znf206, Sox15, Mybl2, Lin28, Dppa2, Esg, Otx2. Ils ont également utilisé un système d'étude dans lequel l'induction de la pluripotence était

combinée à la résistance à la gentamycine, un antibiotique. Ils ont ainsi reprogrammé avec succès des cellules somatiques à l'aide de la combinaison de ces quatorze facteurs. En testant différentes combinaisons, ils ont défini que la meilleure était celle utilisant Oct4, Sox2, Nanog et Lin28.

Nanog est exprimé dans les cellules souches embryonnaires et est considéré comme ayant un rôle clé dans le maintien de la pluripotence en collaboration avec Oct4 et Sox2. Lin28 est une protéine, exprimée dans les cellules souches embryonnaires, se liant à l'ARN, et caractérisée par une combinaison unique de motifs CSD (cold shock domains) et ZFM (zinc finger motifs). Cette protéine semble indispensable pour le développement embryonnaire précoce, pendant lequel son expression est contrôlée par plusieurs facteurs protéiques et par des microARNs. En effet, Yu *et al.* ont constaté qu'en l'absence d'Oct4 et de Sox2, aucune cellule pluripotente n'était générée. De plus, la présence de Nanog dans la combinaison semble avoir un effet bénéfique sur l'efficacité de reprogrammation (deux cent fois plus importante que sans Nanog) ainsi que sur la survie des cellules en cours de reprogrammation même s'il n'est pas indispensable à l'obtention d'iPSCs. Il en est de même pour Lin28 mais à un degré moindre. Toutefois, comme les facteurs précédemment cités, la surexpression de Nanog et de Lin28 est détectée dans des tumeurs solides. La surexpression de Nanog implique une augmentation de la prolifération cellulaire alors que celle de Lin28 favorise la transformation maligne et la progression tumorale (Peng *et al.*, 2010 ; Zhong *et al.*, 2010 ; Lin *et al.*, 2011). Il a notamment été démontré que Lin28 réprime la transcription de microARNs et plus précisément les membres de la famille LET-7, souvent réprimés dans les cancers humains. Ceci a pour conséquence l'expression *de novo* de leurs cibles dont HMGA-2 (High-mobility group AT-hook 2), K-Ras et c-Myc (Viswanathan *et al.*, 2009).

f) Petites molécules

Shi *et al.* ont utilisé les petites molécules BIX-01294 (dérivé du diazépín-quinazolinamine) et BayK8644 (dihydropyridine) combinées à la transduction rétrovirale de Oct4 et Klf4 pour reprogrammer des fibroblastes d'embryons murins de façon comparable à la combinaison OKSM (Shi *et al.* 2008). BIX-01294 est un inhibiteur sélectif de la G9a histone (Lysine 9 de l'histone 3 euchromatique) méthyltransférase (G9a HMTase) et réduit les niveaux de H3K9me2 (méthylation de la lysine 9 de l'histone 3) au niveau des gènes cibles de G9a (Kubicek *et al.*, 2007). Cette inhibition

favorise l'expression du gène de pluripotence Oct4, important lors de la reprogrammation (Feldman *et al.*, 2006). BayK8644 est un agoniste des canaux calciques de type L favorisant l'ouverture prolongée de ces derniers (Schramm *et al.*, 1983). Les canaux calciques de type L sont connus pour médier des processus intracellulaires dans différents tissus tels que la régulation de la tension artérielle, la contraction du muscle lisse, la sécrétion d'insuline et le développement cardiaque (Tosti *et al.*, 2006). L'activation de ces canaux par un agoniste comme BayK8644 induit la signalisation intracellulaire par l'activation de CREB et le changement de l'activité de l'AMPC. Il est à noter que le calcium pourrait jouer un rôle dans le contrôle de la prolifération des cellules souches embryonnaires murines (Heo *et al.*, 2006). BayK8644 est intéressant car il exerce son action en amont des voies de signalisation et n'engendre pas directement de modifications épigénétiques favorisant ainsi une induction plus spécifique de la reprogrammation.

Huangfu *et al.* ont réussi à substituer Klf4 et c-Myc dans la combinaison de reprogrammation par l'acide valproïque (VPA), un inhibiteur de l'histone déacétylase afin de générer des iPSCs à partir de fibroblastes humains avec une efficacité avoisinant les 0,005% (Huangfu *et al.*, 2008). Par son action, le VPA favorise l'acétylation des histones, influençant ainsi la conformation de la chromatine et plus particulièrement sa compaction. Les résidus acétyl étant chargés, leur transfert sur les histones par les histone acétyl-transférases (HAT) correspond à une relaxation de la chromatine, permettant ainsi une meilleure accessibilité aux autres facteurs, et sa conversion à un état actif sur le plan transcriptionnel. L'effet du VPA mais aussi d'autres histone déacétylases, comme l'acide suberoylanilide hydroxamique (SAHA) ou trichostatine A (TSA), suggère donc que le remodelage de la chromatine est une étape limitante de la reprogrammation.

Li *et al.* ont montré, chez l'homme et le rat, que l'addition d'un cocktail d'inhibiteurs chimiques aux facteurs Oct4, Sox2 et Klf4 favorisait l'obtention de cellules pluripotentes aux caractéristiques comparables à celles des cellules souches embryonnaires. Pour ce faire, ils ont eu recours à un inhibiteur de la voie de signalisation TGF β et plus précisément du récepteur de TGF β 1, ALK5 (A-83-01), d'un inhibiteur de la voie MEK (MAPK/ERK), le PD0325901, et un inhibiteur de GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β), le CHIR99021 (Li *et al.*, 2009). En effet, la cascade de signalisation TGF β /Activine A/Nodal joue un rôle essentiel sur le contrôle de la maintenance de l'état indifférencié des cellules souches embryonnaires

humaines et plus précisément sur le marqueur de pluripotence Nanog. En inhibant l'activation de ERK (Extracellular signal-regulated kinases) avec le PD0325901, l'activation de facteurs de transcription est bloquée. Enfin, grâce au CHIR99021, la GSK3 ne peut inhiber la voie de signalisation Wnt favorisant par conséquent l'auto-renouvellement et le maintien de la pluripotence des cellules souches.

g) MicroARNs miR302/367

Enfin, Anokye-Danso *et al.* ont réussi à générer des cellules iPS à partir de cellules somatiques murines et humaines avec une efficacité élevée à l'aide des microARNs 302/367. Des études avaient déjà montré que différents microARNs, préférentiellement exprimés dans les cellules souches embryonnaires, en complément de la combinaison des facteurs OKSM pouvaient améliorer l'efficacité de reprogrammation (Judson *et al.*, 2009). Parmi les miARNs fortement exprimés dans les ESCs et les iPSCs, le groupe miR302/367, cinq miARNs (miR302a/b/c/d et miR367) localisés dans l'intron 8 du gène *Larp7* sur le chromosome 3, est une cible directe d'Oct4 et de Sox2 (Card *et al.*, 2008). Anokye-Danso *et al.* ont obtenu des iPSCs sept jours après avoir transduit des fibroblastes murins à l'aide d'un vecteur lentiviral contenant les miR302/367 en association avec l'acide valproïque. En l'absence de l'acide valproïque, la transduction des miARNs ne permet pas de reprogrammer les cellules somatiques murines. En comparant cette stratégie avec la combinaison OKSM, ils ont constaté une efficacité de reprogrammation cent fois supérieure (jusqu'à 17%). Les auteurs ont également obtenu des iPSCs humaines environ douze jours après avoir transduit des fibroblastes avec les vecteurs contenant les miR302/367 en l'absence d'acide valproïque avec une efficacité d'environ 10%. Ils ont montré l'importance de la combinaison des miR302a/b/c/d et miR367 dans la reprogrammation en n'obtenant aucune iPSC après avoir transduit des fibroblastes murins à l'aide de vecteurs lentiviraux contenant seulement les miR302a/b/c/d. De même, ils n'ont constaté aucune reprogrammation en transduisant les cellules murines avec uniquement miR367. L'acide valproïque est nécessaire pour la reprogrammation chez la souris afin de dégrader la protéine HDAC2 des fibroblastes embryonnaires murins (MEFs). Dans les fibroblastes du derme humain, le niveau d'expression de HDAC2 est plus faible que dans les MEFs. La suppression ou un faible niveau d'expression de HDAC2 semble donc nécessaire

à une reprogrammation efficace (Anokye-Danso *et al.*, 2011). Cette approche est à l'heure actuelle celle qui offre la meilleure efficacité de reprogrammation.

h) Facteurs complémentaires

En 2008, Park *et al.* ont eu des difficultés à obtenir des cellules souches pluripotentes à l'aide des facteurs OKSM à partir de cellules somatiques humaines adultes (fibroblastes de prépuces néonataux, cellules souches mésenchymateuses adultes, fibroblastes du derme adulte). Ils ont en effet observé un ralentissement de la prolifération des cellules ainsi que la sénescence cellulaire. Ils ont alors envisagé de compléter la combinaison de facteurs de reprogrammation avec des facteurs connus pour avoir un effet dans l'établissement des cellules humaines en culture : la sous-unité catalytique de la télomérase humaine hTERT (Human Telomerase Reverse Transcriptase), qui est exprimée dans les cellules souches et les cellules cancéreuses, et SV40 (Simian Vacuolating Virus 40) large T, qui a une puissante activité anti-apoptotique. Cela a permis d'accroître la prolifération cellulaire et, ainsi, de légèrement améliorer la fréquence de reprogrammation des cellules. Néanmoins, ces deux facteurs ne sont pas indispensables à la reprogrammation (Park *et al.*, 2008).

Hanna *et al.* ont reprogrammé des lymphocytes B immatures en utilisant les gènes OKSM mais n'ont pas pu obtenir de cellules reprogrammées à partir de lymphocytes B matures. Pour reprogrammer les cellules matures, les auteurs ont montré que l'ajout de C/EBP α (CCAAT/enhancer-binding protein α), qui joue un rôle dans la spécification des granulocytes (Ramji et Foka, 2002), aux quatre facteurs originaux était nécessaire pour favoriser un retour des lymphocytes B à un état macrophage-like avant la reprogrammation (Hanna *et al.*, 2008).

2.2 Les vecteurs

Différentes méthodes de transport des facteurs de reprogrammation ont été testées depuis les premiers travaux de reprogrammation. Les différentes approches ont montré que le mode de transport peut influencer sur l'efficacité de la reprogrammation mais aussi sur la qualité des cellules générées (**Tableau 1**).

a) Vecteurs intégratifs

Les premières études sur la génération de cellules souches pluripotentes induites utilisaient des vecteurs rétroviraux (Takahashi et Yamanaka, 2006 ; Maherali *et al.*, 2007 ; Okita *et al.*, 2007 ; Wernig *et al.*, 2007 ; Kim *et al.*, 2008 ; Tsai *et al.*, 2010). L'efficacité de reprogrammation obtenue avec ces vecteurs était comprise entre environ 0,01% et 0,5% selon les études. Ces vecteurs s'intègrent de façon stable dans le génome des cellules hôtes permettant ainsi l'introduction des facteurs de reprogrammation. Dans ces conditions, l'expression des transgènes décroît, généralement, au fil de la reprogrammation pour être nulle à la fin du processus. Néanmoins, cette extinction reste parfois incomplète en raison d'une suractivation des DNA-méthyltransférases (Lei *et al.*, 1996) et des histone-méthyltransférases (Matsui *et al.*, 2010) ce qui induit des cellules stables dans un état partiellement reprogrammé. Ces cellules restent dépendantes de l'expression exogène des facteurs et sont dans l'incapacité d'activer les gènes endogènes correspondant tout comme les gènes qu'ils contrôlent. On note également une répression incomplète des facteurs de transcription exprimés dans les cellules somatiques (Takahashi and Yamanaka, 2006 ; Mikkelsen *et al.*, 2008 ; Sridharan *et al.*, 2009). Il est important de ne plus avoir d'expression des facteurs exogènes à la fin de la reprogrammation sachant qu'une activité résiduelle de ceux-ci peut nuire au potentiel développemental des cellules générées mais également induire la formation de tumeurs lors de l'utilisation future de ces cellules (Takahashi et Yamanaka, 2006 ; Okita *et al.*, 2007). Dans le but d'améliorer l'efficacité de reprogrammation, des travaux ont ensuite été réalisés à l'aide de vecteurs lentiviraux (Yu *et al.*, 2007 ; Ebert *et al.*, 2009 ; Sun *et al.*, 2009). En effet, tout comme les vecteurs rétroviraux, ils ont la possibilité de transduire des cellules en division mais ils sont également capable de pénétrer les cellules quiescentes. Ils sont ainsi plus efficaces pour infecter différents types de cellules somatiques (entre environ 0,1% et 1%). Les vecteurs lentiviraux, tout comme les rétroviraux, contenant une cassette polycistronique qui inclut les quatre facteurs de reprogrammation ont aussi été utilisés avec succès (Carey *et al.*, 2009 ; Sommer *et al.*, 2009). Néanmoins, tout comme les rétrovirus, les lentivirus s'intègrent dans le génome cellulaire en différents sites. De plus, l'expression des séquences issues de ces vecteurs s'avère être encore moins efficacement éteinte que pour les vecteurs rétroviraux ce qui semble impliquer des difficultés de différenciation des iPSCs ainsi générées (Brambrink *et al.*, 2008 ; Sommer *et al.*, 2010).

Pour résoudre ce problème, un système de vecteurs lentiviraux inducibles peut être utilisé (Maherali *et al.*, 2008 ; Hanna *et al.*, 2008). Dans ces conditions, l'expression des transgènes est contrôlée par la doxycycline, une drogue inerte permettant ainsi de réduire le risque d'expression permanente de ceux-ci ainsi que d'améliorer la sélection des iPSCs complètement reprogrammées. En effet, celles-ci dépendent uniquement de l'expression endogène des facteurs de pluripotence et leur prolifération est interrompue lors du retrait de la doxycycline (Brambrink *et al.* 2008 ; Stadtfeld *et al.*, 2008). L'efficacité de reprogrammation est équivalente à celle des vecteurs lentiviraux non inducibles mais, à nouveau, les vecteurs s'intègrent en de nombreux sites dans le génome des cellules. Ce système a également servi à générer des iPSCs dites secondaires voir tertiaires (Eminli *et al.*, 2009 ; Hockemeyer *et al.*, 2008). Ainsi, les iPSCs primaires ont été générées à l'aide de vecteurs viraux inducibles par la doxycycline, puis, après retrait de la drogue, différenciées *in vitro*. Les cellules ainsi obtenues ont alors été mises en contact avec la doxycycline entraînant à nouveau une reprogrammation pour obtenir les iPSCs dites secondaires. A noter que la seconde reprogrammation était d'une efficacité nettement supérieure à celle de la reprogrammation primaire.

Afin d'envisager l'utilisation des cellules souches pluripotentes induites pour des approches thérapeutiques, il est important de remédier au problème de l'intégration des vecteurs dans le génome pouvant engendrer des mutagénèses insertionnelles, tout comme le problème de l'expression persistente des transgènes. Ainsi, trois types de techniques de reprogrammation sans intégration ont été mis en place. Il existe une approche consistant à utiliser des vecteurs intégratifs pouvant, après reprogrammation, être retirés du génome, mais aussi l'emploi de vecteurs non intégratifs et enfin une méthode n'ayant pas recours à des vecteurs contenant les séquences nucléotidiques des facteurs d'intérêt.

b) Vecteurs non-intégratifs

Les premières iPSCs générées en l'absence d'intégration dans le génome ont été dérivées à partir d'hépatocytes de souris adultes ou de fibroblastes humains à l'aide de vecteurs adénoviraux, incapables de se répliquer et donc non-intégratifs, favorisant une forte expression des transgènes de façon transitoire (Stadtfeld *et al.*, 2008 ; Zhou and Freed, 2009). Néanmoins, en raison de la faible subsistance des gènes exogènes dans les cellules et donc de l'incapacité pour celles-ci d'atteindre un

état de reprogrammation dans lequel la pluripotence était maintenue par les gènes endogènes, l'efficacité était d'environ 0,001% et donc bien inférieure à celle obtenue avec les vecteurs intégratifs.

Un autre type de virus non-intégratif, faisant partie de la famille des Paramyxoviridae, a été également utilisé. Il s'agit du virus Sendai (SeV) qui est un virus à ARN brin négatif non-segmenté (Fusaki *et al.*, 2009 ; Nishimura *et al.*, 2010). Ce virus peut infecter une large gamme d'hôtes tout en étant incapable de se répliquer et en n'étant pas pathogène chez l'Homme, ce qui en fait un vecteur intéressant capable, de surcroît, d'une surexpression transitoire mais forte des transgènes. Fusaki *et al.* ont utilisé quatre vecteurs pour délivrer les quatre facteurs de reprogrammation aux fibroblastes murins avec une efficacité avoisinant les 1% alors que Nishimura *et al.* ont eu recours à un unique vecteur pour délivrer les quatre gènes avec une efficacité de reprogrammation de 0,83%. Néanmoins, la nature cytopathique et le potentiel d'auto-réplication des vecteurs SeV sont des limites à leur utilisation.

En 2008, Okita *et al.* ont également généré avec succès des iPSCs à partir de fibroblastes et d'hépatocytes de souris en utilisant deux constructions plasmidiques pour transporter les facteurs de reprogrammation (un plasmide pour Oct4, Sox2 et Klf4 et un autre plasmide pour c-Myc) (Okita *et al.*, 2008). L'efficacité de reprogrammation était faible avec environ 0,001%. De même, Si-Tayeb *et al.* ont généré des cellules iPS humaines à partir de fibroblastes par la transfection de quatre plasmides contenant chacun un facteur de reprogrammation parmi Oct4, Nanog, Sox2 et Lin28 avec une efficacité de 0,0003% (Si-Tayeb *et al.*, 2010). Si cette technique apporte des progrès concernant l'intégration des vecteurs dans le génome, il subsiste néanmoins des risques d'intégration occasionnelle.

En 2010, Jia *et al.* ont utilisé un vecteur ADN minicercle polycistronique afin de délivrer les facteurs de reprogrammation à des cellules souches du tissu adipeux humain. Ce vecteur a pour avantages une forte efficacité de transfection ainsi qu'une longue expression des gènes exogènes en raison de la faible activation des mécanismes de « silencing » exogènes. L'efficacité de reprogrammation obtenue était d'environ 0,005%, ce qui est certes inférieur à celle des vecteurs intégratifs mais qui reste supérieur à celle des plasmides (Jia *et al.*, 2010).

Un autre type de virus a permis de générer avec succès des iPSCs à partir de fibroblastes humains sans intégration du vecteur dans le génome. Il s'agit d'un vecteur episomal dérivé de oriP/EBNA1 (Epstein-Barr Nuclear Antigen-1). Pour être

efficace, il est nécessaire que ce vecteur contienne à la fois Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4, Nanog, Lin28 et SV40LT. Néanmoins, là encore, l'efficacité de reprogrammation reste très limitée avec environ cinq colonies d'iPSCs générées à partir de 10^6 cellules somatiques (Yu *et al.*, 2009). Dans l'ensemble, les vecteurs non-intégratifs ont donc une efficacité inférieure à celle des vecteurs intégratifs. Ceci s'explique par le fait que l'expression des facteurs exogènes est transitoire et donc que cette durée n'est pas suffisante pour permettre le remodelage épigénétique complet des cellules.

c) Vecteurs excisables

Pour contourner ce problème, de nouvelles approches ont recours à des vecteurs intégratifs excisables et notamment des vecteurs avec des sites loxP incorporés permettant l'excision par l'expression transitoire de la Cre recombinase (Kaji *et al.* 2009 ; Soldner *et al.* 2009). La protéine Cre est une recombinase de l'ADN site-spécifique qui catalyse donc la recombinaison de l'ADN entre deux sites spécifiques, en l'occurrence deux sites loxP. Ainsi, la séquence comprise entre les deux sites est excisée et une DNA ligase va permettre la jonction entre les fragments d'ADN entourant cette séquence. Soldner *et al.* ont ainsi utilisé des vecteurs lentiviraux inducibles par la doxycycline et au sein desquels les transgènes étaient flanqués par deux sites loxP afin de reprogrammer des fibroblastes humains. Les fibroblastes ont donc été transduits avec les différents vecteurs contenant les facteurs de reprogrammation ainsi qu'un autre vecteur exprimant le transactivateur inverse de la tétracycline se liant à la doxycycline afin d'induire l'expression des transgènes. L'efficacité de ce système, après ajout de la doxycycline, était de 0,005% (trois facteurs de reprogrammation ; sans c-Myc). Avant excision, il a été montré qu'il existait environ cinq sites d'intégration des transgènes dans le génome. Ensuite, un vecteur contenant la Cre recombinase et la séquence codant pour le gène de résistance à la puromycine (ou Cre recombinase et EGFP) a été transfecté dans les iPSCs générées afin d'exciser les transgènes. Après cette étape, aucun site d'intégration résiduel n'a été détecté dans le génome. Kaji *et al.* ont, quant à eux, eu recours à un plasmide contenant les quatre facteurs de reprogrammation dits de Yamanaka flanqués par des sites loxP afin de reprogrammer des fibroblastes murins avec une efficacité de reprogrammation de l'ordre de 2,5%. Un site d'intégration du vecteur a été détecté dans le génome. Le vecteur a ensuite été excisé grâce à la Cre recombinase. Ce système génère donc, avec succès, des cellules souches

pluripotentes induites libres de toute intégration des vecteurs de reprogrammation mais les sites loxP restent, quant à eux, présents dans le génome des cellules. Il faut donc s'assurer que cela n'aura aucune influence sur le devenir des cellules générées. Un autre type de vecteur excisable utilisé est le transposon PiggyBac. Il permet de délivrer les quatre facteurs de Yamanaka ensemble dans les cellules. Il s'agit d'un élément génétique mobile issu d'un insecte qui s'intègre efficacement dans le génome et plus précisément les régions transcrites des cellules de mammifères. Une fois la reprogrammation effective, les transgènes sont excisés grâce à l'expression transitoire de la transposase (Yusa *et al.*, 2009). Le transposon a été transfecté dans des fibroblastes murins avec une efficacité de reprogrammation d'environ 1% générant également de multiples sites d'insertion dans le génome. La transposase a alors été transfectée à l'aide d'un plasmide pour permettre l'excision des transgènes. Les cellules générées étaient alors libres de sites d'insertion. Néanmoins, comme pour les vecteurs utilisant le système d'excision Cre-lox, la sélection des lignées excisées reste délicate. De plus, il faut encore s'assurer que l'expression de la transposase n'induit pas l'apparition d'altérations génomiques non spécifiques dans les iPSCs obtenues (Stadtfield et Hochedlinger, 2009).

d) Absence de vecteur

Des cellules souches pluripotentes induites ont également été générées à partir de fibroblastes humains et murins sans utiliser de vecteurs viraux ou plasmidiques mais en délivrant les facteurs de reprogrammation aux cellules sous forme de protéines recombinantes purifiées (Zhou *et al.*, 2009), d'extraits cellulaires issus de cellules souches embryonnaires (Cho *et al.*, 2010), ou de cellules HEK293 (cellules du rein embryonnaires humaines) génétiquement modifiées (Kim *et al.*, 2009) ou encore d'ARNs modifiés (Warren *et al.*, 2010).

Concernant la méthode des protéines, Zhou *et al.* ont construit des protéines recombinantes dans lesquelles le facteur de reprogrammation était lié par son domaine C terminal à un domaine poly-arginine (11R) qui a pour but de faciliter la transduction de la protéine. Les protéines générées ont alors été exprimées dans les corps d'inclusion chez *Escherichia Coli* puis solubilisées, et purifiées. Les fibroblastes murins ont donc été traités, à quatre reprises (tous les deux jours), sur la nuit, avec les protéines recombinantes de reprogrammation Oct4-11R, Sox2-11R, Klf4-11R et c-Myc-11R. L'efficacité de reprogrammation était faible avec 0,001% environ mais les

Vecteurs	Intégratifs			Excisables		Non-intégratifs		Absence d'ADN	
	rétroviraux	lentiviraux	Lentiviraux inducibles	Transposons	Lentiviraux via recombinaison	adénoviraux	plasmides	protéines	ARN
Types cellulaires	Fibroblastes, cellules souches neurales, cellules du foie, kératinocytes, cellules amniotiques, cellules sanguines, cellules du tissu adipeux	Fibroblastes, kératinocytes	Fibroblastes, cellules β , kératinocytes, cellules sanguines, mélanocytes	Fibroblastes	Fibroblastes	Fibroblastes, cellules du foie	Fibroblastes, cellules sanguines	Fibroblastes	Fibroblastes
Espèces	Homme, souris, rat, porc, singe rhésus	Homme, souris	Homme, souris, porc, mouton	Homme, souris	Homme, souris	Homme, souris	Homme, souris	Homme, souris	Homme
Efficacité	Entre 0,01% et 0,5%	Entre 0,1% et 1%	Entre 0,1% et 1%	Environ 0,1%	Entre 0,1% et 1%	$\approx 0,001\%$	$\approx 0,001\%$	$\approx 0,001\%$	$\approx 1\%$
Avantages	Efficacité raisonnable	Efficacité raisonnable	Efficacité raisonnable, expression contrôlée des facteurs délivrés	Efficacité raisonnable, absence d'intégration	Efficacité raisonnable, absence d'intégration	Absence d'intégration	Absence d'intégration	Absence d'intégration, absence d'ADN	Absence d'intégration, efficacité élevée
Inconvénients	Sites d'intégration multiples, silencing incomplet	Sites d'intégration multiples, silencing incomplet	Sites d'intégration multiples, nécessite l'expression de transactivateur (Doxycycline,...)	Sélection des lignées excisées délicate	Sélection des lignées excisées délicate, les sites de recombinaison (loxP) persistent dans le génome	Faible efficacité	Faible efficacité, risque occasionnel d'intégration	Faible efficacité	Nécessite de nombreuses étapes de transfection

Tableau 1. Récapitulatif des vecteurs utilisés pour la reprogrammation des cellules souches pluripotentes induites.

auteurs ont constaté l'absence d'insertion de composés exogéniques dans le génome (Zhou *et al.*, 2009).

Cho *et al.* ont, pour leur part, utilisé des extraits cellulaires issus de cellules souches embryonnaires murines pour reprogrammer des fibroblastes cardiaques murins. Afin de préparer les extraits cellulaires, les cellules ES ont été trypsinées et centrifugées. Le culot cellulaire a alors été placé dans du tampon de lyse et le lysat a été centrifugé à grande vitesse (15000g) afin de récolter les protéines. Pour préparer le transfert des protéines dans les fibroblastes, les membranes de ces derniers ont été perméabilisées de façon réversible à l'aide de streptolysine O et les cellules ont alors été mises en contact avec les extraits cellulaires avant d'être placées sur un tapis de cellules nourricières (Cho *et al.*, 2010).

Kim *et al.* ont travaillé à partir d'extraits cellulaires de cellules HEK293 génétiquement modifiées pour exprimer les protéines OKSM liées à un domaine poly-arginine (9R) ou le tag Myc pour reprogrammer des fibroblastes de nouveau-né humain. A nouveau, l'efficacité de reprogrammation était de l'ordre de 0,001% (Kim *et al.*, 2009). Pour ces approches utilisant les protéines recombinantes, un recours aux inhibiteurs des histone déacétylases (HDAC) et à l'acide valproïque (VPA) est nécessaire pour accroître la reprogrammation. Les inhibiteurs de HDAC, en diminuant le degré de méthylation de la cytosine dans les cellules somatiques, mais aussi en induisant la répulsion des nucléosomes, la transcription des gènes et la relaxation de la chromatine, favorisent ainsi un retour à un stade pluripotent. L'acide valproïque est un inhibiteur de la GABA (γ -Aminobutyric acid) transaminase qui peut également avoir un rôle d'inhibiteur des HDAC.

Dernièrement, Warren *et al.* ont reprogrammé avec succès différents types cellulaires humains à l'aide d'ARNs modifiés. Pour cela, ils ont produits des ARNs via la transcription *in vitro* (IVT). Afin d'améliorer la traduction et d'accroître la demi-vie des ARNs, une coiffe de cinquante guanines leur a été incorporée durant les réactions d'IVT par inclusion d'un analogue synthétique de la coiffe. Dans les ARNs générés, le cadre de lecture ouvert (ORF) des gènes d'intérêt était flanqué par une région non traduite en 5' contenant un fort signal d'initiation de la traduction (Kozak) et d'une région non traduite α -globine en 3' terminant par une séquence d'oligos dT afin d'y ajouter une queue polyA. Pour faciliter l'incorporation des ARNs dans la cellule et réduire les risques de réponse immunitaire, la séquence en bases ribonucléosidiques de ces derniers a été modifiée avec notamment la substitution de

la cytidine par la 5-méthylcytidine et la substitution de l'uridine par la pseudo-uridine. De plus, le milieu de culture était complété par la protéine recombinante B18R, un inhibiteur des interférons de type I. Les ARNs modifiés de Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc ont alors été transfectés dans les fibroblastes humains pour induire la reprogrammation avec une efficacité d'environ 1%. Il est également bon de noter qu'en conditions d'hypoxie (5% O₂ au lieu de 20%) et en transfectant les cellules à l'aide de cinq ARNs modifiés (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, Lin28), l'efficacité de reprogrammation a été amplifiée pour atteindre 4% (Warren *et al.*, 2010). Si ce système est très intéressant de par l'absence de site d'intégration et donc cette forte efficacité, il nécessite un grand nombre d'étapes dans la préparation des ARNs modifiés.

2.3 Les types de cellules somatiques

Depuis la première publication sur les iPSCs, différents types cellulaires ont servi de sources dans le but notamment de définir la meilleure source de cellules pour de futures applications thérapeutiques comme je l'ai relevé dans les exemples ci-dessous (**Tableau 2**). En effet, le type de cellules sources choisi a une influence sur l'efficacité de transduction/transfection ainsi que sur l'efficacité et la rapidité de reprogrammation (Maherali et Hochedlinger, 2008). Les cellules les moins matures semblant être les plus intéressantes comme outils de reprogrammation.

a) Cellules du mésoderme

En 2006, Takahashi et Yamanaka ont utilisé des fibroblastes aussi bien embryonnaires qu'adultes chez la souris. L'efficacité de reprogrammation était relativement faible (0,02%). Dans la même étude, afin de vérifier que l'origine des iPSCs n'était pas une fraction de cellules souches contenue dans la population de fibroblastes (0,0067% des cellules de peau chez la souris sont des cellules souches), un deuxième type cellulaire contenant une population plus importante de cellules souches ou multipotentes, des cellules de la moelle épinière, a été utilisé comme source d'iPSCs. En obtenant une efficacité de reprogrammation similaire à celle des fibroblastes, les auteurs ont conclu que les cellules souches présentes dans la population source n'étaient pas à l'origine des iPSCs générées (Takahashi et Yamanaka, 2006) .

Espèces	Feuillets embryonnaires	Type cellulaires	Références
Souris	Mésoderme	Fibroblastes	Takahashi and Yamanaka, 2006 Nakagawa <i>et al.</i> , 2008 Wernig <i>et al.</i> , 2008 Feng <i>et al.</i> , 2009 Heng <i>et al.</i> , 2010
		Cellules B matures	Hanna <i>et al.</i> , 2008
		Cellules B et T matures	Eminli <i>et al.</i> , 2009
		Progéniteurs myéloïdes	Eminli <i>et al.</i> , 2009
		Cellules souches Hématopoïétiques	Eminli <i>et al.</i> , 2009
		Cellules souches dérivées du tissu adipeux	Sugii <i>et al.</i> , 2010
		Derme papillaire	Tsai <i>et al.</i> , 2010
	Endoderme	Cellules pancréatiques β Endoderme hépatique	Stadtfeld <i>et al.</i> , 2008 Aoi <i>et al.</i> , 2008
	Ectoderme	Cellules souches neurales	Kim <i>et al.</i> , 2008 Kim <i>et al.</i> , 2009
		Mélanocytes	Utikal <i>et al.</i> , 2009
Homme	Mésoderme	Fibroblastes	Takahashi <i>et al.</i> , 2007 Yu <i>et al.</i> , 2007 Nakagawa <i>et al.</i> , 2008
		Sang périphérique mobilisé	Loh <i>et al.</i> , 2009
		Cellules endothéliales du sang de cordon	Haase <i>et al.</i> , 2009
		Cellules souches du sang de cordon	Eminli <i>et al.</i> , 2009 Giorgetti <i>et al.</i> , 2009
		Cellules souches dérivées du tissu adipeux	Sugii <i>et al.</i> , 2010
	Endoderme	Hépatocytes	Liu <i>et al.</i> , 2010
	Ectoderme	Kératinocytes	Aasen <i>et al.</i> , 2008
		Cellules souches neurales	Kim <i>et al.</i> , 2009
	Extra-embryonnaire	Cellules amniotiques	Li <i>et al.</i> , 2009
Rat	Mésoderme	Fibroblastes	Liao <i>et al.</i> , 2009 Chang <i>et al.</i> , 2010
	Endoderme	Cellules progénitrices du foie	Li <i>et al.</i> , 2009
	Ectoderme	Cellules progénitrices neurales	Chang <i>et al.</i> , 2010
Porc	Mésoderme	Fibroblastes embryonnaires	Esteban <i>et al.</i> , 2009
Mouton	Mésoderme	Fibroblastes de peau (oreille)	Bao <i>et al.</i> , 2011
Singe Rhésus	Mésoderme	Fibroblastes de peau (oreille)	Liu <i>et al.</i> , 2008
Ouistiti	Mésoderme	Fibroblastes de peau	Wu <i>et al.</i> , 2010

Tableau 2. Récapitulatif des différentes espèces et des différents types cellulaires utilisés pour la génération de cellules souches pluripotentes induites.

En 2008, Hanna *et al.* ont voulu vérifier la capacité des cellules matures murines complètement différenciées à générer des iPSCs. Pour cela, ils ont reprogrammé des lymphocytes B matures et immatures en utilisant les gènes OKSM. Si ces quatre facteurs étaient suffisant pour reprogrammer les cellules immatures, les auteurs ont noté que, concernant la reprogrammation des cellules matures, l'induction de la surexpression de C/EBP α ou le knock-down de Pax5, facteur de transcription spécifique des cellules B, était nécessaire pour interrompre l'état transcriptionnel maintenant leur identité et ainsi les placer dans un état macrophage-like avant la reprogrammation. L'efficacité de reprogrammation de ces cellules matures était d'environ 3% ce qui est assez élevé et probablement dû à la forte induction médiée par la doxycycline des facteurs nécessaires à la reprogrammation contenus dans des vecteurs lentiviraux (Hanna *et al.*, 2008).

L'année suivante, des travaux sur des cellules hématopoïétiques ont confirmé l'importance de l'état de différenciation sur l'efficacité de reprogrammation (Eminli *et al.*, 2009). En effet, des iPSCs ont été générées à partir de fibroblastes de la queue de souris à l'aide des quatre facteurs de Yamanaka dans un système induit par la doxycycline. Ces cellules pluripotentes ont alors été injectées dans un blastocyste murin. Lorsque l'embryon a atteint 14,5 jours, le foie fœtal a été isolé et la différenciation des cellules a été poursuivie *in vitro* en co-culture. Les cellules T CD8⁺ ont ensuite été triées puis retransduites par les quatre vecteurs en présence de doxycycline pour générer des iPSCs secondaires qui ont de nouveau été injectées dans un blastocyste murin pour générer des chimères adultes. Les cellules hématopoïétiques des différentes étapes de la différenciation ont alors été isolées dans ces chimères et mises en présence de doxycycline afin de générer des iPSCs tertiaires utilisées ensuite pour l'étude. Ainsi, des iPSCs ont été obtenues à partir de cellules souches hématopoïétiques (16% d'efficacité), de progéniteurs myéloïdes (25%), de progéniteurs mégacaryocytaires/érythrocytaires (9%), de progéniteurs de granulocytes et macrophages (25%), de progéniteurs lymphoïdes communs (16%), de cellules B et T matures (0,02%), et de macrophages I (0,55%) et II (0,35%). Ces résultats montrent donc que l'efficacité de reprogrammation est plus importante à partir de cellules progénitrices que de cellules matures. De plus, des iPSCs ont été générées à partir de cellules endothéliales dérivées du sang de cordon, chez l'homme, avec une efficacité de reprogrammation de 0,01% à l'aide de vecteurs lentiviraux contenant les séquences codant pour OSNL (Haase *et al.*, 2009), mais

également à partir de cellules souches dérivées du sang de cordon, à l'aide de vecteurs rétroviraux contenant uniquement Oct4 et Sox2 (0,01%) (Giorgetti *et al.*, 2009).

En 2010, une fraction du stroma vasculaire a été isolée du tissu adipeux blanc de souris. Les cellules souches dérivées de ce tissu ont alors été reprogrammées à l'aide des facteurs de Yamanaka avec une efficacité de 0,2% (Sugii *et al.*, 2010). La même année, Tsai *et al.* ont généré avec succès des iPSCs à partir de cellules de papilles dermiques par transduction de vecteurs rétroviraux contenant OKSM (1,4%), voire même par transduction uniquement de vecteurs contenant OK (0,02%) (les cellules des papilles dermiques exprimant déjà fortement Sox2 et c-Myc) (Tsai *et al.*, 2010).

b) Cellules de l'ectoderme

Kim *et al.* ont reprogrammé des cellules souches neurales murines et humaines qui ont, elles aussi, la caractéristique d'exprimer fortement Sox2 et c-Myc en iPSCs (Kim *et al.*, 2008 ; Kim *et al.*, 2009). Dans leurs travaux, ils ont transduit les cellules avec différentes combinaisons de vecteurs rétroviraux contenant les gènes de Yamanaka, tout d'abord, avec quatre facteurs (3,6% de reprogrammation), puis trois (OKM, OKS, OMS) et deux (OK, OM) (0,11%). Cette population a aussi servi à générer des iPSCs chez le rat (Chang *et al.*, 2010). Utikal *et al.* ont utilisé comme sources d'iPSCs des mélanocytes aussi bien murins qu'humains à l'aide de 4 ou 3 facteurs (OKM) (0,2% d'efficacité de reprogrammation) (Utikal *et al.*, 2009).

Aasen *et al.* ont montré la capacité de kératinocytes issus de prépuce humain à être reprogrammés en cellules souches pluripotentes plus rapidement (10 jours contre 21 à 25 jours) et plus efficacement (1% contre 0,01%) que les fibroblastes par des vecteurs rétroviraux contenant les 4 facteurs dits de Yamanaka (Aasen *et al.*, 2008). Il ont noté que l'efficacité de transduction des 2 types cellulaires par des vecteurs lentiviraux contenant la séquence codant pour la GFP était similaire prouvant que la différence d'efficacité de reprogrammation n'était pas due à l'efficacité de transduction. Cette différence semble d'avantage due au fait que les kératinocytes expriment plus fortement c-Myc et Klf4 que les fibroblastes, qu'ils expriment des gènes spécifiques des cellules souches comme CD24 et donc que, d'un point de vue transcriptionnel, les kératinocytes sont plus proches des cellules souches

embryonnaires que les fibroblastes générant ainsi des iPSCs également plus proches des ESCs que celle issues des fibroblastes.

c) Cellules de l'endoderme

En 2008, Stadtfeld *et al.* ont, eux aussi, généré des iPSCs murines à partir de cellules complètement différenciées c'est-à-dire les cellules pancréatiques β , en utilisant le même type de vecteurs (0,1-0,2% de reprogrammation) (Stadtfeld *et al.*, 2008). La même année, Aoi *et al.* ont obtenu des iPSCs à partir d'hépatocytes primaires et de cellules épithéliales gastriques de souris. S'il n'y a pas d'indication concernant l'efficacité de reprogrammation, il est à noter qu'en terme d'expression des gènes de pluripotence, ces cellules dérivées de cellules épithéliales sont plus proches des cellules souches embryonnaires que celles issues de fibroblastes (Aoi *et al.*, 2008). Li *et al.* ont aussi généré des cellules souches pluripotentes induites à partir de cellules progénitrices hépatiques chez le rat (Li *et al.*, 2009).

d) Cellules du tissu extra-embryonnaire

Des cellules dérivées du liquide amniotique humain, et plus précisément des cellules adhérentes courtes et fusiformes, ont également servi de sources pour la génération de cellules souches pluripotentes à l'aide de vecteurs rétroviraux contenant OKSM. L'efficacité de reprogrammation varie selon les différentes expériences de 0,05% à 1,5% et l'apparition des colonies d'iPSCs a lieu dès 6 jours après transduction (Li *et al.*, 2009).

2.4 Les espèces

Les tous premiers travaux sur les iPSCs ont été réalisés chez la souris (Takahashi *et al.*, 2006). Dès l'année suivante, les travaux sur les cellules souches induites ont été concentrés sur l'obtention de l'outil chez l'Homme (Takahashi *et al.*, 2007 ; Yu *et al.*, 2007). Différents autres modèles animaux ont également été mis en place. Ainsi, des cellules souches pluripotentes induites ont été générées chez le rat (Liao *et al.*, 2009) ou encore, dans le cas d'un plus gros animal, le porc (Esteban *et al.*, 2009), dans le modèle historique du transfert nucléaire, le mouton (Bao *et al.*, 2011), mais aussi des primates non humains comme le ouistiti (Wu *et al.*, 2010) et le singe rhésus (Liu *et al.*, 2008) (**Tableau 2**).

2.5 Comparaison des cellules souches pluripotentes induites et embryonnaires

Une question complexe, et jusqu'à présent non-résolue, est de savoir si les iPSCs sont équivalentes aux ESCs. Dans l'espoir d'utiliser les cellules souches induites comme outil alternatif de thérapie, il est primordial d'y répondre car des anomalies génétiques ou épigénétiques peuvent influencer les cellules reprogrammées au cours de la différenciation, de la transplantation, générant par conséquent des cellules avec des profils moléculaires et biologiques différents des cellules dérivées des ESCs. Ainsi, pour déterminer si les cellules reprogrammées sont pluripotentes, différentes caractéristiques des cellules souches sont étudiées. En effet, en plus de vérifier l'auto-renouvellement des cellules générées, une étude morphologique de celles-ci doit montrer qu'elles sont similaires aux cellules souches embryonnaires : colonies plates, compactes et aux bords bien définis pour les cellules humaines et des colonies moins plates et plus agrégées pour les cellules murines. De plus, l'expression de marqueurs de pluripotence tels que Nanog, ou encore les glycolipides SSEA3 et SSEA4 et les antigènes associés aux tumeurs TRA 1-60 et TRA 1-81 (chez l'homme) est analysée par immunocytochimie. Une forte activité de l'alkaline phosphatase (ALP), enzyme responsable de la déphosphorylation de nucléotides et protéines, est également mesurée dans ces cellules tout comme dans les cellules souches. Il est important de s'assurer de l'extinction des gènes exogènes et donc garantir que l'expression, par exemple, de Oct4 est uniquement endogène afin de confirmer la reprogrammation totale des cellules. Il est aussi intéressant d'évaluer, dans le cas des vecteurs intégratifs, le nombre de copies des gènes exogènes insérés dans le génome cellulaire et de déterminer les sites d'intégration pour s'assurer que l'intégration n'active pas d'oncogènes notamment. Il est également nécessaire de vérifier l'intégrité du caryotype après reprogrammation ainsi que les caractéristiques des télomères telles que leur longueur (Stadtfield *et al.*, 2008 ; Marion *et al.*, 2009). Il est intéressant de mesurer l'activité des télomérases ainsi que l'expression de hTERT dans ces cellules. En effet, les télomérases, nécessaires au maintien de la division cellulaire et donc à l'auto-renouvellement et la prolifération des cellules, sont très actives dans les cellules reprogrammées tout comme dans les ESCs. De même, l'expression de hTERT, élément nécessaire dans le complexe protéique télomérase, y est élevée. Afin de confirmer la pluripotence des cellules générées, celles-ci doivent être différenciées en des types cellulaires

provenant de chacun des trois feuillets embryonnaires et aussi être capables de former des tératomes, tumeurs contenant des tissus provenant à la fois de l'ectoderme, de l'endoderme et du mésoderme, lorsqu'elles sont transplantées dans des souris immunodéficientes.

Le remodelage épigénétique est également étudié, et plus particulièrement la déméthylation des promoteurs de Nanog et Oct4, grâce au traitement au bisulfite des séquences d'ADN. Cela révèle que, contrairement aux cellules somatiques d'origine, les iPSCs obtenues ont leur séquence ADN déméthylée au niveau de ces promoteurs de façon comparable à ce qui est observé dans les ESCs. Il a été démontré, chez la souris notamment, qu'il était possible de générer des individus chimères en introduisant des iPSCs dans le blastocyste et que celles-ci contribuaient à l'établissement de la lignée germinale de ces chimères. La génération de souris dérivées totalement d'iPSCs a même été réalisée par complémentation tétraploïde confirmant que le potentiel développemental des cellules souches induites est comparable à celui des ESCs (Zhao *et al.*, 2009). Il est également intéressant de noter que le X inactivé est réactivé dans les iPSCs générées à partir de cellules somatiques de souris femelle, celui-ci pouvant de nouveau s'inactiver aléatoirement en cours de différenciation (Maherali *et al.*, 2007). Au contraire, chez l'homme, les iPSCs dérivées à partir de fibroblastes du derme de femme n'ont pas été capable de réactiver le chromosome X inactivé et conservent ainsi le même chromosome X inactivé dans les cellules différenciées (Tchieu *et al.*, 2010).

Certains travaux indiquent qu'une analyse de l'expression d'un grand nombre de gènes et de modifications des histones révèle de légères variations entre les iPSCs et les ESCs, chez l'homme, au niveau de la structure chromatinienne et dans l'expression des gènes même si cela ne reflète pas une distinction constante entre les deux types cellulaires (Guenther *et al.*, 2010 ; Newman et Cooper, 2010). Cependant d'autres études laissent penser que les iPSCs sont une sous-population unique de cellules pluripotentes ayant une signature constante, quelles que soient les cellules d'origine et la méthode de reprogrammation, et distinguishable des ESCs lors des premiers passages suivant la reprogrammation, s'estompant sans complètement disparaître par la suite (Chin *et al.*, 2009). Il est intéressant de déterminer si cette signature très marquée lors des passages précoces représente une mémoire génétique (Chin *et al.*, 2009) et épigénétique (Marchetto *et al.*, 2009 ; Kim *et al.*, 2010 ; Polo *et al.*, 2010 ; Lister *et al.*, 2011) des cellules donneuses ou si

elle résulte de l'expression résiduelle des transgènes qui peut perturber le profil transcriptionnel des iPSCs (Soldner *et al.*, 2009). Il est important de noter aussi, qu'en plus des variations d'expressions géniques entre iPSCs et ESCs, il existe également des variations d'expression génique entre les différentes lignées d'iPSCs générées (Lister *et al.*, 2011). Les effets de ces variations spécifiques sur les fonctions cellulaires restent encore à déterminer. Il faut aussi prendre en compte la question de l'empreinte génétique, à savoir si les gènes maternels ou paternels conservent ou non leur expression mono-allélique durant la reprogrammation avec extinction du second allèle. Si, dans la plupart des cas, l'expression de ces gènes soumis à empreinte reste mono-allélique, Pick *et al.* ont identifié quelques lignées iPSCs avec une expression bi-allélique aberrante de certains de ces gènes (Pick *et al.*, 2009). Ces résultats soulignent l'intérêt d'analyser l'« imprinting » des gènes notamment dans les iPSCs susceptibles d'avoir une utilité thérapeutique sachant qu'une expression perturbée des gènes soumis à empreinte peut engendrer des troubles génétiques.

Néanmoins, afin de définir de façon plus explicite les différences et les similarités entre iPSCs et ESCs, il serait intéressant de comparer des iPSCs dérivées du trophoblastes d'un individu à des ESCs issues de la masse interne du blastocyste du même individu, ce qui n'a jusqu'à présent pas été réalisé.

2.6 Applications pratiques des iPSCs

a) Modèles animaux de maladies

La convergence de la recherche sur les cellules souches et d'applications médicales est depuis longtemps déjà la cible d'un grand intérêt de la part de la communauté scientifique. En effet, les cellules souches pluripotentes offrent l'espoir de traitement pour les personnes souffrant de maladies génétiques ou encore d'une dégénération cellulaire due à une blessure. Il a déjà été prouvé que les cellules souches embryonnaires pouvaient être différenciées *in vitro* en un grand nombre de types cellulaires comme les neurones, les cardiomyocytes ou encore des cellules hématopoïétiques (Murry et Keller, 2009). De plus, le potentiel thérapeutique des cellules ainsi obtenues a été démontré dans des modèles animaux comme, par exemple, la capacité de neurones dopaminergiques dérivés à partir de cellules ES humaines à corriger des déficits fonctionnels dans le modèle de la maladie de Parkinson chez le rat (Yang *et al.*, 2008 ; Kim *et al.*, 2008). Jusqu'à présent,

l'adaptation de ses approches à des patients humains a été confrontée à des préoccupations éthiques concernant l'utilisation de matériel embryonnaire humain ainsi que les risques de rejet immunitaire des cellules transplantées.

L'utilisation de cellules souches pluripotentes induites pour une approche thérapeutique spécifique à chaque patient permet de contourner ces obstacles. En effet, l'utilisation des cellules somatiques du patient comme source des iPSCs n'induit pas de rejet immunitaire en cas de transplantation autologue. Par conséquent, dans les cas de maladies génétiques pour lesquelles le déficit est connu, il sera possible d'apporter la preuve de concept de leur utilisation à des fins thérapeutiques pour chaque tissu chez l'animal. Le premier exemple a été réalisé dans le modèle murin humanisé de l'anémie falciforme, maladie caractérisée par une altération de l'hémoglobine et plus précisément la chaîne β (Hanna *et al.*, 2007). Dans cette étude, les fibroblastes d'une souris, pour laquelle les gènes de l' α -globine murine ont été remplacés par les gènes humains et ceux de la β -globine murine ont été substitués par le gène de la β -globine humaine ayant la mutation β^S (sickle), ont été reprogrammés en iPSCs à l'aide de vecteurs rétroviraux contenant les séquences codant pour OKS. Un vecteur lentiviral a également délivré la séquence codant pour c-Myc flanquée de deux sites loxP afin de permettre l'excision de celle-ci à l'aide de la Cre recombinase. Les cellules ainsi obtenues ont alors subi une électroporation afin d'y délivrer une construction contenant le gène « wild type » de la β -globine humaine (β^A). Les iPSCs possédant la correction ont été différenciées *in vitro* en progéniteurs hématopoïétiques qui ont alors été transplantés dans des souris mâles anémiques préalablement irradiées afin d'évaluer leur capacité de reconstitution du système hématopoïétique tout en corrigeant le phénotype de la maladie (**Figure 13**). 70% des cellules issues du sang périphérique de ces souris provenaient des iPSCs induisant ainsi une présence de l'allèle S de la β -globine toujours plus importante à celle évaluée dans les contrôles β^A/β^S . Néanmoins, jusqu'à 65% de cellules exprimaient la β^A -globine contre 0% avant la transplantation. Ces travaux ont donc prouvé pour la toute première fois l'important potentiel thérapeutique des iPSCs.

Raya *et al.* ont montré qu'il était également possible de corriger le phénotype de progéniteurs hématopoïétiques issus de patients atteints de l'anémie de Fanconi (AF), maladie se manifestant par une insuffisance médullaire et due à des mutations sur un des treize gènes FANC (le plus souvent FANCA ou encore FANCC, FANCG

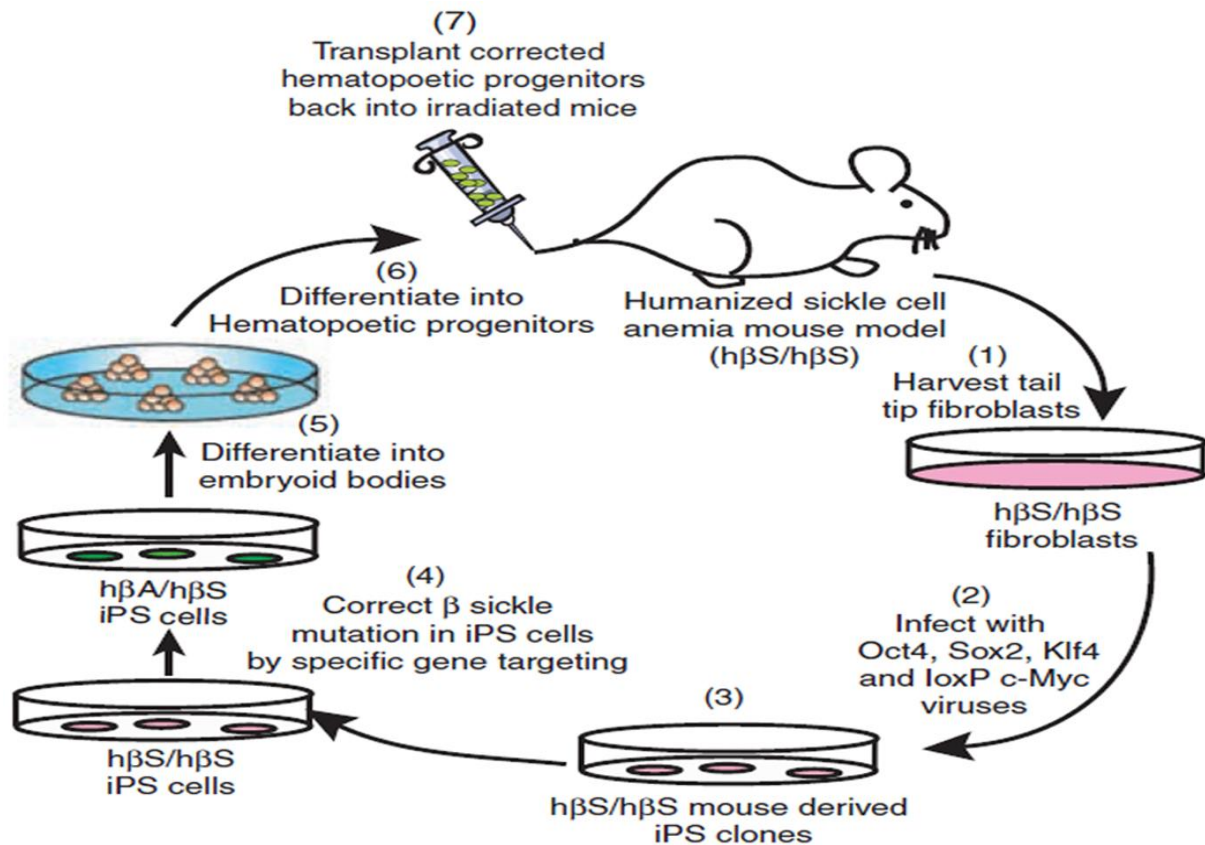


Figure 13. Schéma de l'approche thérapeutique pour corriger l'anémie falciforme, chez le modèle murin, à l'aide des iPSCs (Hanna et al, 2007). Les iPSCs sont générées à partir des cellules de peau de souris anémiques. La mutation est alors corrigée dans ces cellules qui sont ensuite différenciées *in vitro* en progéniteurs hématopoïétiques afin d'être transplantées dans les souris porteuses de la mutation préalablement irradiées.

et FANCD2). Pour cela, les auteurs ont isolé des fibroblastes du derme et des kératinocytes de l'épiderme de six patients : quatre pour lesquelles la mutation concerne le groupe de complémentation AF-A et deux dont la mutation concerne le groupe AF-D2.

En raison de l'instabilité génétique et de la prédisposition à l'apoptose des cellules AF, le phénotype a été corrigé dans les cellules somatiques à l'aide de vecteurs lentiviraux contenant les séquences codant pour FANCA ou FANCD2 avant la reprogrammation. La génération d'iPSCs à partir de ces cellules corrigées a été obtenue en deux transductions rétrovirales des gènes OKSM. Malgré le choix de vecteurs lentiviraux, connus pour être résistants à l'extinction des transgènes dans les cellules ES, les auteurs ont constaté une extinction partielle des gènes de correction de l'anémie dans les iPSCs générées. Néanmoins, elles possédaient une voie AF complètement fonctionnelle et étaient phénotypiquement non malades. Ces cellules ont ensuite été différenciées *in vitro* en progéniteurs hématopoïétiques, de façon comparable à la différenciation des ESCs et iPSCs d'individus non malades, tout en conservant un phénotype non malade (Raya *et al.*, 2009).

D'autres approches ont utilisé des iPSCs générées à partir de cellules somatiques non malades comme outil thérapeutique. Ainsi, Wernig *et al.* ont étudié le potentiel thérapeutique du remplacement cellulaire sur la maladie de Parkinson. Il s'agit d'une maladie neurologique chronique affectant le système nerveux central se manifestant par la perte de neurones de la substance noire et d'une atteinte des faisceaux nigro-striés (système dopaminergique). La dégénérescence plutôt localisée d'un type cellulaire spécifique en faisait donc un candidat de choix à cette approche thérapeutique (Wernig *et al.*, 2008). Ils ont, pour cela, reprogrammé des fibroblastes de rat par transduction rétrovirale des quatre facteurs de transcription OKSM. Les iPSCs générées ont alors été différenciées *in vitro* en neurones dopaminergiques. Les rats ont été traités par la 6-hydroxydopamine (6-OH-DA) dans le striatum, tuant spécifiquement les neurones dopaminergiques, ce qui offrait un modèle animal de la maladie de Parkinson. Afin de voir la capacité des neurones dérivés des iPSCs à restaurer la fonction après la perte de neurones dopaminergiques du mésencéphale dans le cerveau adulte, les cellules ont été transplantées dans le striatum de ces rats. Quatre semaines après l'intervention chirurgicale, un grand nombre de cellules exprimant la tyrosine hydroxylase, une enzyme impliquée dans la synthèse de la

dopamine, étaient présentes dans le cerveau des rats traités indiquant ainsi un recouvrement de la fonction des neurones dopaminergiques.

Dans une autre étude, Xu *et al.* ont corrigé le phénotype de souris atteintes de l'hémophilie A en transplantant des cellules dérivées d'iPSCs saines (Xu *et al.*, 2009). L'hémophilie A est une maladie congénitale de la coagulation sanguine causée par une mutation du gène Facteur VIII (FVIII). Les auteurs ont donc généré des iPSCs à partir de fibroblastes de l'extrémité de la queue de souris C57BL/6, proche du modèle de l'hémophilie A (délétion de l'exon 16 du gène FVIII), transduits par des rétrovirus contenant OKS. Les cellules pluripotentes ont ensuite été différenciées en progéniteurs endothéliaux et cellules endothéliales matures, connues pour être les principales sources de sécrétion du Facteur VIII *in vivo* en utilisant la méthode de différenciation des corps embryoïdes. Les cellules ainsi différenciées ont alors été transplantées dans le foie de souris hémophiles mâles préalablement irradiées. Pour évaluer la correction phénotypique, les auteurs ont effectué un test de saignement au niveau de la queue de souris hémophiles non traitées, de souris hémophiles transplantées et de souris saines C57BL/6. Alors que les souris non-traitées sont mortes après quelques heures, les souris C57BL/6 et les souris transplantées ont survécu. De plus, trois mois après transplantation, le niveau d'expression du Facteur VIII est d'environ 10% de l'expression normale avec également une expression accrue de FVIII comparées aux souris non-traitées (trois fois plus importante au niveau du foie, sept fois au niveau du cœur et des reins, huit fois au niveau de la rate).

Nelson *et al.* ont prouvé la capacité de la technologie des iPSCs pour résorber un infarctus aigu du myocarde (nécrose d'une partie du muscle cardiaque) chez la souris (Nelson *et al.* 2009). Pour cela, ils ont reprogrammé des fibroblastes à l'aide des facteurs de transcription OKSM. Les cellules souches ainsi générées ont ensuite été transduites par un vecteur lentiviral contenant un gène rapporteur (LacZ ou Luciférase). Deux cent mille cellules ont ensuite été transplantées dans le myocarde d'hôtes immunocompétents (dose déterminée comme n'engendrant pas de tumeur avec les ESCs). Cette greffe s'est avérée stable et sans formation de tumeur. Quatre semaines après la transplantation, la population indifférenciée issue des iPSCs était quasiment nulle, ce qui indique une différenciation presque complète en cellules cardiaques. La transplantation d'iPSCs dans un myocarde post-ischémique a révélé

la génération *de novo* du tissu cardiovasculaire (différents types cellulaires) et une amélioration de la performance des cellules du myocarde.

Néanmoins, l'utilisation des cellules iPS en médecine régénérative fait, pour le moment, face à de nombreux obstacles. A l'heure actuelle, la méthode de reprogrammation la plus fréquemment utilisée a recours aux vecteurs rétroviraux ou lentiviraux, qu'ils soient inductibles ou non ou encore excisable ou non. L'utilisation de ces vecteurs intégratifs induit un risque de mutagénèse mais également un risque de dérégulation de l'expression des gènes endogènes (Montini *et al.*, 2009). Il sera donc important de développer les méthodes utilisant des vecteurs non intégratifs afin d'en améliorer l'efficacité de reprogrammation. De plus, les principaux facteurs impliqués dans la reprogrammation sont soit des oncogènes comme c-Myc et KLF4 soit liés à la tumorigénèse comme Oct4, Sox2 et Nanog comme nous l'avons vu précédemment. Si certains ne sont pas indispensables, leur absence dans le cocktail de facteurs entraîne une diminution de l'efficacité de reprogrammation. Même si l'extinction des gènes exogènes est constatée après la reprogrammation, celle-ci s'avère parfois incomplète, pouvant, ainsi, favoriser la réactivation à des stades plus tardifs de ces gènes et entraîner la formation de tumeurs malignes dans le cadre d'une transplantation (Okita *et al.*, 2007).

b) Modélisation des maladies in vitro à partir de cellules humaines et drug screening

Les ESCs et les iPSCs représentent des sources illimitées de différents types cellulaires qu'il était, pour un certain nombre, difficile d'obtenir auparavant comme les hépatocytes. Pour un grand nombre de maladies génétiques, et plus particulièrement pour les maladies rares, la physiologie de la pathogénèse n'est pas complètement connue et jusqu'à présent, les modèles animaux étaient utilisés afin d'étudier les mécanismes de ces maladies. La génération d'iPSCs de donneurs atteints de maladies génétiques offre la possibilité de récapituler directement *in vitro* le développement d'altérations physiopathologiques et d'en comprendre les mécanismes moléculaires. C'est pourquoi l'utilisation de modèles humains générés grâce aux iPSCs est cruciale comme le prouvent différents échecs liés, entre autres, aux différences entre espèces, lors d'essais cliniques (Rubin, 2008). Ainsi, divers travaux utilisant les iPSCs ont prouvé la possibilité de modéliser différentes maladies.

Par exemple, la première étude montrant cette opportunité a été réalisée par Ebert *et al.* en générant des iPSCs par transduction lentivirale de OSNL à partir de fibroblastes de peau de patients atteints d'amyotrophie spinale (Ebert *et al.*, 2009). Cette maladie neurologique autosomale récessive est due à une mutation sur le gène SMN1 (Survival Motor Neuron 1) conduisant à la dégénérescence des motoneurones α inférieurs qui entraîne une faiblesse musculaire, une paralysie et parfois la mort infantile. Les cellules pluripotentes générées ont été caractérisées et sont confirmées avoir toujours des niveaux bas de transcription de SMN1. Les auteurs ont alors différencié ces cellules en astrocytes, neurones et surtout motoneurones. En parallèle, des iPSCs d'individu non malade ont été générées et également différenciées en cellules neuronales. La comparaison de ces deux cas de figure indique que si les iPSCs issues de patients peuvent générer la même quantité de neurones et motoneurones que celles d'individus sains au début du processus, à long terme, le phénotype de la maladie réduit sélectivement la production de motoneurones et/ou augmente la dégénérescence de ceux-ci.

Une autre équipe a utilisé la technologie des iPSCs pour étudier la pathogénèse de la dysautonomie familiale ou syndrome de Riley-Day (Lee *et al.*, 2008). Il s'agit d'une maladie autosomale récessive fatale affectant le système nerveux périphérique et plus particulièrement caractérisée par la dégénérescence des neurones sensoriels et autonomes. Il a été montré, chez la plupart des patients, une mutation du gène IKBKAP (I- κ -B kinase complex associated protein) qui a pour conséquence une réduction de la motilité cellulaire. Les auteurs ont reprogrammé des fibroblastes de patients atteints de la dysautonomie familiale par transduction lentivirale des facteurs de transcription OKSM. Les progéniteurs de la crête neurale avaient un niveau d'expression de l'IKBKAP faible confirmant le phénotype malade de ces cellules. Une comparaison du transcriptome de ces cellules avec des cellules obtenues à partir d'individus sains a permis de mettre en lumière des gènes surexprimés dans le cadre de la maladie (35) ainsi que des gènes dont l'expression était réduite (54) dont certains impliqués dans la génèse du système nerveux périphérique et la différenciation neuronale.

Cette technologie a également permis de générer des motoneurones de patients atteints de sclérose latérale amyotrophique (SLA) également connue sous le nom de maladie de Charcot (Dimos *et al.*, 2008). Cette maladie neurodégénérative autosomale est caractérisée par la mort des motoneurones de la moëlle épinière et

du cortex moteur entraînant une paralysie progressive et la mort. La SLA peut être sporadique (dans 90% des cas) ou familiale (environ 5% des cas). Dans cette étude, les auteurs ont utilisé des fibroblastes d'une femme de 82 ans atteinte par une forme familiale de la maladie de Charcot, possédant une mutation sur le gène SOD1 (Super-Oxide Dismutase), qu'ils ont reprogrammés par transduction rétrovirale des facteurs de transcription OKSM. Les iPSCs ont alors pu être différenciées en motoneurones porteurs de la mutation présente dans les fibroblastes de la patiente donneuse ouvrant ainsi la voie à une thérapie par remplacement cellulaire.

Carvajal-Vergara *et al.* ont reprogrammé, selon le même protocole, des fibroblastes de patients atteints du syndrome LEOPARD, maladie génétique associant des lentigines multiples, des anomalies de la conduction cardiaque, un hypertélorisme, une sténose de la valve pulmonaire, des anomalies génitales, un retard de croissance et une surdité. Cette maladie autosomale dominante est due à une mutation du gène PTPN11 codant pour la protéine tyrosine phosphatase Shp2, impliquée dans la voie de signalisation RAS-MAPK et intervenant, notamment, dans les processus de croissance cellulaire, différenciation et cycle mitotique. Les iPSCs de ces patients ont ensuite été différenciées en différents types de cellules hématopoïétiques comme les progéniteurs hématopoïétiques précoces, les érythroblastes précoces et les macrophages mais aussi en cardiomyocytes afin de pouvoir étudier l'hypertrophie des cardiomyocytes détectée dans le syndrome LEOPARD.

Maehr *et al.* ont prouvé qu'il était tout autant possible de définir un modèle pour le diabète de type I ou diabète insulino-dépendant (Maehr *et al.*, 2009). Cette maladie, généralement auto-immune, aboutit à la destruction des cellules β des îlots de Langerhans, chargées du contrôle de la glycémie via la production d'insuline. Les auteurs ont donc utilisé des fibroblastes isolés à partir de biopsie de peau de patients atteints du diabète de type I afin de générer des iPSCs via une transduction rétrovirale des facteurs de transcription OKS. Les cellules pluripotentes, après caractérisation, ont été différenciées en cellules productrices d'insuline c'est-à-dire les cellules β via la différenciation en endoderme puis en progéniteurs pancréatiques. Ces cellules ainsi générées ont donc permis de mettre en place un dépistage de médicaments capables de traiter la maladie.

Moretti *et al.* ont généré, par transduction rétrovirale des facteurs de Yamanaka, des iPSCs à partir de fibroblastes du derme de patients atteints par le syndrome du QT

long de type I (Moretti *et al.*, 2010). Cette maladie, généralement autosomale dominante, se caractérise par une prolongation de l'espace QT (durée électrique de la contraction cardiaque ou systole) sur l'électrocardiogramme de surface et une tachy-arythmie ventriculaire conduisant à une syncope ou une mort soudaine. Elle est associée à une mutation dans le gène KCNQ1 (potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1) qui, normalement, induit la repolarisation des canaux potassiques favorisant le maintien d'un rythme cardiaque régulier. Les cellules pluripotentes obtenues ont alors été différenciées en myocytes qui ont conservé la mutation du gène KCNQ1. Les auteurs ont alors pu étudier la distribution de la protéine KCNQ1 au sein des myocytes obtenus à partir des cellules des patients afin de connaître les conséquences de la mutation (l'arginine en position 190 est remplacée par une glutamine) et ont découvert un défaut dans le trafic de la protéine. Ils ont également pu comparer la fonctionnalité des protéines mutantes et des protéines intactes sur les courants potassiques confirmant ainsi une corrélation entre le génotype et le phénotype.

Tolar *et al.* ont reprogrammé des cellules somatiques de patients atteints de mucopolysaccharidose de type I dit syndrome de Turner (Tolar *et al.*, 2011). Cette maladie est due au déficit en α -L-iduronidase (IDUA), une enzyme impliquée dans la cascade de dégradation des glycosaminoglycanes (GAG) dans le lysosome, qui résulte en une accumulation toxique d'héparanes sulfates et de dermatanes sulfates. Ce trouble conduit à un dysfonctionnement cellulaire progressif et touchant différents organes comme les viscères, les os, le tissu conjonctif et le cerveau. Non traitée, cette maladie entraîne une mort précoce entre cinq et dix ans. Pour générer les iPSCs porteuses de cette maladie, les auteurs ont transduit, à l'aide de vecteurs rétroviraux, les facteurs de transcription OKSM dans des kératinocytes de peau et des cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse de deux garçons. Les cellules souches ainsi obtenues ont alors été transduites avec un vecteur lentiviral contenant la séquence codante pour le gène de l'IDUA afin de corriger le déficit et ont ensuite été différenciées à la fois en cellules hématopoïétiques et en cellules du mésoderme. Il est à noter que la différenciation hématopoïétique des iPSCs était similaire avec ou sans correction du déficit en IDUA. Les cellules différenciées à partir des iPSCs ayant reçu l'iDUA exogène ont montré un effet bénéfique de la correction, indiquant ainsi une piste pour une application thérapeutique.

Park *et al.* ont également démontré qu'il était possible de générer des cellules souches pluripotentes induites à partir de cellules somatiques de patients atteints de différentes maladies. Pour cela, les auteurs ont transduit, avec les quatre facteurs de transcription OKSM voire parfois seulement trois (sans c-Myc), les fibroblastes de patients atteints du syndrome de Down ou trisomie 21, d'un déficit en adénosine déaminase responsable d'un déficit immunitaire combiné sévère (ADA-SCID), du syndrome de Shwachman-Bodian-Diamond (SBDS), de la maladie de Gaucher de type III, de dystrophie musculaire de Duchenne, de dystrophie musculaire de Becker, de Chorée de Huntington, de la maladie de Parkinson, de diabète de type I ou diabète insulino-dépendant (DID), ou enfin du syndrome de Lesch-Nyhan (Park *et al.*, 2008).

Certains de ces travaux ont été accompagnés de tentatives de criblage de drogues dans le but d'apporter la preuve de concept de l'utilisation des iPSCs pour le drug screening. Ainsi, Ebert *et al.* ont démontré que les motoneurones différenciés à partir des iPSCs de patients atteints d'amyotrophie spinale, étaient un bon modèle pour le drug screening en testant deux composés connus pour accroître l'expression de la protéine SMN (l'acide valproïque et la tobramycine) sur ces cellules et sur les fibroblastes de patients (le modèle d'étude humain jusque là) (Ebert *et al.*, 2009). Les résultats ont indiqué une augmentation de la concentration de protéines SMN dans les motoneurones issus des iPSCs de patients traités, après deux jours de traitement, de façon comparable à ce qui était observé dans les fibroblastes (Ebert *et al.*, 2009). De même, Lee *et al.*, ont étudié, sur les précurseurs de la crête neurale, les effets de différents composés connus pour avoir un effet sur la production d'IKBKAP : la kinétine, l'EGCG (Epigallocatechin gallate) et le tocotrienol. Leurs résultats ont indiqué, notamment, un effet bénéfique de la kinétine qui a induit une réduction marquée de la forme d'épissage mutante d'IKBKAP et une augmentation de la forme normale. Par contre, aucun effet notable n'a été constaté pour l'EGCG et le tocotrienol (Lee *et al.*, 2009).

Moretti *et al.* ont également utilisé les myocytes différenciés à partir des iPSCs de patients atteints du Syndrome du QT long de type I pour tester l'effet d'un traitement médicamenteux et ont révélé un effet protecteur du propranolol, un bêta-bloquant non-sélectif, sur les cellules porteuses de la mutation face à une tachy-arythmie induite par des catécholamines.

L'ensemble de ces travaux démontre le grand intérêt des cellules pluripotentes induites pour la recherche fondamentale et l'étude du phénotype et du développement des cellules porteuses d'un déficit génétique mais aussi pour la recherche thérapeutique et le traitement de ces maladies génétiques. Néanmoins, il reste encore différents challenges à résoudre (Saha et Jaenisch, 2009). En effet, concernant les maladies à longue latence comme les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson, la dynamique de progression de la maladie s'avère différente *in vivo* et *in vitro* indiquant une imperfection du modèle généré. Il est également délicat de modéliser une maladie à l'aide d'une seule population cellulaire en raison de l'interaction entre différentes populations cellulaires dans le corps du patient. Il est donc nécessaire de générer les différents types cellulaires pouvant être mis en jeu mais les protocoles de différenciation ne sont pas encore tous établis. De plus, pour les maladies mettant en jeu des composantes épigénétiques, leur étude est compliquée dans les iPSCs sachant que le protocole de reprogrammation est prévu pour supprimer les modifications épigénétiques des cellules somatiques. Il est également nécessaire d'améliorer les conditions de reprogrammation qui restent peu efficaces et jusqu'à présent essentiellement médiées par transduction rétrovirale ou lentivirale (vecteurs intégratifs). Les copies des vecteurs intégrées peuvent, en effet, interférer avec l'expression génique. Il est important, pour la suite, de pouvoir se dispenser de l'oncogène c-Myc dans le cocktail de facteurs de reprogrammation. Il sera donc intéressant de mettre en œuvre les méthodes alternatives, sans intégration, vues précédemment pour l'application clinique. Concernant les protocoles de différenciation cellulaire, il est important de générer des populations de cellules matures les plus pures possible afin d'éviter l'interférence potentielle lors de tests *in vitro* de la maladie due aux populations de cellules non spécifiques. De plus, les fonctions cellulaires sont parfois influencées *in vivo* par un stimuli du micro-environnement, incluant les cellules voisines, la matrice extra-cellulaire, ou encore des facteurs solubles. Pour cette raison, l'utilisation de la co-culture ou encore de biomatériaux en tant que matrices peuvent fournir un moyen puissant pour générer un contexte plus riche afin de mieux étudier les interactions entre cellules impliquées pour la maladie en question.

Chapitre 4: Transplantation d'hépatocytes

Le foie est un organe volumineux qui joue un rôle essentiel pour un grand nombre de fonctions physiologiques comme le métabolisme des nutriments à partir de la nourriture ingérée, la synthèse de glucides et d'un grand nombre de protéines, le maintien des métabolites et l'homéostasie des protéines sériques dans le sang, la détoxification et la régulation de l'hématopoïèse pendant la gestation.

Le foie est associé à de nombreuses maladies incluant les hépatites chroniques et aiguës ainsi que les maladies métaboliques héréditaires. La transplantation orthotopique est actuellement le seul traitement de choix voire curatif pour les patients atteints de maladies hépatiques sévères, y compris les maladies métaboliques hépatiques mettant en jeu le pronostic vital (Sterling et Fisher, 2001). Toutefois le nombre de patients sur liste d'attente augmente du fait du manque de donneurs d'organes, et ceci malgré des critères plus larges de choix des foies à greffer et les avancées chirurgicales permettant de réaliser des greffes de donneurs vivants et de foies partagés.

Aux Etats-Unis, plus de dix-sept mille patients attendent une transplantation hépatique. Ce nombre sous-estime sérieusement le nombre de patients qui requièrent un tel traitement (Soltys *et al.*, 2010) puisqu'il a été estimé que plus d'un million de patients pourraient bénéficier d'une telle transplantation.

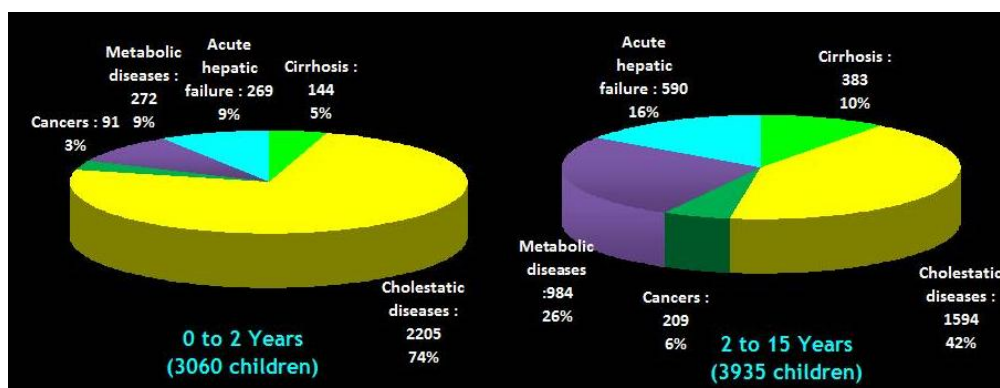


Figure 14. Transplantations de foie chez des patients pédiatriques (1968-2009). D'après l'ELTR (European Liver Transplant Registry).

En Europe, on estime à 15% le nombre de patients qui meurent alors qu'ils sont sur liste d'attente pour une transplantation hépatique et ce nombre a augmenté ces dernières années du fait d'un manque crucial de donneurs d'organes.

Les taux de mortalité et de morbidité liées aux complications post-chirurgicales (vasculaires et biliaires) des transplantations de foie et au rejet immunitaire (rejet aigu) ne sont pas insignifiants. De plus, les complications possibles à long-terme incluent l'hypertension, l'hyperlipidémie, le diabète et l'obésité. En Europe, le taux de survie pour des patients adultes était de 71% en 2005.

Ainsi, depuis de nombreuses années, la transplantation d'hépatocytes est considérée comme une alternative potentielle à la transplantation orthotopique de foie et, depuis le premier essai de Ira Fox, en 1998, qui a injecté 7,5 milliards d'hépatocytes à une enfant atteinte du syndrome de Crigler-Najjar (Fox *et al.*, 1998), la transplantation d'hépatocytes a été essentiellement réalisée dans le cadre du traitement des maladies métaboliques génétiques. Il paraît logique, pour ces maladies, de remplacer les hépatocytes dans lesquels un gène est déficient plutôt que la totalité du foie. Cette thérapie cellulaire a l'avantage de laisser en place les vaisseaux et les voies biliaires du receveur. Elle est moins invasive que la transplantation d'organe et pourrait être répétée ou encore suivie, en cas d'échec, par une transplantation hépatique.

En 2009, environ trente patients ont reçu un tel traitement pour des maladies métaboliques (Waelzlein *et al.*, 2009). Les observations cliniques ont démontré l'innocuité de la procédure et les patients qui ont bénéficié d'une transplantation d'hépatocytes ont montré, pour certains, une amélioration clinique et/ou une correction partielle du défaut métabolique. Cela suggère que de telles approches de thérapie cellulaire pourraient représenter des alternatives à la transplantation hépatique. Citons deux essais qui se sont plus particulièrement avérés prometteurs :

- une femme de 47 ans souffrant du type 1a de la maladie de stockage de glycogène, un désordre héréditaire du métabolisme du glucose résultant de mutations dans le gène codant l'enzyme hépatique glucose-6-phosphatase (Muraca *et al.*, 2002). Deux milliards d'hépatocytes compatible ABO ont été infusés en deux perfusions dans la veine porte. La correction métabolique s'est nettement améliorée neuf mois après la transplantation d'hépatocytes.

- une fillette de 3,5 ans atteinte d'un déficit en argininosuccinate lyase, un autre désordre du cycle de l'urée. L'enfant a reçu trois séries d'infusion d'hépatocytes

obtenus à partir de donneurs cadavériques des deux sexes. Le pourcentage de prise de greffe des hépatocytes transplantés a été suivi à l'aide de sondes dirigées contre le chromosome Y, donnant comme résultat une prise de greffe de 19% à huit mois et 12,5% à douze mois après transplantation. L'activité argininosuccinate lyase est passée de 0 à 3% transformant la forme sévère néonatale de la maladie en une forme modérée et induisant une amélioration psychomotrice significative (Stéphenne *et al.*, 2006).

Toutefois, dans la majorité des cas, les améliorations constatées se sont avérées transitoires et aucun bénéfice soutenu n'a été observé.

Les résultats de ces essais suggèrent que le nombre d'hépatocytes transplantés, qui ont été intégrés et fonctionnels, est insuffisant. Le caractère transitoire de la correction métabolique est probablement dû au nombre insuffisant d'hépatocytes greffés et fonctionnels, au fait qu'ils ne prolifèrent pas et aux problèmes liés au traitement immunosuppresseur. En effet, de nombreux travaux expérimentaux, réalisés chez le rongeur, ont démontré la présence de nombreux obstacles pour l'intégration des hépatocytes dans le foie receveur à savoir (I) la traversée des espaces portes, (II) la traversée de la barrière de l'endothélium sinusoidal, (III) l'intégration dans les travées hépatocytaires et la formation de jonctions intercellulaires avec les hépatocytes résidents.

Si l'on considère la première étape, c'est-à-dire la viabilité et la fonctionnalité des hépatocytes adultes *in vitro*, le premier challenge est le nombre limité de donneurs d'organes disponibles pour isoler des hépatocytes de bonne qualité. De fait, les sources courantes d'hépatocytes sont essentiellement les donneurs non utilisés et considérés inappropriés pour la transplantation du foie.

1-Les hépatocytes adultes

Il n'existe pas encore de procédure standardisée pour évaluer la qualité des préparations cellulaires mais, récemment, une première conférence de consensus a tenté d'en jeter les bases (Puppi *et al.*, 2011). De plus, les hépatocytes ne se divisent pas ou très peu en culture *in vitro* et, de ce fait, ne peuvent être amplifiés. Idéalement, les cellules fraîchement isolées devraient être transplantées mais il est nécessaire de disposer de tests rapides et sensibles pour évaluer leur viabilité et leur fonctionnalité,

et donc leur potentiel à être transplantées. De telles procédures n'ont été, à notre connaissance, mises en place que dans l'équipe du Professeur Castell à Valence jusqu'à présent (Donato *et al.*, 2008). En effet pour pouvoir transplanter des cellules fraîchement isolées, les tests d'analyse de la qualité des cellules doivent être réalisés dans les deux heures suivant l'isolement des hépatocytes afin de déterminer leur compétence métabolique, la synthèse de l'urée et les activités des enzymes qui métabolisent les drogues, les cytochromes P450 (CYP1A2, 2A6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, and 3A4) (Donato *et al.*, 2008).

Lorsque les hépatocytes sont dissociés par la collagénase, ils sont séparés des constituants de la matrice extra-cellulaire et ce processus, qui semble impliquer l'activation de caspases, dépend aussi des conditions d'ischémie du foie avant l'isolement des cellules. Ainsi, les rendements publiés d'hépatocytes viables varient entre vingt mille et cinq millions de cellules par millilitre (Bhoghal et Afford, 2010). Les hépatocytes sont, en règle générale, congelés et stockés immédiatement après isolement et des échantillons sont mis en culture et analysés. Cependant, les hépatocytes sont aussi très susceptibles au processus de congélation-décongélation qui affecte leur structure et certaines de leurs fonctions métaboliques incluant leur attachement, ce qui est important pour la greffe des cellules transplantées dans le foie (Terry *et al.*, 2010). Il a été suggéré que la congélation d'hépatocytes fraîchement isolés correspondait à un stimulus supplémentaire de mort par apoptose des cellules. L'implication de l'apoptose via l'activation des caspases a été mise en évidence sur les hépatocytes de porc et il a été montré que l'ajout d'un inhibiteur de caspases (ZVAD-fmk), au moment de la congélation, exerçait un effet cytoprotecteur et diminuait la proportion d'hépatocytes apoptotiques lors de leur décongélation.

Il faut noter qu'actuellement, on ne connaît pas les tests qui pourraient utilement prédire la prise de greffe à long terme et seules des études rétrospectives de comparaison des données *in vitro* avec la fonctionnalité des cellules greffées indiqueront les tests les plus appropriés.

A l'heure actuelle, parmi les maladies métaboliques qui sont la principale indication de la transplantation cellulaire, on peut retenir les défauts du cycle de l'urée et le syndrome de Crigler-Najjar de type 1. Récemment, Bonora-Centelles *et al.* ont proposé des tests spécifiques des hépatocytes concernant ces deux maladies (synthèse de l'urée à partir de l'ammoniaque et activité UDP-glucuronosyltransférase 1A1 utilisant le β -estradiol comme substrat, ce qui permet de personnaliser les

préparations d'hépatocytes pour ces patients (Bonora-Centelles *et al.*, 2010). L'hypercholestérolémie familiale fait également partie des maladies candidates.

Ainsi, les limites des procédures d'isolement et de congélation des hépatocytes, couplées au fait que les hépatocytes ne peuvent être amplifiés *in vitro*, nécessitent la préparation d'un grand nombre de cellules qui, souvent, proviennent de plusieurs donneurs. De plus, en conditions normales où le foie est en quiescence, les hépatocytes transplantés ne prolifèrent pas *in situ* ce qui entraîne une prise de greffe modeste dans les foies receveurs.

La transplantation d'hépatocytes autologues génétiquement corrigés est, dans certains cas, une alternative dans la mesure où elle permet de circonvenir les problèmes de pénurie de donneurs, de rejet et d'immunosuppression.

Le seul essai clinique concernant cette approche a été celui réalisé par Grossman *et al.* il y a plus de quinze ans. Ce dernier s'est révélé totalement inefficace et n'a pas été répété depuis. Il faut considérer que cette approche nécessitait une lobectomie du lobe gauche, représentant 15% de la masse totale du foie. Les hépatocytes ($3.2 \cdot 10^9$ cellules) ont été isolés par perfusion de collagénase, puis transduits quarante-huit heures après leur mise en culture avec un vecteur rétroviral contenant le gène RLDL avec une durée d'exposition au virus de dix-huit heures. Vingt pourcents des cellules transduites étaient en mesure d'internaliser les LDLs. Les cellules ont alors été réintroduites dans le foie via la veine porte en trois séries de trente minutes espacées de quatre heures (Grossman *et al.*, 1994). Ce protocole n'est pas dépourvu de risques pour des patients atteints de certaines maladies incluant l'hypercholestérolémie familiale. De plus, dans ces conditions, les hépatocytes autologues ne peuvent être transplantés qu'une fois.

2- La transplantation d'hépatocytes dans les modèles animaux

Dans les maladies métaboliques hépatiques héréditaires, l'architecture du foie est habituellement préservée. Les hépatocytes sont transplantés dans la rate, la veine porte ou la veine mésentérique inférieure et sont transférés aux sinusoides hépatiques et la région périportale des lobules du foie (Koenig *et al.*, 2005). Les cellules transplantées traversent, par la suite, la barrière des cellules endothéliales et

s'intègrent dans le parenchyme hépatique en établissant des jonctions intercellulaires avec les cellules hôtes voisines.

De nombreux travaux, réalisés chez les rongeurs, ont montré qu'entre 50% et 70% des hépatocytes transplantés restent piégés dans les espaces portes où ils sont détruits et phagocytés par des macrophages dès vingt-quatre heures après la transplantation et ceci avant leur intégration au sein des travées hépatocytaires et du parenchyme hépatique (Gupta *et al.*, 1995 ; Gupta *et al.*, 1999). Des résultats similaires ont été obtenus dans notre laboratoire, chez le primate non humain (le macaque *cynomolgus*), modèle pré-clinique d'autotransplantation d'hépatocytes, dans lequel 50% des hépatocytes transplantés ont été greffés dans le foie de l'hôte (Andreoletti *et al.*, 2001 ; Vons *et al.*, 2001).

De nombreux modèles de rongeurs ont montré qu'une repopulation efficace du foie par les hépatocytes transplantés nécessite un avantage sélectif en terme de prolifération et de survie par rapport aux hépatocytes résidents et plusieurs modèles ont été décrits aux cours des années (Grompe, 2006).

Chez le rat, un repeuplement efficace du foie est obtenu en combinant un traitement à la rétorsine, un alcaloïde qui provoque un arrêt de prolifération des hépatocytes en phase G2 et G2/M tout en maintenant leur potentiel métabolique, et une hépatectomie de 70% (Laconi *et al.*, 1998). Le modèle de rat déficient en dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) a été largement utilisé car cette protéine est exprimée au niveau de la membrane des canalicules biliaires, ce qui fournit un système pratique pour visualiser les canalicules hybrides entre les hépatocytes résidents et les hépatocytes transplantés et évaluer ainsi l'efficacité de prise de greffe (Gupta *et al.*, 1995).

Le premier modèle, développé en 1991 par Sandgren *et al.* est un modèle de souris transgéniques chez lesquelles le gène de l'urokinase (uPA : urokinase-type plasminogen activator), sous le contrôle du promoteur de l'albumine, a été introduit (Sandgren *et al.*, 1991). Ces souris Alb-uPA développaient une pathologie hépatique et leur foie présentait un signe d'inflammation, de nécrose et un faible nombre d'hépatocytes matures. Une repopulation complète du foie de ces souris a été rapportée par cette équipe avec la transplantation de seulement mille hépatocytes normaux (Rhim *et al.*, 1994). La même équipe a, par la suite, démontré la complète reconstitution du foie de souris Alb-uPA immunodéficientes par la transplantation d'hépatocytes xénogéniques de rat (Rhim *et al.*, 1995).

Les souris déficitaires en fumarylacétoacétate hydrolase (FAH), modèle de la tyrosinémie de type I, une maladie héréditaire chez l'homme, ont été largement utilisées car le déficit enzymatique induit l'accumulation d'un substrat toxique pour les hépatocytes (Overturf *et al.*, 1998). La transplantation de seulement dix mille hépatocytes corrigés a permis la reconstitution du foie déficient, prouvant ainsi que les hépatocytes transplantés possèdent un important potentiel prolifératif (Overturf *et al.*, 1996).

Enfin, citons les souris $mdr2^{-/-}$ (multiple drug resistance-2), modèle animal de la cholestase intra-hépatique familiale progressive. L'absence de sécrétion des phospholipides dans la bile de ces animaux provoque une toxicité hépatocytaire. La transplantation d'hépatocytes $mdr2^{+/+}$ permet une repopulation stable de 21% du foie des souris $mdr2^{-/-}$ et favorise ainsi un rétablissement de la sécrétion des phospholipides (De Vree *et al.*, 2000).

3-Les sources alternatives aux hépatocytes adultes

3.1 Les progéniteurs fœtaux

Au vu des propriétés limitantes des hépatocytes adultes, un certain nombre d'équipes, dont la nôtre, ont cherché à isoler et caractériser les cellules d'origine fœtale, les progéniteurs bipotents ou hépatoblastes.

Leur utilisation potentielle est sous-tendue par un certain nombre d'avantages : elles sont plus petites que les hépatocytes adultes ($15\mu\text{m}/30\mu\text{m}$), elles peuvent être amplifiées en culture dans une certaine mesure et, chez les rongeurs en système syngéniques, elles ont montré des propriétés de prise de greffe et de prolifération *in situ* dans le foie receveur supérieures à celles des hépatocytes adultes. Ainsi, des cellules progénitrices murines, par exemple, ont été purifiées par cytométrie de flux (Suzuki *et al.*, 2002). Des populations clonales de cellules souches, capables d'autorenouvellement et de se différencier en cellules de lignages variés (foie, pancréas, intestin, estomac), ont été mises en évidence. Après transplantation, ces cellules ont pu repeupler les tissus en hépatocytes, canaux biliaires, pancréas (cellules ductales pancréatiques) et épithélium intestinal. Toutefois, ces cellules souches sont rares, même dans le foie fœtal de souris, et leur nombre diminue avec l'âge.

Chez l'Homme, de telles cellules ont été isolées de fœtus « tardifs » (18-22 semaines) par cytométrie de flux (Dan *et al.*, 2006). Toutefois, après transplantation dans un modèle de souris immunotolérantes Rag2^{-/-}γ^{-/-} traitées à la rétrovirusine (dans le but d'inhiber la réplication des hépatocytes natifs), ces cellules n'ont pas été capables de repeupler les foies des animaux receveurs.

Dans notre équipe, Dominique Mahieu-Caputo a défini des conditions pour isoler des progéniteurs hépatiques à partir de foie humain à un stade précoce de développement (10-13 semaines de gestation). En culture la population isolée est constituée d'environ 80% d'hépatoblastes bipotents, les autres types cellulaires étant des cellules mésenchymateuses, des hépatocytes et cholangiocytes fœtaux. La transplantation des hépatoblastes décongelés a résulté en une prise de greffe comprise entre 1% et 10% du foie et les cellules humaines exprimaient des marqueurs d'hépatocytes adultes comme l'albumine (Mahieu-Caputo *et al.*, 2004 ; Delgado *et al.*, 2009).

Récemment, une équipe a marqué les hépatocytes adultes et fœtaux à l'¹¹¹Indium et a montré que la biodistribution des deux types de cellules était similaire et restreinte au foie sans translocation dans la circulation systémique ou pulmonaire (Cheng *et al.*, 2009).

Il faut noter que ces résultats n'ont pu être reproduits dans le modèle murin immunodéficient hétérozygote pour albumin-urokinase-type plasminogen activator (uPA), dans lequel les cellules hépatiques fœtales humaines (14-17 semaines de gestation) transplantées n'ont permis qu'une faible repopulation hépatique en comparaison aux hépatocytes adultes (Haridass *et al.*, 2009). Cependant, les différences inter-espèces ont pu avoir un effet sur la capacité de repopulation et de maturation des cellules.

3.2 Les cellules souches du foie adulte

Le foie adulte maintient une homéostasie entre le gain et la perte de cellules mais il est normalement quiescent avec un taux de mitoses inférieur à 0,1%. Cependant, le foie a une capacité remarquable à régénérer et la résection des 2/3 du foie résulte en une hyperplasie des lobes restants jusqu'à ce que sa masse soit restaurée. La régénération s'opère par la prolifération des populations cellulaires matures qui composent l'organe normal. Toutefois, si la capacité régénératrice des hépatocytes matures est endommagée par des agents toxiques (virus, carcinogènes), des petites

cellules bipotentes progénitrices sont activées et prolifèrent dans le parenchyme hépatique à la place des hépatocytes lésés pour générer des nouveaux hépatocytes et/ou cellules biliaires et ainsi restaurer l'homéostasie du foie (Fausto et Campbell, 2003). Ces progéniteurs, aussi appelés cellules ovales, représentent une population hétérogène exprimant des marqueurs d'hépatocytes et de cholangiocytes et constituent un compartiment de réserve. Dans le foie humain, les cellules ovales sont activées dans différentes pathologies hépatiques incluant les hépatites virales chroniques et les nécroses sévères (Roskams *et al.*, 2003). Récemment, des cellules souches et progénitrices ont été isolées à partir de foies normaux par l'équipe de Lola Reid (Schmelzer *et al.*, 2007). Cette équipe a montré que des cellules souches hépatiques pouvaient être purifiées à partir de foies néonataux et adultes en cytométrie de flux sur la base de l'expression de marqueurs spécifiques tels que N-CAM (Neural Cell Adhesion Molecule), I-CAM (Intercellular Adhesion Molecule) et CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4). Elles représenteraient de 0,01% à 1% environ de la masse des cellules hépatiques dans les foies de nouveau-nés. Ces cellules, après transplantation, sont capables de repeupler le foie de souris traitées au tétrachlorure de carbone. Reste le problème de leur amplification *in vitro* car les cellules souches/progénitrices n'ont pas d'activité télomérase, au contraire de leurs équivalents fœtaux, ce qui suggère des propriétés d'amplification réduites et limite, de ce fait, leur utilisation potentielle en clinique (Schmelzer *et al.*, 2007 ; Schmelzer *et al.*, 2009 ; Zhang *et al.*, 2008).

Il en est de même pour les cellules fœtales, du fait de leur quantité restreinte dans un foie. Pour transplanter une quantité de cellules correspondant à environ 2% de la masse d'un foie de nouveau-né, environ trente foies fœtaux (12 semaines de gestation) seraient nécessaires. La sécurité d'une telle approche thérapeutique a été soulevée récemment par le cas d'un enfant, ayant une ataxie téléangiectasique, traité par injections intracérébelleuse et intrathécale de cellules neurales fœtales humaines et qui a développé une tumeur du cerveau multifocale quatre ans après le traitement. Les études moléculaires et cytogénétiques suggèrent qu'elle dérivait des cellules souches transplantées (Amariglio *et al.*, 2009). Ceci souligne la nécessité absolue d'études précliniques poussées d'une part et l'importance du processus de consentement éclairé comme élément central de toute étude expérimentale d'autre part.

3.3 Les cellules souches mésenchymateuses (MSCs)

Les MSCs (Mesenchymal Stem Cells) peuvent être isolées à partir de différentes sources comme la moelle osseuse, le sang de cordon, le liquide amniotique, le placenta et plus facilement le tissu adipeux. Les MSCs sont des cellules progénitrices multipotentes qui possèdent la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier en cellules tissu-spécifiques pouvant former de l'os, du cartilage, du tissu adipeux, des tendons et du tissu musculaire. Elles sont caractérisées par l'expression de CD29, CD44, CD71, CD73, CD90, CD105, des antigènes SH-2 et SH-3 et l'absence des marqueurs hématopoïétiques typiques et de l'endoderme.

Certaines de ces cellules sont capables, *in vitro* et dans certaines conditions, d'exprimer des marqueurs hépatiques. Cependant, dans tous les cas, le nombre de cellules qu'il faut amplifier *in vitro* et différencier constitue, à l'heure actuelle, une limite majeure. De plus, la fonctionnalité de ces types cellulaires doit être soigneusement vérifiée *in vivo* dans les modèles animaux. Une étude a montré que les cellules souches mésenchymateuses, isolées à partir du tissu adipeux humain, différenciées *in vitro* en cellules hépatiques, pouvaient se différencier *in vivo* après transplantation dans le foie de souris traitées à la monocrotaline (Aurich *et al.*, 2009). L'introduction de MSCs humaines dans le foie de souris immunodéficientes NOD-SCID, ayant subi des lésions ou un traitement au tétrachlorure de carbone, induisait la formation de quelques groupes d'hépatocytes humains (Sharma *et al.*, 2005). Une étude d'Aurich *et al.* a comparé la capacité de MSCs humaines issues du tissu adipeux, avec ou sans différenciation hépatocytaire *in vitro* préalable, à reconstituer la masse hépatocytaire et à améliorer la fonction hépatique lorsqu'elles sont transplantées dans le foie de souris Pfp/Rag2^{-/-}. En effet, ils ont trouvé des cellules humaines exprimant l'albumine et HepPar1 humains dans le foie hôte (Aurich *et al.*, 2009). La prise de greffe est significativement améliorée après différenciation *in vitro* en cellules hépatocyte-like par rapport aux cellules non différenciées au préalable. Néanmoins, les études actuelles n'ont pas fourni la preuve définitive de la capacité des MSCs à se différencier en hépatocytes fonctionnels *in vivo* (Kuo *et al.*, 2008 ; Banas *et al.*, 2009). Ces améliorations pourraient être attribuées à la sécrétion de facteurs solubles par les MSCs, en empêchant l'apoptose des hépatocytes et en favorisant leur prolifération (Okabe *et al.*, 2009).

Il faut noter qu'un autre article suggère la possibilité d'un transfert de gène horizontal après transplantation de cellules souches d'origine extra-hépatique (Brulport *et al.*,

2007). En effet, des cellules exprimant l'albumine humaine étaient porteuses d'ADN microsatellite murin, mis en évidence par FISH (fluorescence in situ hybridization). Les auteurs suggèrent que les cellules humaines transplantées, qui ne s'intègrent pas et entrent en apoptose, relargueraient leur ADN qui serait phagocyté par les hépatocytes murins résidents, ce qui expliquerait une très faible proportion de cellules exprimant des marqueurs hépatiques humains.

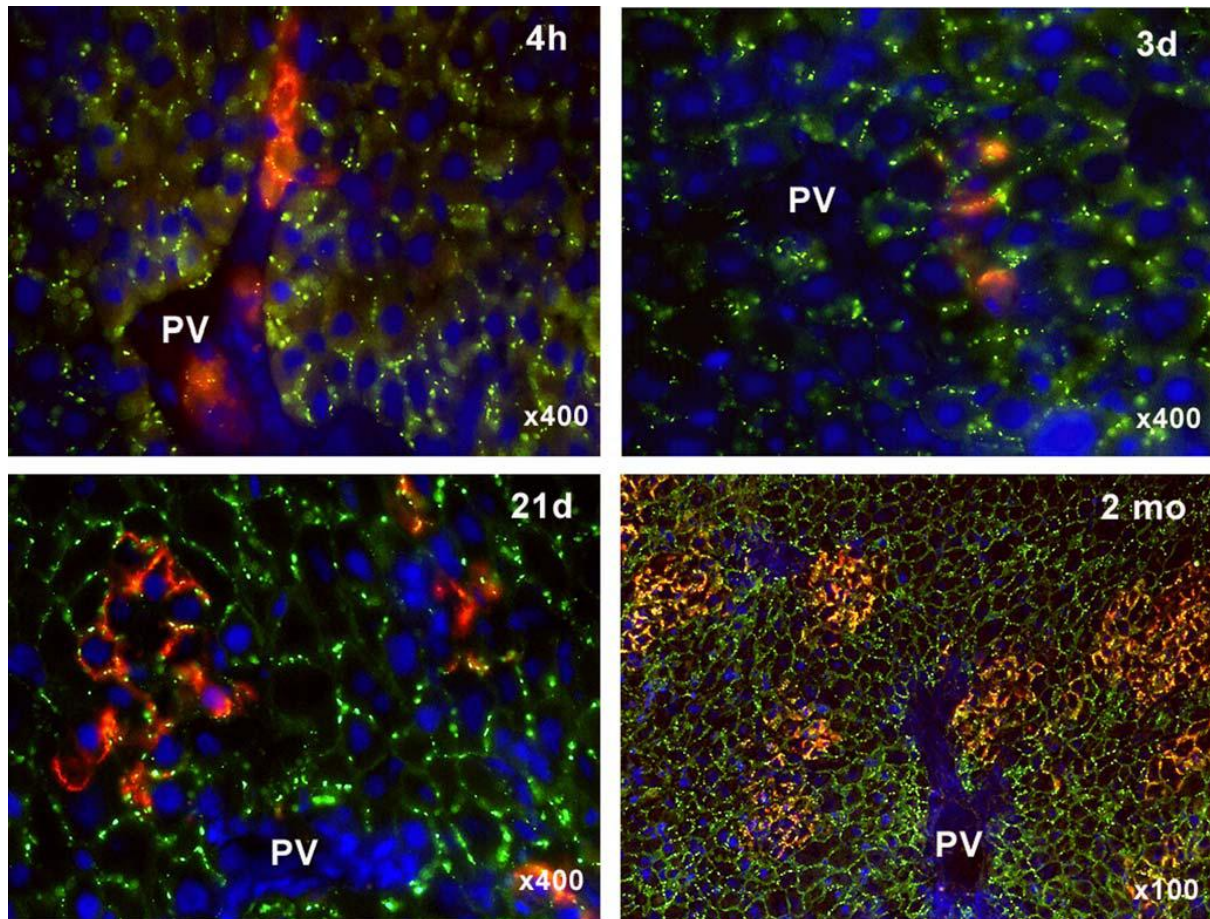


Figure 15. Repopulation du foie par des hépatocytes adultes. L'intégration et la repopulation du foie ont été étudiées par la colocalisation des hépatocytes transplantés en rouge (DPP-IV+) et un marqueur fluorescent de gap junctions intercellulaires, la connexine 32, en vert. (A) Présence d'embolies cellulaires dans les branches distales des veines portes avec passage vers les sinusoides quatre heures après transplantation. (B) Intégration des cellules transplantées dans le parenchyme hépatique et formation de jonctions cellulaires avec les cellules voisines. (C) Vingt-et-un jours après transplantation, les hépatocytes forment des clusters dans les zones centrolobulaires. (D) Prolifération des cellules transplantées avec formation de clusters intégrés dans les zones centrolobulaires du parenchyme hépatique. (D'après Nussler *et al.*, *journal of hepatology* 2006).

OBJECTIFS

Dans le cadre du traitement de maladies métaboliques, la transplantation d'hépatocytes est devenue une alternative à la transplantation orthotopique du foie. Néanmoins, face aux difficultés rencontrées pour isoler des hépatocytes matures qui, de surcroît, sont délicats à manipuler *in vitro*, les cellules souches pluripotentes, aussi bien embryonnaires qu'induites à partir de cellules somatiques adultes, apparaissent comme de nouvelles sources illimitées d'hépatocytes.

Nos travaux se divisent en quatre volets.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la mise au point d'un protocole de différenciation hépatique des cellules ES humaines récapitulant, *in vitro*, les étapes du développement embryonnaire du foie et selon des conditions chimiquement définies.

Nous avons, ensuite, généré des iPSCs à partir de cellules somatiques de patients atteints d'hypercholestérolémie familiale dans le but de les différencier en hépatocytes et ainsi modéliser la maladie.

Les protocoles mentionnés ci-dessus ne permettant pas d'obtenir une population homogène d'hépatocytes, nous avons alors participé à une étude ayant pour objectif de définir une stratégie d'enrichissement de la population hépatique par tri cellulaire à l'aide d'un vecteur contenant la séquence codant pour le gène eGFP sous le contrôle des séquences promotrices d'APOA-II, un marqueur hépatique spécifique.

Enfin, nous avons défini les conditions de différenciation en endoderme des cellules ES chez un modèle animal proche de l'Homme, le primate non-humain.

RESULTATS

Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions that recapitulate liver development.

Les protocoles existant de différenciation hépatique des cellules ES avaient recours à des cellules nourricières, à des supports comme le matrigel ou encore des agents pouvant causer des modifications épigénétiques comme le DMSO ou le butyrate de sodium.

Nos objectifs étaient de mettre au point les conditions de différenciation en endoderme des cellules ES humaines en milieu défini puis d'orienter la population ainsi générée vers un devenir hépatique en récapitulant *in vitro* les étapes du développement embryonnaire du foie.

Cet article est divisé en deux temps. Tout d'abord, nous décrivons une nouvelle méthode d'obtention de cellules de l'endoderme définitif ainsi que la caractérisation de la population générée. Dans un deuxième temps, nous avons décrit la génération de progéniteurs hépatiques fœtaux puis d'hépatocytes fœtaux ainsi que leur caractérisation, notamment leur fonctionnalité *in vitro* et leur potentiel à greffer et se différencier *in vivo*.

La combinaison de LY294002 (inhibiteur de la PI3-kinase) et de fortes concentrations d'Activine A a été décrite par KA D'Amour comme favorisant l'obtention d'une population homogène de cellules de l'endoderme définitif. Nous avons démontré que l'addition de BMP4 à cette association permettait une perte de pluripotence et une expression de gènes spécifiques de l'endoderme. Si l'ajout de FGF2 n'a pas semblé avoir d'effet sur l'expression de ces gènes, il a favorisé la survie et la prolifération cellulaire. Nous avons obtenu environ 75% de cellules positives pour les marqueurs de l'endoderme définitif après trois jours de traitement des cellules ES humaines avec la combinaison LY294002/Activine A/BMP4/FGF2.

Les cellules obtenues ont alors été orientées dans une différenciation hépatique en étant traitées trois jours au FGF10, puis deux jours en présence de FGF10, SB431542 (inhibiteur de la voie de signalisation Activine/Nodal) et d'acide rétinoïque. Les cellules exprimaient alors des marqueurs hépatiques précoces comme HNF4 α , l'AFP et CK19. Ces cellules ont ensuite été cultivées en présence de HGF, FGF4 et EGF pendant trois à huit jours. Leur morphologie correspondait alors à celle de progéniteurs hépatiques et, si la culture était prolongée, elles exprimaient des marqueurs hépatiques plus tardifs comme l'AAT, l'albumine, TAT, ApoA-II, le facteur IX et les cytochromes foétaux Cyp3A7 et Cyp7A1. Les cellules générées ont également été capables de stocker le glycogène, sécréter de l'albumine, métaboliser l'indocyanine green et l'ammonium via le cycle de l'urée et d'internaliser le Dil-LDL (LDL combiné à une molécule fluorescente). Elles possédaient également une activité du cytochrome P450 Cyp3A7.

Des cellules ES ont alors été transduites par un vecteur lentiviral contenant la séquence codant pour la GFP puis différenciées en cellules hépatiques et transplantées dans le foie de souris nouveau-nés Alb-uPA rag2 γ c^{-/-}. Des groupes de cellules exprimant les marqueurs hépatiques humains (albumine, AAT) ont été détectées dans le foie de certaines souris huit semaines après la transplantation. De plus, une faible quantité d'albumine sérique humaine a aussi été trouvée. Aucune tumeur n'a été constatée chez les animaux transplantés.

Enfin, le protocole de différenciation mis en place s'est avéré également efficace pour générer des progéniteurs hépatiques à partir de cellules pluripotentes induites humaines.

Nous avons participé à la définition d'un protocole de différenciation hépatique en conditions chimiquement définies permettant de générer des progéniteurs hépatiques puis des hépatocytes foétaux à partir de cellules souches embryonnaires humaines. Il s'agit de la première approche permettant d'induire une différenciation efficace sans avoir recours à des facteurs d'origine animale.

Generation of Functional Hepatocytes from Human Embryonic Stem Cells Under Chemically Defined Conditions that Recapitulate Liver Development

Thomas Touboul,^{1,2} Nicholas R. F. Hannan,^{3*} Sébastien Corbineaue,^{1,2*} Amélie Martinez,^{1,2} Clémence Martinet,^{1,2} Sophie Branchereau,^{1,4} Sylvie Mainot,^{1,2} Hélène Strick-Marchand,⁴ Roger Pedersen,³ James Di Santo,⁵ Anne Weber,^{1,2} and Ludovic Vallier³

Generation of hepatocytes from human embryonic stem cells (hESCs) could represent an advantageous source of cells for cell therapy approaches as an alternative to orthotopic liver transplantation. However, the generation of differentiated hepatocytes from hESCs remains a major challenge, especially using a method compatible with clinical applications. We report a novel approach to differentiate hESCs into functional hepatic cells using fully defined culture conditions, which recapitulate essential stages of liver development. hESCs were first differentiated into a homogenous population of endoderm cells using a combination of activin, fibroblast growth factor 2, and bone morphogenetic protein 4 together with phosphoinositide 3-kinase inhibition. The endoderm cells were then induced to differentiate further into hepatic progenitors using fibroblast growth factor 10, retinoic acid, and an inhibitor of activin/nodal receptor. After further maturation, these cells expressed markers of mature hepatocytes, including asialoglycoprotein receptor, tyrosine aminotransferase, α 1-antitrypsin, Cyp7A1, and hepatic transcription factors such as hepatocyte nuclear factors 4 α and 6. Furthermore, the cells generated under these conditions exhibited hepatic functions *in vitro*, including glycogen storage, cytochrome activity, and low-density lipoprotein uptake. After transduction with a green fluorescent protein-expressing lentivector and transplantation into immunodeficient uPA transgenic mice, differentiated cells engrafted into the liver, grew, and expressed human albumin and α 1-antitrypsin as well as green fluorescent protein for at least 8 weeks. In addition, we showed that hepatic cells could be generated from human-induced pluripotent cells derived from reprogrammed fibroblasts, demonstrating the efficacy of this approach with pluripotent stem cells of diverse origins. **Conclusion:** We have developed a robust and efficient method to differentiate pluripotent stem cells into hepatic cells, which exhibit characteristics of human hepatocytes. Our approach should facilitate the development of clinical grade hepatocytes for transplantation and for research on drug discovery. (HEPATOLOGY 2010;51:1754-1765.)

Abbreviations: AAT, α 1-antitrypsin; AFP, alpha-fetoprotein; APOA-II, apolipoprotein A-II; BMP, bone morphogenetic protein; CDM, chemically defined medium; CK, cytokeratin; CT, cycle threshold; DEC, definitive endoderm cell; EGF, epidermal growth factor; FBS, fetal bovine serum; GFP, green fluorescent protein; FACS, fluorescent-activated cell sorting; FGF, fibroblast growth factor; hESC, human embryonic stem cell; HGF, hepatocyte growth factor; hiPSC, human-induced pluripotent stem cell; HNF, hepatocyte nuclear factor; ICG, indocyanine green; PBGD, porphobilinogen deaminase; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PVA, polyvinyl alcohol; Q-PCR, quantitative polymerase chain reaction; RA, retinoic acid; RT-PCR, reverse-transcription polymerase chain reaction.

From ¹French National Institute for Health and Medical Research U972 and the ²Department of Surgery, Bichat Hospital, Kremlin-Bicêtre, France; ³Univ Paris-Sud, Orsay, France; the ⁴Department of Surgery, The Anne McLaren Laboratory for Regenerative Medicine, Cambridge, UK; and ⁵Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U668 Cytokines and Lymphoid Development Unit, Pasteur Institute, Paris, France.

Received June 19, 2009; accepted December 3, 2009.

Supported by National Agency for Research (ANR-05-PRIB-006-02), Région Ile de France Pôle de Compétitivité Médicines, European Community grant LIV-ES (to T. T. and A. W.), and an Medical Research Council Senior Fellowship (to L. V.). T. T. was supported by National Agency for Research. A. M. and S. C. were supported by Ingecell (Medicines). N.H. was supported by EC grant LIV-ES.

Liver diseases are becoming one of the most common causes of mortality in developing countries, and orthotopic liver transplantation is the only available treatment. However, an increasing number of patients die while on the liver transplant waiting list due to the shortage of suitable donor livers.¹ Hepatocyte transplantation recently became an alternative to orthotopic liver transplantation for the treatment of acute failure and life-threatening metabolic liver diseases.² However, this strategy is also restricted by the lack of donors and by the limited number of cells, because functional human hepatocytes cannot be expanded *in vitro* and are difficult to cryopreserve.³ Therefore, exploring other sources of cells, either of hepatic or extrahepatic origin, to generate hepatic cells capable to proliferate *in vitro* and to express hepatic-specific functions remains a major goal. Recently, human hepatic stem cells isolated from adult livers were shown to be functional *in vivo* after transplantation into a mouse model of liver injury.⁴ More recently, human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells were also differentiated into hepatocyte-like cells *in vitro* and were able to engraft and express hepatic-specific proteins in recipient mouse livers.⁵ However, the number of cells that need to be expanded *in vitro* and differentiated still constitutes a limitation to these approaches.

Human pluripotent stem cells represent an alternative source of hepatocytes to solve the lack of liver cells for regenerative medicine. They can be derived from embryos at the blastocyst stage as human embryonic stem cells (hESCs)⁶ or from fibroblasts reprogrammed by overexpressing transcription factors such as Oct-4, Sox2, KLF-4, and C-Myc (human-induced pluripotent stem cells [hiPSCs]).^{7,8} hESCs proliferate infinitely *in vitro* while maintaining the capacity to differentiate into a broad number of cell types, and recent results suggest that human induced pluripotent stem cells (hiPSC) share these characteristics.⁹ Several groups have already reported the differentiation of hESCs into hepatic cells using diverse culture systems.¹⁰⁻¹⁵ However, these approaches are all based on culture media containing serum, complex matrices such as matrigel, and/or mouse embryonic fibroblasts as feeders—all of which are sources of unknown

factors that could obscure studies of molecular mechanisms controlling human liver development or render the resulting tissues incompatible with future clinical applications. In this study, we describe a new culture system for driving differentiation of hESCs into hepatocytes using fully defined culture media devoid of animal products or unknown factors. This approach follows a natural path of development by respecting key stages of liver development, which may provide the best approach for generating differentiated cells with native properties. The differentiated hepatic cells expressed specific adult liver cell markers and displayed hepatic functions *in vitro*. We also showed that these cells were capable to participate in liver growth *in vivo* after transplantation into newborn uPAxrag2gammac^{-/-} mouse liver. Finally, our approach also induced differentiation of hiPSCs generated from human fibroblasts.

Materials and Methods

Cell Culture. hESCs (H9; WiCell, Madison, WI) were grown in chemically defined medium (CDM) as described.¹⁶

Fetal livers were obtained after termination of pregnancy at 11-13 weeks' gestation, with the informed consent of the mothers, as recommended by the French Ethics Committee and the local Ethics Committee of Paris XI University (Paris, France). Human hepatoblasts were isolated and cultured as described.¹⁷ Primary human hepatocytes were isolated from normal liver tissue biopsies obtained during resections (partial hepatectomies) for hepatic or metastatic tumors after informed patient consent. The primary hepatocytes were obtained by a two-step collagenase method and cultured as described.¹⁷

Differentiation of hESCs into Hepatic Cells. Cells were harvested using 5 mg/mL collagenase IV (Invitrogen) and then plated into plates (Costar; Corning Life Sciences, Acton, MA) precoated either with fetal bovine serum (FBS) or with 15 g/mL of human Fibronectin (Chemicon, Molsheim, France). Fibronectin-coated plates were used for small-scale experiments (see Figs. 1, 2, and 4), and FBS-coated plates were used in large-scale experiments (see Figs. 5, 6, and 7). No differences were

*These authors contributed equally to this work.

Address reprint requests to: Anne Weber, INSERM U972, Hôpital de Bicêtre, 80 Avenue du Général Leclerc, Le Kremlin-Bicêtre, F-94276, France. E-mail: anne.weber@inserm.fr; fax: (33)-1-49-59-19-59. Ludovic Vallier, Department of Surgery, The Anne McLaren Laboratory for Regenerative Medicine, University of Cambridge, West Forvie Building, Robinson Way, Cambridge CB2 0SZ, United Kingdom. E-mail: lv225@cam.ac.uk; fax: (44)-1223763350.

Copyright © 2010 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

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

DOI 10.1002/hep.23506

Potential conflict of interest: Dr. Pedersen owns stock in and is a consultant for Stemnion LLC. He also advises Astar Singapore.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

observed between cells differentiated on fibronectin-coated plates and those differentiated on FBS-coated plates.

The following three days cells were grown in presence of LY294002 (Calbiochem), activin A, fibroblast growth factor (FGF) 2, and bone morphogenetic protein (BMP) 4 (R&D Systems). To induce hepatic endoderm, cells were then cultured during 3 days in the presence of FGF10 (Autogenbioclear, Nottingham, UK) and then in the presence of retinoic acid (RA) (Sigma, SB431542 (Tocris, Bristol, UK), and FGF10 (Autogenbioclear) for 2 days. Finally, the cell population was grown in CDM supplemented with FGF4, hepatocyte growth factor (HGF), and epidermal growth factor (EGF) (Peprotech, Neuilly-Sur-Seine, France) for 10 days.

Reverse-Transcription and Quantitative Polymerase Chain Reaction. Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and quantitative PCR (Q-PCR) experiments were performed as described.¹⁸

The results are presented as the mean of three independent experiments and error bars indicate standard deviation. The number of Q-PCR cycles (cycle threshold [CT] value) is also indicated for key genes and for porphobilinogen deaminase (PBGD).

Microarray Analyses. Specific experimental details are provided in the Supporting Information.

Immunofluorescence, Flow Cytometry, and Immunohistochemistry. These assays relied on well-established procedures. Details are provided in the Supporting Information.

Lentivirus Production and Transduction of hESCs. The EF1 α -green fluorescent protein (GFP) lentivector was constructed and produced by Vectalys (Toulouse, France). The apolipoprotein A-II (APOA-II)-GFP lentivector was constructed in the laboratory and produced by Vectalys.

Prior to transduction with lentiviruses, hESCs were dissociated and were incubated with viral particles for 3 hours at 37°C in low-attachment 24-well plates (Corning Life Sciences) under gentle rocking before being seeded onto mitotically inactivated mouse embryonic fibroblasts in hESC medium containing 4 ng/mL FGF2 (R&D Systems). Undifferentiated transduced cells were expanded and differentiated using chemically defined conditions described above.

Animals. Animal studies were conducted under protocols approved by the French Ministry of Agriculture. Differentiated cells (5×10^5 cells/animal in 50 μ L saline solution) were injected into the liver of 5-day-old uPAxRag2gammac^{-/-} mice ($n = 9$). To control non-adaptive defense, mice were treated as described.¹⁹ The transplanted mice were killed 8 weeks after transplanta-

tion. Blood samples were collected, and human albumin was quantified in sera by enzyme-linked immunosorbent assay. Livers were removed for histologic analysis, and liver fragments were either embedded in OCT compounds and then frozen in liquid nitrogen, or were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Non-transplanted mice were used as controls.

Results

Combination of Activin, FGF2, BMP4, and LY294004 Drives Differentiation of hESCs into Definitive Endoderm. Our differentiation strategy is illustrated in Fig. 1.

During organogenesis in mammalian embryos, the liver is specified from the ventral foregut endoderm and consequently, endoderm cells represent the earliest progenitors of hepatoblasts. To induce differentiation of hESCs into definitive endoderm cells (DECs), we analyzed the effects of three factors known to control specification of the three germ layers in mammals: activin A, BMP4, and FGF2.²⁰ This analysis was performed in the absence of feeder cells using CDM,²¹ which is devoid of serum and is supplemented with insulin, transferrin, and defined lipids to which polyvinyl alcohol (PVA) was added as a substitute for bovine serum albumin. H9 and hSF-6 hESC lines were plated on plastic dishes precoated with human fibronectin or serum²² and grown in CDM supplemented with activin A (10 ng/mL) and FGF2 (12 ng/mL) for 2 days. Cells were then cultured in the presence of diverse combinations of the three factors for 5 days, and expression of the pluripotency marker (Oct-4), mesendoderm marker (Brachyury), and definitive endoderm marker (Sox17) were analyzed using Q-PCR (Supporting Fig. 1). The assessment of the three growth factors showed that a high dose of activin A (100 ng/mL) was necessary and sufficient to induce the expression of endoderm markers Sox17, GSC, and Mixl1 in hESCs (Fig. 2A), but pluripotency markers such as Oct-4 and Nanog remained expressed (Fig. 2A, Supporting Fig. 2). These results are in agreement with recent publications showing that activin/nodal signaling controls the expression of key pluripotent transcription factors such as Nanog in hESCs.^{23,24} They also suggest that, in our conditions, activin A is sufficient to induce the expression of endoderm markers in hESCs and that cofactors are required to block its effect on pluripotency.

Combination of high doses of activin A, FGF2, and BMP4 induced the strongest increase in endoderm markers, but none of the combinations analyzed was efficient to decrease the expression of pluripotency markers (Fig. 2B). We then investigated the effect of phosphoinositide

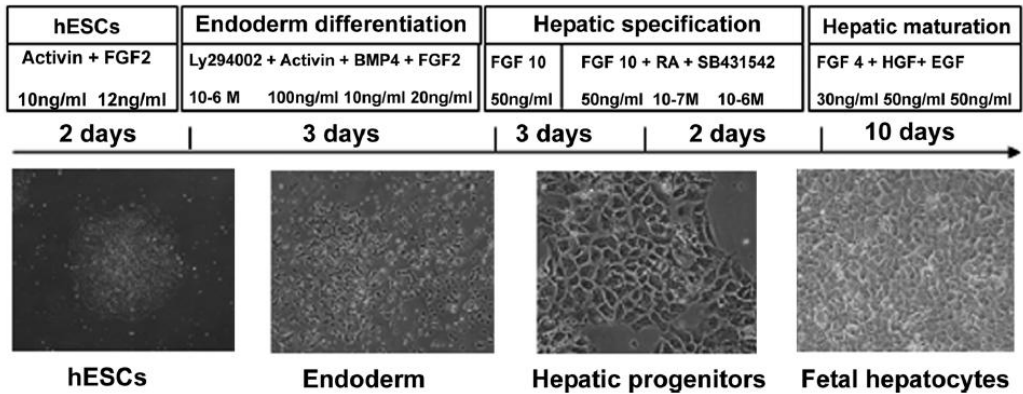


Fig. 1. Protocol to differentiate pluripotent human cells into hepatocytes. H9 cells or hiPSCs were passaged and grown for 2 days in CDM + 10 ng/mL activin + FGF2 12 ng/mL. hESCs were then grown for 3 days in culture conditions inductive for endoderm differentiation (CDM/PVA, 100 ng/mL activin, 20 ng/mL FGF2, 10 ng/mL BMP4, 10 μ M LY294003). Endoderm cells were further differentiated for 3 days into anterior definitive endoderm using 50 ng/mL FGF10. Hepatic progenitors were obtained by growing the resulting anterior definitive endoderm cells for 2 days in CDM/PVA, 50 ng/mL FGF10, 10⁻⁷ M retinoic acid, 10 μ M SB431542. Hepatocytes were obtained after 10 additional days in CDM/PVA, 30 ng/mL FGF4, 50 ng/mL HGF, and 50 ng/mL EGF.

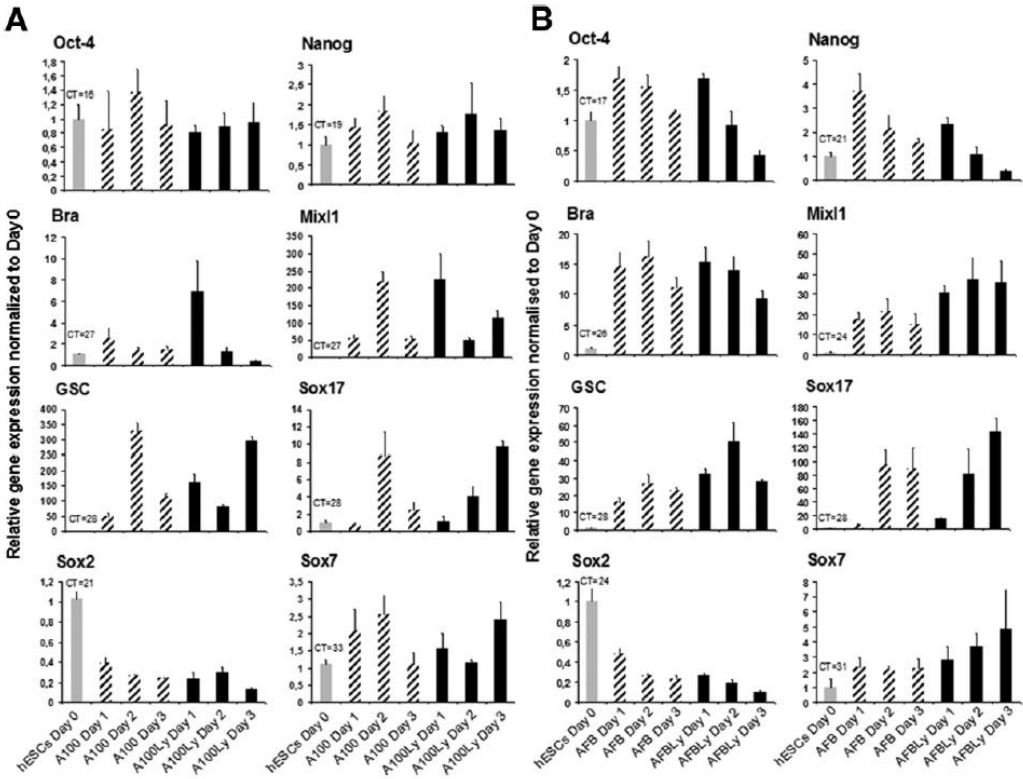


Fig. 2. Combination of high doses of activin, FGF2, BMP4, and inhibition of PI3K drives hESCs to differentiate into a homogenous population of definitive endoderm cells. (A) Inhibition of PI3K in the presence of high doses of activin is not sufficient to induce differentiation of hESCs into endoderm. H9 cells were grown for 3 days in the presence of activin (100 ng/mL) $\pm$ the PI3K inhibitor LY29002 (10 μ M). RNAs were extracted every day, and expression of the denoted genes was determined by way of Q-PCR. CT of PBGD, 24 $\pm$ 1. (B) H9 cells were grown for 3 days in the presence of activin (100 ng/mL), FGF2 (20 ng/mL), and BMP4 (10 ng/mL) $\pm$ LY29002 (10 μ M). Expression of the denoted genes was determined by way of Q-PCR. CT of PBGD, 24 $\pm$ 1

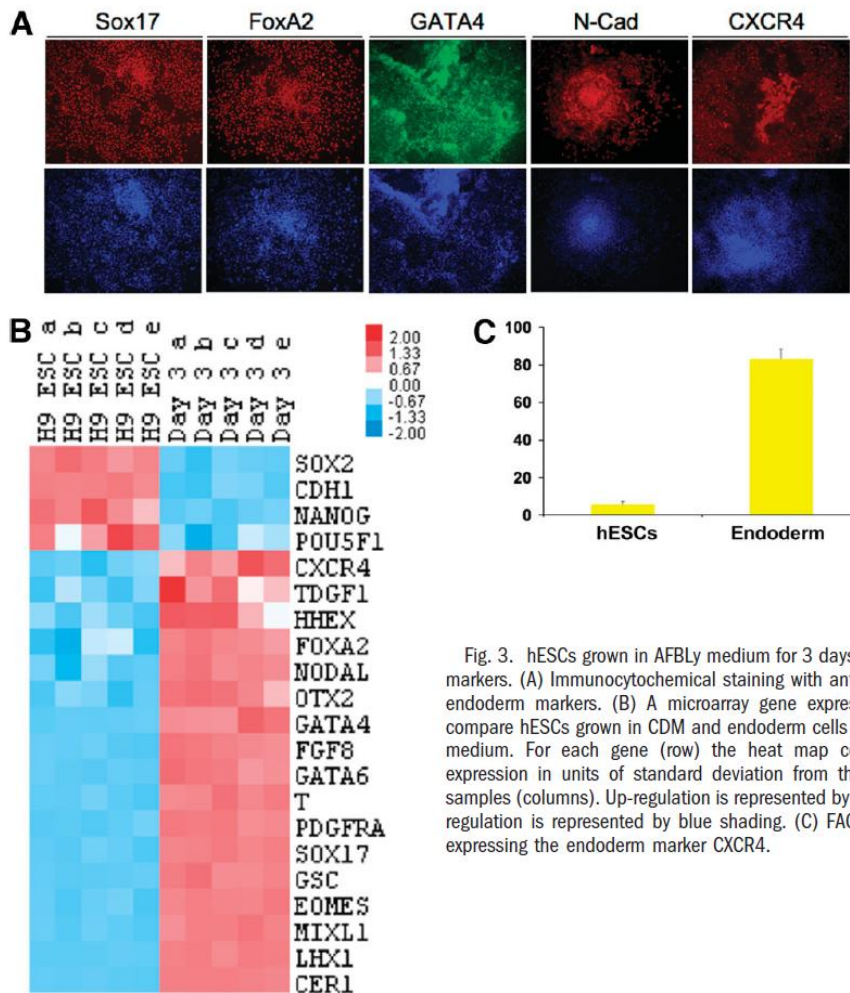


Fig. 3. hESCs grown in AFBly medium for 3 days express endoderm markers. (A) Immunocytochemical staining with antibodies specific for endoderm markers. (B) A microarray gene expression heat map to compare hESCs grown in CDM and endoderm cells generated in AFBly medium. For each gene (row) the heat map colors sample gene expression in units of standard deviation from the mean across all samples (columns). Up-regulation is represented by red shading; down-regulation is represented by blue shading. (C) FACS analysis of cells expressing the endoderm marker CXCR4.

3-kinase (PI3K) inhibition on hESCs, because it has been shown to increase the effect of activin/nodal signaling on endoderm differentiation of hESCs grown on feeders and on medium containing serum.²⁵ Combination of high doses of activin A and LY294002, a chemical inhibitor of PI3K, resulted in a significant increase in expression of endoderm markers (Fig. 2A), confirming that the PI3K pathway might have an inhibitory effect on endoderm differentiation. However, addition of LY294002 was not sufficient to repress the expression of pluripotency markers (Fig. 2A), suggesting that this inhibitor did not interfere with the mechanisms involving activin/nodal signaling in pluripotency. Full differentiation was only achieved by combining high doses of activin A, BMP4, FGF2, and LY294004 in CDM (AFBly medium) (Fig. 2B), suggesting that only the combination of different signals of differentiation can block the positive effect of activin/nodal signaling on pluripotency.

The cells generated in AFBly medium expressed definitive endoderm markers (Sox17, GSC, Mixl1, Lhx1, CXCR4, GATA6, Eomes, Hex, and so forth) as assessed by Q-PCR, immunostaining, and gene expression profiling (Figs. 2B, 3A-C). Importantly, the expression of extra-embryonic markers such as Sox7 (Fig. 2B) and the expression of neuroectoderm markers such as Sox2 (Figs. 2B, 3B) were not detected, excluding that cell types generated under these culture conditions could be primitive endoderm cells or neuronal progenitors. Finally, fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis revealed that 80% of the cells generated in AFBly medium expressed the endoderm marker CXCR4, suggesting that our approach allowed the differentiation of hESCs into near homogenous population of endoderm cells (Fig. 3C).

Differentiation of Human Endoderm Cells into Hepatic Progenitors. We then investigated the capacity

of DEC cells generated in AFBly medium to differentiate further into liver progenitors in the presence of diverse combinations of factors known to be involved in the patterning of the primitive gut, including FGF10, Wnt, RA, and activin A. The effect of inhibiting the activin and Wnt pathways was also analyzed using SB431542, a pharmacological inhibitor of activin/nodal receptors,²⁶ or Frizzled-8/Fc chimera, an inhibitor of the Wnt signaling pathway.²⁷

Generation of liver cells was monitored for the expression of hepatocyte nuclear factor (HNF) 4 α and α -fetoprotein (AFP) (Fig. 4A,B), two markers expressed in hepatic progenitors during the early stages of liver development. The highest induction in HNF4 α and AFP expression was observed when DEC cells were first grown for 3 days in the presence of FGF10, and then for 2 additional days in a combination of FGF10, RA, and SB431542 (Figs. 1, 4A-C). Inhibition of Wnt signaling decreased hepatic differentiation, which confirms recent observations showing that Wnt has an essential function in the mechanisms controlling the differentiation of DEC cells into hepatic endoderm.¹⁵ However, exogenous Wnt was not necessary in our culture conditions, because DEC cells already expressed a high level of Wnt3a (Supporting Fig. 3). These results suggest that RA plays an important role in hepatic specification, which is synergized by FGF10 and Wnt signaling, whereas transforming growth factor β signaling might interfere with the early step of DEC differentiation into liver progenitors.

Most of the hepatic progenitors generated by the combination of FGF10, RA and SB431542 expressed EpCAM (Fig. 4D). HNF4 α and AFP or cytokeratin (CK) 19 were coexpressed in 60% and 50% of the cells, respectively (Fig. 4C,D). Because hepatocytes and biliary epithelial cells derive from a common bipotential progenitor (hepatoblasts) during liver development, our results suggest that a population of hepatoblasts has been generated during the differentiation process.

Maturation of Hepatic Progenitors into Hepatocyte-Like Cells. We then developed culture conditions to differentiate hepatic progenitors into hepatocytes using factors known to be involved in these mechanisms *in vivo*. We observed that the combination of FGF4, HGF, and EGF was sufficient to drive differentiation of hepatic progenitors into more differentiated cells (Fig. 1). After 5 days in these culture conditions, the morphology of the cells resembled the cuboidal shapes typical of hepatocytes. In addition, the cells generated expressed markers specific for mature liver cells, including α 1-antitrypsin (AAT), APOA-II, tyrosine aminotransferase, tryptophan 2,3-dioxygenase, factor IX, and the detoxifying enzymes Cyp3A7 and Cyp7A1 as compared with human fetal and

adult hepatocytes (Fig. 5A). Generation of hepatocytes was confirmed by immunostaining analyses showing that differentiating hepatic progenitors expressed nearly homogeneous CK8/18 and that clusters of cells expressed AAT and high levels of albumin (Fig. 5B). FACS analyses revealed that 35% of the cells expressed asialoglycoprotein receptor 1, low-density lipoprotein receptor, c-met, and α 6 integrin (Fig. 5C). Interestingly, the latter two cell surface markers are hallmarks of proliferating hepatic cells *in vivo*.

To further confirm the identity of these hepatocyte-like cells, we transduced undifferentiated hESCs with a recombinant lentivirus carrying the GFP under the control of the human APOA-II regulatory sequences and induced their differentiation. Cells transduced with a lentivector carrying the GFP under the control of the EF1 α promoter were used as a positive control. Flow cytometry analyses revealed that 75% of the control cells were fluorescent 48 hours after transduction, whereas expression of GFP was not detectable when driven by the APOA-II promoter. Cells transduced with the APOA-II-GFP lentivector began to express GFP only after 13 days of differentiation (Fig. 5D,a), confirming the progressive differentiation of endoderm cells into mature liver cells and also demonstrating that hepatic cells generated in our culture system display the physiological regulation of a hepatic-specific promoter. In addition, we tested whether these differentiated cells were functional *in vitro*. Periodic acid-Schiff staining revealed that 60% of the cells could store glycogen (Fig. 5D,b). In addition CK19-positive cells and AFP-positive cells were capable to uptake LDL (Fig. 5D,c, D,d). We also examined uptake and excretion of indocyanine green (ICG), which is a functional characteristic of hepatocytes. ICG-positive cells were visible, and the cells had excluded ICG by 16 hours after its removal from the medium (Fig. 5E,a, E,b). Analysis of the secreted amount of albumin in the culture medium revealed that these cells secreted albumin at a rate of $5.9 \pm 0.7 \mu\text{g}/10^6$ cells/day. Thawed fetal hepatocytes secreted albumin at a rate of $5.6 \mu\text{g}/10^6$ cells/day.

Finally, generated hepatocytes displayed CYP3A7 activity (Fig. 5F).

ESC-Derived Hepatic Cells Are Functional In Vivo.

We then investigated the capacity of hepatocytes generated from hESCs to engraft and to differentiate within liver parenchyma. GFP-expressing hESCs were differentiated for 21 days, and the resulting cells were transplanted into the liver uPAxrag2gammac^{-/-} mice. These immunodeficient transgenic mice express the urokinase gene under the control of albumin promoter. This transgene is toxic for hepatocytes, thus it blocks transient liver growth (until the transgene is inactivated in resident

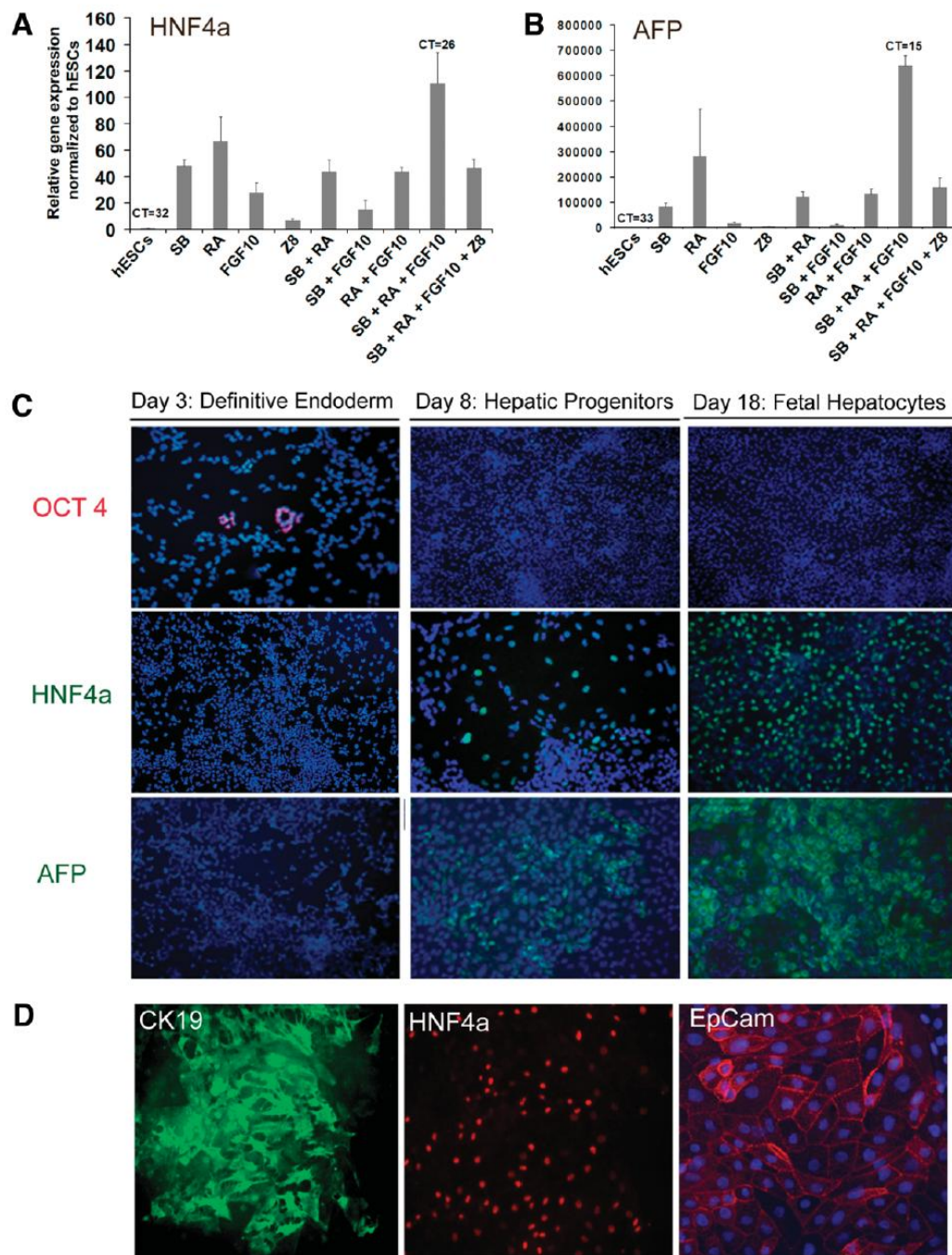


Fig. 4. Definitive endoderm cells generated from hESCs can differentiate into hepatic progenitors. (A, B) DEC were grown for 5 days in CDM/PVA supplemented with a diverse combination of factors (FGF10, RA, activin receptor inhibitor SB54142 [SB], Wnt inhibitor Frizzled-8/Fc chimera [Z8]). Expression of the denoted genes was determined by Q-PCR. CT of PBGD, 23 ± 1 . (C) Expression of pluripotency marker (Oct-4) and hepatic markers (HNF4 α , AFP). Nuclei are highlighted with Hoechst staining (blue fluorescence). (D) Expression of CK19, HNF4 α , and EpCAM in the hepatic progenitors after 8 days of differentiation.

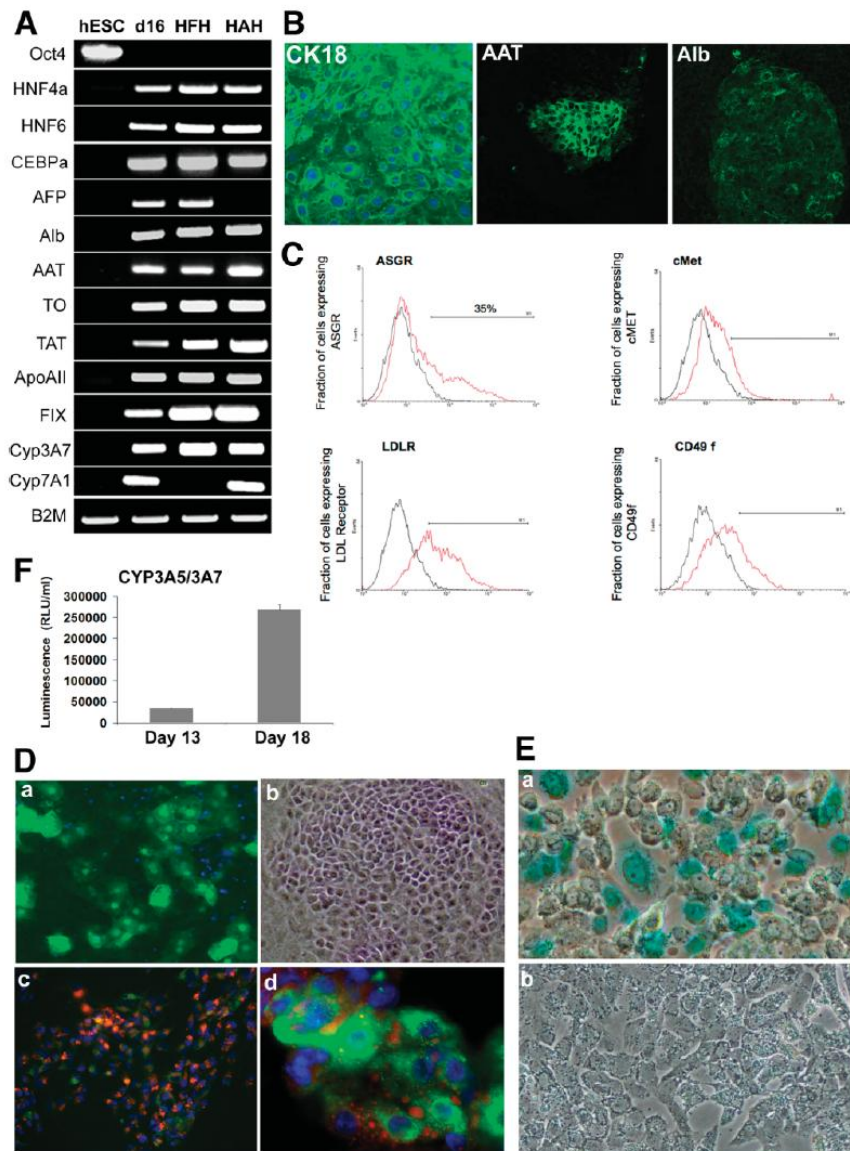


Fig. 5. Hepatic cells generated from hESCs display characteristics and functional properties specific of hepatocytes. (A) RT-PCR analysis of liver cell gene expression in day 18 differentiated cells. Fetal hepatocytes and adult hepatocytes were used as a positive control. (B) Expression of CK18, AAT, and albumin in day 18 differentiated cells. Data are representative of 10 independent experiments. (C) FACS analysis of asialoglycoprotein receptor, HGF receptor (cMET), low-density lipoprotein receptor, and α 6-integrin (CD49f) expression. Data are representative of three independent experiments. (D,a) Expression of APOA-II-GFP after lentiviral transduction of undifferentiated hESCs and 18 days of differentiation. (D,b) PAS stain analysis. Expression of liver cell markers CK19 (D,c) and AFP (D,d) after LDL uptake test is shown. (E,a) ICG uptake in differentiated cells. (E,b) Excretion of ICG from the cells 16 hours later. (F) Hepatocytes generated from hESCs display cytochrome P450 3A7 activity, as assessed by the enzymatic release of free luciferin by cytochrome P450 from an inactive luciferin precursor. The results are expressed as relative light units (RLU) per milliliter of media normalized to the number of cells at day 13 and day 18 of differentiation.

cells), allowing a better engraftment of the transplanted cells. Immunohistochemical analyses revealed the presence of cells expressing human AAT and albumin in the livers of transplanted mice (Fig. 6A-D), confirming that hepatic cells generated from hESCs were capable of en-

grafting in vivo and expressing protein characteristics of hepatocytes. Human cells were distributed throughout the liver, mainly as small and large cell clusters, suggesting that transplanted cells had proliferated and participated in liver growth (Fig. 6A-D). In addition, human AAT and

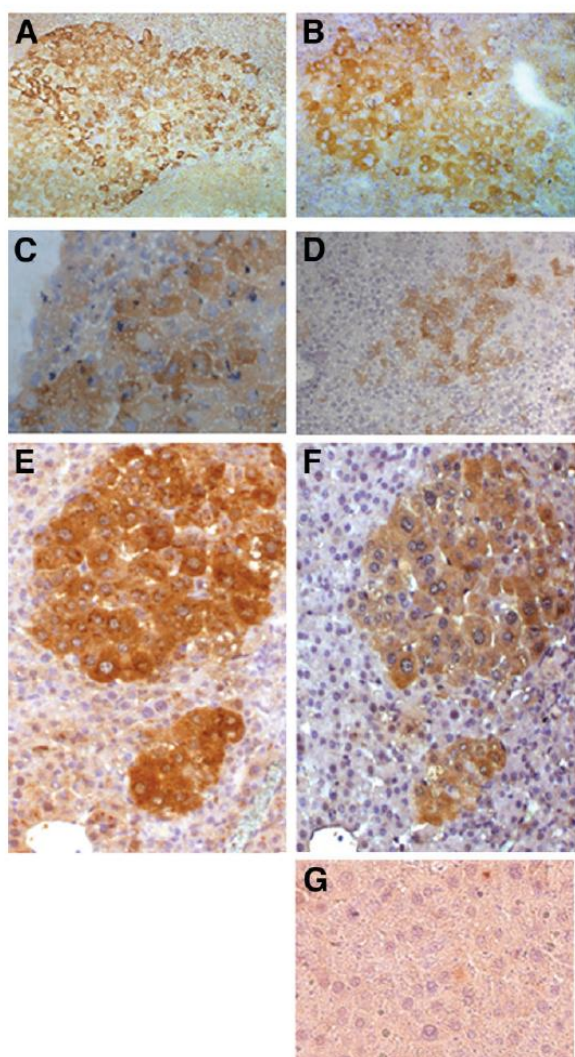


Fig. 6. Engraftment of GFP-expressing hepatic cells into the livers of immunodeficient uPA mice. hESCs were transduced by a GFP-expressing lentivirus, differentiated for 18 days, and then injected into the livers of newborn uPAxrag2gammac^{-/-} mice. The transplanted livers were analyzed for the presence of human hepatocytes 8 weeks after cell infusion by way of immunohistochemical staining. Clusters of (A,B) human AAT-expressing cells and (C,D) human albumin-expressing cells were found in liver sections. The exogenous origin of these clusters was confirmed by costaining for (E) GFP and (F) AAT. (G) Representative field showing no GFP staining in a nontransplanted liver section.

GFP protein were coexpressed in the same cells, confirming the human origin of these cell clusters (Fig. 6E,F). Furthermore, the serum of transplanted animals contained 3 ng/mL human albumin, confirming that the transplanted cells displayed some characteristics of hepatocytes *in vivo*. Finally, histological examination did not reveal the presence of teratomas or intrahepatic tumor,

suggesting that the cell population injected contains only fully differentiated cells.

Generation of Hepatic Progenitors from hiPSCs Using Culture Conditions Developed for hESCs. hiPSCs can be derived from reprogrammed fibroblasts. Therefore, we investigated whether the culture conditions developed to generate hepatocytes from hESCs could also be efficient in differentiating hiPSCs into hepatic cells. Foreskin fibroblasts were reprogrammed in CDM + activin A + FGF2 as described¹⁸ using retrovirus expressing Oct-4, Sox2, KLF4, and cMyc and three of the resulting hiPSCs lines were grown in the culture conditions described above. Immunostaining and Q-PCR analyses revealed that the cells generated under these culture conditions expressed HNF4 α , AFP, and albumin at levels similar to those found in hESCs differentiated using the same culture conditions (Fig. 7A,B). Taken together, these data suggest that our approach developed with hESCs can be used to generate liver cells from hiPSCs.

Discussion

Although several methods are currently available to generate hepatocyte-like cells from hESCs, our approach has two major advantages. It is based on fully defined media devoid of feeder cells and serum, and it also avoids the use of sodium butyrate or dimethyl sulfoxide, both of which are known to affect the epigenetic profile of mammalian cells by respectively inhibiting histone acetylation and increasing DNA methylation.²⁸ Consequently, our method brings clear improvement on existing methods, allowing the differentiation of hESCs into hepatocytes.^{10-13,29}

Furthermore, our protocol follows a process that mimics the progressive differentiation of definitive endoderm cells into hepatic cells during mammalian development. In the first step, hESCs are differentiated into DEC⁺s using a combination of high doses of activin A, FGF2, BMP4, and Ly294002. The use of this PI3K inhibitor to increase endoderm differentiation of hESCs has been shown previously.²¹ However, this study was based on media containing serum, matrigel, and feeders. In addition, inhibition of PI3K in our conditions was not sufficient to block the effect of activin signaling on pluripotency. Consequently, other factors such as BMP4 are required to repress the expression of pluripotent genes and to transform Activin signaling into an inductive signal for endoderm differentiation. These results emphasize the importance to use fully defined culture conditions to define signaling pathways controlling key cell fate choice. In the second step, combination of FGF10 and RA, two factors known to be critical for liver growth and for hepatoblast survival *in vivo*,^{30,31} appear to be essential to drive

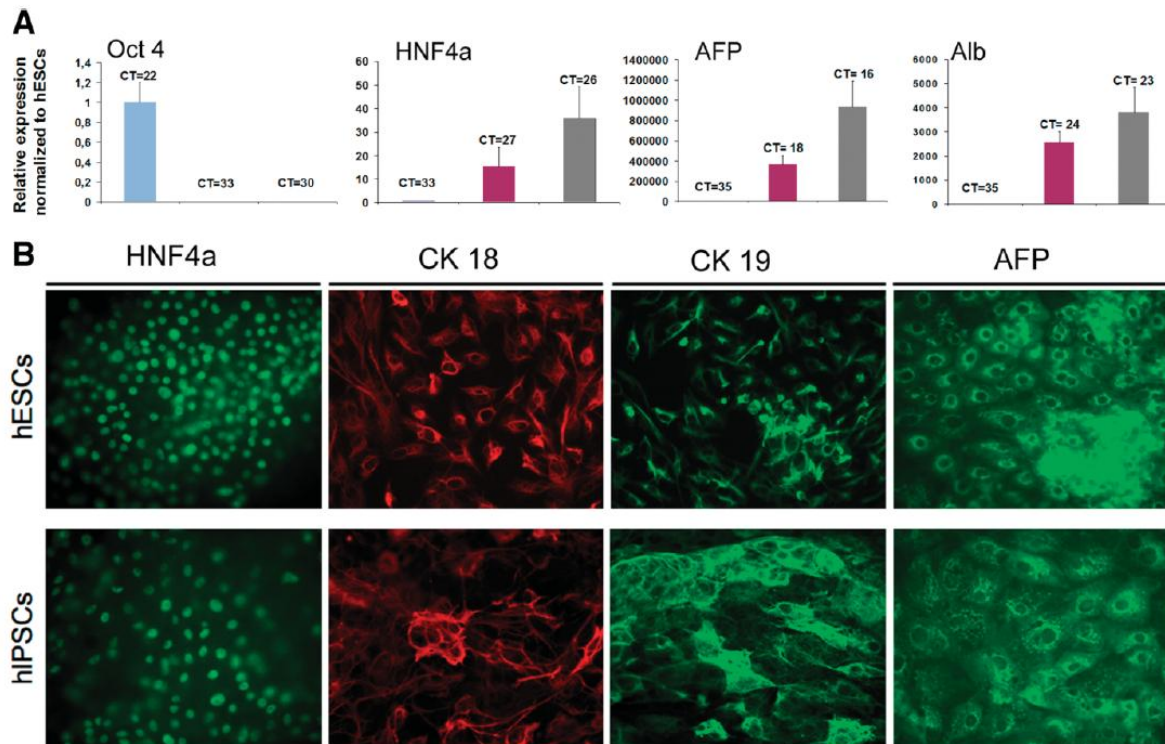


Fig. 7. hiPSCs can differentiate into hepatic cells using culture conditions defined for hESCs. (A) RNAs were extracted after 12 days of differentiation, and expression of the denoted genes was analyzed using Q-PCR. CT of PBGD, 24 ± 1 . (B) Hepatic cells generated from hiPSCs express markers specific for hepatic progenitors (HNF4 α , CK19, CK18, and AFP).

differentiation of endoderm cells into hepatic progenitors coexpressing CK19 and HNF4 α . These two markers are specifically coexpressed by bipotential hepatoblasts at early stages of development, and their expression becomes segregated between biliary epithelial cells and hepatocytes, respectively, during liver organogenesis. However, we also observed that inhibition of activin signaling can increase hepatic differentiation, by contrast to studies in the mouse embryo showing that transforming growth factor β is necessary for liver bud formation.³² However, the function of activin/transforming growth factor β signaling in mouse and human liver development might not be conserved. Alternatively, liver bud specification takes 3–4 days in human versus 12–24 hours in the mouse; therefore, mechanisms happening very quickly during mouse development could become more evident during differentiation of hESCs *in vitro*.

The third step consists in differentiating these hepatic progenitors into hepatocytes while maintaining a proliferative status using a combination of growth factors (FGF4, EGF, and HGF) known to be involved in this process *in vivo*.^{33,34} The cells generated expressed various adult liver-specific proteins, as well as key hepatocyte nu-

clear factors required for controlling the expression of many liver-specific genes. In addition, these cells also exhibited specific function of liver cells. Although these characteristics suggest that hESC-derived hepatocytes are differentiated, our results also suggest that this population is still at the fetal liver developmental stage. Indeed, these hepatocytes retain some immature characteristics, such as expression of AFP, as already reported by others.^{10,14} Further investigations will be required to determine conditions for generating fully mature hepatocytes. Additional inducing factors in combination with high cell-density culture or coculture with other cell types such as endothelial cells might represent a potential solution to overcome this major challenge.

Our study also demonstrates that hESC-derived hepatocytes engrafted efficiently within host liver parenchyma while retaining the ability to proliferate and to display characteristics of normal differentiated hepatocytes. However, low amounts of human albumin in the serum of transplanted mice suggest a lack of correlation between human protein secretion and engraftment efficacy. This has been reported by one of the authors and others in this model.¹⁷ One explanation is that the degree of hepatic cell

differentiation is partial 2 months after transplantation and that engrafted cells produce less than the expected amount of albumin. The xenogenic environment could also underestimate the capacity of human progenitors to fully differentiate.

Tumor formation and abnormal growth remain another major issue when using hESC-derived cells *in vivo*. Indeed, generated populations can be easily contaminated by undifferentiated pluripotent cells, which have the capacity to form teratomas.^{35,36} In addition, the adult environment might not be capable of controlling the proliferative capacity of early progenitors, leading to uncontrolled proliferation. Thus, it was recently reported that hESC-derived AFP-producing cells induced the formation of teratomas.³⁷ Adenocarcinomas were also observed intraperitoneally in analbuminemic rats transplanted with hESC-derived hepatocytes.¹⁴ Importantly, hepatic cells generated using our three-step approach did not produce tumors after transplantation, suggesting that our method induces differentiation of the totality of pluripotent cells.

Although the capacity to generate large quantities of hepatocytes presents obvious advantages for *in vitro* studies such as pharmacotoxicology, the use of terminally differentiated cells might present several drawbacks for cell-based therapy. Indeed, numerous studies in rodents have demonstrated that hepatocytes do not proliferate *in vivo* unless they display a proliferative advantage.³⁸ The use of progenitors/fetal hepatocytes could represent an advantageous alternative that might solve these major limitations. We previously isolated such immature cells during the early developmental stages of human liver and showed that they were able to differentiate and proliferate in rodent livers.¹⁷ Moreover, the proof of principle that progenitors can be used efficiently for cell-based therapy has been clearly established for other organs such as neuronal stem cells in the context of neurodegenerative diseases.³⁹

In any case, mouse models will not allow by themselves to determine whether differentiated cells will be safe for clinical applications. Indeed, the quantity of cells transplanted is limited by the size of the organs, and studies on large animals such as nonhuman primates will be needed to carefully address safety issues.

In conclusion, we have provided the first demonstration that fully defined conditions mimicking liver development results in the generation of functional hepatocytes *in vitro* and *in vivo*. We have also shown that this approach is directly transposable to pluripotent stem cells generated by the reprogramming of adult somatic cells from individual patients. This study opens up the way for the production of liver cells from hESCs or hiPSCs reprogrammed from patients with liver disease. This

should allow the creation of new *in vitro* models to perform drug screening and to develop new therapies for liver diseases.

Acknowledgment: The authors are grateful to C. Guettier (Department of Pathology, Bicêtre Hospital) for help with transplanted liver analyses; J. C. Magnier (Unité Fonctionnelle d'Orthogénie, Bicêtre Hospital) and D. Franco (Department of General Surgery, Beclere Hospital) for providing access to human fetal and adult tissues, respectively; C. Cosson (Department of Biochemistry, Bicêtre Hospital) for albumin assays; M. J. Vilarem (INSERM U632, Montpellier) for providing primers for RT-PCR analyses; and P. Leclerc and O. Trassard (IFR 93, Bicêtre Hospital) for help with artwork.

References

1. Fox IJ, Roy-Chowdhury J. Hepatocyte transplantation. *J Hepatol* 2004; 40:878-886.
2. Puppi J, Dhawan A. Human hepatocyte transplantation overview. *Methods Mol Biol* 2009;481:1-16.
3. Terry C, Hughes RD, Mitry RR, Lehec SC, Dhawan A. Cryopreservation-induced nonattachment of human hepatocytes: role of adhesion molecules. *Cell Transplant* 2007;16:639-647.
4. Schmelzer E, Zhang L, Bruce A, Wauthier E, Ludlow J, Yao HL, et al. Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med* 2007;204:1973-1987.
5. Aurich H, Sgoddard M, Kaltwasser P, Vetter M, Weise A, Liehr T, et al. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue *in vitro* promotes hepatic integration *in vivo*. *Gut* 2009;58:570-581.
6. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-1147.
7. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131:861-872.
8. Meissner A, Wernig M, Jaenisch R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2007; 25:1177-1181.
9. Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 2008;451:141-146.
10. Cai J, Zhao Y, Liu Y, Ye F, Song Z, Qin H, et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *HEPATOLOGY* 2007;45:1229-1239.
11. Duan Y, Catana A, Meng Y, Yamamoto N, He S, Gupta S, et al. Differentiation and enrichment of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells *in vitro* and *in vivo*. *Stem Cells* 2007;25:3058-3068.
12. Schwartz RE, Linehan JL, Painschab MS, Hu WS, Verfaillie CM, Kaufman DS. Defined conditions for development of functional hepatic cells from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2005;14:643-655.
13. Lavon N, Yanuka O, Benvenisty N. Differentiation and isolation of hepatic-like cells from human embryonic stem cells. *Differentiation* 2004; 72:230-238.
14. Basma H, Soto-Gutierrez A, Yannam GR, Liu L, Ito R, Yamamoto T, et al. Differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived hepatocytes. *Gastroenterology* 2009;136:990-999.
15. Hay DC, Fletcher J, Payne C, Terrace JD, Gallagher RC, Snoeys J, et al. Highly efficient differentiation of hESCs to functional hepatic endoderm requires ActivinA and Wnt3a signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:12301-12306.
16. Vallier L, Touboul T, Brown S, Cho C, Bilican B, Alexander M, et al. Signalling pathways controlling pluripotency and early cell fate decisions of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2009;27:2655-2666.

17. Mahieu-Caputo D, Allain JE, Branger J, Coulomb A, Delgado JP, Andreoletti M, et al. Repopulation of athymic mouse liver by cryopreserved early human fetal hepatoblasts. *Hum Gene Ther* 2004;15:1219-1228.
18. Vallier L, Touboul T, Chng Z, Brimpari M, Hannan N, Millan E, et al. Early cell fate decisions of human embryonic stem cells and mouse epiblast stem cells are controlled by the same signalling pathways. *PLoS ONE* 2009;4:e6082.
19. Strick-Marchand H, Morosan S, Charneau P, Kremsdorf D, Weiss MC. Bipotential mouse embryonic liver stem cell lines contribute to liver regeneration and differentiate as bile ducts and hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:8360-8365.
20. Robb L, Tam PP. Gastrula organiser and embryonic patterning in the mouse. *Semin Cell Dev Biol* 2004;15:543-554.
21. Johansson BM, Wiles MV. Evidence for involvement of activin A and bone morphogenetic protein 4 in mammalian mesoderm and hematopoietic development. *Mol Cell Biol* 1995;15:141-151.
22. Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva de Sousa Lopes SM, et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 2007;448:191-195.
23. Xu RH, Sampsel-Barron TL, Gu F, Root S, Peck RM, Pan G, et al. NANOG is a direct target of TGFbeta/activin-mediated SMAD signaling in human ESCs. *Cell Stem Cell* 2008;3:196-206.
24. Vallier L, Mendjan S, Brown S, Chng Z, Teo A, Smithers LE, Trotter MW, et al. Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression. *Development* 2009;136:1339-1349.
25. McLean AB, D'Amour KA, Jones KL, Krishnamoorthy M, Kulik MJ, Reynolds DM, et al. Activin A efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signaling is suppressed. *Stem Cells* 2007;25:29-38.
26. Inman GJ, Nicolas FJ, Callahan JF, Harling JD, Gaster LM, Reith AD, et al. SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol* 2002;62:65-74.
27. Hsieh JC, Rattner A, Smallwood PM, Nathans J. Biochemical characterization of Wnt-frizzled interactions using a soluble, biologically active vertebrate Wnt protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:3546-3551.
28. Iwatani M, Ikegami K, Kremenska Y, Hattori N, Tanaka S, Yagi S, et al. Dimethyl sulfoxide has an impact on epigenetic profile in mouse embryoid body. *Stem Cells* 2006;24:2549-2556.
29. Rambhatla L, Chiu CP, Kundu P, Peng Y, Carpenter MK. Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplant* 2003;12:1-11.
30. Zaret KS. Genetic programming of liver and pancreas progenitors: lessons for stem-cell differentiation. *Nat Rev Genet* 2008;9:329-340.
31. Hatzis P, Talianidis I. Regulatory mechanisms controlling human hepatocyte nuclear factor 4alpha gene expression. *Mol Cell Biol* 2001;21:7320-7330.
32. Lemaigre F, Zaret KS. Liver development update: new embryo models, cell lineage control, and morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2004;14:582-590.
33. Jung J, Zheng M, Goldfarb M, Zaret KS. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* 1999;284:1998-2003.
34. Suzuki A, Iwama A, Miyashita H, Nakauchi H, Taniguchi H. Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. *Development* 2003;130:2513-2524.
35. D'Amour KA, Bang AG, Eliazer S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG, et al. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2006;24:1392-1401.
36. Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazer S, et al. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol* 2008;26:443-452.
37. Ishii T, Yasuchika K, Machimoto T, Kamo N, Komori J, Konishi S, et al. Transplantation of embryonic stem cell-derived endodermal cells into mice with induced lethal liver damage. *Stem Cells* 2007;25:3252-3260.
38. Azuma H, Paulk N, Ranade A, Dorrell C, Al-Dhalimy M, Ellis E, et al. Robust expansion of human hepatocytes in Fah^{-/-}/Rag2^{-/-}/Il2rg^{-/-} mice. *Nat Biotechnol* 2007;25:903-910.
39. Bachoud-Levi AC, Gaura V, Brugieres P, Lefaucheur JP, Boisse MF, Maisson P, et al. Effect of fetal neural transplants in patients with Huntington's disease 6 years after surgery: a long-term follow-up study. *Lancet Neurol* 2006;5:303-309.

Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'intérêt majeur actuel des cellules iPS est de générer des modèles de maladies génétiques *in vitro*. Des groupes ont déjà généré des cellules iPS à partir de cellules de patients atteints de maladies neurologiques. Cela peut, en effet, permettre de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les maladies, à condition que le stress cellulaire associé à la reprogrammation ne perturbe pas le trafic ni les activités protéiques au sein de la cellule. Ainsi, cette approche est particulièrement intéressante pour étudier les mécanismes en place dans les maladies métaboliques et héréditaires du foie qui sont dues à des mutations génétiques affectant les protéines clés des hépatocytes. En effet, il est difficile de réaliser ces études sur les hépatocytes primaires en raison de la difficulté de les cultiver *in vitro*. De plus, les biopsies chez les patients qui permettraient d'isoler des hépatocytes déficients sont inenvisageables.

Nos objectifs étaient donc, dans un premier temps, de générer des cellules iPS à partir de cellules somatiques de patients atteints de maladies métaboliques du foie (et plus particulièrement le déficit en Alpha-1-AntiTrypsine [A1ATD] dû à une substitution de l'acide glutamique par une lysine en position 342, l'hypercholestérolémie familiale [FH] due à un déficit en Récepteur aux LDLs, la glycogénose de type 1a [GSD1a] due à un déficit en Glucose-6-Phosphatase). Ensuite, nous avons induit la différenciation, selon des conditions chimiquement définies, des cellules reprogrammées en cellules hépatiques.

L'article se décompose en trois étapes. Tout d'abord, nous avons généré des cellules iPS à partir de cellules issues de patients atteints de maladies métaboliques du foie. Ensuite, nous avons induit la différenciation hépatique des cellules souches obtenues et caractérisé celles-ci (marqueurs hépatiques, fonctionnalité). Enfin, nous avons vérifié le maintien du phénotype lié aux maladies étudiées.

Des fibroblastes du derme ont été obtenus de biopsie de peau de sept patients atteints de maladies métaboliques du foie et de trois individus sains (contrôles). Ces cellules ont ensuite été reprogrammées par transduction rétrovirale des quatre

facteurs de Yamanaka avec une efficacité variant entre 0,01% et 0,1%. Les iPSCs générées exprimaient des marqueurs de pluripotence endogènes comme Nanog, Oct4, Sox2 et TRA 1-60. Elles avaient aussi une forte activité de la phosphatase alcaline, caractéristique des cellules pluripotentes. Elles avaient la capacité de se différencier en des types cellulaires dérivés des trois feuillets embryonnaires *in vivo* comme le prouvaient les tératomes formés dans des souris immunodéficientes mais aussi *in vitro*. Nous avons également démontré la capacité de nos vecteurs à s'éteindre dans les cellules pluripotentes induites en ne détectant quasiment plus d'expression exogène des facteurs transduits. Nous avons déterminé le nombre de copies intégrées dans le génome pour chaque gène. Ce nombre variait selon les patients et les lignées d'iPSCs. De plus, en réalisant le caryotype des cellules générées, nous avons prouvé que la reprogrammation ne perturbait pas le caryotype des cellules.

Un protocole de différenciation hépatique efficace sur les cellules ES et iPS normales humaines a été établi au sein du laboratoire de Cambridge. Ce protocole se décompose en trois étapes reproduisant le développement embryonnaire hépatique *in vitro*. Lors du premier jour de différenciation, les cellules sont mises en contact avec un milieu chimiquement défini et en présence de Ly294002, Activine A, FGF2 et BMP4 et de CHIR99021. Le CHIR99021 étant un inhibiteur de la GSK3 β , une enzyme impliquée dans la voie de signalisation Wnt, il favorise la transcription des gènes cibles de Wnt et le modelage des tissus durant le développement. Le CHIR99021 est retiré le deuxième jour. Après deux jours de différenciation, nous avons obtenu des cellules de l'endoderme définitif. Au troisième jour, le milieu est remplacé par du RPMI/B27 (Roswell Park Memorial Institute) contenant de l'activine A et du FGF2 pour générer des cellules exprimant des marqueurs de l'endoderme comme Sox17, CXCR4 et FoxA2 ainsi que Hex, un marqueur spécifique de l'endoderme définitif antérieur à l'origine des cellules hépatiques. Ces cellules sont alors cultivées dans du RPMI-1640/B27 contenant de l'activine A pendant cinq jours pour obtenir des progéniteurs hépatiques exprimant l'AFP, CK18, CK19, HNF4 α et HNF6. Enfin, les cellules obtenues ont été placées dans du CMRL-1066 (Connaught Medical Research Laboratories)/Hepatozyme, un milieu de culture favorisant le maintien à long terme de l'expression phénotypique spécifique des hépatocytes (formes actives et inductibles des cytochromes P450, enzymes de phase II actives),

contenant du HGF et de l'oncostatine M pendant 15 jours, afin de générer des cellules hépatiques plus différenciées capables d'exprimer l'albumine et l' α -1-antitrypsine (AAT) et avec une morphologie semblable à celle des hépatocytes. Les cellules ainsi différenciées étaient alors capables de stocker le glycogène, de sécréter de l'albumine et possédaient une activité du cytochrome p450 Cyp3A4. En dehors des cellules de patients hypercholestérolémiques, les cellules hépatiques générées étaient également en mesure d'internaliser le Dil-LDL via l'activité des récepteurs aux LDLs. Une étude de l'expression exogène des facteurs de reprogrammation dans ces cellules hépatiques a confirmé l'extinction de celle-ci.

Nous avons finalement validé notre approche de modélisation *in vitro* des trois maladies métaboliques du foie (A1ATD, FH, GSD1a) en s'assurant que les cellules différenciées à partir des iPSCs reproduisaient bien les caractéristiques propres de chacune des maladies.

La maladie à laquelle je me suis intéressé est l'hypercholestérolémie familiale, une maladie liée à l'absence de récepteurs aux LDLs (ou la formation de récepteurs non fonctionnels) qui empêche donc l'internalisation du cholestérol associé aux LDLs. Nous avons donc confirmé l'absence de RLDL dans les cellules dérivées d'iPSCs de patients atteints de FH à l'aide d'un western blot. De plus, nous avons montré, par immunocytochimie et cytométrie de flux, que les hépatocytes obtenus étaient dans l'impossibilité d'internaliser le Dil-LDL (LDL combiné à une molécule fluorescente).

Tamir Rashid, quant à lui, s'est intéressé au déficit en Alpha-1-AntiTripsine et à la glycogénose de type 1a.

Pour l'A1ATD, la mutation entraîne la formation de polymères ordonnés d' α -1-antitrypsine qui s'accumulent dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes. Par immunocytochimie et par analyse ELISA, nous avons détecté la présence de ces polymères dans les cellules hépatiques générées à partir des iPSCs de patients atteints de déficit en A1AT. Nous avons également constaté une diminution de l'activité de l'endoglycosidase H, une enzyme éliminant les N-glycanes sous forme de mannose au niveau du réticulum, confirmant ainsi que les polymères d'A1AT restaient stockés dans ce compartiment cellulaire.

La glycogénose de type 1a, due à un déficit en glucose-6-phosphatase, entraîne une accumulation importante de glycogène dans les hépatocytes induisant une hyperlipidémie, une acidose lactique, une hyperuricémie, une hépatomégalie et un retard de croissance. Nous avons donc confirmé le phénotype des cellules

hépatiques issues de patient GSD1a à l'aide d'un test PAS (Periodic Acid-Schiff) montrant une accumulation des glycogènes dans les cellules. Ces cellules ont également une accumulation de lipides ainsi qu'une production excessive d'acide lactique.

Nous avons démontré la possibilité de modéliser un groupe de maladies métaboliques du foie par le biais de la différenciation hépatique de cellules iPS reprogrammées à partir de cellules somatiques de patients. Ces cellules permettront d'apporter la preuve de concept de la correction du déficit par thérapie génique *in vitro*. De plus, nous avons prouvé la reproductibilité de notre protocole sur différentes lignées cellulaires provenant de différents patients.



Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells

S. Tamir Rashid,^{1,2} Sebastien Corbineau,^{1,3} Nick Hannan,¹ Stefan J. Marciniak,² Elena Miranda,^{2,4} Graeme Alexander,⁵ Isabel Huang-Doran,⁶ Julian Griffin,⁶ Lars Ahrlund-Richter,⁷ Jeremy Skepper,⁸ Robert Semple,⁶ Anne Weber,³ David A. Lomas,² and Ludovic Vallier¹

¹Laboratory for Regenerative Medicine and ²Department of Medicine, Cambridge Institute for Medical Research, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom. ³INSERM U972, University Paris-Sud, IFR 69, Hôpital du Kremlin-Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France.

⁴Department of Cell Biology and Development, Università "La Sapienza," Rome, Italy. ⁵Department of Medicine, School of Clinical Medicine, and ⁶University of Cambridge Metabolic Research Laboratories, Institute of Metabolic Science, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom.

⁷Department of Woman and Child Health, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden. ⁸Department of Physiology, Development and Neuroscience, Multi-Imaging Centre School of Biological Sciences, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom.

Human induced pluripotent stem (iPS) cells hold great promise for advancements in developmental biology, cell-based therapy, and modeling of human disease. Here, we examined the use of human iPS cells for modeling inherited metabolic disorders of the liver. Dermal fibroblasts from patients with various inherited metabolic diseases of the liver were used to generate a library of patient-specific human iPS cell lines. Each line was differentiated into hepatocytes using what we believe to be a novel 3-step differentiation protocol in chemically defined conditions. The resulting cells exhibited properties of mature hepatocytes, such as albumin secretion and cytochrome P450 metabolism. Moreover, cells generated from patients with 3 of the inherited metabolic conditions studied in further detail (α_1 -antitrypsin deficiency, familial hypercholesterolemia, and glycogen storage disease type 1a) were found to recapitulate key pathological features of the diseases affecting the patients from which they were derived, such as aggregation of misfolded α_1 -antitrypsin in the endoplasmic reticulum, deficient LDL receptor-mediated cholesterol uptake, and elevated lipid and glycogen accumulation. Therefore, we report a simple and effective platform for hepatocyte generation from patient-specific human iPS cells. These patient-derived hepatocytes demonstrate that it is possible to model diseases whose phenotypes are caused by pathological dysregulation of key processes within adult cells.

Introduction

The possibility of deriving human induced pluripotent stem (iPS) cells by overexpressing just a few transcription factors in somatic cells has opened new opportunities for regenerative medicine and in vitro disease modeling (1). Human iPS cells have since been generated from patients with various diseases (2–4), with several groups reporting disease-specific phenotypes when these cells were subsequently differentiated to neural progenitors (5, 6). To our knowledge, however, no human iPS cell-based models have been reported to date for diseases specific to non-neuronal cells (such as cells of mesoderm and endoderm lineages), nor for diseases that arise as a consequence of loss of function that are only seen in fully differentiated adult cells (late-onset diseases). Furthermore, concerns remain that the cellular stresses inherent in reprogramming and differentiation may prevent human iPS cell-derived cell models from preserving the myriad of subtle interactions governing the trafficking and activity of proteins. Understanding these interactions is central to understanding various disease mechanisms and may also provide insights into currently unexplained variations in clinical phenotypes observed between individuals of identical genetic backgrounds (7–9).

These issues are particularly pertinent to the inherited metabolic disorders of the liver (IMDs). This group of diseases results from genetic mutations that affect key proteins within hepatocytes. While IMDs may be treated by whole-organ liver transplant, this procedure carries considerable risk. There is therefore a need for greater understanding of the disease mechanisms and for the development of alternative therapies (10, 11). Such investigations are hampered by difficulty in culturing primary hepatocytes and an inability to provide relevant human hepatocyte-like cell lines that faithfully replicate the protein dysfunction and subsequent cellular defects responsible for the disease (12). We report here the generation of a library of human iPS cell lines from individuals with a range of IMDs. A simple, chemically defined culture system for the efficient hepatic differentiation of the new human iPS cell lines was subsequently developed. Finally, by focusing on 3 diseases, we showed that human iPS cell-derived hepatocytes from affected patients successfully recapitulated key features of the cellular pathology seen in the associated diseases, such as aggregation of misfolded mutant α_1 -antitrypsin in the endoplasmic reticulum, deficient LDL receptor-mediated cholesterol uptake, and elevated cellular lipid and glycogen accumulation. These data demonstrate, for the first time to our knowledge, that human iPS cells can be used to model a diverse range of inherited diseases in adult cells.

Authorship note: S. Tamir Rashid and Sebastien Corbineau, as well as Anne Weber and David A. Lomas, contributed equally to this work.

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Citation for this article: *J Clin Invest*. 2010;120(9):3127–3136. doi:10.1172/JCI43122.



Table 1
Characterization of human iPS cell lines

Disease	Genotype	Clinical features	Human iPS cell lines (n)		
			Derived	Characterized	Differentiated
A1ATD	Homozygous Glu342Lys (Z mutation)	65-year-old male of mixed European descent, liver transplant recipient (patient 1)	9	3	3
A1ATD	Homozygous Glu342Lys (Z mutation)	55-year-old male of mixed European descent with clinical symptoms; liver biopsy confirmed intrahepatic α_1 -antitrypsin polymer accumulation (patient 2)	8	2	2
A1ATD	Homozygous Glu342Lys (Z mutation)	16-week-old male of mixed European descent with liver disease; biopsy confirmed diagnosis	2	1	1
GSD1a	Absent hepatic glucose-6-phosphatase enzyme	25-year-old male of mixed European descent with clinical features of excess glycogen deposition; confirmed by enzyme functionality assay	6	3	3
FH	Autosomal-dominant mutation in LDL receptor	Patient of unknown age and sex with reported symptoms of early-onset atherosclerotic disease secondary to hypercholesterolemia and strong family history; diagnosis confirmed by LDL receptor dysfunction assay	9	3	1
Crigler-Najjar syndrome	Homozygous for 13-bp deletion, exon 2 of <i>UGT1A1</i>	2-month-old male of mixed European descent with clinical features of disease	6	3	1
Hereditary tyrosinemia type 1	2 alleles ^A	2-month-old male of mixed European descent with clinical features of disease	6	3	1
Control ^B	Not tested	Asymptomatic	15	8	8

^AOne allele carries a missense mutation in codon 166 of fumarylacetoacetate hydrolase (*FAH*) gene: T>G in base 553 (553T>G) causes a Val166Gly substitution; the other allele is unknown. ^BIn total, 3 control patients were included; iPS cell line data are summed for all controls.

Results

Generation of a human iPS cell library from patients with IMDs

Dermal fibroblasts were obtained from skin biopsies from 7 individuals with a range of IMDs and from 3 healthy controls (20 human iPS cell lines, 5 diseases; Table 1 and Supplemental Table 1; supplemental material available online with this article; doi:10.1172/JCI43122DS1). These somatic cells were then reprogrammed to pluripotent stem cells using the 4-factor approach developed by Yamanaka and colleagues (13). The success rate of human iPS cell derivation was extremely variable, ranging from 0.01% to 0.1% for each individual, confirming the existent variability in capacity to reprogram dermal fibroblasts from patients of different age and sex. Where possible, 3 human iPS cell lines per individual were subsequently used for further analyses in order to define the conserved variability in differentiation capacity between lines derived from the same individual. The resulting library of human iPS cell lines – 20 lines from 10 individuals – were characterized for their morphology, expression of pluripotency markers, capacity to form derivatives of the 3 germ layers *in vivo* and *in vitro*, normal karyotype, and expression profiles of endogenous and exogenous pluripotency genes (Supplemental Figure 1, A–F). All the human iPS cells expressed endogenous markers of pluripotency and were able to differentiate into neuroectoderm, endoderm, and mesoderm cells (Supplemental Figure 1, B–D and F, and data not shown), confirming successful generation of pluripotent stem cells from somatic cells. Interestingly, none of the human iPS cell lines lacked the ability to differentiate into 1 specific germ layer, showing the absence of strong variability in the capacity of differentiation of the human iPS cell lines generated for this study. Furthermore, abnormal karyotype was only observed in human iPS cells grown for long periods of time (i.e., passage 40)

in chemically defined conditions. This suggests that the culture system used to expand human iPS cells can affect their genetic stability, as had been described for human ES cells (14). Therefore, only early-passage human iPS cells (i.e., before passage 30) were used for the present study. The number of viral integrations was variable between lines and patients (data not shown), reinforcing previous studies showing that full reprogramming is not associated with a specific pattern of viral integration (15). Finally, ectopic expression of exogenous transgenes was rarely detected in our human iPS cell lines (Supplemental Figure 1F), demonstrating the efficiency of our viral vector to be silenced in pluripotent stem cells. Collectively, these results demonstrate that the human iPS cell lines generated for this study were fully reprogrammed and thus represent what we believe to be a unique library of human iPS cell lines derived from patients with IMDs.

Development of a robust and simple method to generate hepatocytes from patient-specific human iPS cells

We have recently developed a robust protocol to differentiate human ES and normal human iPS cells into hepatocytes (16). This culture system provided the basis for a method of differentiation optimal for use with patient-specific iPS cells. Our main objective was to develop a simple method that could effectively differentiate a broad number of human iPS cell lines into hepatocytes. Human iPS cell lines derived from healthy individuals (6 lines, $n = 2$ subjects) and individuals with α_1 -antitrypsin deficiency (A1ATD; 6 lines, $n = 3$ subjects) were used to empirically screen a wide range of culture conditions. The 3-step protocol shown in Figure 1 follows the key stages of the natural pathway of hepatocyte development. The first step consisted of driving human iPS cells to endoderm cells expressing Sox17, CXCR4, foxA2, and Hex, a specific marker of anterior definitive endoderm from which liver cells are generated

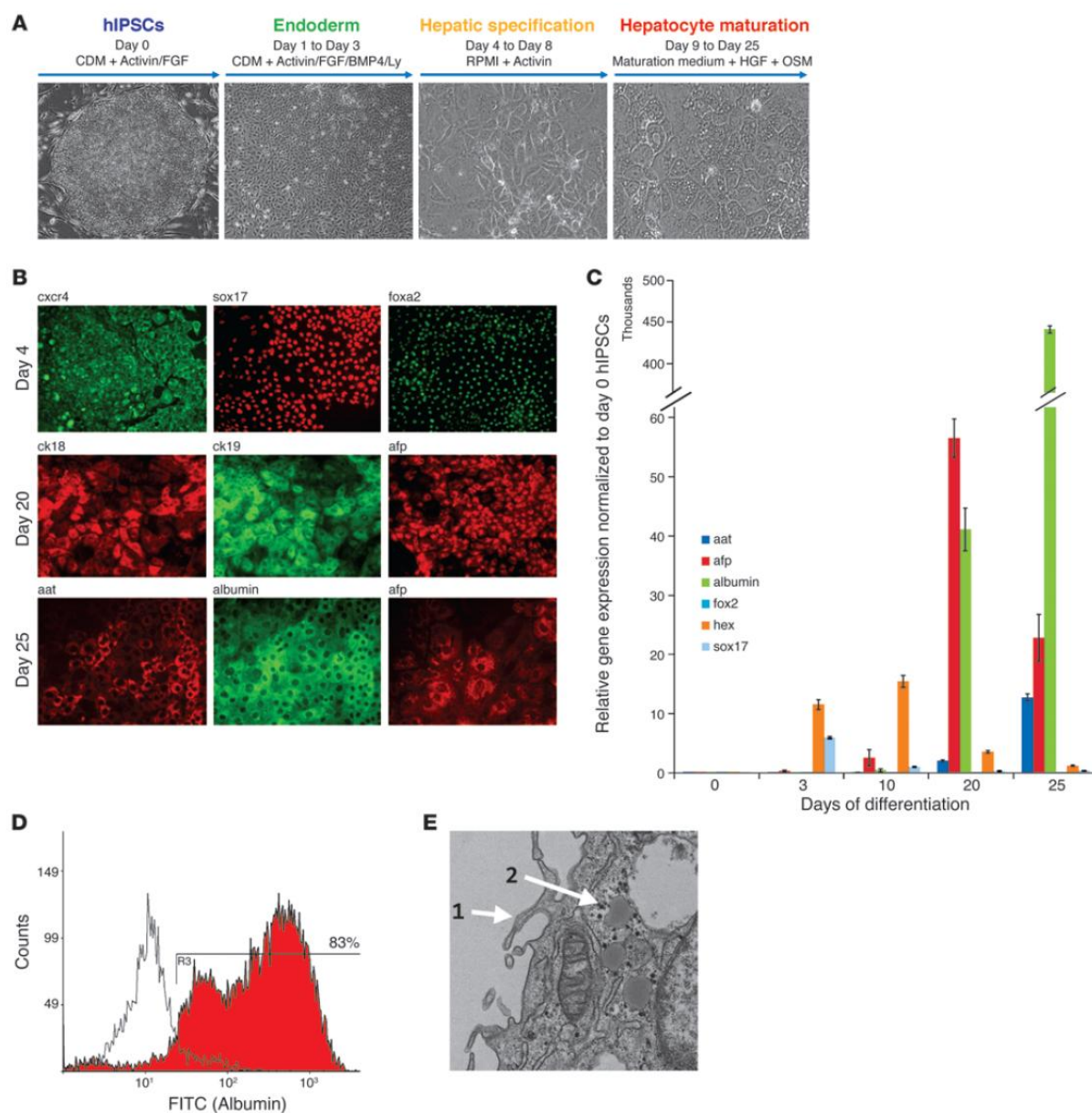


Figure 1

Generation of hepatocytes from disease-specific human iPS cells. (A) Protocol used to differentiate the disease-specific human iPS cell library into hepatocytes. (B) Immunostaining analyses for expression of the indicated proteins marking key stages of hepatocyte development (day 4, endoderm; day 20, hepatic progenitor; day 25, fetal hepatocyte). (C) Real-time PCR analysis for expression of genes marking key stages of disease-specific human iPS cell (hiPSC) differentiation to hepatocytes. Error bars denote SEM. (D) Fraction of cells expressing albumin after 25 days of hepatic differentiation, as shown by FACS analyses. (E) Morphologic analysis of disease-specific human iPS cell–derived hepatocytes (day 25) by transmission EM, showing the presence of apical microvilli and glycogen rosettes (numerals 1 and 2, respectively). Original magnification, $\times 20$ (A); $\times 40$ (B); $\times 3,000$ (E). The data shown were taken from 1 line (patient 1; line 1), but are representative of all lines similarly characterized (Table 1).

(Figure 1, B and C), using chemically defined medium containing polyvinyl alcohol (CDM-PVA medium) supplemented with activin, FGF2, BMP-4, and a PI3K inhibitor. The resulting endoderm cells were then differentiated into hepatic progenitors expressing AFP,

CK18, CK19, HNF4, and HNF6 (Figure 1, B and C, and Supplemental Figure 2, A–C) using activin and B27 supplement. Finally, maturation in a CMRL/hepatocyte culture medium mix supplemented with HGF and Oncostatin-M yielded hepatocyte-like cells

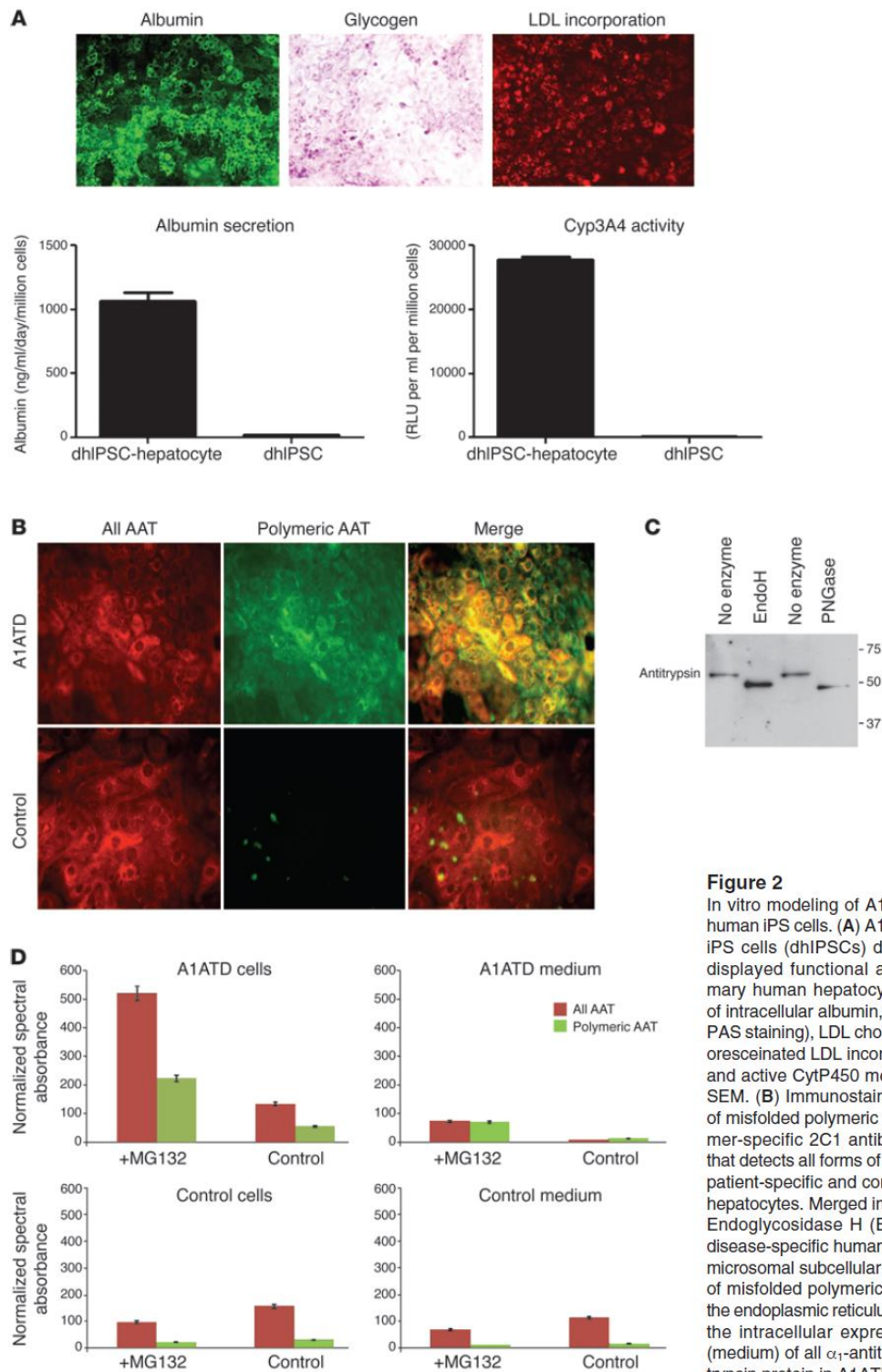


Figure 2

In vitro modeling of A1ATD using disease-specific human iPS cells. (A) A1ATD disease-specific human iPS cells (dhIPSCs) differentiated to hepatocytes displayed functional activity characteristic of primary human hepatocytes, including the presence of intracellular albumin, glycogen storage (shown by PAS staining), LDL cholesterol uptake (shown by fluoresceinated LDL incorporation), albumin secretion, and active Cyp450 metabolism. Error bars denote SEM. (B) Immunostaining analyses for expression of misfolded polymeric α_1 -antitrypsin using the polymer-specific 2C1 antibody (green) or an antibody that detects all forms of α_1 -antitrypsin (red) in A1ATD patient-specific and control human iPS cell-derived hepatocytes. Merged images are shown at right. (C) Endoglycosidase H (EndoH) digestion of A1ATD disease-specific human iPS cell-derived hepatocyte microsomal subcellular fraction, confirming retention of misfolded polymeric α_1 -antitrypsin protein within the endoplasmic reticulum. $n = 3$. (D) ELISA to assess the intracellular expression (cells) and secretion (medium) of all α_1 -antitrypsin and polymeric α_1 -antitrypsin protein in A1ATD patient-specific and control human iPS cell-derived hepatocytes after overnight proteasomal inhibition by MG132. Error bars denote SEM. $n = 3$. Original magnification, $\times 20$ (A); $\times 40$ (B).



expressing both albumin and α_1 -antitrypsin by day 25 (Figure 1, B–D). FACS analyses showed that greater than 80% of the cells generated in these culture conditions expressed albumin (Figure 1D), confirming the homogeneity of the cell population generated with this approach. By day 25, the cells showed a strong morphological resemblance to human hepatocytes, displaying occasional binucleity (Figure 1A), glycogen deposits, and apical microprotrusions (Figure 1E) as well as rough and smooth ER and a prominent Golgi body (Supplemental Figure 2E). In addition, the human iPS cell–derived hepatocytes shared *in vitro* functional characteristics with native human hepatocytes in that they were able to store glycogen and LDL, secrete albumin, metabolize drugs via the CYP450 pathway (Figure 2A and Supplemental Figure 2H), and express GFP protein under the control of the hepatocyte-specific ApoAII promoter (Supplemental Figure 2D). Furthermore, the expression of exogenous reprogramming factors remained suppressed in these cells, confirming that the retroviral transgenes stayed silenced after differentiation (Supplemental Figure 2F). Although these data provide considerable evidence showing relevant functional characteristics of the liver cells generated in our culture system, we acknowledge that these cells were not terminally differentiated, as evidenced by their continued expression of AFP (Figure 1, B and C). Instead, these hepatocytes are likely to be developmentally located somewhere between the end of the first trimester of fetal embryonic development and fully adult cells, as displayed by their α_1 -antitrypsin gene expression levels and percentage of albumin-expressing cells seen by FACS (Figure 1D, Supplemental Figure 1G, and Supplemental Figure 3B). Finally, we note that this culture system was applied to a large number of lines, 20 derived from 10 individuals, and only 2 human iPS cell lines were unable to differentiate into liver cells (Supplemental Figure 2, C and H). Collectively, these results demonstrate the efficiency of our defined culture conditions for driving differentiation of human iPS cells to near-homogenous populations of fetal hepatic cells displaying some functional characteristics specific to mature hepatocytes.

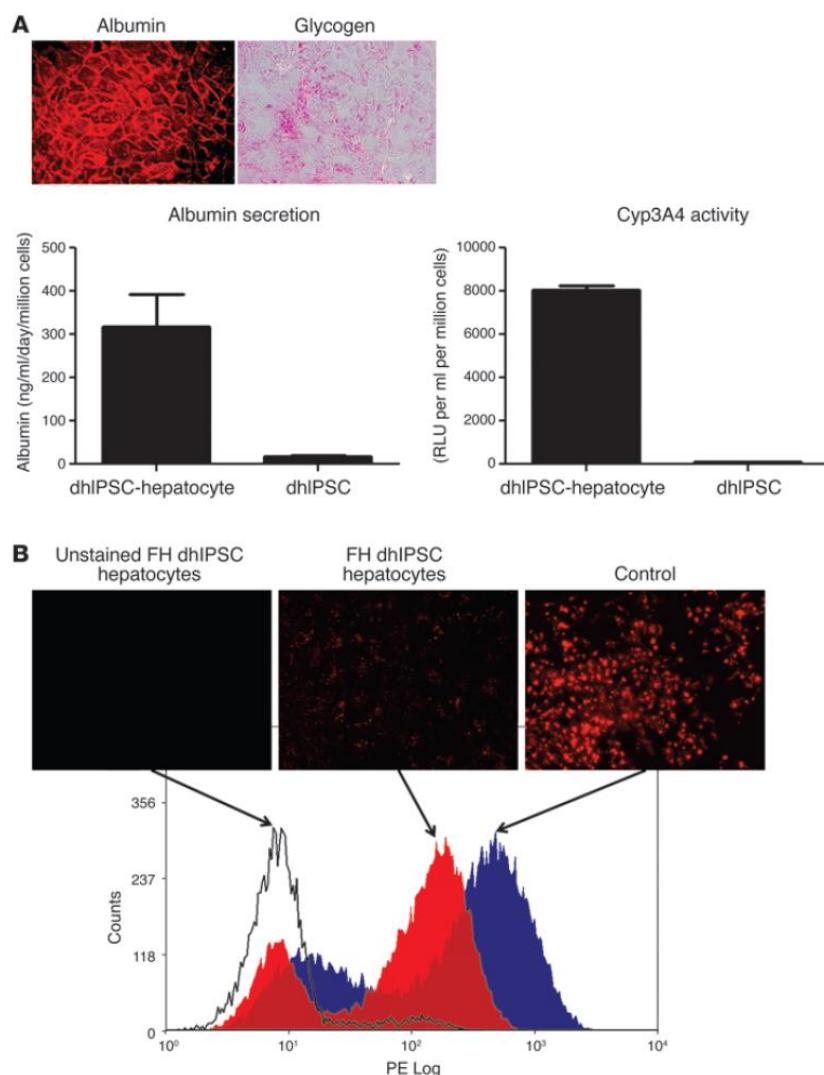
In vitro modeling of liver diseases using patient-specific human iPS cells

A1ATD. The validity of our approach to model liver disease *in vitro* was assessed by investigating whether disease-specific human iPS cell–derived hepatocytes replicated key features of the diseases from which they were derived. We first focussed on A1ATD disease-specific human iPS cells. Previous studies have shown that the Z allele (Glu342Lys) results in the formation of ordered polymers of α_1 -antitrypsin that are retained within the ER (17). These polymers accumulate within hepatocytes, predisposing the homozygote to neonatal hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (18). This pathway of α_1 -antitrypsin polymerization is central to the clinical phenotype (17). We therefore used the 2C1 polymer specific monoclonal antibody (19) to detect polymers within A1ATD disease-specific human iPS cell–derived hepatocytes. Polymers were detected by immunostaining and by ELISA analyses (Figure 2, B and D, and Supplemental Figure 2G). These data showed that accumulation of α_1 -antitrypsin polymers only occurred in disease-specific human iPS cell–derived hepatocytes from individuals with A1ATD; no polymers were present in human iPS cell–derived hepatocytes from control subjects. The cellular localization of the polymers was confirmed by subcellular fractionation of the cells, followed by digestion with endoglycosidase H (Figure 2C and Supplemental Figure 3C), an enzyme that removes N-linked glycans still in the high

mannose ER form but does not affect oligosaccharide chains after the addition of sialic acid in the Golgi apparatus. Endoglycosidase H treatment reduced all intracellular α_1 -antitrypsin in the disease-specific but not control human iPS cell–derived hepatocytes to a single 50-kDa band, demonstrating that all such intracellular α_1 -antitrypsin was retained within the ER. Importantly, the observed increase in polymer was consistent among 3 different iPS cell lines taken from the same patient, but varied among iPS cell lines taken from different patients (Supplemental Figure 2G). This phenotypic variability could correlate with the disease status in the patient and thus could reflect a clinical feature of this disease. However, a low level of polymer expression was observed in human iPS cell lines derived from A1ATD patient 2, which were also particularly resistant to endoderm differentiation (Supplemental Figure 2C). Therefore, variability in disease phenotype observed in this study mainly reflects the capacity of human iPS cells to achieve efficient hepatic differentiation. Finally, to investigate the potential application of this cell line for future *in vitro* drug screening, we assessed the effects of adding the proteasome inhibitor MG132 to the medium overnight. Blockage of this important protein degradation pathway revealed a disease-specific intracellular increase in α_1 -antitrypsin polymers (Figure 2D). Taken together, these results demonstrated that disease-specific human iPS cell–derived hepatocytes are capable of modeling key pathological feature of A1ATD *in vitro* and may also prove useful for future drug screening assays.

FH. To confirm the ability of our culture system to model clinical disease, and to investigate its potential for studying disease processes specific to other subcellular locations (Supplemental Figure 3A), we characterized the disease-specific human iPS cell–derived hepatocytes from 1 individual with familial hypercholesterolemia (FH). The primary defect in FH is impaired functioning of the LDL receptor, resulting in an excess of plasma LDL and premature atherosclerosis (20). Disease-specific human iPS cell lines generated from the individual with FH were differentiated into hepatocytes displaying typical functional characteristics (Figure 3A). Western blot analysis of the differentiated cells confirmed the absence of the LDL receptor (Supplemental Figure 3E). The *in vivo* functional implications of this receptor deficiency were also conserved in our model, as shown by immunostaining and FACS analysis demonstrating that FH disease-specific human iPS cell–derived hepatocytes had an impaired ability to incorporate LDL (Figure 3B). These results demonstrated that disease-specific human iPS cells can successfully be used to model FH and may therefore be suitable for modeling other diseases involving transmembrane protein trafficking and receptor dysfunction.

GSD1a. Finally, we used our approach to model a condition representative of impaired cytosolic metabolism. Glycogen storage disease type 1a (GSD1a) is caused by a deficiency in glucose-6-phosphatase, the main enzyme catalyzing the hydrolysis of glucose-6-phosphate to glucose and phosphate, the terminal steps in gluconeogenesis and glycogenolysis. Individuals with GSD1a cannot maintain glucose homeostasis and experience hyperlipidemia, lactic acidosis, hyperuricemia, hypoglycemia, hepatomegaly, kidney enlargement, and growth retardation (21). We differentiated 3 GSD1a lines from 1 subject, and the resulting cells were characterized for their hepatocyte-like nature (Figure 4A and Supplemental Figure 3F). Period acid Schiff (PAS) staining revealed the GSD1a disease-specific human iPS cell–derived hepatocytes accumulated substantially greater amounts of intracellular glycogen than did those of controls (Figure 4B), confirming the cellular disease phenotype.

**Figure 3**

In vitro modeling of FH using disease-specific human iPS cells. (A) FH disease-specific human iPS cells differentiated to hepatocytes displayed functional activity characteristic of primary human hepatocytes, including intracellular presence of albumin, glycogen storage, albumin secretion, and active Cyp450 metabolism. Error bars denote SEM. (B) FACS analysis for fluoresceinated LDL incorporation confirmed FH disease-specific human iPS cell-derived hepatocytes (red curve) lacked the ability to efficiently take up LDL compared with the positive control (blue curve). Human iPS cells grown in the absence of LDL were used as a negative control (unstained; black curve). Original magnification, $\times 40$ (A); $\times 20$ (B).

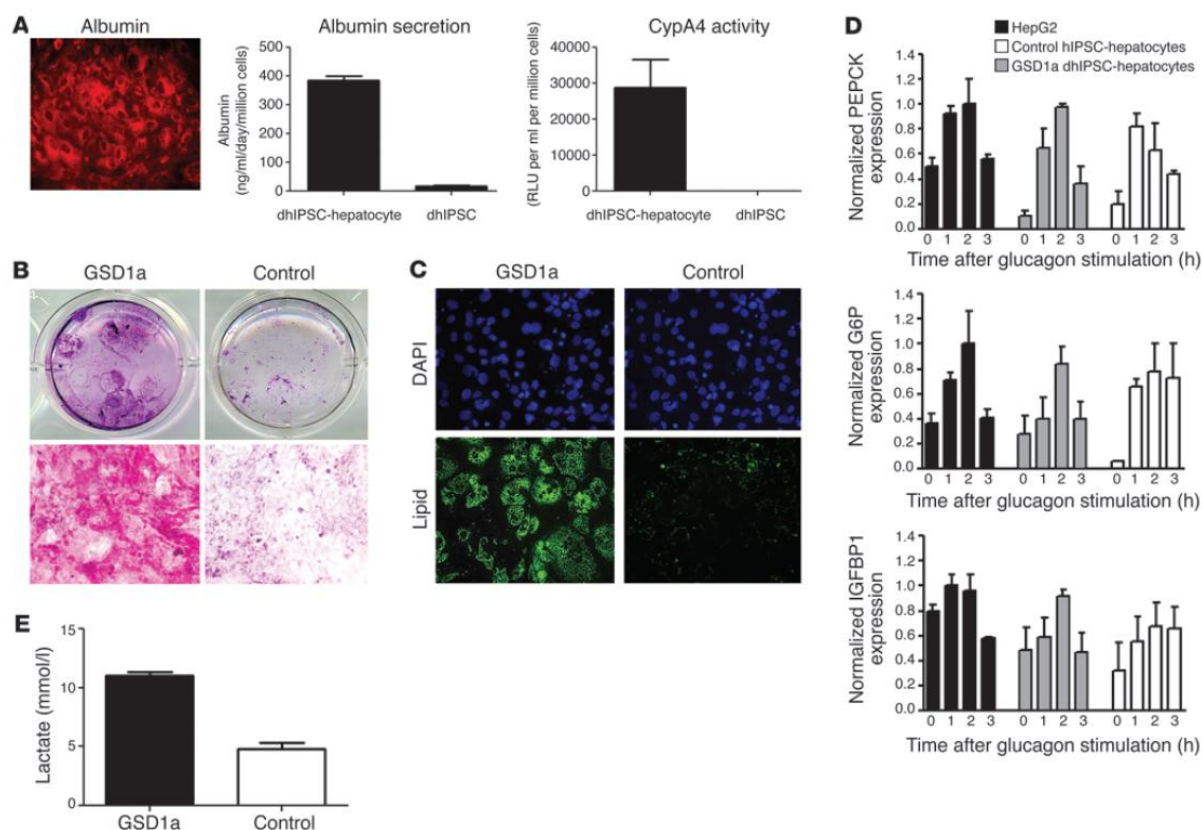
In addition, the same cells also replicated other features of the disease, such as excessive lipid accumulation and excessive production of lactic acid (Figure 4, C and E). Critically, the cells induced expression of 3 canonical glucagon-responsive genes after glucagon stimulation (Figure 4D and refs. 22, 23). These results demonstrated not only that key cellular aspects of GSD1a can be modeled in vitro, but also that the hepatocytes generated in our culture system display at least some responsiveness to a key hormone of intermediary metabolism, which suggests that our approach may therefore be applied to model other, more common metabolic disorders.

Discussion

Patient-specific disease modeling using human iPS cells has to date proven possible for a limited number of very rare neurodevelopmental disorders. By developing a simple chemically defined culture system permitting efficient differentiation of numerous human iPS cell lines toward cells of a mature hepatic state, we now demonstrate the pos-

sibility of modeling groups of diseases of non-neuronal origin whose phenotypes are a consequence of complex protein dysregulation within adult cells. The 3 diseases we modeled cover a diverse range of pathological mechanisms, from protein misfolding in the ER to cell surface receptor dysfunction and finally to obstruction of cytosolic metabolism, thereby demonstrating the potentially wide applications for exploitation of this platform into other research areas.

The potential of our modeling system is best exemplified by first considering the most common and well-characterized disorder from our group of diseases, A1ATD. Previous studies have demonstrated that misfolding and entrapment of the Z polymers within the ER is the underlying mechanism for the clinical phenotype (17). However, the variation in phenotype displayed among individuals with the same genotype has not yet been explained. Such variations may be caused by different patients' capacities to handle misfolded proteins (7–9, 18, 24, 25). The hepatocyte-specific quality control mechanisms responsible for processing such

**Figure 4**

In vitro modeling of GSD1a using disease-specific human iPS cells. (A) GSD1a disease-specific human iPS cells differentiated to hepatocytes displayed functional activity characteristic of primary human hepatocytes, including intracellular presence of albumin, albumin secretion, and active CytP450 metabolism. Error bars denote SEM. (B) PAS staining showing excessive accumulation of intracellular glycogen in GSD1a disease-specific human iPS cell-derived hepatocytes compared with human iPS cell-derived hepatocytes from control subjects. $n = 3$. (C) BODIPY staining showed excessive accumulation of intracellular lipid in GSD1a disease-specific human iPS cell-derived hepatocytes compared with human iPS cell-derived hepatocytes from control subjects. $n = 3$. (D) Disease-specific human iPS cell-derived hepatocytes appropriately upregulated transcriptional targets of glucagon, as shown by quantitative RT-PCR analysis of PEPCK, glucose-6-phosphatase (G6P), and IGFBP1 expression analyzed 0, 1, 2, and 3 hours after stimulation with 100 nM glucagon hydrochloride. Error bars denote SEM. $n = 3$. (E) GSD1a disease-specific human iPS cell-derived hepatocytes secreted more lactate than did human iPS cell-derived hepatocytes from control subjects, as assessed by ELISA analysis of a 24-hour collection of cell culture medium. Error bars denote SEM. $n = 3$. Original magnification, $\times 40$ (A; B, bottom; and C).

proteins are now being elucidated (26, 27). Although one such pathway, that of the proteasome, has an important role in metabolizing Z α_1 -antitrypsin in some hepatic (28) and extrahepatic mammalian cell lines (29), it can only approximate protein handling in the proteasome of the human hepatocyte. Furthermore, despite our increased understanding of the protein degradation pathway, it still remains unclear how accumulation of Z α_1 -antitrypsin causes cell death and liver failure. In order to enhance our understanding of this and other related mechanisms critical to the etiology of similar protein misfolding disorders, elucidation of the protein degradation pathways specific to human hepatocytes is a crucial next stage of investigation. By generating patient-specific iPS cell-derived hepatocytes capable of conserving core elements of disease-specific protein polymerization and ER entrapment, we showed that such subtle intracellular processes can potentially be studied with the in vitro cellular system described

herein. Our data also suggest that the same intracellular processes can be accurately preserved despite the highly stressful implications that ex vivo reprogramming and differentiation protocols may exert upon the cells (8, 25). However, it should be noted that before comparative patient-specific human iPS cell-based studies are performed, clearly defined criteria will need to be agreed upon to assure that investigators have achieved a sufficient level of cellular differentiation. Our data, although limited to hepatocyte differentiation, suggest that individuals of differing genetic backgrounds host intrinsic variance in the capacity of their human iPS cells to achieve in vitro differentiation toward adult cells. Therefore, any phenotypic variance observed in vitro between lines originating from different patients will need to be confirmed with large numbers of replicate patient samples to ensure that such observations do not simply reflect each line's varied capacity of differentiation toward a given cell of interest.



Table 2
Primer sequences

Primer	Sequence
Exogenous hOCT4, forward	5'-CCTCACTTCACTGCACTGTA-3'
Exogenous hOCT4, reverse	5'-TCCTGTCTTTAACAATGGACT-3'
Exogenous hKLF4, forward	5'-GATGAAGTACAGGCACTA-3'
Exogenous hKLF4, reverse	5'-TCCTGTCTTTAACAATGGACT-3'
Exogenous hSOX2, forward	5'-CCCAGCAGACTTACATGT-3'
Exogenous hSOX2, reverse	5'-TCCTGTCTTTAACAATGGACT-3'
Exogenous hMYC, forward	5'-AAGAGGACTTGTGCGGAAA-3'
Exogenous hMYC, reverse	5'-TCCTGTCTTTAACAATGGACT-3'
Endogenous hOCT4, forward	5'-CCTCACTTCACTGCACTGTA-3'
Endogenous hOCT4, reverse	5'-CAGGTTTCTTCCCTAGCT-3'
Endogenous hKLF4, forward	5'-GGTCGGACCACTCGCCTACAC-3'
Endogenous hKLF4, reverse	5'-CTCAGTTGGGAACCTTGACCA-3'
Endogenous hSOX2, forward	5'-ATGTCCAGCACTACAGAG-3'
Endogenous hSOX2, reverse	5'-GCACCCCTCCCATTTCCC-3'
Endogenous hMYC, forward	5'-CTGAAGAGGACTTGTGCGGAAAC-3'
Endogenous hMYC, reverse	5'-TCTCAAGACTCAGCCAGGTTGTG-3'
NANOG, forward	5'-CATGAGTGTGGATCCAGCTTG-3'
NANOG, reverse	5'-CCTGAATAAGCAGATCCATGG-3'
SOX17, forward	5'-CAGTGACGACAGAGCCAGACC-3'
SOX17, reverse	5'-CCACGACTTCCCGACCATCTT-3'
FOXA2, forward	5'-ACTCGCTCTCCTCAACG-3'
FOXA2, reverse	5'-CCTGGTAGTAGGAGGTATCTGC-3'
PBGD, forward	5'-GGAGCCATGTCTGGTAACGG-3'
PBGD, reverse	5'-CCACGCAATCACTCTCATCT-3'
HEX, forward	5'-CACCCGACGCCCTTTTACAT-3'
HEX, reverse	5'-GAAGGCTGGATGGATCGGC-3'
AFP, forward	5'-AGAACCTGTCAAGCTGTG-3'
AFP, reverse	5'-TGGTAGCCAGGTGAGCTAA-3'
ALBUMIN, forward	5'-CCTTTGGCACAATGAAGTGGTAACC-3'
ALBUMIN, reverse	5'-GACAGCAAGCTGAGGATGTC-3'
AAT, forward	5'-AGACCTTTTGAAGTCAAGCGACC-3'
AAT, reverse	5'-CCATTGCTGAAGACCTTAGTGATGC-3'
CYP3A4, forward	5'-TGTCCTGAGAACACAGAG-3'
CYP3A4, reverse	5'-GTGGTGGAAATAGTCCGTG-3'
ApoA2, forward	5'-GGAGAAGGTCAAGAGCCAGAG-3'
ApoA2, reverse	5'-AGCAAAGAGTGGGTAGGACAG-3'
LDLR, forward	5'-GGGCGTGAAATTGCGCTGGACCGTC-3'
LDLR, reverse	5'-TCACAGACGAAGTCCGAGAGATGC-3'

The 2 other diseases subsequently assessed with our modeling system reinforced the demonstration that downstream effects of protein dysfunction in hepatocytes were conserved in a patient-specific manner using disease-specific human iPS cells. By replicating the lack of LDL receptor-mediated uptake of LDL lipid into hepatocytes, we successfully established a cell model for FH. The FH model illustrates how this platform is uniquely equipped to provide a holistic impression of the hepatocyte-specific native processes governing receptor dysfunction, from nuclear synthesis to trafficking through the ER to recycling at the cell membrane. We therefore suggest that this platform may be well-suited for further follow-up studies into a broad range of liver-related receptoropathies.

Finally, by demonstrating the conservation of several key facets of the GSD1a cellular phenotype and the hepatocyte-specific, glucagon-induced upregulation of key downstream gluconeogenic enzymes and a secreted IGF1 binding protein, we provided proof of concept that similar studies to investigate other more common metabolic disorders could be feasible with this platform. These dis-

eases have suffered from shortcomings of currently available in vitro cell models unable to simulate some of the key hepatocyte processes that go awry in disease. The use of patient-specific human iPS cell lines in our system could permit modeling of such disease processes within a context of well-characterized genetic and clinical profiles, therefore offering exciting opportunities for cellular dissection of these diseases.

In conclusion, we believe the present study has advanced the human iPS cell field in several ways. First, demonstration of the possibility of modeling different diseases affecting adult cells using a single platform has answered one of the most pressing questions in the human iPS cell-disease modeling field. This realization has accordingly allowed us to provide other investigators with a robust and easily reproducible technical resource for potential application into diverse fields of research. Second, by demonstrating that human iPS cell-derived hepatocytes can be generated from multiple patients of varied genetic and disease backgrounds, we propose our system as an efficient methodology, which we believe to be new, for the early-stage safety and therapeutic screening of liver-targeted compounds of potential relevance to the pharmaceutical industry. Finally, and perhaps most importantly, demonstrating the ability to homogeneously derive large numbers of patient-specific hepatocytes from a group of diseases ideal for cell-based therapy raises the possibility that we have taken another step toward realizing the ultimate goal of patient-specific human iPS cell technology.

Methods

Human iPS cell derivation and culture. Following appropriate ethical approval and patient consent, 8-mm skin punch biopsies were obtained from volunteering patients attending Addenbrooke's Hospital (ethics reference no. 08/H0311/201; R&D no. A091485). Fibroblasts were derived from the donated tissue in GMP conditions using standardized in-house protocols and expanded in standard fibroblast culture medium. Additional fibroblast samples were obtained from INSERM and the Coriell Biorepository. In total, 5 different disease samples from 7 different patients were obtained (Table 1). Moloney murine leukemia virus-derived vectors, each containing the coding sequences of 1 of the 4 human genes *OCT4*, *SOX2*, *c-Myc*, and *KLF4*, and the corresponding viral particles were generated by Vectalys and used to infect the fibroblasts at MOI 10 as originally described by Yamanaka and colleagues and as we also recently described (13, 30).

Once derived, human iPS cells were cultured in standard human ES cell culture conditions (KSR; Gibco, Invitrogen) plus FGF2 (4 ng/ml; R&D Systems Inc.) on plates containing irradiated mouse feeders.

RNA extraction and real-time PCR. Total RNAs were extracted from human iPS cells or differentiated progenitors using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). Each sample was treated with RNase-Free DNase (Qiagen) to avoid DNA contamination. For each sample, 0.6 µg of total RNA was reverse transcribed using Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Real-time PCR reaction mixtures were prepared per the SensiMix protocol (Quantace), then denatured at 94°C for 5 minutes and cycled at 94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, followed by a final extension at 72°C for 10 minutes after completion of 40 cycles. Primer sequences were as described elsewhere (16). Real-time PCR reactions were performed using a Stratagene Mx3005P in triplicate and normalized to porphobilinogen deaminase (PBGD) in the same run. Quantitative PCR data are presented as the mean of 3 independent experiments; error bars indicate SEM. Primers used for Real Time PCR analyses are shown in Table 2.



Immunofluorescence. Human iPS cells or their differentiated progenitors were fixed for 20 minutes at 4°C in 4% paraformaldehyde and then washed 3 times in PBS. Cells were incubated for 20 minutes at room temperature in PBS containing 10% donkey serum (Serotec Ltd.) and subsequently incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies, diluted in 1% donkey serum in PBS: Oct-4 (1:100; Abcam ab18976), Sox2 (1:100; Abcam ab15830), Brachyury (1:100; Abcam ab20680 or R&D Systems Inc.), Sox17 (R&D Systems Inc.), FoxA2 (1:50; Abcam ab5074), GATA4 (1:250; Santa Cruz Biotechnology Inc.), GATA6 (1:200; Abcam ab22600 or Santa Cruz Biotechnology Inc.), CXCR4 (1:100; R&D Systems Inc. or BD Biosciences – Pharmingen), CK18 (1:50; Dako), CK19 (1:50; Dako), albumin (1:100; R&D1455), alpha fetoprotein (AFP; 1:300; Dako A008), and α_1 -antitrypsin (AAT; 1:100; Sigma-Aldrich A0608). Cells were then washed 3 times in PBS and incubated with Texas Red or FITC-conjugated anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich; 1:200 in 1% donkey serum in PBS) or rabbit IgG (Jackson Laboratory; 1:400 in donkey serum in PBS) or goat IgG (Jackson Laboratory; 1:400 in donkey serum in PBS) for 2 hours at room temperature. Unbound secondary antibody was removed by 3 washes in PBS. Hoechst 33258 was added to the first wash (1:10,000; Sigma-Aldrich). For lipid visualization, a lipid-specific stain boron-dipyrromethene (BODIPY 493/503; Invitrogen D-3922) was used.

Teratomas. Human iPS cells were harvested mechanically immediately prior to implantation, and approximately 10^6 cells were inoculated beneath the testicular capsule of 8-week-old C.B.-17/GbmsTac-scldbgDFN7 male mice (Taconic M&B) housed and maintained at 20°C–24°C, 50% room humidity, in a 14-hour light, 10-hour dark cycle with food and water ad libitum. The mice were sacrificed after 60 days, and the injected testes were cut into equal pieces using a razor blade. The material was fixed overnight in 4% neutral buffered formaldehyde, and dehydrated through a graded series of alcohols to xylene. The tissue was embedded in paraffin and serially sectioned at 5 μ m, followed by H&E staining and characterization. A human origin of the selected areas was verified by FISH (human-specific probes, CEP XY; Vysis Inc.). The experiments were performed with permission from the Regional Committee for Animal Experimentation (Stockholm, Sweden; Dnr N107/06).

Karyotype analysis. Human iPS cells were grown to confluence on 10-cm dishes, then harvested and metaphase spreads obtained by the Cambridge University Hospitals Cytogenetics diagnostics laboratory.

Differentiation of human iPS cells to hepatocytes. Human iPS cells were passaged using 5 mg/ml collagenase IV/Dispase (0.1%; Gibco, Invitrogen) 1:1 (v/v) mix, then transferred onto plates precoated with FBS in CDM-PVA or in plates precoated with human fibronectin, as previously described (16). For the first following day, cells were grown in CDM-PVA supplemented with CHIR99021 (3 μ M; Stemgent), Ly294002 (10 μ M; Calbiochem), Activin (100 ng/ml; R&D Systems), FGF2 (40 ng/ml; R&D Systems), and BMP4 (10 ng/ml; R&D Systems) to drive differentiation of human iPS cells into primitive streak like cells. The next day, the resulting cells were grown in CDM-PVA supplemented with Ly294002 (10 μ M; Calbiochem), Activin (100 ng/ml); FGF2 (40 ng/ml; R&D Systems), and BMP4 (10 ng/ml; R&D Systems) to drive their differentiation toward definitive endoderm. On the third day, the basal medium was changed to RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen) and supplemented with Activin (100 ng/ml; R&D Systems), FGF2 (40 ng/ml; R&D Systems), and B27 to obtain anterior definitive endoderm cells. To induce hepatic endoderm, anterior definitive endoderm cells were then cultured for 5 days in the presence of RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen) supplemented with Activin (50 ng/ml; R&D Systems). Finally, to mature the resulting hepatic progenitors, cells were grown in a CMRL/Hepatocyte (Invitrogen) basal medium supplemented by HGF (20 μ g/ml; Peprotech) and Oncostatin-M (10 μ g/ml; R&D Systems).

Flow cytometry. For detection of albumin-positive cells, adherent cells at the end of the hepatocyte differentiation protocol were washed twice in PBS and then incubated for 20 minutes at 37°C in cell dissociation buffer

(Invitrogen). Cells were dissociated by gentle pipetting and resuspended at approximately 0.1×10^5 cells/ml in PBS plus 3% normal goat serum containing 0.1% azide (Serotec Ltd.) and 0.1% Triton-X. Cells were then incubated for 40 minutes at 4°C with primary mouse anti-human albumin antibody (1:100; R&D Systems 1455) or mouse IgG isotype control (BD Biosciences – Pharmingen). Cells were then analyzed by a FACSCalibur machine (BD Biosciences). The number of albumin-positive cells was recorded as the average from 3 separate experiments.

Subcellular fractionation using iodixanol-stepped gradient and endoglycosidase H digestion. Disease-specific human iPS cell-derived hepatocytes were grown in 6-well plates and harvested using a cell scraper. Cells were then mechanically disrupted by repeated passage over a ball bearing homogenizer. The cell suspension was centrifuged at 3,000 g for 5 minutes at 4°C, and the supernatant was diluted to a final concentration of 35% OptiPrep (Axis-Shield) and transferred to a new centrifuge tube. 2 ml 30% OptiPrep and 1 ml 0% OptiPrep were carefully layered sequentially on top of the supernatant, and the tube was spun at 70,000 g for 2 hours at 4°C. The liquid interface formed between the 2 bottom layers was carefully aspirated and again spun at 100,000 g for 45 minutes at 4°C. The subsequent pellet formed was resuspended in 50 μ l buffer and labeled as the microsomal fraction. For endoglycosidase H [EC 3.2.1.96, glycopeptide-D-mannosyl-N4-(N-acetyl-D-glucosaminyl)2-asparagine 1,4-N-acetyl-b-glucosaminohydrolase] digestion, microsomal cellular fractions were digested with 500 U endoglycosidase H enzyme (Boehringer Mannheim) for 3 hours at 37°C, then analyzed as detailed below.

SDS-PAGE and Western blot analysis. Samples of 30 μ l were mixed with 10 μ l 4 $\times$ loading buffer containing 10% (v/v) β -mercaptoethanol and 4% (w/v) SDS and analyzed by 8% (w/v) acrylamide SDS-PAGE. The proteins were transferred from the gels onto Immobilon P membrane (Millipore Corp.) at 200 mA for 2 hours for Western blot analysis. 20% (v/v) methanol was added to the transfer buffer. After transfer, the membrane was washed in PBT (PBS plus 0.1% [v/v] Tween 20) and blocked overnight in PBT plus 5% (w/v) dried skim milk powder (PBT-milk). The following day, the membrane was incubated with anti- α_1 -antitrypsin antibody diluted 1:10,000 in PBT-milk for 1 hour, washed 6 times for 5 minutes with PBT, and then incubated with 1:100,000 anti-mouse IgG-HRP antibody in PBT-milk for 1 hour. The membrane was washed a further 6 times for 5 minutes with PBT and 15 minutes in PBS before developing using the ECL Super Signal West Femto maximum sensitivity substrate (Pierce) and exposed to film.

ELISA for α_1 -antitrypsin. High binding surface Costar 96-well plates (Corning) were coated overnight with affinity-purified rabbit polyclonal antibodies against α_1 -antitrypsin (Abcam ab31657) at 2 μ g/ml in carbonate/bicarbonate buffer ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$, pH 9.5). After washing (0.9% [w/v] NaCl and 0.05% [v/v] Tween 20), the plates were blocked for 2 hours in blocking buffer (PBS, 0.25% [w/v] BSA, 0.05% [v/v] Tween 20). Samples (culture medium or cells lysed in 50 μ l Nonidet lysis buffer – 150 mM NaCl; 50 mM Tris-Cl, pH 7.5; 1% [v/v] Nonidet P-40) and standards (plasma purified M or Z α_1 -antitrypsin) were diluted in blocking buffer, and 50 μ l was added to each well and then incubated for 2 hours. After washing, the wells were incubated with either 9C5 or 2C1 monoclonal antibodies (1 μ g/ml diluted in blocking buffer) and incubated for 2 hours. Bound monoclonal antibodies were detected with rabbit anti-mouse IgG HRP-labeled antibody (1:20,000; Sigma-Aldrich) for 1 hour. The reaction was developed with TMB liquid substrate (Sigma-Aldrich) for 10 minutes in the dark, and the reaction was stopped with 1 M H_2SO_4 . Absorbance was read at 450 nm on a Thermo-max microplate reader (Molecular Devices). For the proteasome blocking assay, cells were grown in 6-well plates, and MG132 (AG Scientific) diluted 1:10,000 was added to the culture medium 16 hours prior to harvest (i.e., overnight). Control samples had equal volumes of PBS added to them.

ELISA for albumin. Cell culture medium collected over 24 hours was analyzed in triplicate by the Cambridge University Hospitals Biochemical



diagnostics laboratory using an in-house human albumin specific ELISA kit (BioSupply UK). Values were expressed as nanograms per million cells per milliliter culture medium.

Cytochrome P450 activity. Cyp3A4 activity assay was measured in triplicate using the P450-Glo assay kit (Promega) according to the manufacturer's instructions. Cytochrome activity was then analyzed using a P450-GloMax 96 microplate luminometer (Promega).

PAS staining. PAS staining was carried out on cells in triplicate using a kit (Sigma-Aldrich 395B-1KT) according to the manufacturer's instructions. Diastase digestion was subsequently performed to confirm that positive staining was due to the presence of glycogen.

Transmission EM. Cells were rinsed briefly in 0.9% NaCl and fixed for 2 hours in 4% glutaraldehyde at 4°C. Cells were then scraped from the plates under fix and resuspended by rinsing in 0.1 M PIPES. Analysis was performed by transmission EM.

Uptake of LDL. The Dil-LDL staining kit was purchased from Stoughton, and the assay was performed according to the manufacturer's instructions. FACS analysis was performed comparing Dil incorporation in FH disease-specific human iPS cell hepatocytes with that in control HepG2 cells.

GFP reporter. Cells were transduced with the APOA-II-GFP lentivector as previously described (16) and examined by microscopy.

Metabolic enzyme response to glucagon stimulation. Disease-specific human iPS cell-derived hepatocytes were incubated for 6 hours in serum-free, high-glucose DMEM supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/l penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 0.5% BSA (all from Sigma-Aldrich). Cells were stimulated with 100 nM glucagon hydrochloride (Novo Nordisk) or PBS (Sigma-Aldrich) as a negative control. Total RNA was harvested using the RNeasy Kit (Qiagen) at 0, 1, 2, or 3 hours after stimulation and purified per the manufacturer's guidelines. Reverse transcription was performed on 1 µg RNA in a 25-µl reaction mixture containing 200 U Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, 500 ng random primers, and 0.5 mM deoxynucleotide triphosphates (all from Promega) per the manufacturer's guidelines. cDNA was subjected to real-time quantitative PCR on an ABI7900 detection system (Applied Biosystems) using Taqman PCR Mastermix (Applied Biosystems) and gene-specific forward and reverse primers and fluorogenic probes. All results were normalized to human 36B4 as a reference gene. Primers and probes for *PEPCK* (Hs00159918_m1), *G6P* (Hs00609178_m1), and *IGFBP1* (Hs00426285_m1) were purchased as pre-made stocks from Applied Biosystems. Oligonucleotides for 36B4 were designed in house and synthesized by Sigma-Aldrich (forward, 5'-GCAGATCCGCATGTCCTT-3'; reverse, 5'-TGTTTTCAGGTGCCCTCG-3'; Probe, 5'-[JOEE]AGGCTGTGGTGTGATG[TAMRA]-3').

phates (all from Promega) per the manufacturer's guidelines. cDNA was subjected to real-time quantitative PCR on an ABI7900 detection system (Applied Biosystems) using Taqman PCR Mastermix (Applied Biosystems) and gene-specific forward and reverse primers and fluorogenic probes. All results were normalized to human 36B4 as a reference gene. Primers and probes for *PEPCK* (Hs00159918_m1), *G6P* (Hs00609178_m1), and *IGFBP1* (Hs00426285_m1) were purchased as pre-made stocks from Applied Biosystems. Oligonucleotides for 36B4 were designed in house and synthesized by Sigma-Aldrich (forward, 5'-GCAGATCCGCATGTCCTT-3'; reverse, 5'-TGTTTTCAGGTGCCCTCG-3'; Probe, 5'-[JOEE]AGGCTGTGGTGTGATG[TAMRA]-3').

Acknowledgments

This work was funded by the Wellcome Trust, MRC, and the Cambridge Hospitals National Institute for Health Research Biomedical Research Center. S.T. Rashid is a Wellcome Trust Clinical Training Fellow, S.J. Marciniak is an MRC Clinician Scientist, R. Semple is a Wellcome Trust Clinician Scientist Fellow, and L. Vallier is an MRC Senior non clinical Fellow. S. Corbinau was supported by a grant from Ingecell, Pôle de compétitivité Medicen, Région Île-de-France. We are grateful to Keith Burling (Clinical Biochemistry) and Joanne Staines (Clinical Cytogenetics) of Addenbrooke's Hospital for their help.

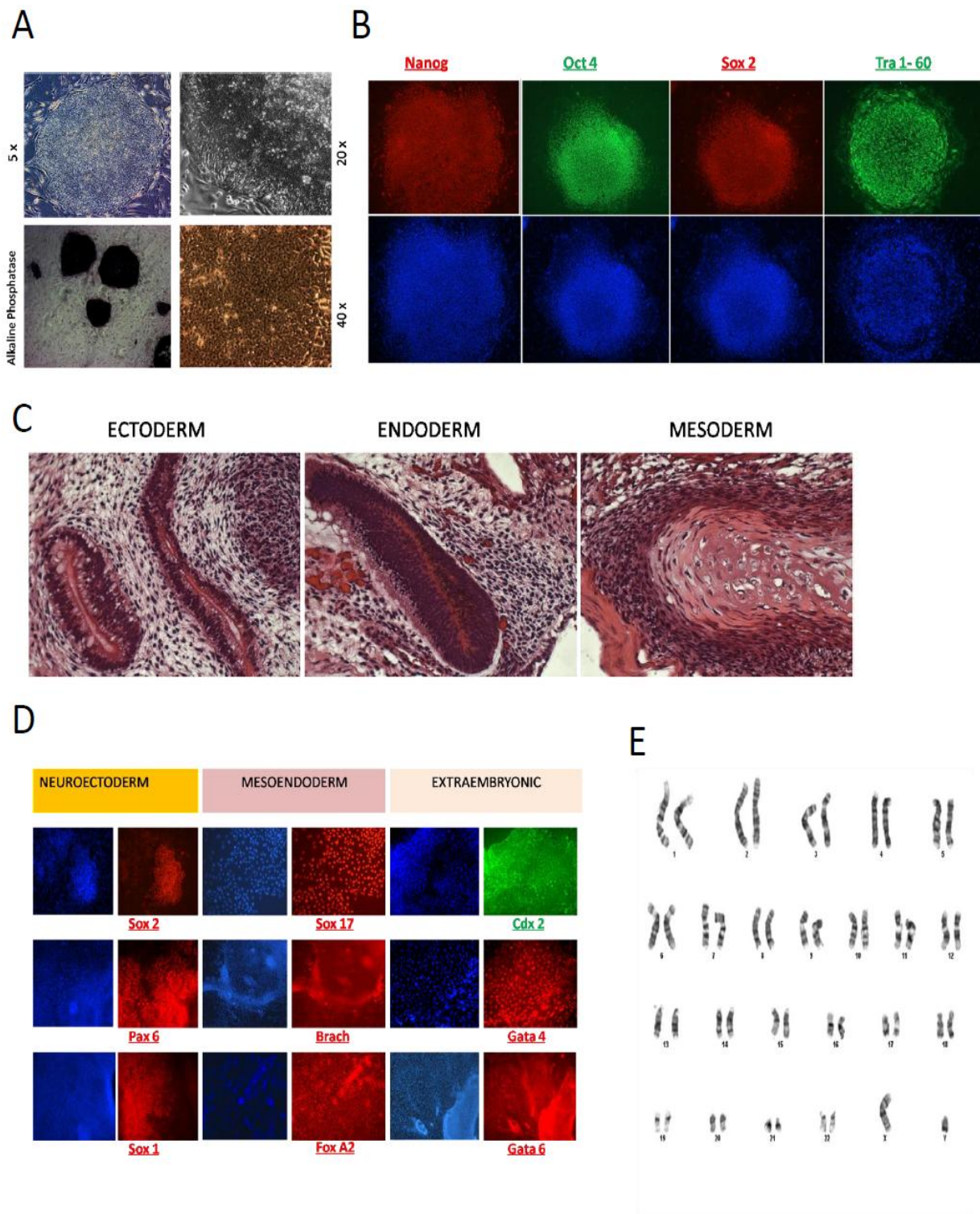
Received for publication March 25, 2010, and accepted in revised form July 14, 2010.

Address correspondence to: Ludovic Vallier or S. Tamir Rashid, Laboratory for Regenerative Medicine, West Forvie Building, Robinson Way, University of Cambridge, Cambridge CB2 0SZ, United Kingdom. Phone: 44.1223.747489; Fax: 44.1223.763350; E-mail: lv225@cam.ac.uk (L. Vallier); str29@cam.ac.uk (S.T. Rashid).

- Saha K, Jaenisch R. Technical challenges in using human induced pluripotent stem cells to model disease. *Cell Stem Cell*. 2009;5(6):584–595.
- Park IH. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*. 2008;134(5):877–886.
- Maehr R, et al. Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(37):15768–15773.
- Dimos JT. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*. 2008;321(5893):1218–1221.
- Lee G, et al. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature*. 2009;461(7262):402–406.
- Ebert AD. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*. 2009;457(7227):277–280.
- Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science*. 2008;319(5865):916–919.
- Pan S, et al. Single nucleotide polymorphism-mediated translational suppression of endoplasmic reticulum mannosidase I modifies the onset of end-stage liver disease in alpha1-antitrypsin deficiency. *Hepatology*. 2009;50(1):275–281.
- Perlmutter DH. Autophagic disposal of the aggregation-prone protein that causes liver inflammation and carcinogenesis in [alpha]-1-antitrypsin deficiency. *Cell Death Differ*. 2008;16(1):39–45.
- Enns GM, Millan MT. Cell-based therapies for metabolic liver disease. *Mol Genet Metab*. 2008;95(1–2):3–10.
- Fisher RA, Strom SC. Human hepatocyte transplantation: worldwide results. *Transplantation*. 2006;82(4):441–449.
- Guillouzo A, Guguen-Guillouzo C. Evolving concepts in liver tissue modeling and implications for in vitro toxicology. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2008;4(10):1279–1294.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663–676.
- Brons IG, et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*. 2007;448(7150):191–195.
- Chin MH, et al. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell*. 2009;5(1):111–123.
- Touboul T, et al. Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions which recapitulate liver development. *Hepatology*. 2010;51(5):1754–1765.
- Goopu B, Lomas DA. Conformational pathology of the serpins: themes, variations, and therapeutic strategies. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:147–176.
- Perlmutter DH. Pathogenesis of chronic liver injury and hepatocellular carcinoma in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Pediatr Res*. 2006;60(2):233–238.
- Miranda E, et al. A novel monoclonal antibody to characterize pathogenic polymers in liver disease associated with alpha(1)-antitrypsin deficiency [published online ahead of print May 14, 2010]. *Hepatology*. doi:10.1002/hep.23760.
- Rader DJ, Cohen J, Hobbs HH. Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment. *J Clin Invest*. 2003;111(12):1795–1803.
- Shieh J-J, et al. The molecular basis of glycogen storage disease type 1a. *J Biol Chem*. 2002;277(7):5047–5053.
- Salavert A, Iynedjian PB. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) synthesis in rat liver cells. Rapid induction of specific mRNA by glucagon or cyclic AMP and permissive effect of dexamethasone. *J Biol Chem*. 1982;257(22):13404–13412.
- Dentin R, et al. Insulin modulates gluconeogenesis by inhibition of the coactivator TORC2. *Nature*. 2007;449(7160):366–369.
- Piitulainen E, Carlson J, Ohlsson K, Sveger T. Alpha1-antitrypsin deficiency in 26-year-old subjects: lung, liver, and protease/protease inhibitor studies. *Chest*. 2005;128(4):2076–2081.
- Wu Y, Whitman I, Molmenti E, Moore K, Hippenmeyer P, Perlmutter DH. A lag in intracellular degradation of mutant [alpha]1-antitrypsin correlates with the liver disease phenotype in homozygous PiZZ alpha1-antitrypsin deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(19):9014–9018.
- Cabral CM, Choudhury P, Liu Y, Sifers RN. Processing by endoplasmic reticulum mannosidases partitions a secretion-impaired glycoprotein into distinct disposal pathways. *J Biol Chem*. 2000;275(32):25015–25022.
- Cabral CM, Liu Y, Moremen KW, Sifers RN. Organizational diversity among distinct glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation programs. *Mol Biol Cell*. 2002;13(8):2639–2650.
- Teckman JH, Burrows J, Hidvegi T, Schmidt B, Hale PD, Perlmutter DH. The proteasome participates in degradation of mutant I α 1-antitrypsin Z in the endoplasmic reticulum of hepatoma-derived hepatocytes. *J Biol Chem*. 2001;276(48):44865–44872.
- Qu D, Teckman JH, Omura S, Perlmutter DH. Degradation of a mutant secretory protein, alpha 1-antitrypsin Z, in the endoplasmic reticulum requires proteasome activity. *J Biol Chem*. 1996;271(37):22791–22795.
- Vallier L, et al. Signalling pathways controlling pluripotency and early cell fate decisions of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2009;27(11):2655–2666.

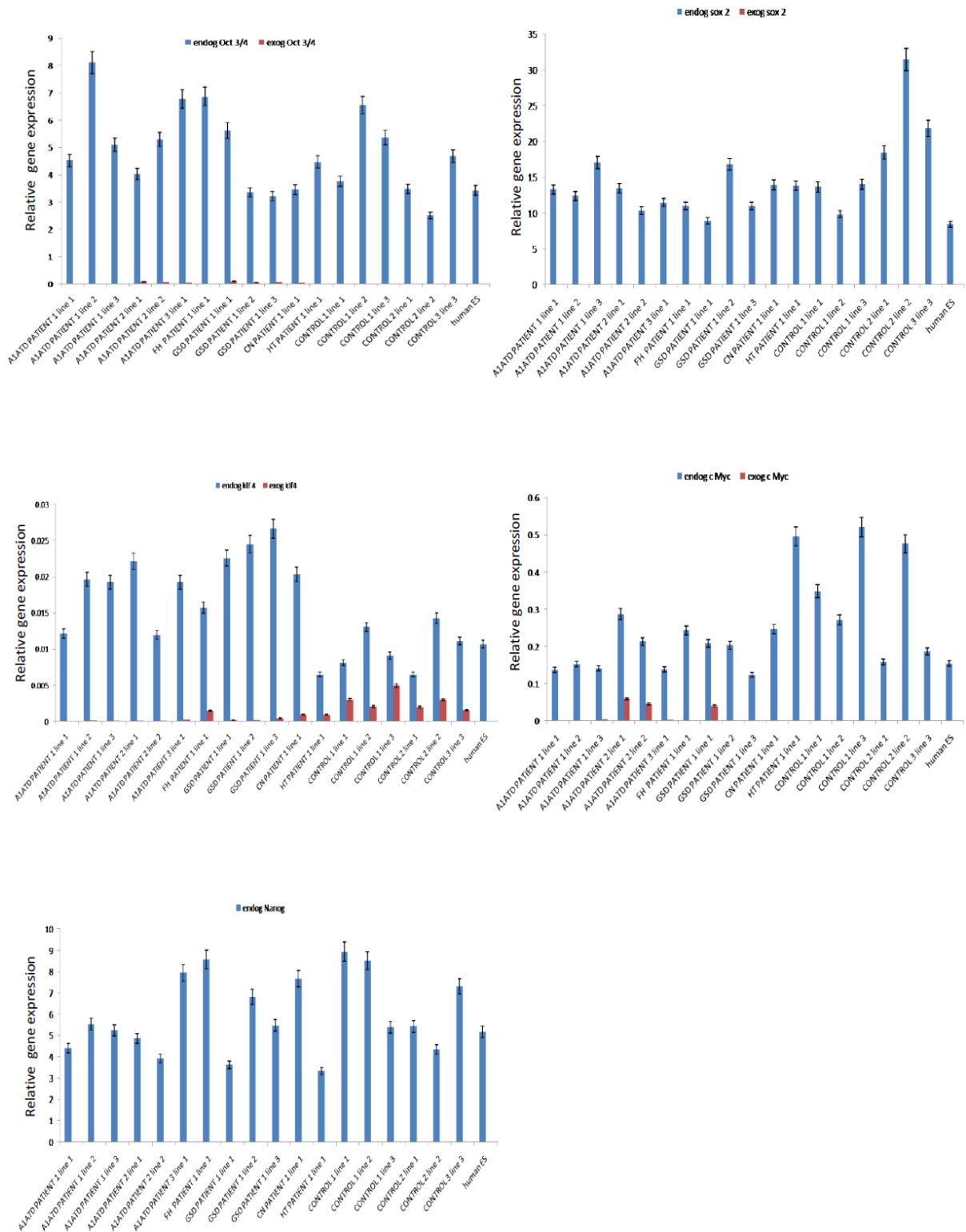
Disease	Clinical features	Genotype
Alpha 1 Antitrypsin deficiency (A1ATD)	Patient 1 – 65 year old caucasian male, liver transplant recipient, explant biopsy confirmed A1ATD induced liver cirrhosis Patient 2 – 55 year old caucasian male with clinical symptoms & liver biopsy confirming intrahepatic α1-antitrypsin polymer accumulation Patient 3 – 16 week old caucasian male with liver disease, biopsy confirmed diagnosis. of A1ATD	Homozygous Glu342Lys (Z mutation) Homozygous Glu342Lys (Z mutation) Homozygous Glu342Lys (Z mutation)
Glycogen storage disease type 1a (GSD1a)	25 year old caucasian male with clinical features of excess glycogen deposition confirmed by enzyme functionality assay.	Absent hepatic glucose – 6 – phosphatase enzyme
Familial Hypercholesterolaemia (FH)	Caucasian adult male patient with symptoms of early onset atherosclerotic disease secondary to hypercholesterolemia and strong family history. Diagnosis confirmed by LDL receptor dysfunction assay.	Autosomal dominant mutation in LDL receptor
Crigler Najjar Syndrome (CN)	2 month old caucasian male with clinical features of CN.	Homozygous for a 13 bp deletion in exon 2 of the UGT1A1 gene.
Hereditary Tyrosinaemia Type 1 (HT)	2 month old caucasian male with clinical features of HT.	One allele carries a missense mutation in codon 166 of fumarylacetoacetate hydrolase (FAH) gene: T>G in base 553 (553T>G) causes a GTC(val) to GGC(gly) substitution [Val166Gly (V166G)]; the other allele is unknown
Control	Asymptomatic 50 and 55 year old males Asymptomatic 60 year old female	Not tested

Supplementary Table 1 – Further clinical details of patients from whom disease specific hiPSC library was generated



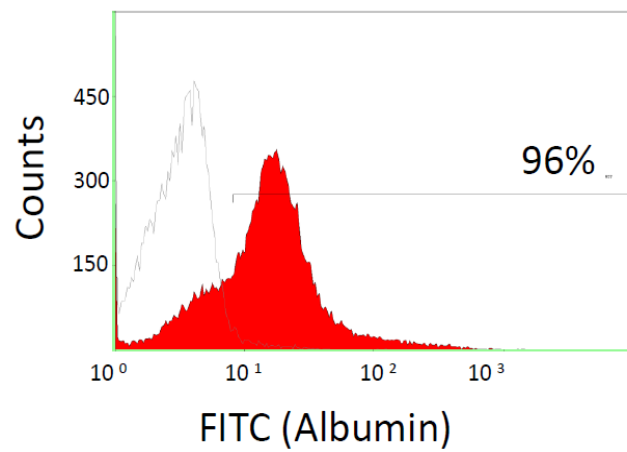
Supplementary Figure 1 - Generation of patient specific Human iPS cells (data shown is taken from one d hPSC line but is representative of all lines characterized from the dhPSC library –see Table 1) (A) Bright field pictures depicting the characteristic hESC like morphology of dhPSC colonies (5X, 20X) and dhPSC cells (40X). The colonies also displayed the alkaline phosphatase activity that is characteristic of pluripotent stem cells. (B) Immunostaining demonstrating dhPSCs expressed proteins characteristic of pluripotency – Nanog, OCT3/4, SOX2 and Tra1-60 (Top panels green fluorescence, Bottom panels: DAPI stained nuclei blue fluorescence). (C) hematoxylin and eosin stained sections of teratomas formed following the injection of dhPSCs into immune deficient mice showing the formation of cell types characteristic of all three germ layers including pigment cells (Ectoderm), goblet cells (endoderm) and cartilage (mesoderm). (D) Immunostaining demonstrating that dhPSCs could be differentiated *in vitro* into derivatives of the three germ layers and into extra-embryonic tissues: neuroectoderm (SOX-2, PAX6, SOX-1), mesendoderm (SOX17, Brachyury, FOXA2) and extraembryonic (CDX-2, GATA-4, GATA-6). (E) G banding analysis confirming normal karyotype of dhPSCs.

F

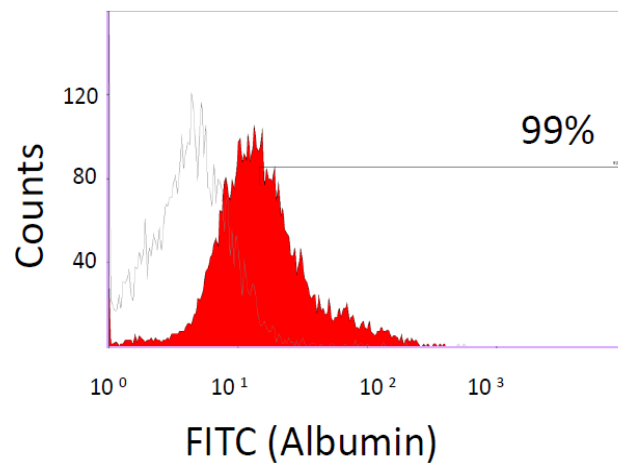


Supplementary Figure 1 contd. - (F) Real Time PCR analyses for the expression of endogenous and exogenous Oct-4, Sox2, Klf-4, C-Myc and Nanog in 18 dhiPSC lines derived from 9 individuals. Human embryonic stem cells (human ES; H9) were used as a positive control.

G

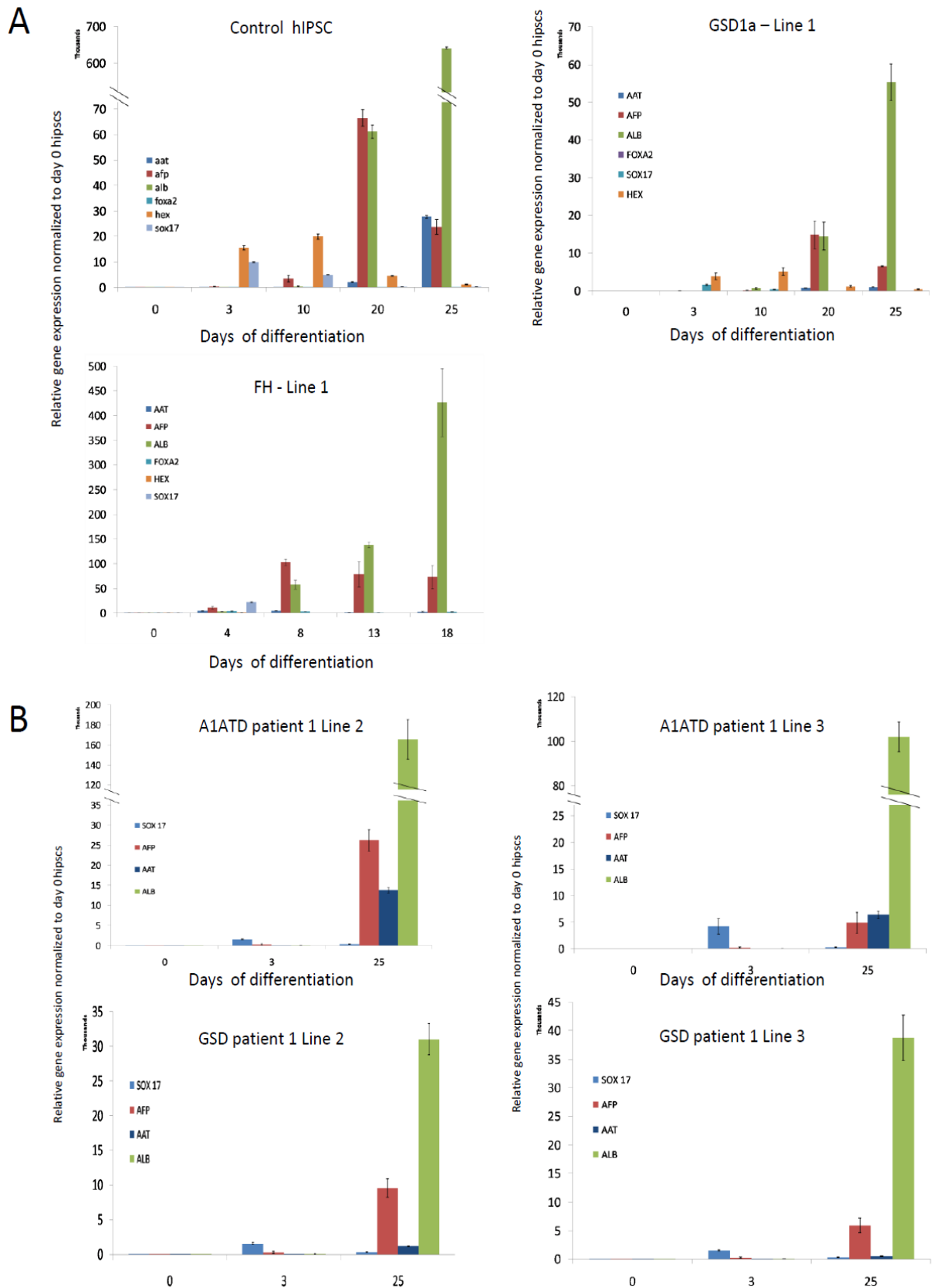


FOETAL



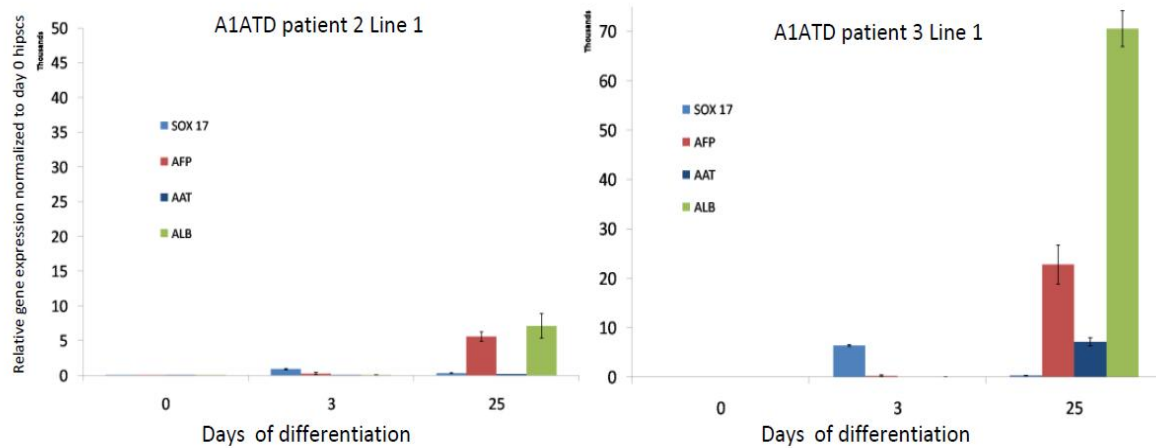
ADULT

Supplementary Figure 1 contd. - (G) Fraction of cells expressing albumin in late first trimester foetal liver (top panel – FOETAL) and adult liver (bottom panel – ADULT) as shown by FACS analyses .

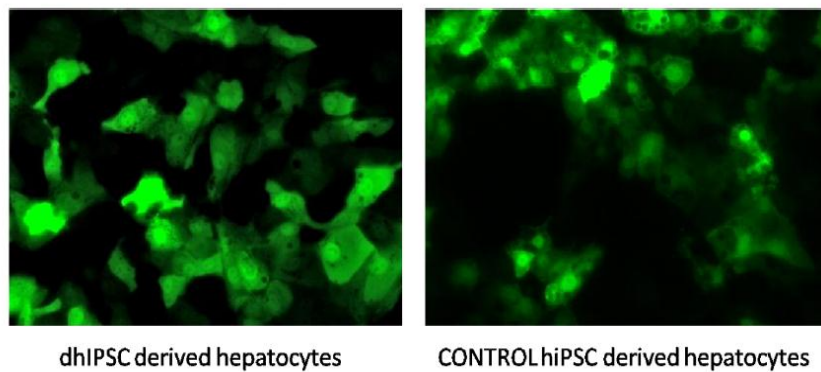


Supplementary Figure 2 – Hepatic differentiation of dhIPSCs (A - B) Real Time PCR analyses for the expression of specific markers of liver development during differentiation of dhIPSCs into hepatocytes.

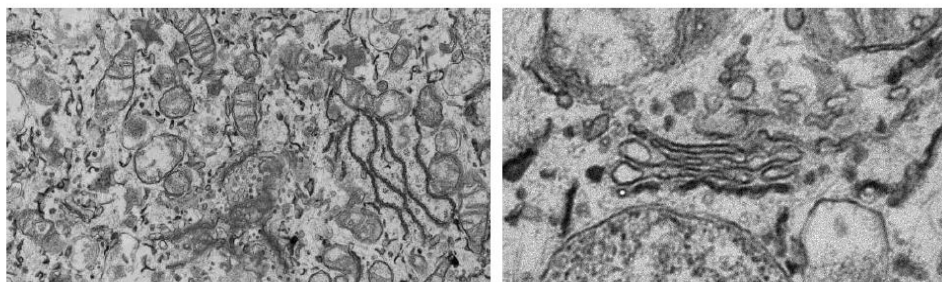
C



D

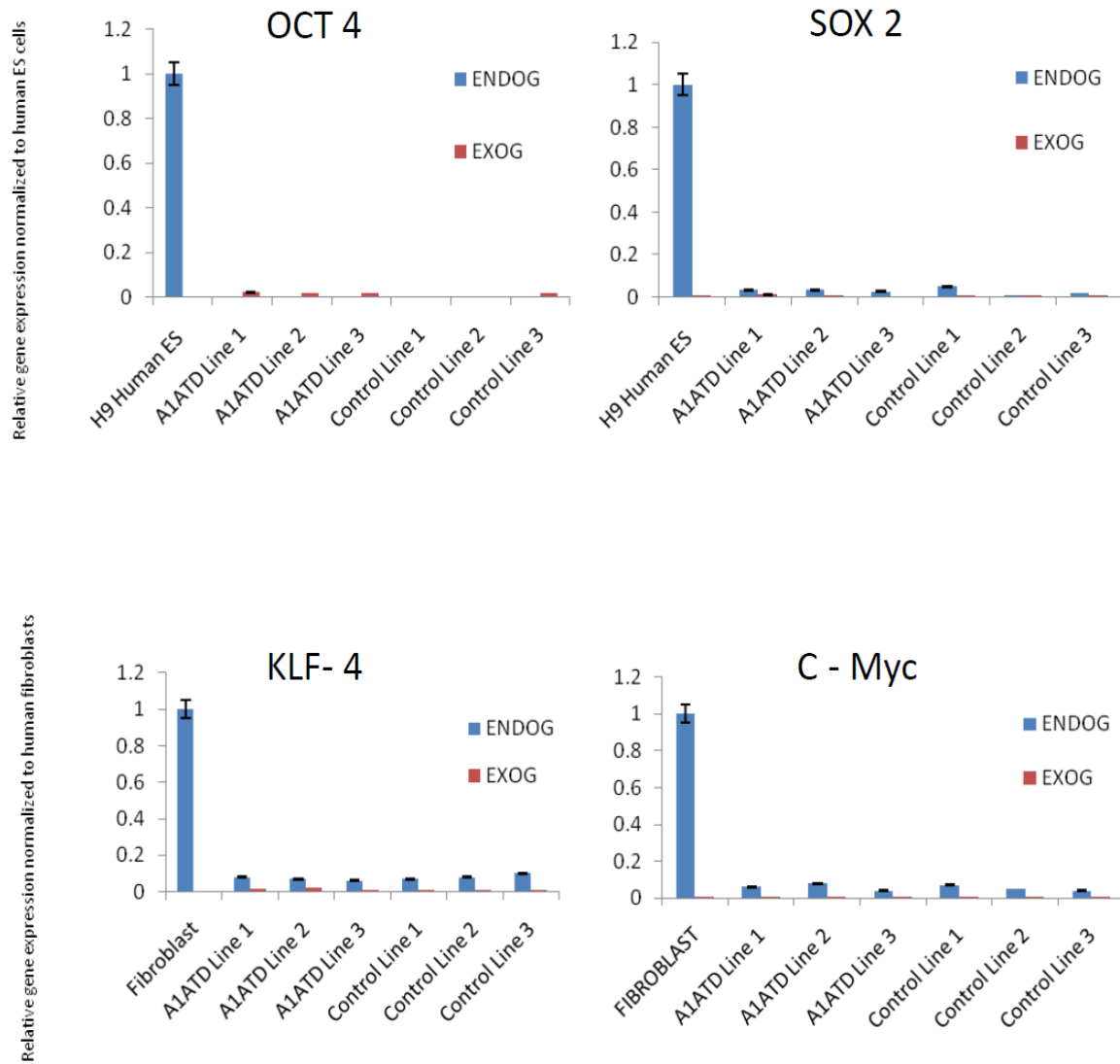


E



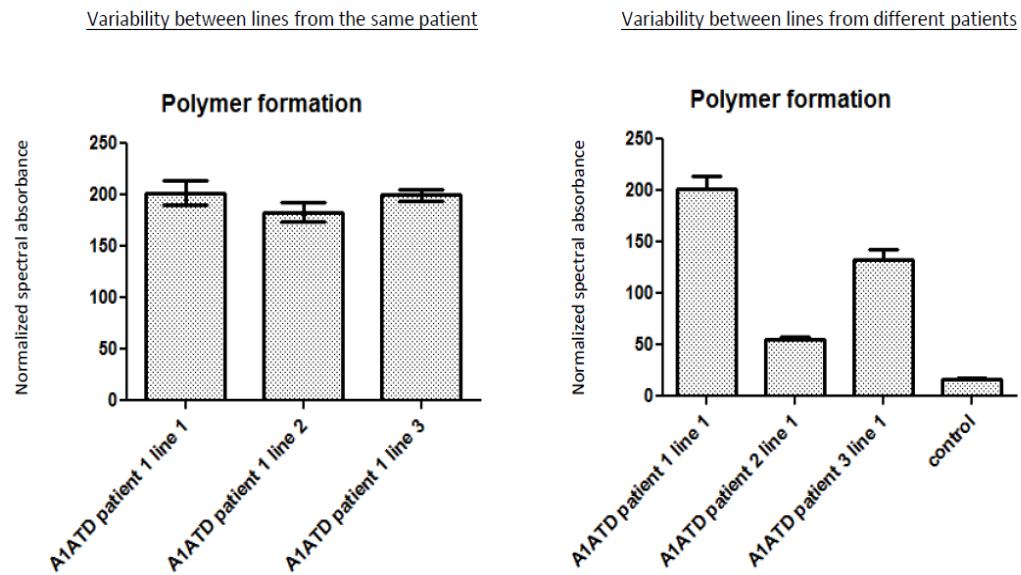
Supplementary Figure 2 contd - (C) Real Time PCR analyses for the expression of specific markers of liver development during differentiation of dhIPSCs into hepatocytes. (D) Immunostaining showing that A1ATD-dhIPSC derived hepatocytes were able to express GFP following transduction of a viral vector containing GFP reporter under the control of the liver specific ApoAII promoter. (dhIPSC)- cells derived from same A1ATD line characterized in Figure 1, (control) - cells from non diseased hiPSC derived hepatocytes. (E) Transmission electron microscopy demonstrating that dhIPSC derived hepatocytes display typical hepatocyte features such as prominent nuclear (sometimes binuclear) structures, Golgi body and rough and smooth endoplasmic reticulum.

F

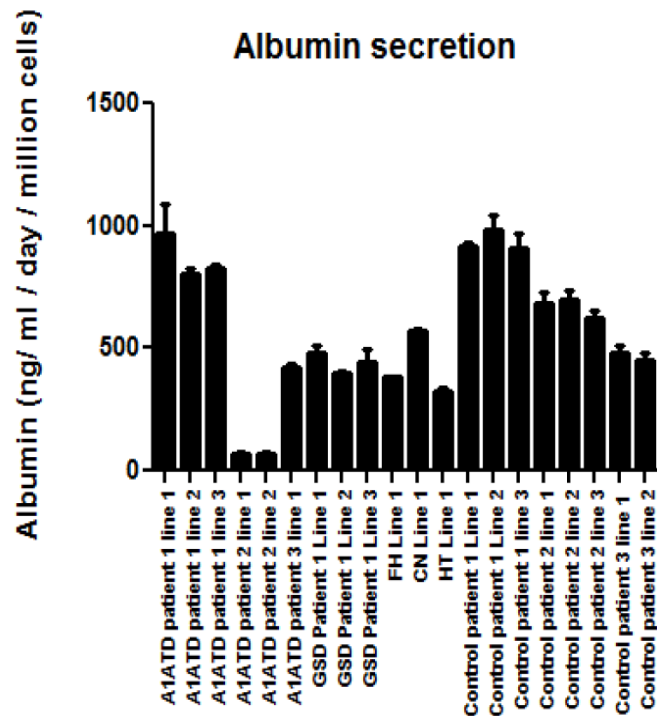


Supplementary Figure 2 contd - (F) Real Time PCR analyses for the expression of exogenous Oct-4, Sox2, Klf-4 and C-Myc in 3 dhiPSC derived hepatocyte lines and 3 controls. Relative expression was normalized to either Human embryonic stem cells (human ES; H9) or fibroblast

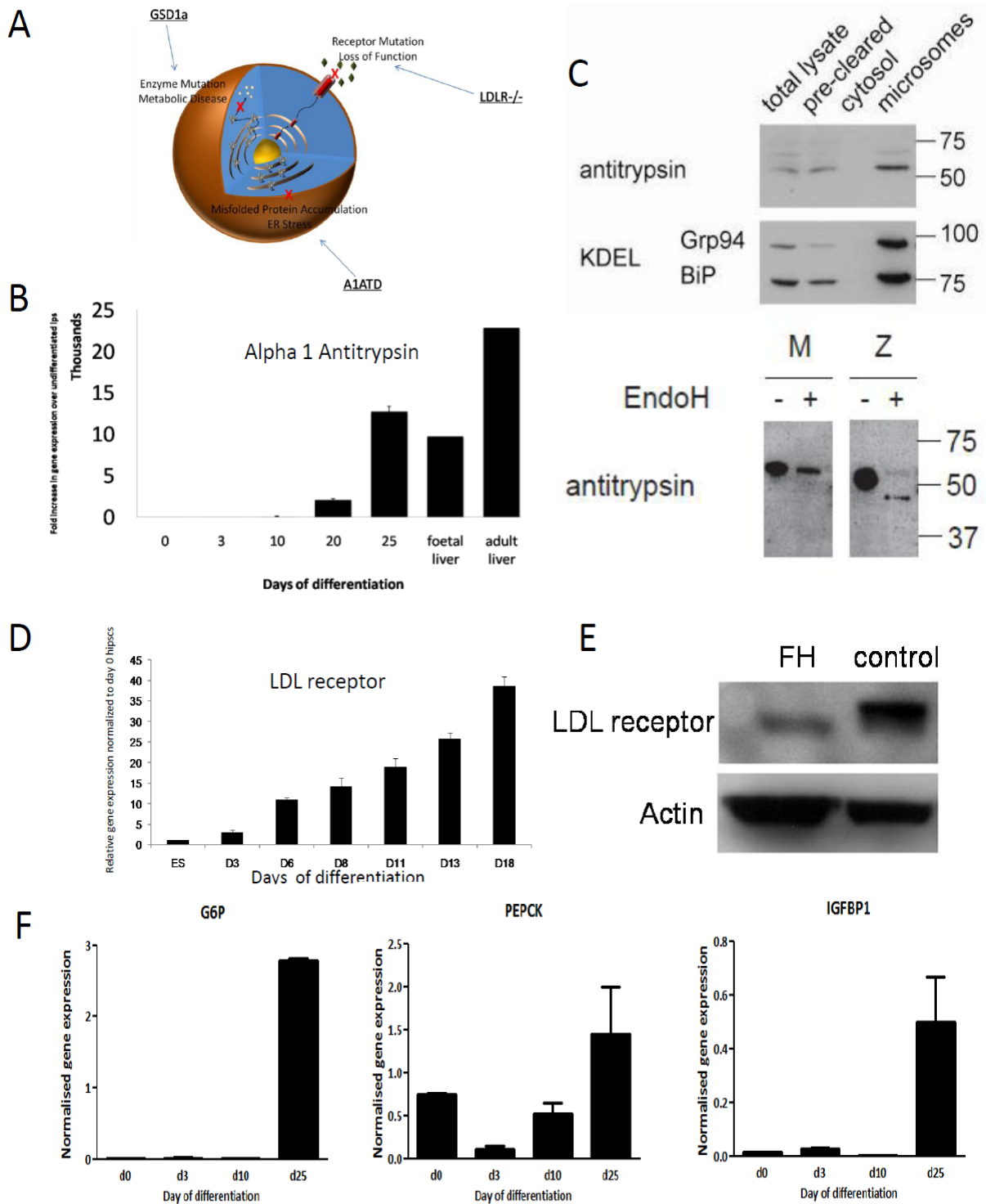
G



H



Supplementary Figure 2 contd - (G) ELISA to assess the intracellular expression of polymeric α_1 -antitrypsin protein in patient specific (A1ATD) and control hiPSC derived hepatocytes (control) following overnight proteasomal inhibition by MG132. n = 3. (H) ELISA to assess Albumin secretion from each of the 20 hiPSC derived hepatocyte lines.



Supplementary Figure 3 – Disease modelling using dhIPSCs (A) Schematic depicting the rationale for choosing A1ATD, GSD-1a and FH to explore the capacity of dhIPSCs for *in vitro* disease modelling. (B) Real Time PCR analyses comparing the level of expression of AAT in A1ATD-dhIPSCs differentiating into hepatocytes (Day 0, 3, 10, 20 and 25) and in late first trimester human foetal liver (foetal) and in adult liver (adult). (C) Subcellular fractionation of dhIPSC derived hepatocytes from an A1ATD patient co-enriches for markers of the endoplasmic reticulum (GRP94 and BiP) and α_1 -antitrypsin as analyzed by western blot (upper panel). Subsequent Endoglycosidase H (*Endo H*) digestion of A1ATD dhIPSC derived hepatocyte microsomal subcellular fraction (Z) or fraction from control patient hiPSC derived hepatocyte (M) confirms specificity of misfolded polymeric α_1 -antitrypsin retention within the endoplasmic reticulum to A1ATD patient line (Z) (lower panel). $n = 3$ (D) Increase in the expression of LDL receptor during hepatic differentiation (Day 0, 6, 8, 11, 13, 18) of FH-dhIPSCs as shown by Real-Time PCR analyses. (E) Western blot analysis for the expression of Low Density Lipoprotein receptor confirming relative absence of LDL receptor in FH-dhIPSC derived hepatocytes (FH) compared to non diseased hiPSC derived hepatocytes (control). (F) Real time PCR analyses showing the expression of G6P, IGFBP1 and PEPCK during hepatic differentiation of GSD-1a dhIPSCs (Day 0, 3, 10, 25).

Non-integrating lentivector mediated purification of embryonic stem cell-derived hepatic progenitors.

Parmi tous les protocoles publiés de génération de cellules hépatocyte-like à partir de cellules ES, des cellules non engagées dans la voie hépatique ou engagées dans une autre voie de différenciation subsistent. Ces cellules peuvent engendrer la formation de tératomes ou carcinomes *in vivo* après une transplantation. Il est donc nécessaire, pour une application clinique, de générer une population homogène de cellules hépatiques.

Le but de cette étude était de mettre en place une stratégie d'enrichissement en cellules hépatiques par tri cellulaire durant notre protocole de différenciation. Comme aucun marqueur de surface spécifique des cellules hépatiques ne permet, jusqu'à présent, de trier efficacement les progéniteurs hépatiques, nous avons utilisé des vecteurs lentiviraux contenant la séquence codant pour le gène eGFP sous le contrôle du promoteur d'un marqueur hépatique spécifique, l'apolipoprotéine A-II (APOA-II) construits au sein de notre laboratoire. Nous avons ensuite différencié les cellules ES transduites en cellules progénitrices hépatiques puis purifié la population hépatique par tri cellulaire. La purification a été, ensuite, réalisée avec un vecteur lentiviral non intégratif (porteur de la mutation de l'intégrase) afin d'éviter toute perturbation du génome.

Afin de tester la spécificité du promoteur contrôlant l'expression de l'eGFP, nous avons transduit différents types cellulaires à l'aide de nos vecteurs ApoA-II-eGFP en comparaison avec des vecteurs contenant l'eGFP sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire, l'EF1 α (elongation factor 1 α). Nous avons détecté l'expression de l'eGFP dans les différents types cellulaires lorsque le gène était sous le contrôle d'EF1 α . En revanche, la GFP n'était détectable que dans les cellules hépatiques HuH7 lorsqu'il était contrôlé par ApoA-II.

Pour définir les conditions de transduction, nous avons transduit des cellules ES H9 et nous avons montré que les cellules transduites conservaient leur morphologie et un caryotype normal.

Les cellules transduites ont alors été différenciées en progéniteurs hépatiques exprimant des marqueurs spécifiques comme l'AFP, HNF4 α , CK19, EpCAM et l'E-cadhérine selon le protocole établi au sein de notre laboratoire. L'expression de l'eGFP est apparue progressivement au cours de la différenciation avec 3% de cellules positives au huitième jour de différenciation (stade de spécification hépatique) et 37% au seizième jour de différenciation.

Les cellules hépatiques préalablement transduites par le vecteur lentiviral ApoA-II-eGFP ont alors été triées par cytométrie de flux au seizième jour de différenciation permettant ainsi d'obtenir une population de cellules dont 99% exprimaient l'eGFP. Après quarante-huit heures de culture sur collagène I, les cellules exprimaient l'AFP et CK19 et avaient une morphologie typique des progéniteurs hépatiques.

Dans un second temps, la purification a été mise au point à l'aide d'un vecteur non-intégratif afin de ne pas perturber l'intégrité du génome. Le vecteur, produit par Vectalys, est un vecteur lentiviral pour lequel l'intégrase est mutée (D64V dans le site catalytique). Les cellules ont été transduites au treizième jour de différenciation à l'aide d'un vecteur non-intégratif EF1 α -eGFP et environ 60% d'entre elles exprimaient l'eGFP trois jours plus tard, ce nombre diminuant par la suite à 1% après dix jours.

Comme il a été montré que les vecteurs non intégratifs pouvaient avoir une activité résiduelle d'intégration, nous avons comparé l'expression de l'eGFP chez des cellules transduites avec des vecteurs intégratifs ou non et en présence ou non d'un inhibiteur de l'intégrase. Si le pourcentage de cellules exprimant l'eGFP était maximum trois jours après transduction, cette population restait élevée après quatorze jours avec le vecteur intégratif et diminuait fortement avec le vecteur non-intégratif. L'addition de l'inhibiteur de l'intégrase réduit le nombre de cellules exprimant l'eGFP aussi bien avec le vecteur non-intégratif qu'avec le vecteur intégratif. Nous avons également montré par PCR quantitative que le nombre de copies d'eGFP dans le génome de cellules transduites à l'aide d'un vecteur non intégratif correspondait à du bruit de fond.

Tout comme avec le vecteur intégratif, environ 40% de cellules différenciées exprimaient l'eGFP avec le vecteur non-intégratif ApoA-II-eGFP au seizième jour de différenciation. Deux jours après le tri cellulaire, les cellules exprimant l'eGFP remises en culture exprimaient l'AFP et CK19 confirmant ainsi qu'il s'agissait de progéniteurs hépatiques.

Dans cette étude, nous avons défini les conditions de purification de la population de progéniteurs hépatiques obtenue avec notre protocole de différenciation aussi bien avec des vecteurs intégratifs que non-intégratifs. Cette approche, combinant vecteur non intégratif et inhibiteur d'intégrase, pourrait être utilisée à terme dans le cadre d'une application clinique.

Non-integrating lentivector mediated purification of embryonic stem cell-derived hepatic progenitors.

Guanghua Yang^{*1,2}, Karim Si-Tayeb^{*1,2}, Sébastien Corbineau^{1,2}, Thomas Touboul^{1,2},
Remi Vernet¹, Clémence Martinet^{1,2}, Régis Gayon⁴, Denis Clay^{1,3}, Sylvie Mainot^{1,2},
Cécile Bas⁵, Gérard Tachdjian⁵, Ludovic Vallier⁶, Pascale Bouillé⁴,
Anne Dubart-Kupperschmitt^{1,2}, Anne Weber^{1,2}

¹ INSERM U 972, IFR 93, Bicêtre Hospital, Kremlin-Bicêtre, F-94270 ;

² Univ Paris-Sud, Orsay, F-91405 ;

³ IFR , Paul Brousse hospital, Villejuif, F-94

⁴ Vectalys, Labège, France

⁵ Department of Cytogenetics, Bécclère Hospital, Clamart, F-92141

⁶ Department of Surgery, The Anne McLaren Laboratory for Regenerative Medicine.
Cambridge, CB2 0SZ, UK

We report the purification of hepatic progenitors differentiated from human embryonic stem cells by cell sorting using integrating and Integrase Defective lentivectors (IDLV) encoding eGFP driven by a human hepatic specific promoter, Apolipoprotein A-II. After sorting, 89% of GFP-positive cells expressed CK19 hepatoblast marker. Furthermore when transduction was performed in the presence of Raltegravir, an inhibitor of HIV integrase, >99% cells were devoid of vector DNA integration with both vectors. This approach is of potential use for therapeutic applications.

Hepatocyte transplantation has become an alternative to liver transplantation for the treatment of liver diseases. However, this approach is limited by shortage of reproducible sources of hepatocytes¹. An ideal source of cells would be stem cells that could be isolated, expanded as clonal population in sufficient number and differentiated in vitro. Amongst human pluripotent stem cells, which display unlimited self-renewal capacities, human embryonic stem cells (hESCs) still appear as the most reliable potential source of hepatocytes.

Others and we have already generated hepatocyte-like cells from hESCs under using animal free conditions and/or recapitulating liver developmental stages yielding various percentages of differentiated cells²⁻⁴. However the presence of cells of undesired phenotype could be potentially harmful in a context of cell transplantation⁵. Hence, for clinical applications, it will be essential to transplant highly enriched cells generated by a simple and reproducible procedure. To date, although purified epithelial cell adhesion molecule EpCam⁺ cells from fetal and postnatal livers are able to give rise to mature hepatocytes⁶, this marker is expressed in visceral endoderm, in several progenitor cell populations and cancer⁷ and is associated with

the maintenance of the undifferentiated phenotype of human embryonic stem cells⁸. Indeed, no specific cell surface marker of hepatic progenitor has been identified yet to be readily available to sort easily, efficiently and safely differentiated hepatic progenitors.

To overcome this issue, we developed a strategy to enrich hepatic precursors by adding a cell-sorting step to our differentiation protocol and we designed specific lentiviral vectors expressing the eGFP under the control of a human hepatic specific Apolipoprotein A-II (APOA-II) (**Fig1a**).

To test the specificity of the promoter, various cell lines including Hela cells, A549, MCF7, HuH7 were transduced with the lentivector containing APOA-II-GFP construct. Comparing with the ubiquitous promoter EF1 α , which was expressed in every cell lines, APOA-II promoter induced high level of eGFP expression only into the hepatic cell line HuH7 (**Fig1c**). The same results were obtained with human primary mesenchymal stem cells in which eGFP was not detected (**Fig1b**), confirming the specificity of the promoter.

In order to set up transduction conditions, hES cells H9 were transduced at different MOI with EF1 α -eGFP lentivirus. Up to 60% of cells were transduced at MOI 10 and 20 (**Suppl Fig1a**) and transduced cells retained pluripotency (**Suppl Fig1b**). Following transduction with APOA-II-eGFP vectors at MOI 10, H9 cell colonies displayed normal hES cells morphology and karyotype (**Suppl Fig1c, d**) and as expected did not express eGFP (Data not shown).

Transduced cells were then differentiated into hepatic progenitors as previously reported⁴ Hepatic differentiation was confirmed by expression of hepatic stem/progenitor markers, such as AFP, HNF4 α , CK19 and EpCAM (**Suppl Fig2a, b**).

We next investigated the time course of expression of eGFP under the control of APOA-II promoter along the different steps of transduced cell differentiation. While early markers of differentiation such as SOX17 and HNF4a were detected (**Fig1d**), less than 3% of cells were found to express eGFP, reflecting a low activity of APOA-II promoter at this stage (**Fig1e**). Once differentiated cells reached the stage of hepatic progenitors, visualized by the expression of AFP (**Fig1e**) and CK19 (**Suppl Fig2b**), up to 37% of cells exhibited eGFP expression (**Fig1e**). Altogether, these data suggest that our construct is specific of hepatic progenitors upon differentiation and is suitable for a cell sorting strategy.

ApoA-II-eGFP transduced cells were sorted at day 16 of differentiation resulting in a highly enriched cell population as 99% of cells expressed eGFP (**Fig1f**). Once sorted, eGFP positive cells were plated on type I collagen coated plates and kept in culture. After a forty-eight hours recovery period, cells were homogeneously distributed, showed a typical hepatic progenitor morphology (**Fig1g**) and co-expressed CK19 and AFP (**Fig1h**).

Then, we sought to develop a cell purification strategy that would not disturb the genome integrity and would prevent its permanent modification. Integrase-defective lentiviral vectors (IDLVs) can be produced by the use of integrase mutation that specifically prevents proviral integration⁹. Transduction with IDVLs results in the generation of increased levels of circular vector episomes in transduced cells and transgene is expressed from these nonintegrated proviral forms which are progressively lost in proliferating cells leading to transient gene expression. For this purpose, the same EF1 α -eGFP and APOA-II-eGFP vectors were produced as a non-integrating form using a GAG/POL packaging plasmid encoding a mutated integrase. It has been shown that the D64V mutation in the integrase catalytic site substantially

decrease integration (up to a thousand fold) without compromising other steps in the transduction pathway¹⁰.

To set up the transduction protocol, H9 cells were transduced with EF1a-eGFP-IDLV at different time point, D8 (not shown), D10 (not shown) and D13 of the differentiation process and kinetic of eGFP expression was monitored from 3 to 7 days after transduction. In the 3 transduction time points assessed, the percentage of eGFP-positive cells reached a maximum three days after transduction and **Fig2a** shows that 50 to 60% of the cells expressed eGFP at MOI 10 and 30 respectively when transduced at day 13 of differentiation. The number of positive cells decreased thereafter. Thus, for all following experiments, MOI 30 was used and cells were sorted three days post-transduction, corresponding to day 16 of differentiation (**Fig2e**).

Despite the integrase mutation, it has shown that IDLV display a residual ability to integrate genomic DNA¹¹. Hence, we transduced cells differentiated for 13 days with ILV and IDLV EF1 α -eGFP and cells were detached 3 days later and re-plated to mimic sorting. As expected, 3, 10 and 14 days after transduction the proportion of eGFP-ILV positive cells remained stable (about 50%). The proportion of eGFP-IDLV cells was equivalent 3 days after transduction, due to 1 and 2 LTR circles, but it decreased to approximately 1% at day 14. To prevent IDLV potential residual integration, transduction was performed in the presence of Raltegravir, a clinically used integrase inhibitor of HIV infection¹². While percentages of eGFP cells were not modified at three days post-transduction due to non-integrated 1 and 2 LTR circle forms, we observed that 10 and 14 days after transduction the proportion of IDLV transduced eGFP-positive cells had further decreased to 1.1% and 0.6% respectively with Raltegravir at a dose 10 fold in excess of that required to inhibit 95% of viral

infection (**10**) (**Fig2b**). Interestingly, addition of Raltegravir was efficiently affecting the percentage of eGFP-positive cells after transduction with ILV resulting in 8.4% and 1% at 10 and 14 days after transduction respectively. In addition, not only qPCR analysis showed a reduction of lentiral vector copy number with time, close to background level, as recently reported with mouse hepatocytes¹², but the use of Raltegravir abolished vector integration. Furthermore the use of raltegravir together with ILV resulted also in a dramatic reduction vector copy number (**Fig2c**). Southern blot analysis performed to analyze the fate of non-integrated forms showed that both one- and two-LTR circle forms detected four days after transduction had almost disappeared 10 days after transduction in agreement with the decrease in the proportion of eGFP-expressing cells (**Fig2d**).

The final protocol for cell sorting is depicted in **Fig2e**. As reported with APOA-II-eGFP-ILV (**Fig1e**), about 39% of differentiated cells were positive for APOA-II-eGFP-IDLV at the time of the sorting (**Fig2f**). After a two-days culture period, RT-Q-PCR on non-sorted and sorted cells showed enrichment in CK19 expression (**Fig2g**). EGFP-sorted cells were also found to co-express CK19 and AFP confirming their hepatic progenitors phenotype (**Fig2i**).

One challenge of hES cells research remains the generation of enriched/purified differentiated cell population that could be available for clinical application. Our approach generated an enriched population of hepatic progenitors using a human hepatic-specific promoter in an integrating lentiviral construct. In addition we show that IDLVs can be efficiently used to generate the progenitor population and that the use of a specific integrase inhibitor totally abolish residual integration. Finally we demonstrate once transduced with the hepatic specific APOA-II-eGFP IDLV, sorted cells can be re-platted on type I Collagen and re-acquire expression of hepatic

progenitors such as CK19 and AFP. Our approach may be useful to analyze the genetic program regulating the differentiation of the bipotential hepatoblastes into either cholangiocytes or hepatocytes but also for therapeutic applications.

Acknowledgments

We thank Dr Wenwei Chen and Pr Richard Benarous for helpful advice.

Figure Legends

Figure 1: Enrichment in hepatic progenitors from the differentiating cell population after transduction of undifferentiated hES cells with APOA-II-eGFP lentiviral vectors.

a. Schematic representation of the APOA-II-eGFP lentiviral vector. Design and construction of the vector has been already described in¹³.

b, c Evaluation of APOA-II promoter specificity. Primary MSC cells as well as **b.** Fluorescence microscopy pictures showing that, while eGFP expression was observed after transduction of MSC with EF1 α -EGFP ILV, it remains undetectable after transduction with APOA-II-eGFP. **c.** Different cell lines (A549, a human alveolar epithelial cell line; HeLa, human cervical epithelial tumor cells; MCF7 a breast cancer epithelial cell line; HuH7 a human hepatoma cell line) were transduced with a control EF1 α -eGFP or with the APOA-II-eGFP lentivectors and analyzed by flow cytometry. While only residual eGFP expression was found in non-hepatic cell lines when driven by APOA-II promoter, eGFP expression driven by APOA-II or EF1 α promoter was equivalent in HuH7 hepatic cells.

d. Time-course analysis of expression of cell markers illustrating the expression of genes characteristic of hES cells (OCT4), Endoderm (Day 3; Sox17), hepatic endoderm (Day 8; HNF4 α) and hepatic progenitors (D14; AFP).

e. FACS analysis monitoring time course of eGFP expression after transduction of hES cells with APOA-II-eGFP ILV. At day 8 of differentiation, 2% of cells expressed eGFP whereas more than 30% of cells expressed eGFP at day 16 of differentiation.

- f.** FACS analysis of the cell population at day 16 of differentiation, before and after sorting of the eGFP-positive cell population.
- g.** A phase contrast image of sorted hES cell-derived hepatic progenitors showing their morphology 48 hours after plating. (magnification x4 and X10).
- h.** Immunofluorescence staining of representative fields of sorted hepatic progenitors showing the co-expression of AFP and CK19.

Figure 2: Integrase-Defective Lentiviral Vector mediated purification of hES cells-derived hepatic progenitors by cell sorting.

- a.** H9 cells were transduced with EF1 α -eGFP IDLV at MOI 10 and 30 at 13 days of differentiation. Transduction efficiency was evaluated by FACS analysis 3, 4, 5 and 7 days post transduction.
- b, c.** HIV-1 integrase inhibitor test showing inhibition effect on the integration function on both ILV and IDLV. **b.** Cells were transduced at day 13 of differentiation with EF1 α -eGFP ILV or IDLV in absence or presence of Raltegravir. The loss of eGFP expression was evaluated by FACS analysis 3, 10 and 14 days post transduction.
- c.** Relative copy number of integrated lentiviral vectors was determined 4 and 10 days post transduction with IDLV and 4 days post transduction with ILV (NT: Not Transduced).
- d.** Southern blot analysis showed the presence of 1 and 2 LTR circle form 3 days post transduction, which are diluted after cell proliferation 10 days post transduction.
- e.** Hepatic progenitor purification protocol.

- f.** Differentiated cells were transduced at day 13 of differentiation with APOA-II-eGFP IDLV and showed about 39% of eGFP positive cells prior cell sorting 3 days after transduction.
- g.** Q-PCR analysis of CK19 expression illustrating that hepatic cell population was enriched after FACS sorting.
- h.** A phase contrast image of hES-derived hepatic progenitors plated on type I Collagen and cultured 48hrs after sorting (magnification x10).
- i.** Immunocytochemistry analysis of expression of hepatic progenitor cell markers (AFP/CK19) after 48h-culture on type 1 collagen showing that sorted cells were hepatic progenitors.

Supplementary Figure 1: Characterization of H9 cells after transduction with EF1 α -eGFP integrating lentiviral vector.

- a.** Transduction efficiency of H9 cells at different MOI. EGFP positive cells were quantified by FACS analysis at day 5 after transduction. (Mean $\pm$ standard error).
- b.** Fluorescence micrographs of representative colonies of EF1 α -eGFP transduced ES cells cultured on MEF feeders showing eGFP and hES cell markers expression such as: OCT4, NANOG and SSEA-4.
- c.** Phase-contrast image of a representative H9 cell colony cultured on MEF feeders and transduced with APOA-II-GFP lentivector.
- d.** H9 cells transduced with APOA-II-eGFP lentivector display a normal karyotype.

Supplementary Figure 2: Characterization of hES-derived hepatic progenitors cultured on feeder-free conditions at day 15 of differentiation.

a. RT-PCR analysis of hepatic cell markers (Fibrinogen β , HNF4 α , AFP, APOA-II), and of a proliferation marker FoxM1B; hESC: human embryonic stem cells), D8, D16: differentiated cells at D8 and D16.

b. Upper panel: A phase-contrast image, showing the hepatic cell population generated. **Lower panel:** Fluorescence micrographs showing the expression of human CK19 (left) and EpCAM (right).

Supplementary Figure 3

a. Genetic map of 1- and 2-LTR circle forms.

b. Map of the probe used for the southern blot experiment.

Figure 1

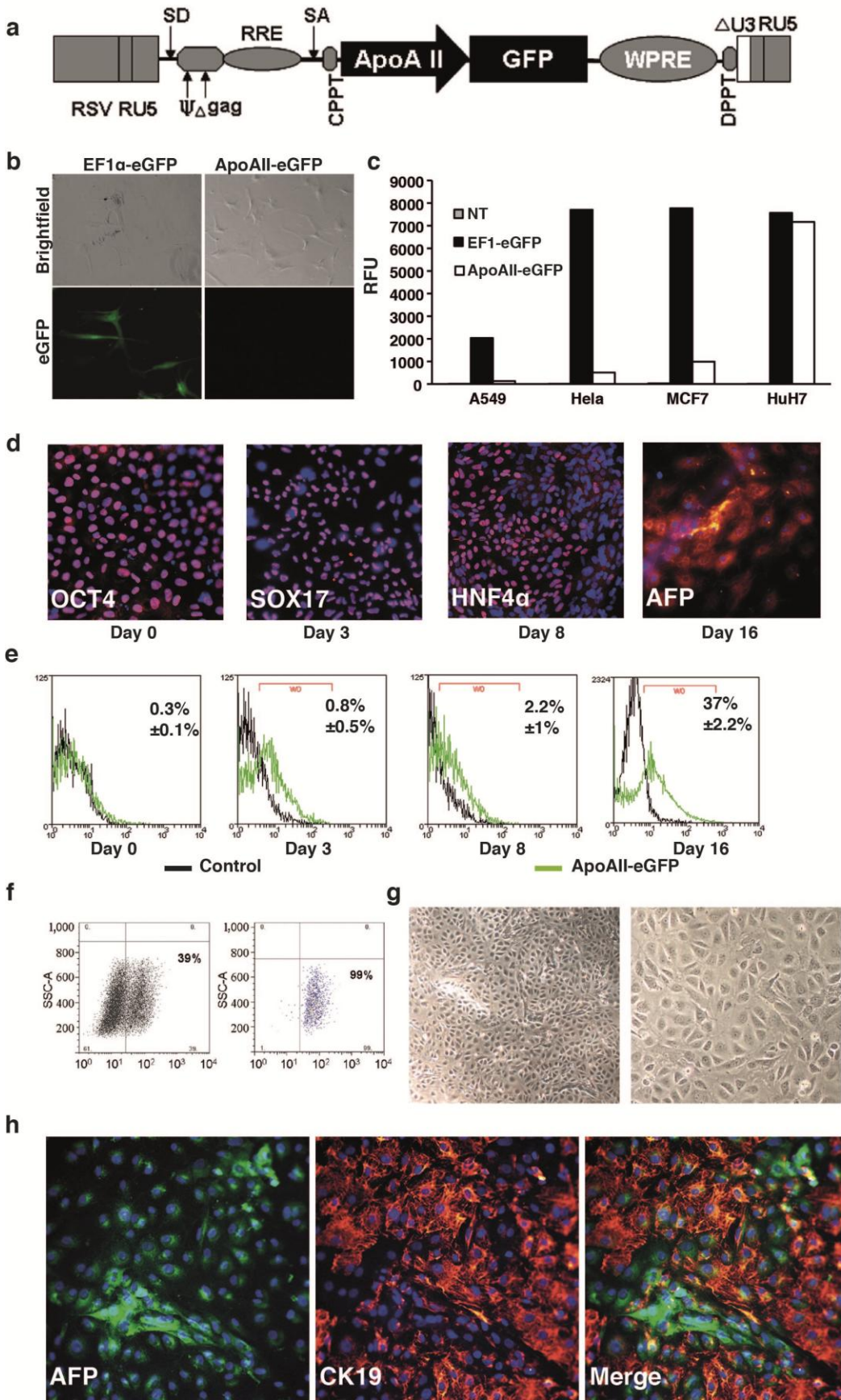
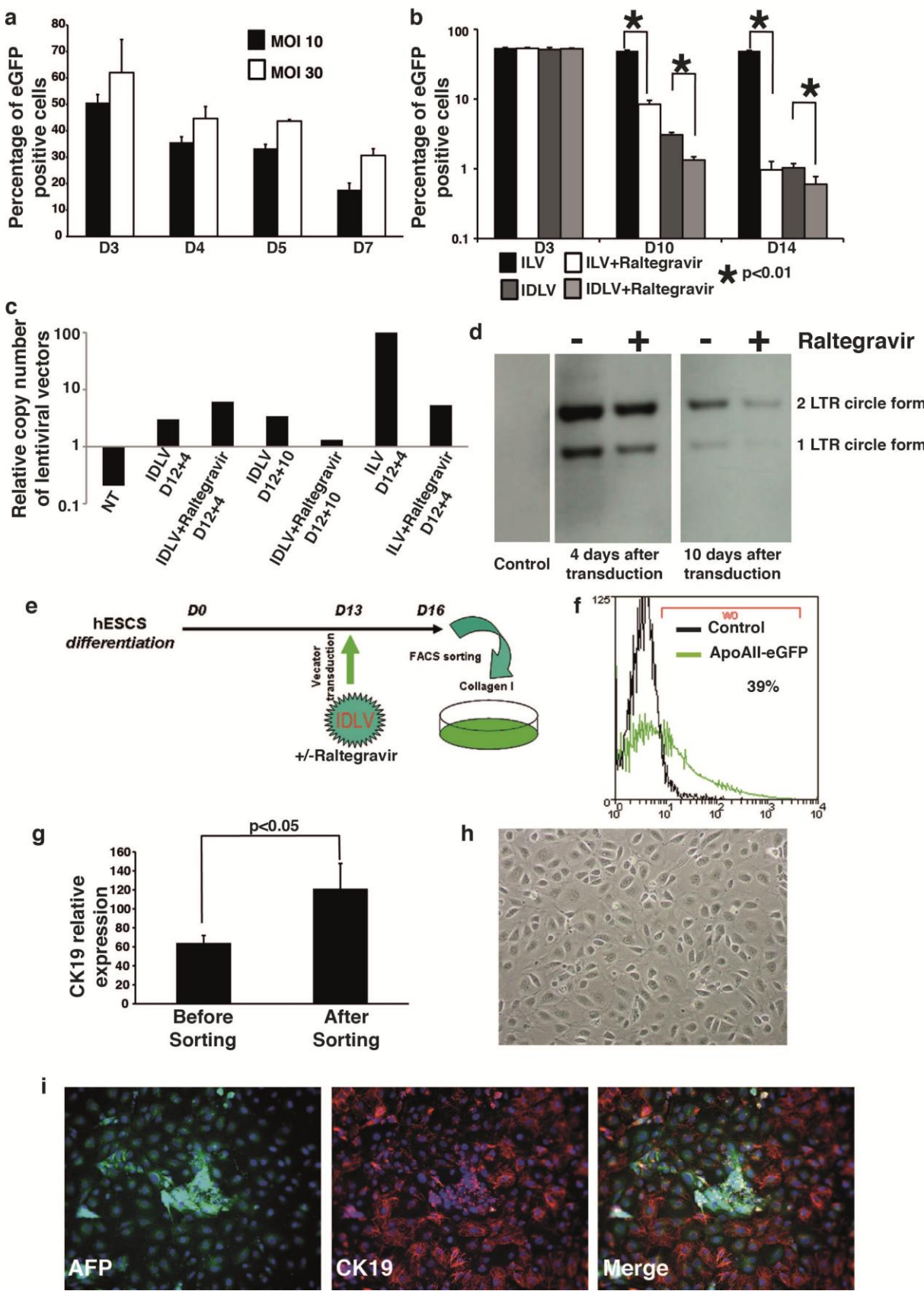
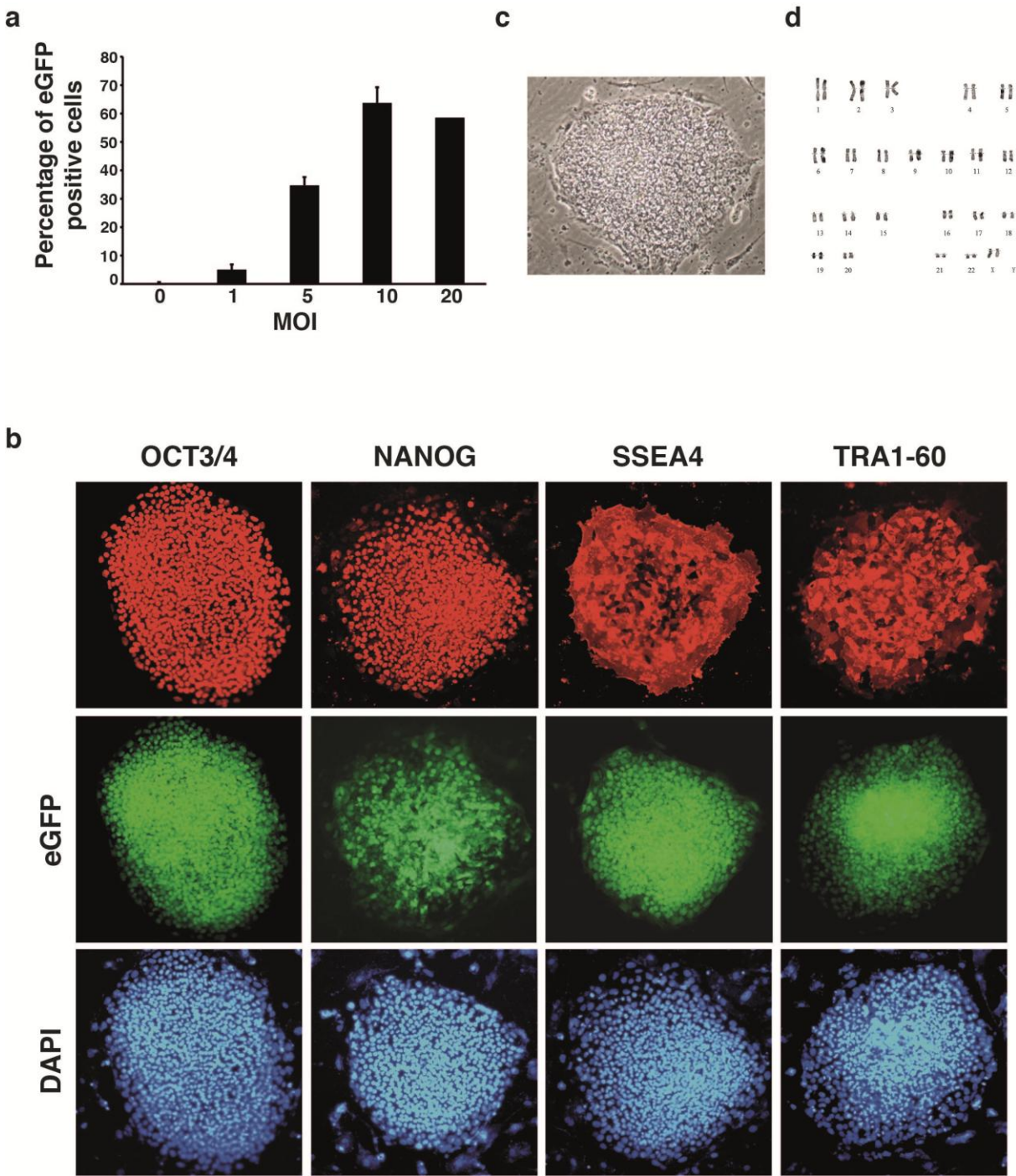


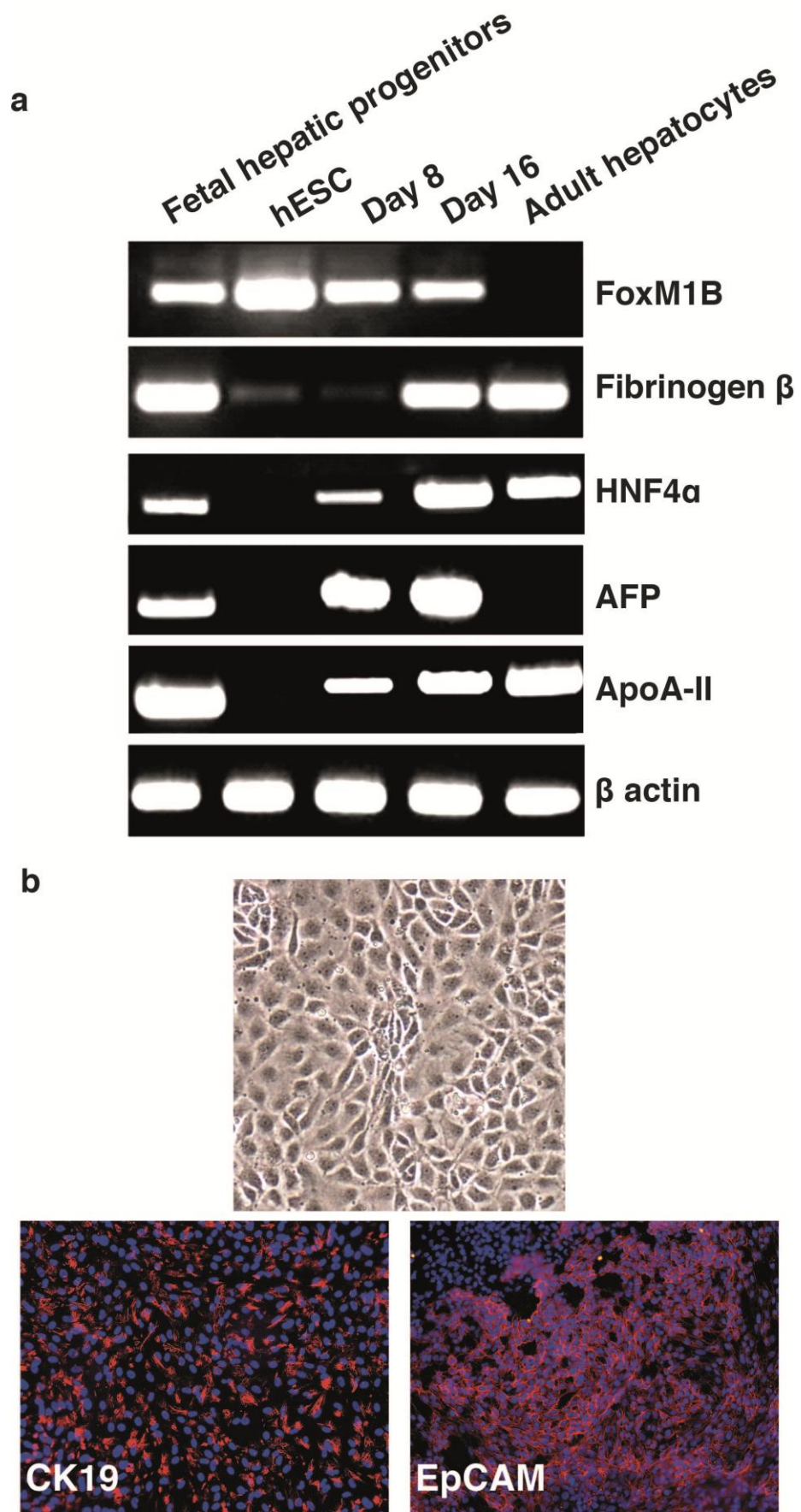
Figure 2



Supplementary figure 1

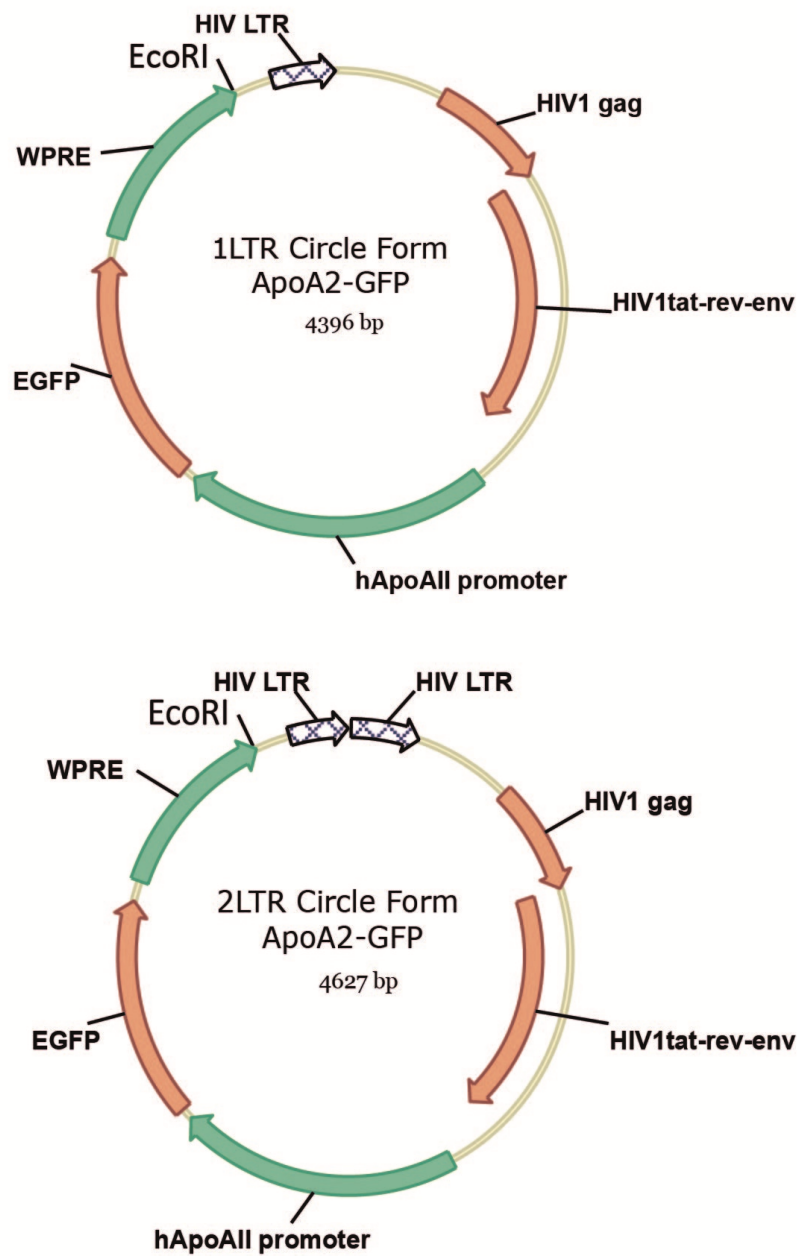


Supplementary figure 2



Supplementary figure 3

a



b



Material and methods

Cell culture

Human embryonic stem cell line H9 (WA09, WiCell, Madison, WI) were cultured on mouse embryonic fibroblasts mitotically inactivated with Mitomycin C (MEFs). Human ES cells culture medium was composed of standard DMEM/F12 supplemented with 20% Knockout serum replacement (GIBCO), 4 ng/ml human recombinant basic fibroblast growth factor (bFGF, R&D Systems), 0.1 mM β -mercaptoethanol, 1mM L-glutamine, and 1% non-essential amino acids. Fetal livers were obtained after termination of pregnancy at 11 to 13 weeks of gestation, with the informed consent of mothers as recommended by the French Ethics Committee and the local Ethics Committee of Paris XI University (Paris, France). Human hepatoblasts were then isolated and cultured as described previously¹³. Primary human adult hepatocytes were isolated from normal liver tissue biopsies obtained during resections (partial hepatectomies) for hepatic or metastatic tumors, after informed patient consent. Primary human adult hepatocytes were obtained and cultured as described previously¹⁴. Mesenchymal Stem Cells, HeLa cells and HuH7 cells are seeded in 6-wells microplate (Corning CellBind 6well-microplate) in DMEM (PAA) supplemented by FBS 10% and cultured at 37°C / 5% CO₂ for 24h. Transduction is performed overnight at MOI 40 for MSC and HeLa cells, and 30 for HuH7 cells, in presence of polybrene 8 μ g/ml overnight. Supernatant is replaced with fresh culture medium.

A549 cells are seeded in 6-wells microplate (Corning CellBind 6well-microplate) in HamF12 (PAA) supplemented by FBS 10% and cultured at 37°C / 5% CO₂ for 24h. Transduction is performed overnight at M.O.I. 40 in presence of polybrene 8 μ g/ml. Supernatant is replaced with fresh culture medium.

MCF7 cells were seeded in 6-wells microplate (Corning CellBind 6well-microplate) in MEM (PAA) supplemented by FBS 10% + Bovine Insulin 0,01 mg/mL (SIGMA-ALDRICH) and cultured at 37°C / 5% CO₂ for 24h. Transduction was performed overnight at M.O.I. 80 in presence of polybrene 8 µg/ml. Supernatant was replaced with fresh culture medium.

One week post-transduction, eGFP expression was analyzed by flow cytometry or fluorescence microscopy.

Lentivirus production and transduction of human embryonic stem cells.

The EF1α-GFP lentiviral vector was designed and produced by Vectalys (Toulouse, France). The APOA-II-eGFP lentiviral vector previously designed¹³ was produced by Vectalys. All vectors were produced by tri-transfection into 293T cells by using standard calcium phosphate procedures. 24 hours after transfection¹⁵, cells were washed and viral supernatants collected 24 hours later and filtered. Lentivirus production step was followed by a concentration step by ultrafiltration.

Prior transduction, hES cells were manually dissociated and were incubated as clumps with viral particles for 2 hours at 37°C in low-attachment 24-well plate (Corning Life Sciences) under gentle rocking before seeding onto MEFs in hES cells medium. Undifferentiated transduced cells were expanded and differentiated using a chemically defined medium (CDM)¹⁵ which is devoid of serum and is supplemented with insulin, transferin and defined lipids to which was added Polyvinyl Alcohol (PVA) as a substitute for bovine serum albumin.

Differentiation of hES into hepatic progenitor cells.

Cells were manually dissected and plated onto 0.1% gelatin-coated culture dishes (Costar, Corning Life Sciences, Acton, MA) for amplification. Hepatic progenitor differentiation of hES cells was conducted as previously described⁴

Transduction of hES-derived hepatic progenitors with integrase-defective lentiviral vectors.

At day 13 of differentiation, after one wash with PBS, culture medium was replaced with fresh CDM supplemented with HGF(50ng/ml), EGF(50ng/ml), FGF4(30ng/ml) and hydrocortisone(10^{-6} M). Integrase-defective lentivirus was added at MOI 30 for 24h and then removed. Cell culture was performed for two additional days and medium was changed daily. The HIV integrase inhibitor Raltegravir was added with the culture medium the day of the transduction at a concentration of 1 μ M and kept for 24h.

Cell preparation for FACS sorting and plating.

Per 60mm dish, differentiated cells were washed with PBS and incubated 5min at 37°C with 2ml of a cell dissociation buffer (EDTA 0.01mg/ml; BSA 0.05mg/ml in PBS without Ca^{2+} / Mg^{2+}). Dissociated cells were suspended in 5ml of plating medium (DMEM/F12, 20% human serum (PAA, France), and centrifuged 5mn at 1200rpm. The cell pellet was finally suspended in plating medium (DMEM/F12, 20% human serum 1mM L-glutamine, 100 μ l/ml antibiotics) supplemented with HGF (50ng/ml) at a density of $3 \cdot 10^6$ cells/ml for FACS sorting. Cells positive for eGFP were plated on Type I Collagen -coated plate (BD Bioscience) at a density of $2 \cdot 10^5$ cells per well of a 24 well plate. Four hours after plating, medium was changed for culture medium

previously described¹³ (supplemented with HGF (50ng/ml), EGF (50ng/ml) and FGF4 (30ng/ml) and cells were cultured two more days before analyses.

Reverse transcription PCR (RT-PCR), PCR and Real-time Quantitative PCR (QPCR)

Total RNAs were extracted from hES cells, differentiated hepatic progenitors, human fetal and adult hepatocytes, with the RNeasy Mini Kit (Qiagen), following the manufacturer's protocol. For each sample, 0.6µg of total RNA was reverse-transcribed using Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Amplification by PCR was performed with the PCR Nucleotide Mix kit (Promega). Primers used and amplicons' size are described in supplementary Table 1a.

Real-time PCR reaction mixtures were prepared the SensiMiX kit (BIOLINE) following the manufacturer's instructions, then denatured at 95°C for 10 minutes, cycled at 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, followed by a final extension at 72°C for 10 minutes after completion of 40 cycles. Real-time PCR reactions were performed using an Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System in triplicate and normalized to Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (hPRT) in the same run. Quantitative PCR data are presented as the mean of 3 independent experiments; error bars indicate SEM. Primers used for Real Time PCR analyses are shown in **Table 1**.

Southern blot

Southern blot hybridization was carried out with DIG system (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) by following the manufacturer's protocol. Briefly, 5µg of genomic DNA from every samples were digested with *EcoRI* (New England BioLabs), and screened on 1% agarose gel. Gels were blotted on Hybond-N+ membrane (Millipore)

overnight in 20X SSC buffer (Sigma). As a probe, 1.3kbp long PCR (eGFP-WPRE) fragments (**Supplementary Fig3b**) were labeled with DIG-11-dUTP using the PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche), and hybridized to the membrane at 42°C overnight in the DIG Easy Hyb solution (Roche). Detection was performed using the DIG Detection System (Roche). DIG labeled probe was detected with Anti-Digoxigenin-AP Fab fragment (Roche) and visualized with CSPD (Roche).

Copy number evaluation

Copy number of lentiviral vector was determined by quantitative PCR analysis. QPCR was performed with 150ng of total DNA, SYBR Greener (Invitrogen), specific primers matching the WPRE sequence and Albumin as house-keeping gene in a final volume of 20µL using the Step One Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems).

Copy number was calculated by reporting Ct values of every samples on a standard plasmid curve. All qPCR reactions were performed in duplicate.

Immunocytochemistry

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 minutes at room temperature and then washed with NH₄Cl 50 mM in PBS, 10 min and permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 4 min. Cells were blocked after incubation with PBS containing 3% serum for 1 hour. Primary antibodies were diluted in PBS with 4% BSA (See Table 2 for the corresponding dilution) and used for a 2 hour-incubation at room temperature. Cells were then washed with PBS and incubated with secondary antibodies diluted in PBS with 4% BSA (See table 2 for corresponding dilution) during 1 hour at room temperature. Cell nuclei were stained with DAPI and cells were mounted with Vectashield mounting medium (Vector Laboratories). Fluorescence micrographs were taken by AxioVision Rel. 4.8 microscope software.

Table 1 (primers)

A RT-PCR Primers

gene	primer sequence	Annealing temperature	Amplification size
<i>FoxM1B</i>	F:GGGCGCACGGCGGAAGATGAA R:CCACTCTTCCAAGGGAGGGCTC	55 ⁰ C	492bp
<i>Fibrinogen β</i>	F:CAAGGTGTCAACGACAATGAGGAG R:CAGGTCTGGGTCAGCGTGAAGAGA	55 ⁰ C	315bp
<i>HNF4α</i>	F:CTGCTCGGAGCCACCAAGAGATCCATG R:ATCATCTGCCACGTGATGCTCTGCA	55 ⁰ C	370bp
<i>AFP</i>	F:AGAACCTGTCACAAGCTGTG R:GACAGCAAGCTGAGGATGTC	55 ⁰ C	675bp
<i>ApoA-II</i>	F:GGAGAAGGTCAAGAGCCCGAG R:AGCAAAGAGTGGGTAGGGACAG	55 ⁰ C	246bp
<i>B-actin</i>	F:TCACCACCACGGCCGAGCG R:TCTCCTTCTGCATCCTGTCTG	58 ⁰ C	350bp

B Q-PCR Primers

gene	primer sequence
<i>CK19</i>	F:TGAGTGACATGCGAAGCCAATAT R:GCGACCTCCCGGTTCAAT
<i>hPRT</i>	F:TAATGGTGGAGATGATCTCTCAAC R:TGCCTGACCAAGGAAAGC

Table 2

Primary antibody	Company	Reference number	Dilution
EpCam	Abcys	abc171	1:20
CK19	DAKO	M0888	1:50
AFP	DAKO	N1501	1:300
HNF4 α	Santa Cruz	SC-8987	1:100
E-Cadherin	DAKO	M3612	1:100
SOX17	R&D	MAB1924	1:100
OCT4	Santa Cruz	SC-5279	1:200
NANOG	R&D	AF1997	1:100
SSEA 4	Abcys	VMA 4304	1:100
TRA 1-60	Millipore	MAB4360	1:100

Secondary antibody	Company	Reference number	Dilution
Goat anti mouse	Molecular Probes	A21123	1:800
Chicken anti goat	invitrogen	A21467	1:800
Goat anti rabbit	Molecular Probes	A11010	1:800

1. Dhawan, A., Puppi, J., Hughes, R.D. & Mitry, R.R. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **7**, 288-298.
2. Hay, D.C. et al. *Stem Cells* **26**, 894-902 (2008).
3. Si-Tayeb, K. et al. *Hepatology* **51**, 297-305.
4. Touboul, T. et al. *Hepatology* **51**, 1754-1765.
5. Basma, H. et al. *Gastroenterology* **136**, 990-999 (2009).
6. Schmelzer, E. et al. *J Exp Med* **204**, 1973-1987 (2007).
7. Yamashita, T. et al. *Gastroenterology* **136**, 1012-1024 (2009).
8. Lu, T.Y. et al. *J Biol Chem* **285**, 8719-8732.
9. Yanez-Munoz, R.J. et al. *Nat Med* **12**, 348-353 (2006).
10. Koh, Y., Matreyek, K.A. & Engelman, A. *J Virol* **85**, 3677-3682.
11. Wanisch, K. & Yanez-Munoz, R.J. *Mol Ther* **17**, 1316-1332 (2009).
12. Matrai, J. et al. *Hepatology* **53**, 1696-1707.
13. Parouchev, A. et al. *J Hepatol* **45**, 99-107 (2006).
14. Allain, J.E. et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3639-3644 (2002).
15. Sena-Esteves, M., Tebbets, J.C., Steffens, S., Crombleholme, T. & Flake, A.W. *J Virol Methods* **122**, 131-139 (2004).

Génération de progéniteurs hépatiques dérivés de cellules iPS de primate non-humain

La génération de cellules ES et surtout iPS simienne ainsi que leur différenciation en progéniteurs hépatiques offre la possibilité de développer des modèles précliniques de transplantation chez un animal très proche de l'homme. Les données ainsi obtenues dans ce modèle étant plus fiables que celles obtenues dans le modèle murin concernant la transplantation, ce projet permettra d'aborder toutes ces questions et de fournir des connaissances importantes dans le domaine des iPSCs, de la thérapie génique corrective et de la technologie de transplantation de cellules.

1- Génération de cellules iPS simiennes

Des biopsies de peau ont, tout d'abord, été réalisées au Centre Boisbonne à Nantes, sur des primates non-humains (*macaca fascicularis*) appartenant au laboratoire du Docteur T. Nguyen (Inserm U948). Néanmoins, les fibroblastes obtenus proliféraient faiblement entraînant une trop faible efficacité de transduction, lors de nos essais de reprogrammation, pour générer des iPSCs.

Nous avons alors réalisé des biopsies de peau sur trois singes achetés par le laboratoire grâce à un financement AFM. Nous avons, ensuite, isolé, amplifié et réalisé des stocks de fibroblastes congelés de ces trois singes.

a) Vecteurs rétroviraux contenant les facteurs de reprogrammation humains

Après amplification et congélation des fibroblastes simiens, nous avons défini les conditions de transduction de ces derniers (pour la transduction nécessaire à la reprogrammation) en utilisant un vecteur rétroviral dérivé de Moloney contenant la séquence codant pour le gène de l'eGFP (production par Vectalys, Toulouse). La transduction la plus efficace a été réalisée à MOI 30 (Multiplicity Of Infection) durant deux heures à 37°C à deux reprises.

Nous avons ensuite utilisé ces conditions afin de reprogrammer les fibroblastes simiens à l'aide de vecteurs rétroviraux dérivés de Moloney contenant la séquence codant pour l'un des quatre gènes de reprogrammation humains (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) précédemment utilisés pour la génération d'iPSCs humaines et murines au sein du laboratoire (production par Vectalys, Toulouse). Nous avons, tout d'abord, transduit 400 000 cellules et nous les avons transférées, quatre jours plus tard, dans des boîtes de 10cm de diamètre. Sept jours après transduction, le milieu de culture de MEF (80% DMEM + 20% SVF) a été remplacé par du milieu de culture de cellules ES simiennes (65% Advanced DMEM + 15% F12 + 20% SVF) contenant 4ng/mL de FGF2. Le milieu a alors été changé tous les jours jusqu'à l'apparition de colonies de cellules iPS. Néanmoins, dix-neuf jours post-transduction, les cellules se sont détachées sans qu'aucun signe de reprogrammation n'ait pu être constaté. Nous avons alors renouvelé l'expérience en réduisant le nombre de fibroblastes à 150 000 ou 100 000 cellules dans l'espoir d'éviter le détachement des cellules. Respectivement vingt et trente jours après transduction, les cellules se sont détachées sans aucun signe de reprogrammation même lorsque la MOI a été augmentée de 30 à 50 unités de transduction par cellule. Enfin, 100 000 fibroblastes ont été transduits à MOI50 à l'aide d'un nouveau lot de vecteurs rétroviraux contenant les séquences codant pour les facteurs de transcription humains mais aucune colonie d'iPSCs n'a été constatée.

b) Vecteurs rétroviraux contenant les facteurs de reprogrammation simiens

En raison de ces difficultés, nous avons décidé de changer de vecteurs et plus précisément les séquences d'ADN complémentaire qu'ils contenaient. En effet, nous avons utilisé des séquences codant pour les gènes simiens des facteurs de reprogrammation (construction dans le laboratoire du Professeur Leboulch) contenues dans des vecteurs rétroviraux dérivés de Moloney (production par Vectalys, Toulouse). Nous avons donc transduit 100 000 fibroblastes simiens à l'aide de ces vecteurs à deux reprises durant quatre heures et à 37°C à différentes MOIs variant entre 30 et 50 unités de transduction par cellule sans la moindre amélioration concernant la reprogrammation même lorsque nous avons augmenté le temps de contact des cellules avec les virus.

c) Vecteurs lentiviraux contenant les facteurs de reprogrammation humains

Avec l'aide de Yann Cherel (du Centre Boisbonne, Nantes), nous avons eu accès à des cellules de moelle osseuse des singes. Les cellules de deux singes ont été amplifiées et congelées avec succès.

Comme les fibroblastes simiens primaires obtenus proliféraient très lentement en culture, nous avons décidé de changer le type de vecteurs en utilisant des vecteurs lentiviraux (production par Vectalys, Toulouse), au lieu de vecteur rétroviraux, dans le but d'accroître l'efficacité de transduction. En effet, alors que les vecteurs rétroviraux, ne peuvent infecter que des cellules en division, les vecteurs lentiviraux sont capables d'infecter des cellules qu'elles soient en division ou non.

Deux échantillons de cellules de moelle osseuse ont été transduits à MOI 50 mais ces essais n'ont pas permis la génération d'iPSCs.

Le **Tableau 1** récapitule les différents essais de reprogrammation des cellules simiennes.

2- Différenciation en endoderme de cellules ES simiennes

En parallèle, nous avons commencé à mettre au point les conditions de différenciation hépatique sur des cellules souches embryonnaires de singe (ORMES cells : Oregon Rhesus Monkey Embryonic Stem cells), fournies par le Docteur Pucéat.

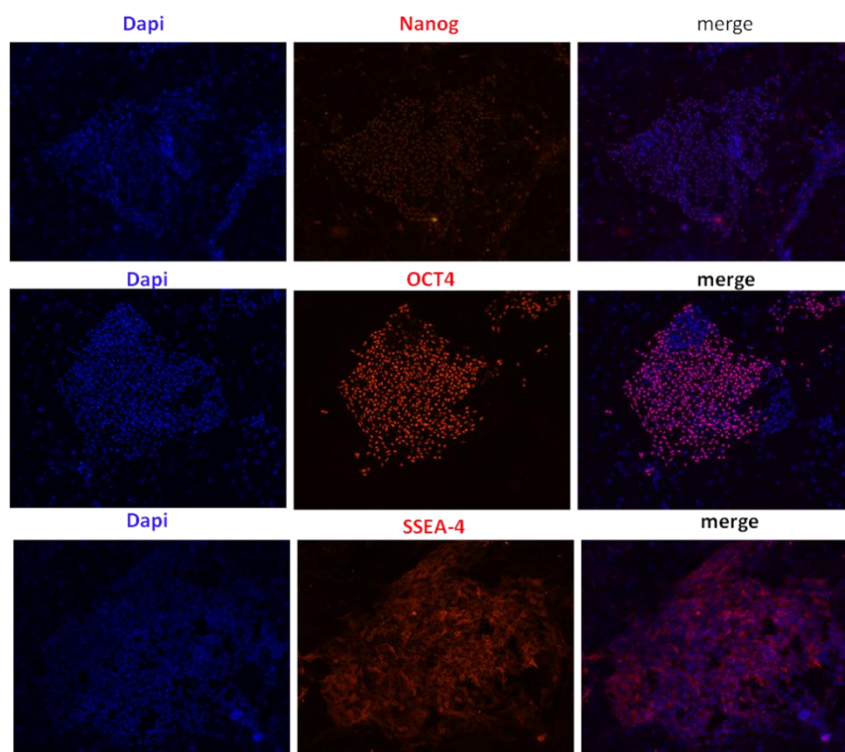
Nous avons eu accès et amplifié les lignées cellulaires ORMES 2, 6, 7 et 18. J'ai, tout d'abord, caractérisé les cellules en vérifiant l'expression de marqueurs de pluripotence comme Nanog, Oct4 et SSEA-4 par immunocytochimie.

Nous avons ensuite concentré notre travail sur les lignées ORMES 2 et 6 qui représentaient les lignées cellulaires les plus pluripotentes et ayant une croissance normale.

La **Figure 1** montre une expérience de caractérisation représentative réalisée avec la lignée ORMES 2 qui exprime les marqueurs de pluripotence Nanog, Oct4 et SSEA-4.

Singe	Type cellulaire	Vecteur	Nombre de cellules	Transduction	Condition de passage	Résultats
BC 29C	fibroblastes	Rétroviraux gènes humains	3 X 400 000	2 fois (J1,J2) à MOI 30 pour 2 puits 3 fois pour 1 puit à MOI 30	A J5 : 1 puit dans 2 B10 (40 000 MEF/cm ²)	Détachement du tapis cellulaire à J19 Pas de reprogrammation
BC 29C	fibroblastes	Rétroviraux gènes humains	3 X 150 000	2 fois pour 2 puits à MOI 30 3 fois pour 1 puit à MOI 30	A J5: 1 puit dans 1 B10 (30 000 MEF/cm ²)	Détachement du tapis cellulaire à J21 pas de reprogrammation
BC 29C	fibroblastes	Rétroviraux gènes humains	3 X 100 000	2 fois pour 2 puits à MOI 50 3 fois pour 1 puit à MOI 50	A J5 : 1 puit dans 2 B10 (20 000 MEF/cm ²)	Détachement du tapis cellulaire à J30
			1 X 200 000	2 fois pour 1 puit à MOI 50	A J5 : 1 puit dans 4 B10 (20 000 MEF/cm ²)	pas de reprogrammation
BC 29C	fibroblastes	Rétroviraux gènes humains	5 X 100 000	2 fois pour 3 puits à MOI 50 3 fois pour 2 puits à MOI 40	A J5 : 1 puit dans 2 B10 (20 000 MEF/cm ²)	Détachement du tapis cellulaire à J30 pas de reprogrammation
BC 13C	fibroblastes	Rétroviraux gènes simiens	5 X 100 000	2 fois pour 3 puits à MOI 50 3 fois pour 2 puits à MOI 60	A J5 : 1 puit dans 2 B10 (20 000 MEF/cm ²)	Détachement du tapis cellulaire à J30 pas de reprogrammation
BC 13C	fibroblastes	Rétroviraux gènes simiens	1 X 100 000	2 fois à MOI 30 (1 fois 4h et 1 fois overnight)	A J5 : 1 puit dans 3 B10 (20 000 MEF/cm ²)	Détachement du tapis cellulaire à J31 pas de reprogrammation
BC 29C	Cellules de moelle osseuse	Lentiviraux gènes humains	1 X 100 000	2 fois à MOI 50 (1 fois 2h en suspension et 1 fois overnight en culture)	A J5 : 1 puit dans 1 B10 (20 000 MEF/cm ²)	Détachement du tapis cellulaire à J33 pas de reprogrammation
BC 29C	Cellules de moelle osseuse	Lentiviraux gènes humains	1 X 100 000	2 fois à MOI 50	A J5 : 1 puit dans 2 B10 (20 000 MEF/cm ²)	Détachement du tapis cellulaire à J40 pas de reprogrammation
BC 29 C	fibroblastes	Rétroviraux gènes humains	2 X 100 000	MOI 50 pour OCT4 et MOI 30 pour SOX2, KLF4, c-MYC	A J1 : 1 puit dans 1 B10 (20 000 MEF/cm ²)	pas de reprogrammation (à J40)
BC 29C	fibroblastes	Lentiviraux gènes humains	2 X 100 000	1 fois pour 2 puits à MOI 50	A J1 : 1 puit dans 1 B10 (20 000 MEF/cm ²)	pas de reprogrammation (à J40)

Tableau 1. Tableau récapitulatif des différents essais de reprogrammation des cellules simiennes réalisés.

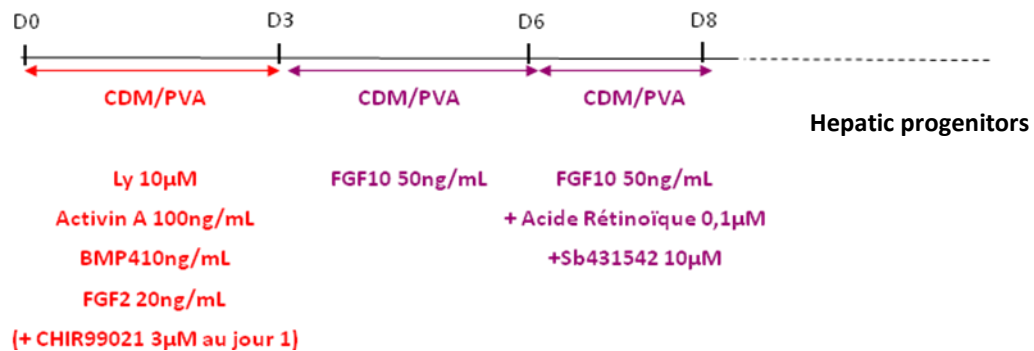


Nous avons ensuite testé trois protocoles de différenciation en endoderme différents, utilisés sur les cellules souches humaines. L'un d'eux a été établi dans notre laboratoire par T. Touboul sur les cellules ES humaines (Touboul *et al.*, Hepatology 2010). Le second a été défini sur les cellules iPS humaines dans le laboratoire de L. Vallier à Cambridge, Royaume-Uni (Rashid *et al.*, JCI 2010). Le dernier a été établi sur des cellules ES et iPS humaines par K. Si-Tayeb, qui a rejoint notre laboratoire, à Milwaukee, USA (Si-Tayeb *et al.*, Hepatology 2010) (**Figure 2**).

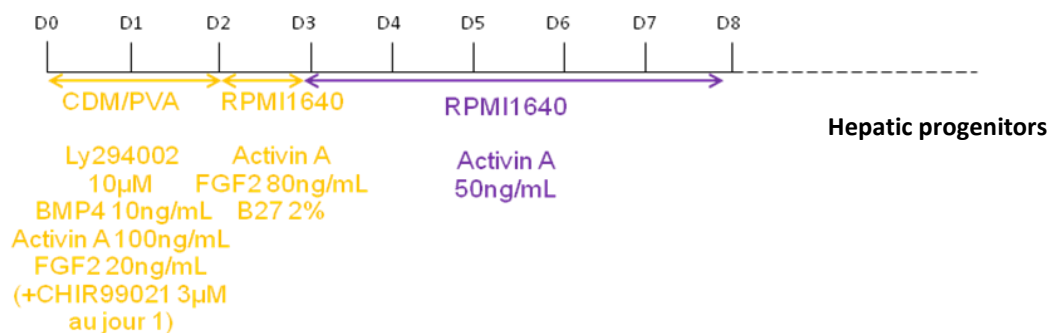
Pour les deux premiers protocoles, les cellules sont mises en culture sur de la gélatine et maintenues à l'état de cellules souches durant un à deux jours avant le début de la différenciation mais les cellules ORMES ont commencé à mourir au cours de cette période. Nous avons donc décidé de débiter la différenciation directement après le passage.

Lorsque nous avons reproduit exactement le protocole, après trois jours de culture dans du CDM/PVA contenant 100ng/mL d'Activine A, 20ng/mL de FGF2, 10ng/mL de BMP4 et 10μM de Ly294002, les cellules sont mortes. Sachant que le Ly294002 pouvait être toxique lorsqu'il était utilisé à des concentrations trop élevées, nous

Protocole Kremlin-Bicêtre (Touboul *et al.*, Hepatology 2010).



Protocole Cambridge (Rashid *et al.*, JCI 2010).



Protocole Milwaukee (Si-Tayeb *et al.*, Hepatology 2010).

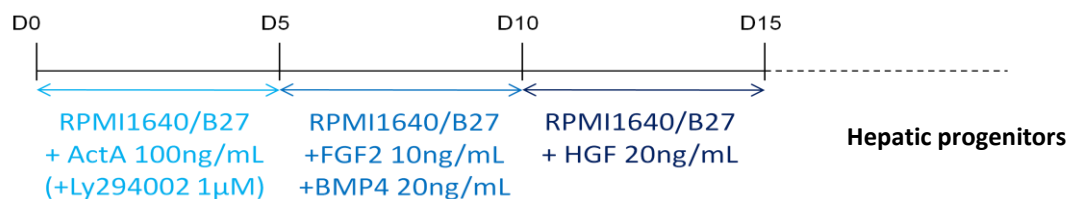


Figure 2. Protocoles de différenciation hépatique des cellules ES et iPS humaines.

avons comparé la différenciation en endoderme en utilisant différentes concentrations de Ly294002 (de 0 à 10 μ M) par une étude de la morphologie cellulaire ainsi qu'en vérifiant l'expression de marqueurs spécifiques de l'endoderme par immunocytochimie. Les résultats ont indiqué qu'une faible concentration de Ly induisait une bonne survie cellulaire mais une faible efficacité de différenciation avec la persistance de nombreuses colonies de cellules indifférenciées après trois jours de différenciation. A l'inverse, une forte concentration augmentait l'efficacité de différenciation (plus aucune colonie de cellules indifférenciées) mais augmentait également la mort cellulaire. Une concentration de Ly294002 de 7,5 μ M offrait un bon compromis entre l'efficacité de différenciation et la survie cellulaire.

Ensuite, nous avons comparé ces conditions avec le troisième protocole (celui de Milwaukee) et nous avons constaté par immunocytochimie que, dans les deux cas, les cellules exprimaient les marqueurs de l'endoderme comme Sox17 et FoxA2 et elles n'exprimaient plus le marqueur de pluripotence Oct4 (**Figure 3**).

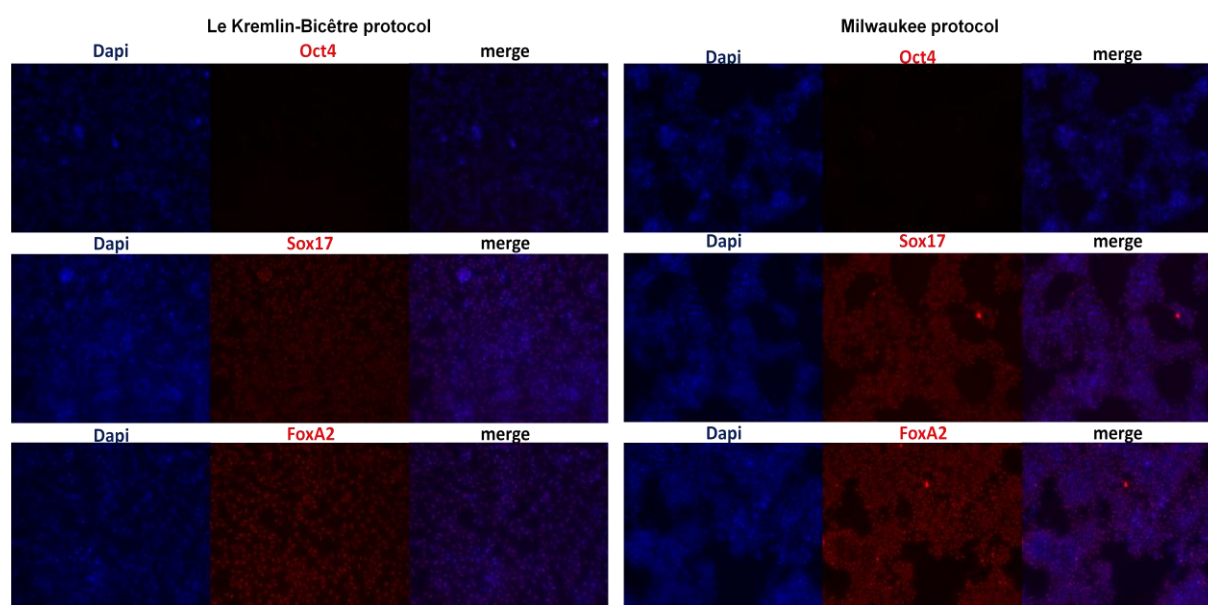


Figure 3. Comparaison des protocoles de différenciation en endoderme. Dans les deux cas, les cellules expriment des marqueurs de l'endoderme comme Sox17 et FoxA2 alors que le marqueur de pluripotence Oct4 n'est plus exprimé.

En parallèle, nous avons défini les conditions pour utiliser les anticorps contre des marqueurs hépatiques simiens comme l'alpha-1-antitrypsine, l'albumine et HNF4 α sur des hépatocytes adultes simiens primaires cryoconservés dans notre laboratoire.

Nous avons également conçu et défini les conditions d'utilisation en PCR quantitative d'oligonucléotides pour les marqueurs des différentes étapes de la différenciation hépatique : les marqueurs de pluripotence Oct4, Sox2 et Nanog, les marqueurs d'endoderme Hex, FoxA2 et les marqueurs hépatiques HNF1 β , HNF4 α , la tyrosine aminotransférase (TAT), l'albumine, le récepteur aux lipoprotéines de faible densité (RLDL), FoxA1, la cytokératine CK18 et la transthyréine (TTR).

3- Différenciation en endoderme de cellules iPS simiennes

Dans le même temps, afin de définir les conditions optimales de différenciation hépatique sur les cellules iPS simiennes, nous avons débuté une collaboration avec le Professeur Leboulch (iMETI CEA, Fontenay-Aux-Roses) qui nous a fourni deux clones d'iPSCs de macaque *cynomolgus*.

DISCUSSION

Le modèle des cellules ES était le plus approprié pour la mise au point d'un protocole de différenciation hépatique des cellules souches. Le protocole tel que nous l'avons défini récapitulé, *in vitro* et en conditions chimiquement définies, les principales étapes du développement embryonnaire du foie afin d'obtenir des cellules exprimant des marqueurs de progéniteurs hépatiques et d'hépatocytes fœtaux (Touboul *et al.*, 2010).

Nous avons ensuite voulu transposer cette technique sur les cellules ES simiennes mais nous avons constaté que cette approche n'était pas aussi efficace. Notamment, lors de la différenciation en endoderme la concentration de 10 μ M de Ly294002, utilisée avec les ESCs humaines, s'est avérée toxique pour les ORMESCs. Le meilleur compromis a été obtenu en réduisant celle-ci à 7,5 μ M et en ajoutant le LY294002 uniquement durant les deux premiers jours, ce qui nous a permis de générer une population de 60% environ de cellules d'endoderme définitif.

Les cellules iPS ont été reprogrammées à partir de fibroblastes issus d'une biopsie de peau d'un patient atteint d'hypercholestérolémie familiale suivant un protocole précédemment décrit par Ludovic Vallier (Vallier *et al.*, 2009). La faible efficacité de reprogrammation (0,04%) s'explique en partie par la faible capacité de prolifération de nos cellules primaires (Ruiz *et al.*, 2011). Les cellules pluripotentes ainsi générées ont été différenciées en cellules hépatiques à l'aide d'un protocole préalablement établi au sein du laboratoire de Cambridge. En effet, si le protocole détaillé précédemment a permis de générer près de 90% de cellules de l'endoderme avec les ESCs, une proportion plus réduite des iPSCs dérivées des patients s'est engagée dans la différenciation endodermique (40%), la proportion de progéniteurs hépatiques devenant ensuite minoritaire. Nous avons donc apporté quelques améliorations, comme, notamment, l'augmentation de la concentration de FGF2 durant les trois jours de différenciation en endoderme (de 20ng/mL à 40ng/mL), l'addition de CHIR99021 le premier jour, dans le but d'accroître la population cellulaire engagée dans la différenciation (90%). Enfin, l'utilisation, lors de la dernière étape du protocole, d'un milieu de culture favorable au maintien à long terme de l'expression phénotypique spécifique des hépatocytes (CMRL1066/Hepatozyme).

Ces modifications ont permis, d'une part, d'accroître la proportion de cellules souches engagées dans la différenciation et, d'autre part, d'améliorer l'expression des marqueurs hépatiques ainsi que la fonctionnalité des cellules générées (sécrétion d'albumine, activité des cytochromes P450).

Si l'utilisation des cellules iPS pour la recherche fondamentale ne bénéficie d'aucune législation en France, l'obtention de tissu humain est très encadrée d'un point de vue éthique. En effet, il est nécessaire, en France, d'obtenir l'autorisation du CPP (Comité de Protection des Personnes) et de la CNIL (Commission Nationale Informatique et Libertés), mais aussi de l'AFSSaPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé), pour toute recherche sur des prélèvements humains. Le protocole doit expliquer de manière détaillée les procédures requises pour le recrutement des donneurs (nombre, critères d'inclusion/exclusion, incitations directes/indirectes à la participation, risques et bénéfices, ...), la nature du matériel collecté (échantillons biologiques, données sensibles ou personnelles, ...). Une attention particulière doit être portée sur la garantie de l'anonymisation totale des prélèvements destinés à générer les iPSCs et les procédures de consentement éclairé qui seront mises en oeuvre. Il est indispensable d'informer le donneur de cellules somatiques du volontariat de sa participation à l'étude, de le renseigner sur les charges et les risques que cela implique avant de rendre sa décision, sur les bénéfices que sa participation apportera. Il doit également être porté à sa connaissance la manière dont les résultats seront collectés, protégés durant le projet, mais aussi si les cellules seront détruites ou réutilisées à la fin du projet auquel cas les équipes sont dans l'obligation de l'informer de l'usage futur qu'il sera fait des prélèvements en terme de recherche ou d'exploitation commerciale. De plus, les donneurs ont le droit de se retirer du projet quand ils le souhaitent. Ainsi, les cellules qu'il leur ont été prélevées et les résultats engendrés devront être détruits.

Des améliorations restent à apporter à la méthodologie iPS. En effet, nous avons eu recours, comme dans les premiers travaux sur les cellules iPS, à des vecteurs rétroviraux. L'infectiosité de ces virus est limitée aux cellules en division, réduisant ainsi la proportion de cellules infectées (Dimos *et al.*, 2008 ; Park *et al.*, 2008).

De plus, ces vecteurs s'intègrent de façon permanente dans le génome hôte. Ceci soulève des problèmes éthiques en raison du risque de mutagénèse insertionnelle et

de réactivation des transgènes qui ont tous un potentiel oncogène (Okita *et al.*, 2007 ; Takahashi *et al.*, 2007). Si le risque d'insertion de transgènes peut être réduit en diminuant le nombre de facteurs requis pour la reprogrammation (Wernig *et al.*, 2007 ; Aoi *et al.*, 2008), il n'en demeure pas moins que même un faible nombre de copies intégrées du génome viral peut toujours activer ou inactiver les gènes hôtes entraînant donc une potentielle tumorigénicité comme cela a été démontré lors d'essais cliniques de thérapie génique (Nienhuis *et al.*, 2006). Ainsi, la thérapie génique de patients SCID réalisée, par une équipe française, à l'aide d'un vecteur rétroviral a résulté en trois cas de leucémie (sur dix patients traités) causée par l'activation du proto-oncogène LMO2 (LIM-domain-only-2) (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003). De même, l'équipe de AJ Trascher a constaté un cas de leucémie sur dix patients traités. Les auteurs ont constaté d'autres anomalies génétiques, en plus de celles liées à l'insertion du vecteur, comme une mutation gain de fonction de Notch1, la délétion du locus du gène suppresseur de tumeur cyclin-dépendent kinase 2A (CDKN2A) dues aux séquences enhancers contenues dans les LTR du vecteur (Howe *et al.*, 2008). En 2004, un essai clinique pour traiter la granulomatose chronique liée à l'X(X-CGD) a été réalisé sur deux jeunes adultes par transplantation de cellules souches hématopoïétiques dont le déficit a été corrigé à l'aide d'un vecteur oncorétroviral. Après la correction initiale des infections bactériennes et fongiques liées à la maladie, une extinction de l'expression du transgène a été constatée chez les deux patients en raison de la méthylation du promoteur viral mais aussi une myélodysplasie avec une monosomie du chromosome 7 en raison de l'activation insertionnelle d'EV1 (ecotropic viral integration site 1) entraînant la mort d'un des deux patients (Stein *et al.*, 2010). En revanche, d'autres essais cliniques, utilisant des vecteurs lentiviraux, ont rencontré des succès sans effet adverse. Ainsi, Cartier *et al.* ont traité l'adrénoleucodystrophie liée à l'X par la transplantation de cellules souches hématopoïétiques autologues transduites par un vecteur lentiviral contenant le gène ABCD1. Environ quinze mois après transplantation, l'interruption de la démyélinisation cérébrale a été constatée chez deux des trois patients traités (Cartier *et al.*, 2009). L'équipe de P Leboulch a également traité avec succès des patients atteints de β -thalassémie par thérapie génique. En 2007, les auteurs ont, en effet, transplanté, chez un patient de 18 ans atteint d'une β^E/β^0 -thalassémie sévère, des cellules de moëlle osseuse CD34⁺ autologues préalablement corrigées par transduction lentivirale de la séquence codant pour le gène de la β -globine. Alors que

le patient était transfusion-dépendant, douze mois après transplantation, celui-ci ne nécessitait plus de transfusion (pendant au moins vingt-et-un mois). La plupart des bénéfices thérapeutiques résultent d'un clone cellulaire dominant chez lequel l'intégration du vecteur dans le génome a activé la transcription du gène HMGA2 (High-mobility group AT-hook 2) dans les cellules érythroïdes (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2010). Toutefois, cela n'entraîne pas la progression d'une leucémie (Wang *et al.*, 2010) .

Les approches utilisant des vecteurs excisables ne sont, pour le moment, pas suffisamment efficaces pour retirer les transgènes et des séquences résiduelles des vecteurs subsistent au site d'insertion. Parmi les approches les plus récentes, celle ayant recours à des séquences ARN semble particulièrement intéressante car l'efficacité de reprogrammation est au minimum similaire à celle obtenue avec les vecteurs intégratifs, sans intégration dans le génome hôte. Toutefois, cette méthode nécessite un grand nombre d'étapes nécessaires à la transfection qui doit être effectuée quotidiennement durant une quinzaine de jours (Warren *et al.*, 2010). Dernièrement, des travaux ont montré une forte augmentation de l'efficacité de reprogrammation en ayant transduit à l'aide d'un vecteur lentiviral les miARNs miR302/367 (10%) (Anokye-Dansot *et al.*, 2011).

Toutefois, les remaniements chromosomiques dûs à la reprogrammation elle-même, à la culture *in vitro* prolongée des iPSCs (Martins-Taylor *et al.*, 2011), mais aussi les différences entre iPSCs et ESCs au niveau de la structure chromatinienne, dans l'expression des gènes (Gunther *et al.*, 2010 ; Newman et Cooper, 2010) restent d'importants obstacles à leur avenir thérapeutique. Ainsi, il paraît intéressant de contourner l'étape iPS et générer des cellules somatiques directement à partir de fibroblastes. Notons que l'obtention de myoblastes grâce à la surexpression de MyoD dans les fibroblastes murins avait été montrée dès 1987 (Davis *et al.*, 1987).

Récemment, Huang *et al.* ont généré des cellules « hépatocyte-like » fonctionnelles, directement à partir de fibroblastes murins, par transduction de facteurs définis (Huang *et al.*, 2011). Pour déterminer la combinaison de facteurs de transcription permettant ce résultat, les auteurs ont transduit, dans des fibroblastes murins, quatorze facteurs connus pour leur importance dans le développement du foie et la fonction hépatique à l'aide de vecteurs lentiviraux (GATA-4, FoxA1, FoxA2, FoxA3, HNF1 α , HNF4 α , HNF6, Hlf, Hhex, Jarid2, Coup-TF1, LRH1, Fxr, Pxr). Vingt-et-un jours après la transduction, les cellules obtenues exprimaient un grand nombre de

gènes hépatiques. De plus, ces cellules étaient capables de stocker du glycogène et d'internaliser le Dil-ac-LDL, l'indocyanine green. Afin de restreindre le nombre de facteurs de transcription indispensables à cette stratégie, les auteurs ont renouvelé l'expérience de transduction des fibroblastes avec un groupe de six facteurs (FoxA2, FoxA3, HNF1 α , HNF4 α , HNF6 et GATA-4) ou un groupe de huit facteurs (FoxA2, FoxA3, HNF1 α , HNF4 α , HNF6, GATA-4, FoxA1 et Hlf), et ont généré des cellules hépatiques. Il en a été de même en retirant HNF4 α et HNF6. Ils ont ensuite constaté que la combinaison GATA-4, FoxA3 et HNF1 α s'avérait plus efficace que la combinaison GATA-4, FoxA2 et HNF1 α et ont donc conservé celle-ci pour la suite. De plus, le retrait d'un des trois facteurs de la combinaison empêche la reprogrammation des cellules transduites. Les auteurs ont ensuite montré, qu'après transplantation des cellules hépatiques issues de fibroblastes dans des souris Fah^{-/-} Rag2^{-/-} souffrant d'insuffisance hépatique, les cellules transplantées étaient capables de repeupler le foie et d'améliorer les fonctions hépatiques des souris hôtes. Néanmoins, les résultats obtenus se sont avérés très variables d'une souris à l'autre (entre 5% et 80% de repeuplement du foie !!).

La démonstration de la fonctionnalité des hépatocytes dérivés de cellules iPS dans des modèles de rongeurs est une étape clé de validation des cellules, de même que l'absence de formation de tumeur à long terme.

En 1991, Chowdhury *et al.* ont observé une amélioration sur le long terme de l'hypercholestérolémie familiale dans le modèle du lapin WHHL (Watanabe Heritable HyperLipidemic ; déficitaire en RLDL) suite à une approche de thérapie génique *ex vivo*. Pour cela, les auteurs ont prélevé un fragment représentant 30% du foie d'animaux déficients et mis en culture les hépatocytes. Environ 2.10⁸ de ces cellules, soit 2% du nombre total des cellules du foie, ont ensuite été transduites à l'aide d'un vecteur rétroviral recombinant contenant la séquence codant pour le gène RLDL du lapin, avec une efficacité d'environ 20%, puis transplantées dans la rate de l'animal dont elles provenaient. La transplantation a été suivie d'une reconstitution de l'expression du gène RLDL de 2 à 4% de l'expression endogène normale ainsi que d'une diminution de 30% en moyenne de la concentration du cholestérol sérique et ceci durant quatre mois (Chowdhury *et al.*, 1991).

En 2006, Nguyen *et al.* ont décrit une approche de thérapie *ex vivo* du syndrome de Crigler-Najjar de type 1 (CN-1) chez le rat Gunn. Cette maladie métabolique du foie à

transmission autosomale dominante est due à un déficit de l'activité bilirubine UDP-glucuronosyltransférase (BUGT) et résulte en une accumulation de bilirubine non-conjuguée dans le sang. (Nguyen *et al.*, 2006). Le rat Gunn possède une mutation naturelle du gène BUGT conduisant à la même accumulation de bilirubine dans le sang très rapidement après la naissance. L'équipe a isolé des hépatocytes de ces rats et les ont transduits à l'aide de vecteurs lentiviraux contenant les séquences codant pour le gène BUGT humain. Vingt millions de ces cellules ont ensuite été transplantées dans le pôle inférieur de la rate de rats Gunn ayant subi une hépatectomie de 70% du foie, les cellules transduites représentant environ 1% du foie receveur. Les auteurs ont alors démontré la correction, sur le long terme, du déficit en observant l'expression de BUGT dans le foie des rats traités ainsi que l'excrétion de dérivés glucuronides de la bilirubine dans la bile contrairement aux rats non-traités.

Chez les animaux de laboratoire, la repopulation du foie est favorisée par le blocage de la capacité proliférative des hépatocytes hôtes par l'administration d'agents alkylants comme la rétrovirusine (Grompe *et al.*, 1999), ou par une irradiation hépatique contrôlée (Jiang *et al.*, 2008). Néanmoins, ces approches ne sont pas applicables chez l'Homme et la majorité des maladies métaboliques ne sont pas associées à une destruction des hépatocytes.

Récemment, Ding *et al.* ont réalisé une étude sur la transplantation d'hépatocytes murins allogènes wild-type dans le foie de souris transgéniques Piz qui expriment la mutation Z de l'Alpha-1-antitrypsine (AAT) résultant en la formation de polymères d'AAT ordonnés et retenus dans le réticulum endoplasmique avec, pour conséquence, un déficit en AAT (Ding *et al.*, 2011). Ce groupe a démontré que les hépatocytes transplantés proliféraient préférentiellement par rapport aux cellules hôtes. Cette prolifération était contrebalancée par l'apoptose accrue des cellules hôtes. Ainsi, le foie des souris est repeuplé d'hépatocytes sains suggérant que la mutation de l'AAT est une maladie pour laquelle les cellules corrigées *ex vivo* pourront repeupler le foie sans incidence majeure sur celui-ci. La prolifération des hépatocytes transplantés pouvait être accrue par une stimulation mitotique comme l'expression ectopique d'HGF (transduction adénovirale). Notons que, chez l'Homme, les déficits en AAT sont effectivement associés à une destruction des hépatocytes par une accumulation des polymères d'AAT mutés.

Au sein de notre laboratoire, pour remplacer l'hépatectomie, les chirurgiens ont mis au point, dans le modèle primate non-humain, une nouvelle approche de transplantation, directement transposable à la clinique, qui consiste à réaliser une embolisation réversible et partielle du système porte (EVP) avant de transplanter les hépatocytes (Lainas *et al.*, 2008 ; Dagher *et al.*, 2009). En effet, cette approche est couramment utilisée, avec un matériel non résorbable, chez l'Homme en préalable à des hépatectomies majeures afin d'induire l'hypertrophie du foie restant. Lainas *et al.* ont utilisé une éponge gélatineuse résorbable sous forme de poudre (Curaspon) afin de réaliser une EVP réversible d'environ 50% du foie (branches gauche et antérieure droite de la veine porte) chez le primate. Cette embolisation est bien tolérée avec une augmentation de pression portale transitoire et sans signe de thrombose, ni de réponse inflammatoire. De plus, l'obstruction des vaisseaux est maintenue complète durant six à huit jours et la recanalisation du territoire portal embolisé est complète après environ deux semaines. L'effet sur la division des hépatocytes dans les segments non embolisés conduit à une hypertrophie de ceux-ci (Lainas *et al.*, 2008). L'équipe a ensuite utilisé cette approche pour évaluer l'effet d'une EVP réversible sur une autotransplantation d'hépatocytes transduits à l'aide d'un vecteur lentiviral contenant la séquence codant pour l'eGFP sous le contrôle du promoteur ApoA-II humain (Dagher *et al.*, 2009). Quatorze jours après la transplantation d'hépatocytes transduits via la veine mésentérique inférieure, les cellules exprimant la GFP étaient détectées dans le parenchyme en petits et larges groupes de cellules, ce qui suggère leur prolifération et leur contribution à la régénération du foie. Les cellules GFP-positives représentaient environ 2% des cellules du foie et étant donnée l'efficacité de transduction (35%), il est possible d'extrapoler à 6% l'efficacité de prise de greffe. De plus, ces cellules expriment l'E-cadhérine, une molécule d'adhésion cellule-cellule qui assure l'architecture tissulaire, prouvant ainsi leur intégration dans le parenchyme du foie.

Une autre approche préclinique de transplantation cellulaire a été réalisée chez le primate par Blin et ses collaborateurs. Les auteurs ont démontré la capacité de progéniteurs cardiovasculaires dérivés de cellules souches à se greffer dans ce même modèle. Les auteurs ont donc induit la différenciation cardiaque de cellules pluripotentes simiennes (ORMES). Les cellules SSEA-1 positives (marqueur précoce de différenciation et de perte de pluripotence) obtenues exprimaient, au cours de la différenciation, des marqueurs spécifiques des cellules cardiogéniques comme FLK1

(Fetal Liver Kinase 1), T brachyury-like, MESP1 (Mesoderm Posterior 1), MYOCD (myocardin), GATA-4, MEF2C (Myocyte-Specific Enhancer Factor 2C), ISL1 (Islet-1) et NKX2.5. Ces progéniteurs ont pu être différenciés en cardiomyocytes matures *ex vivo*. Afin d'observer la prise de greffe de ces cellules, les auteurs ont provoqué un infarctus du myocarde chez des singes Rhésus par un protocole d'occlusion coronarienne/reperfusion percutanée de quatre-vingt-dix minutes puis, deux semaines plus tard, ils ont transplanté les progéniteurs cardiaques dérivés des cellules ORMES dans la zone infarctée. Les cellules SSEA-1 positives transplantées se sont alors différenciées en cardiomyocytes ventriculaires matures exprimant MLC2v et MLCK (Myosin Light Chain) et aucun tératome n'a été constaté (Blin *et al.*, 2010).

L'expérimentation sur le gros animal, en particulier le primate, pour évaluer la combinaison du conditionnement de l'animal et de la transplantation des cellules différenciées, paraît incontournable lorsque les cellules dérivées de cellules pluripotentes potentiellement tumorigènes sont utilisées.

Conclusions et perspectives

Nous avons contribué à la mise au point, pour la première fois, d'un protocole de différenciation des cellules ES humaines permettant de générer des progéniteurs hépatiques en conditions chimiquement définies.

Nous avons reprogrammé, pour la première fois, des cellules somatiques de patients atteints d'une maladie métabolique du foie en cellules iPS que nous avons différenciées en cellules hépatiques ayant conservé le déficit génétique.

Toutefois, la génération de cellules hépatiques matures et complètement différenciées issues des cellules pluripotentes reste un champs de recherche intensément exploré au vu de l'intérêt majeur de ces cellules. Par ailleurs, nous n'avons généré des iPSCs à partir des cellules que d'un seul patient. Il sera nécessaire de reproduire notre approche sur les cellules de nouveaux patients puis de caractériser les hépatocytes déficients générés, afin de générer des lignées plus représentatives de la diversité génétique.

Les cellules iPS RLDL^{-/-} devront être transduites par un vecteur lentiviral ApoA-II-RLDL et différenciées en hépatocytes afin d'évaluer *in vitro* la correction du phénotype, et, *in vivo*, leur devenir dans un modèle murin immunodéficient.

Enfin, les travaux sur les iPS simiennes, qui seront poursuivis en collaboration avec le Professeur Leboulch, devront, à terme, apporter la preuve de concept de l'application thérapeutique de l'autotransplantation de cellules issues d'iPSCs dans un modèle animal très proche de l'humain.

Enfin, il est intéressant de noter que le RLDL est impliqué dans l'endocytose du virus de l'hépatite C ainsi que d'autres virus de la famille des *Flaviviridae* (virus à ARN linéaire non segmenté simple brin à polarité positive) comme le virus de la diarrée virale bovine (BVDV) ou encore le virus GB-C et le virus de l'hépatite G (GBV-C/HGV). En effet, Agnello *et al.* ont montré l'endocytose de ces virus en présence d'un anticorps anti-RLDL mais une inhibition de celle-ci en présence de l'anticorps (Agnello *et al.*, 1999). Concernant le virus de l'hépatite C, il a été montré que les protéines de l'enveloppe E1/E2 se liaient aux LDLs, VLDLs et HDLs (Monazahian *et al.*, 2000) notamment via l'apolipoprotéine E (Chang *et al.*, 2007). Les cellules iPS RLDL^{-/-} pourront également apporter un modèle d'étude des mécanismes d'infection de ces virus.

BIBLIOGRAPHIE

- Benedetti A, Bassotti C, Rapino K, Marucci L, Jezequel AM. (1996). A morphometric study of the epithelium lining the rat intrahepatic biliary tree. *J Hepatol* 24, 335-342.
- Saxena R, Theise N. (2004). Canals of Hering: recent insights and current knowledge. *Semin Liver Dis* 24, 43-48.
- Kuwahara R, Kofman AV, Landis CS, Swenson ES, Barendswaard E, Theise ND. (2008). The hepatic stem cell niche: identification by label-retaining cell assay. *Hepatology* 47, 1994-2002.
- Schmelzer E, Zhang L, Bruce A, Wauthier E, Ludlow J, Yao HL, Moss N, Melhem A, McClelland R, Turner W, Kulik M, Sherwood S, Tallheden T, Cheng N, Furth ME, Reid LM. (2007). Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med* 204, 1973-1987.
- Arias IM. (1990). The biology of hepatic endothelial cell fenestrae. *Prog Liver Dis* 9:11-26.
- Smedsrod, B, De Bleser, PJ, Braet F, Lovisetti P, Vanderkerken K, Wisse E, Geerts A. (1994). Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells. *Gut* 35, 1509-1516.
- Parker GA, Picut, CA. (2005). Liver immunobiology. *Toxicol Pathol* 33, 52-62.
- Strick-Marchand H, Masse GX, Weiss MC, Di Santo JP. (2008). Lymphocytes support oval cell-dependent liver regeneration. *J Immunol* 181, 2764-2771.
- Friedman SL. (2008). Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 88, 125-172.
- Weibel ER, Staubli W, Gnagi HR, Hess FA. (1969). Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. *J Cell Biol* 42, 68-91.
- Feldmann G. (1989). The cytoskeleton of the hepatocyte. Structure and functions. *J Hepatol* 8, 380-386.
- Rappaport AM, Borowy ZJ, Loughheed WM, Lotto WN. (1954). Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology. *Anat Rec* 119, 11-33.
- Gumucio DL, Shelton DA, Blanchard-McQuate K, Gray T, Tarle S, Heilstedt-Williamson H, Slightom JL, Collins F, Goodman M. (1994). Differential phylogenetic footprinting as a means to identify base changes responsible for recruitment of the anthropoid gamma gene to a fetal expression pattern. *J Biol Chem* 269, 15371-15380.
- Rajvanshi P, Liu D, Ott M, Gagandeep S, Schilsky ML, Gupta S. (1998). Fractionation of rat hepatocyte subpopulations with varying metabolic potential, proliferative capacity, and retroviral gene transfer efficiency. *Exp Cell Res* 244, 405-419.
- Lawson KA, Meneses JJ, Pedersen RA. (1991). Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development* 113(3):891-911.

Wells JM, Melton DA. (1999). Vertebrate endoderm development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:393-410.

Tada S, Era T, Furusawa C, Sakurai H, Nishikawa S, Kinoshita M, Nakao K, Chiba T. (2005). Characterization of mesendoderm: a diverging point of the definitive endoderm and mesoderm in embryonic stem cell differentiation culture. *Development* 132, 4363-4374.

Zorn AM, Wells JM. (2009). Vertebrate endoderm development and organ formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25:221-51.

Tam PP, Loebel DA. (2007). Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation. *Nat Rev Genet* 8(5):368-81.

Brennan J, Lu CC, Norris DP, Rodriguez TA, Beddington RS, Robertson EJ. (2001). Nodal signalling in the epiblast patterns the early mouse embryo. *Nature* 411, 965-969.

Conlon FL, Lyons KM, Takaesu N, Barth KS, Kispert A, Herrmann B, Robertson EJ (1994). A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse. *Development* 120, 1919-1928.

Zhou X, Sasaki H, Lowe L, Hogan BL, Kuehn MR. (1993). Nodal is a novel TGFbeta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature* 361, 543-547.

Ben-Haim N, Lu C, Guzman-Ayala M, Pescatore L, Mesnard D, Bischofberger M, Naef F, Robertson EJ, Constam DB. (2006). The nodal precursor acting via activin receptors induces mesoderm by maintaining a source of its convertases and BMP4. *Dev Cell* 11, 313-323.

Liu Y, Festing M, Thompson JC, Hester M, Rankin S, El-Hodiri HM, Zorn AM, Weinstein M. (2004). Smad2 and Smad3 coordinately regulate craniofacial and endodermal development. *Dev Biol* 270, 411-426.

Lowe LA, Yamada S, Kuehn MR. (2001). Genetic dissection of nodal function in patterning the mouse embryo. *Development* 128, 1831-1843.

Meno C, Gritsman K, Ohishi S, Ohfuji Y, Heckscher E, Mochida K, Shimono A, Kondoh H, Talbot WS, Robertson EJ, Schier AF, Hamada H. (1999). Mouse Lefty2 and zebrafish antivin are feedback inhibitors of nodal signaling during vertebrate gastrulation. *Mol Cell* 4, 287-298.

Huelsken J, Vogel R, Brinkmann V, Erdmann B, Birchmeier C, Birchmeier W. (2000). Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *J Cell Biol* 148, 567-578.

Liu P, Wakamiya M, Shea MJ, Albrecht U, Behringer RR, Bradley A. (1999). Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nat Genet* 22, 361-365.

Hoodless PA, Pye M, Chazaud C, Labbe E, Attisano L, Rossant J, Wrana JL. (2001). FoxH1 (Fast) functions to specify the anterior primitive streak in the mouse. *Genes Dev* 15, 1257-1271.

Yamamoto M, Meno C, Sakai Y, Shiratori H, Mochida K, Ikawa Y, Saijoh Y, Hamada H. (2001). The transcription factor FoxH1 (FAST) mediates Nodal signaling during anterior-posterior patterning and node formation in the mouse. *Genes Dev* 15, 1242-1256.

Reissmann E, Jornvall H, Blokzijl A, Andersson O, Chang C, Minchiotti G, Persico MG, Ibanez CF, Brivanlou AH. (2001). The orphan receptor ALK7 and the Activin receptor ALK4 mediate signaling by Nodal proteins during vertebrate development. *Genes Dev* 15, 2010-2022.

Yeo C, Whitman M. (2001). Nodal signals to Smads through Cripto-dependent and Cripto-independent mechanisms. *Mol Cell* 7, 949-957.

Morkel M, Huelsken J, Wakamiya M, Ding J, van de Wetering M, Clevers H, Taketo MM, Behringer RR, Shen MM, Birchmeier W. (2003). Beta-catenin regulates Cripto- and Wnt3-dependent gene expression programs in mouse axis and mesoderm formation. *Development* 130, 6283-6294.

Teo AK, Arnold SJ, Trotter MW, Brown S, Ang LT, Chng Z, Robertson EJ, Dunn NR, Vallier L. (2011). Pluripotency factors regulate definitive endoderm specification through eomesodermin. *Genes Dev* 25(3):238-50.

Jacobsen CM, Narita N, Bielinska M, Syder AJ, Gordon JI, Wilson DB. (2002). Genetic mosaic analysis reveals that GATA-4 is required for proper differentiation of mouse gastric epithelium. *Dev Biol* 241, 34-46.

Koutsourakis M, Langeveld A, Patient R, Beddington R, Grosveld F. (1999). The transcription factor GATA-6 is essential for early extraembryonic development. *Development* 126, 723-732.

Ang SL, Wierda A, Wong D, Stevens KA, Cascio S, Rossant J, Zaret KS. (1993). The formation and maintenance of the definitive endoderm lineage in the mouse: involvement of HNF3/forkhead proteins. *Development* 119, 1301-1315.

Sasaki H, Hogan BL. (1993). Differential expression of multiple fork head related genes during gastrulation and axial pattern formation in the mouse embryo. *Development* 118, 47-59.

Kanai-Azuma M, Kanai Y, Gad JM, Tajima Y, Taya C, Kurohmaru M, Sanai Y, Yonekawa H, Yazaki K, Tam PP, Hayashi Y. (2002). Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice. *Development* 129, 2367-2379.

Howard L, Rex M, Clements D, Woodland HR. (2007). Regulation of the *Xenopus* Xsox17alpha(1) promoter by co-operating VegT and Sox17 sites. *Dev Biol* 310, 402-415.

Sinner D, Kirilenko P, Rankin S, Wei E, Howard L, Kofron M, Heasman J, Woodland HR, Zorn AM. (2006). Global analysis of the transcriptional network controlling *Xenopus* endoderm formation. *Development* 133, 1955-1966.

Ahmed N, Howard L, Woodland HR. (2004). Early endodermal expression of the *Xenopus* Endodermin gene is driven by regulatory sequences containing essential Sox protein-binding elements. *Differentiation* 72, 171-184.

Sinner D, Rankin S, Lee M, Zorn AM (2004). Sox17 and beta-catenin cooperate to regulate the transcription of endodermal genes. *Development* 131, 3069-3080.

Tam PP, Khoo PL, Lewis SL, Bildsoe H, Wong N, Tsang TE, Gad JM, Robb L. (2007). Sequential allocation and global pattern of movement of the definitive endoderm in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 134, 251-260.

Howell M, Itoh F, Pierreux CE, Valgeirsdottir S, Itoh S, ten Dijke P, Hill CS. (1999). *Xenopus* Smad4beta is the co-Smad component of developmentally regulated transcription factor complexes responsible for induction of early mesodermal genes. *Dev Biol* 214, 354-369.

Zhang H, Fraser ST, Papazoglu C, Hoatlin ME, Baron MH. (2009). Transcriptional Activation by the Mixl1 Homeodomain Protein in Differentiating Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 27(12):2884-95.

Zaret KS. (2008). Genetic programming of liver and pancreas progenitors: lessons for stemcelldifferentiation. *Nat Rev Genet* 9, 329-340.

Zhao R, Duncan SA. (2005). Embryonic development of the liver. *Hepatology* 41, 956-967.

Zaret KS. (2002). Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. *Nat Rev Genet*. Jul;3(7):499-512.

Bossard P, Zaret KS. (1998). GATA transcription factors as potentiators of gut endoderm differentiation. *Development* 125, 4909-4917.

Lee CS, Friedman JR, Fulmer JT, Kaestner KH. (2005). The initiation of liver development is dependent on Foxa transcription factors. *Nature* 435, 944-947.

Lokmane L, Haumaitre C, Garcia-Villalba P, Anselme I, Schneider-Maunoury S, Cereghini S. (2008). Crucial role of vHNF1 in vertebrate hepatic specification. *Development* 135, 2777-2786.

Gualdi R, Bossard P, Zheng M, Hamada Y, Coleman JR, Zaret KS. (1996). Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control. *Genes Dev* 10, 1670-1682.

Jung J, Zheng M, Goldfarb M, Zaret KS. (1999). Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* 284, 1998-2003.

Rossi JM, Dunn NR, Hogan BL, Zaret KS. (2001). Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev* 15, 1998-2009.

Calmont A, Wandzioch E, Tremblay KD, Minowada G, Kaestner KH, Martin GR, Zaret KS. (2006). An FGF response pathway that mediates hepatic gene induction in embryonic endoderm cells. *Dev Cell* 11, 339-348.

Serls AE, Doherty S, Parvatiyar P, Wells JM, Deutsch GH. (2005). Different thresholds of fibroblast growth factors pattern the ventral foregut into liver and lung. *Development* 132, 35-47.

Bort R, Signore M, Tremblay K, Martinez Barbera JP, Zaret KS. (2006). Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development. *Dev Biol* 290, 44-56.

Margagliotti S, Clotman F, Pierreux CE, Lemoine P, Rousseau GG, Henriot P, Lemaigre FP. (2008). Role of metalloproteinases at the onset of liver development. *Dev Growth Differ* 50, 331-338.

Si-Tayeb K, Lemaigre FP, Duncan SA. (2010). Organogenesis and development of the liver. *Dev Cell*. 18(2):175-89.

Hunter MP, Wilson CM, Jiang X, Cong R, Vasavada H, Kaestner KH, Bogue CW. (2007). The homeobox gene Hhex is essential for proper hepatoblast differentiation and bile duct morphogenesis. *Dev Biol* 308, 355-367.

Keng VW, Yagi H, Ikawa M, Nagano T, Myint Z, Yamada K, Tanaka T, Sato A, Muramatsu I, Okabe M, Sato M, Noguchi T. (2000). Homeobox gene Hex is essential for onset of mouse embryonic liver development and differentiation of the monocyte lineage. *Biochem Biophys Res Commun* 276, 1155-1161.

Martinez Barbera JP, Clements M, Thomas P, Rodriguez T, Meloy D, Kioussis D, Beddington RS. (2000). The homeobox gene Hex is required in definitive endodermal tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation. *Development* 127, 2433-2445.

Watt AJ, Zhao R, Li J, Duncan SA. (2007). Development of the mammalian liver and ventral pancreas is dependent on GATA-4. *BMC Dev Biol* 7, 37.

Zhao R, Watt AJ, Li J, Luebke-Wheeler J, Morrissey EE, Duncan SA. (2005). GATA-6 is essential for embryonic development of the liver but dispensable for early heart formation. *Mol Cell Biol* 25, 2622-2631.

Sosa-Pineda B, Wigle JT, Oliver G. (2000). Hepatocyte migration during liver development requires Prox1. *Nat Genet* 25, 254-255.

Ludtke TH, Christoffels VM, Petry M, Kispert A. (2009). Tbx3 promotes liver bud expansion during mouse development by suppression of cholangiocyte differentiation. *Hepatology* 49, 969-978.

Margagliotti S, Clotman F, Pierreux CE, Beaudry JB, Jacquemin P, Rousseau GG, Lemaigre FP. (2007). The Onecut transcription factors HNF-6/OC-1 and OC-2 regulate early liver expansion by controlling hepatoblast migration. *Dev Biol* 311, 579-589.

Medico E, Gentile A, Lo Celso C, Williams TA, Gambarotta G, Trusolino L, Comoglio PM. (2001). Osteopontin is an autocrine mediator of hepatocyte growth factor-induced invasive growth. *Cancer Res* 61, 5861-5868.

Papoutsis M, Dudas J, Becker J, Tripodi M, Opitz L, Ramadori G, Wilting J. (2007). Gene regulation by homeobox transcription factor Prox1 in murine hepatoblasts. *Cell Tissue Res* 330, 209-220.

Fassler R, Meyer M. (1995). Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. *Genes Dev* 9, 1896-1908.

Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. (2003). Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 915-925.

Suzuki T, Kanai Y, Hara T, Sasaki J, Sasaki T, Kohara M, Maehama T, Taya C, Shitara H, Yonekawa H, Frohman MA, Yokozeki T, Kanaho Y. (2006). Crucial role of the small GTPase ARF6 in hepatic cord formation during liver development. *Mol Cell Biol* 26, 6149-6156.

McLin VA, Rankin SA, Zorn AM. (2007). Repression of Wnt/beta-catenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development. *Development* 134, 2207-2217.

Tan X, Yuan Y, Zeng G, Apte U, Thompson MD, Cieply B, Stolz DB, Michalopoulos GK, Kaestner KH, Monga SP. (2008). Beta-catenin deletion in hepatoblasts disrupts hepatic morphogenesis and survival during mouse development. *Hepatology* 47, 1667-1679.

Weinstein M, Monga SP, Liu Y, Brodie SG, Tang Y, Li C, Mishra L, Deng CX. (2001). Smad proteins and hepatocyte growth factor control parallel regulatory pathways that converge on beta1-integrin to promote normal liver development. *Mol Cell Biol* 21, 5122-5131.

Tang Y, Katuri V, Dillner A, Mishra B, Deng CX, Mishra L. (2003). Disruption of transforming growth factor-beta signaling in ELF beta-spectrin-deficient mice. *Science* 299, 574-577.

Stenvers KL, Tursky ML, Harder KW, Kountouri N, Amatayakul-Chantler S, Grail D, Small C, Weinberg RA, Sizeland AM, Zhu HJ. (2003). Heart and liver defects and reduced transforming growth factor beta2 sensitivity in transforming growth factor beta type III receptor-deficient embryos. *Mol Cell Biol* 23, 4371-4385.

Ijpenberg A, Perez-Pomares JM, Guadix JA, Carmona R, Portillo-Sanchez V, Macias D, Hohenstein P, Miles CM, Hastie ND, Munoz-Chapuli R. (2007). Wt1 and retinoic acid signaling are essential for stellate cell development and liver morphogenesis. *Dev Biol* 312, 157-170.

Lemaigre FP. (2009). Mechanisms of liver development: concepts for understanding liver disorders and design of novel therapies. *Gastroenterology* 137, 62-79.

Suzuki A, Sekiya S, Buscher D, Izpisua Belmonte JC, Taniguchi H. (2008). Tbx3 controls the fate of hepatic progenitor cells in liver development by suppressing p19^{ARF} expression. *Development* 135, 1589-1595.

Ito Y, Matsui T, Kamiya A, Kinoshita T, Miyajima A. (2000). Retroviral gene transfer of signaling molecules into murine fetal hepatocytes defines distinct roles for the STAT3 and ras pathways during hepatic development. *Hepatology* 32, 1370-1376.

Kamiya A, Kinoshita T, Ito Y, Matsui T, Morikawa Y, Senba E, Nakashima K, Taga T, Yoshida K, Kishimoto T, Miyajima A. (1999). Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *EMBO J* 18, 2127-2136.

Kamiya A, Kinoshita T, Miyajima A. (2001). Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS Lett* 492, 90-94.

Suzuki A, Iwama A, Miyashita H, Nakauchi H, Taniguchi H. (2003). Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. *Development* 130, 2513-2524.

Imamura M, Kojima T, Lan M, Son S, Murata M, Osanai M, Chiba H, Hirata K, Sawada N. (2007). Oncostatin M induces upregulation of claudin-2 in rodent hepatocytes coinciding with changes in morphology and function of tight junctions. *Exp Cell Res* 313, 1951-1962.

Matsui T, Kinoshita T, Morikawa Y, Tohya K, Katsuki M, Ito Y, Kamiya A, Miyajima A. (2002). K-Ras mediates cytokine-induced formation of E-cadherin-based adherens junctions during liver development. *EMBO J* 21, 1021-1030.

Kamiya A, Gonzalez FJ. (2004). TNF-alpha regulates mouse fetal hepatic maturation induced by oncostatin M and extracellular matrices. *Hepatology* 40, 527-536.

Wang ND, Finegold MJ, Bradley A, Ou CN, Abdelsayed SV, Wilde MD, Taylor LR, Wilson DR, Darlington GJ. (1995). Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* 269, 1108-1112.

Timchenko NA, Harris TE, Wilde M, Bilyeu TA, Burgess-Beusse BL, Finegold MJ, Darlington GJ. (1997). CCAAT/enhancer binding protein alpha regulates p21 protein and hepatocyte proliferation in newborn mice. *Mol Cell Biol* 17, 7353-7361.

Parviz F, Matullo C, Garrison WD, Savatski L, Adamson JW, Ning G, Kaestner KH, Rossi JM, Zaret KS, Duncan SA. (2003). Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nat Genet.* 34(3):292-6.

Benhamouche S, Decaens T, Godard C, Chambrey R, Rickman DS, Moinard C, Vasseur-Cognet M, Kuo CJ, Kahn A, Perret C, Colnot S. (2006). Apc tumor suppressor gene is the "zonation-keeper" of mouse liver. *Dev Cell.* 10(6):759-70.

Burke ZD, Reed KR, Phesse TJ, Sansom OJ, Clarke AR, Tosh D. (2009). Liver zonation occurs through a beta-catenin-dependent, c-Myc-independent mechanism. *Gastroenterology* 136, 2316-2324 e2311-2313.

Colletti M, Cicchini C, Conigliaro A, Santangelo L, Alonzi T, Pasquini E, Tripodi M, Amicone L. (2009). Convergence of Wnt signaling on the HNF4alpha-driven transcription in controlling liver zonation. *Gastroenterology* 137, 660-672.

Thomson, JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.

Eckfeldt CE, Mendenhall EM, Verfaillie CM. (2005). The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(9):726-37.

Zeng X, Rao MS. (2007). Human embryonic stem cells: long term stability, absence of senescence and a potential cell source for neural replacement. *Neuroscience* 145, 1348-1358.

Massague J, Seoane J, Wotton D. (2005). Smad transcription factors. *Genes Dev* 19, 2783-2810.

Vallier L, Touboul T, Chng Z, Brimpari M, Hannan N, Millan E, Smithers LE, Trotter M, Rugg-Gunn P, Weber A, Pedersen RA. (2009). Early cell fate decisions of human embryonic stem cells and mouse epiblast stem cells are controlled by the same signalling pathways. *PLoS One*. 4(6):e6082.

Chng Z, Vallier L, Pedersen R. (2011). Activin/Nodal signaling and pluripotency. *Vitam Horm* 85:39-58.

Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K. (2002). Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells* 7, 1191-1204.

D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazar S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE. (2005). Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol* 23, 1534-1541.

Dailey L, Ambrosetti D, Mansukhani A, Basilico C. (2005). Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 233-247.

Xu RH, Peck RM, Li DS, Feng X, Ludwig T, Thomson JA. (2005). Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods* 2, 185-190.

Dravid G, Ye Z, Hammond H, Chen G, Pyle A, Donovan P, Yu X, Cheng L. (2005). Defining the role of Wnt/beta-catenin signaling in the survival, proliferation, and self renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 23, 1489-1501.

Bendall SC, Stewart MH, Menendez P, George D, Vijayaragavan K, Werbowetski-Ogilvie T, Ramos-Mejia V, Rouleau A, Yang J, Bosse M, Lajoie G, Bhatia M. (2007). IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in vitro. *Nature* 448, 1015-1021.

Wang L, Schulz TC, Sherrer ES, Dauphin DS, Shin S, Nelson AM, Ware CB, Zhan M, Song CZ, Chen X, Brimble SN, McLean A, Galeano MJ, Uhl EW, D'Amour KA, Chesnut JD, Rao MS, Blau CA, Robins AJ. (2007). Self-renewal of human embryonic stem cells requires insulin-like growth factor-1 receptor and ERBB2 receptor signaling. *Blood* 110, 4111-4119.

Guenou H, Nissan X, Larcher F, Feteira J, Lemaitre G, Saidani M, Del Rio M, Barrault CC, Bernard FX, Peschanski M, Baldeschi C, Waksman G. (2009). Human

embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. *Lancet* 374, 1745-1753.

Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, Pera MF, Reinhartz E, Itzik A, Ben-Hur T. (2001). Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19, 1134- 1140.

Roy NS, Cleren C, Singh SK, Yang L, Beal MF, Goldman SA. (2006). Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat Med* 12, 1259-1268.

Cooper O, Hargus G, Deleidi M, Blak A, Osborn T, Marlow E, Lee K, Levy A, Perez-Torres E, Yow A, Isacson O. (2010). Differentiation of human ES and Parkinson's disease iPS cells into ventral midbrain dopaminergic neurons requires a high activity form of SHH, FGF8a and specific regionalization by retinoic acid. *Mol Cell Neurosci*. 45(3):258-66.

Cerdan C, Rouleau A, Bhatia M. (2004). VEGF-A165 augments erythropoietic development from human embryonic stem cells. *Blood* 103, 2504-2512.

Galic Z, Kitchen SG, Kacena A, Subramanian A, Burke B, Cortado R, Zack JA. (2006). T lineage differentiation from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11742-11747.

Tomescot A, Leschik J, Bellamy V, Dubois G, Messas E, Bruneval P, Desnos M, Hagege AA, Amit M, Itskovitz J, Menasché P, Pucéat M. (2007). Differentiation in vivo of cardiac committed human embryonic stem cells in postmyocardial infarcted rats. *Stem Cells* 25, 2200-2205.

Shirahashi H, Wu J, Yamamoto N, Catana A, Wege H, Wager B, Okita K, Zern MA. (2004). Differentiation of human and mouse embryonic stem cells along a hepatocyte lineage. *Cell Transplant* 13, 197-211.

Baharvand H, Hashemi SM, Kazemi Ashtiani S, Farrokhi A. (2006). Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro. *Int J Dev Biol* 50, 645-652.

Chiao E, Elazar M, Xing Y, Xiong A, Kmet M, Millan MT, Glenn JS, Wong WH, Baker J. (2008). Isolation and transcriptional profiling of purified hepatic cells derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 26, 2032-2041.

Lavon N, Yanuka O, Benvenisty N. (2004). Differentiation and isolation of hepatic like cells from human embryonic stem cells. *Differentiation* 72, 230-238.

D'Amour KA, Bang AG, Eliazer S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG, Moorman MA, Kroon E, Carpenter MK, Baetge EE. (2006). Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 24, 1392-1401.

Seguin CA, Draper JS, Nagy A, Rossant J. (2008). Establishment of endoderm progenitors by SOX transcription factor expression in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 182-195.

Agarwal S, Holton KL, Lanza R. (2008). Efficient differentiation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 26, 1117-1127.

Basma H, Soto-Gutierrez A, Yannam GR, Liu L, Ito R, Yamamoto T, Ellis E, Carson SD, Sato S, Chen Y, Muirhead D, Navarro-Alvarez N, Wong RJ, Roy-Chowdhury J,

Platt JL, Mercer DF, Miller JD, Strom SC, Kobayashi N, Fox IJ. (2009). Differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived hepatocytes. *Gastroenterology* 136, 990-999.

Cai J, Zhao Y, Liu Y, Ye F, Song Z, Qin H, Meng S, Chen Y, Zhou R, Song X, Guo Y, Ding M, Deng H. (2007). Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology* 45, 1229-1239.

Hay DC, Fletcher J, Payne C, Terrace JD, Gallagher RC, Snoeys J, Black JR, Wojtacha D, Samuel K, Hannoun Z, Pryde A, Filippi C, Currie IS, Forbes SJ, Ross JA, Newsome PN, Iredale JP. (2008a). Highly efficient differentiation of hESCs to functional hepatic endoderm requires ActivinA and Wnt3a signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 12301-12306.

Hay DC, Zhao D, Fletcher J, Hewitt ZA, McLean D, Urruticoechea-Uriquen A, Black JR, Elcombe C, Ross JA, Wolf R, Cui W. (2008b). Efficient differentiation of hepatocytes from human embryonic stem cells exhibiting markers recapitulating liver development in vivo. *Stem Cells* 26, 894-902.

Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, Li J, Battle MA, Duris C, North PE, Dalton S, Duncan SA. (2010). Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology* 51(1):297-305.

Inamura M, Kawabata K, Takayama K, Tashiro K, Sakurai F, Katayama K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. (2011). Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Mol Ther.* 19(2):400-7.

Ishii T, Yasuchika K, Machimoto T, Kamo N, Komori J, Konishi S, Suemori H, Nakatsuji N, Saito M, Kohno K, Uemoto S, Ikai I. (2007). Transplantation of embryonic stem cell-derived endodermal cells into mice with induced lethal liver damage. *Stem Cells.* 25(12):3252-60.

Cerec V, Glaise D, Garnier D, Morosan S, Turlin B, Drenou B, Gripon P, Kremsdorf D, Guguen-Guillouzo C, Corlu A. (2007). Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology.* 45(4):957-67.

Wang Y, Yao HL, Cui CB, Wauthier E, Barbier C, Costello MJ, Moss N, Yamauchi M, Sricholpech M, Gerber D, Lobo EG, Reid LM. (2010). Paracrine signals from mesenchymal cell populations govern the expansion and differentiation of human hepatic stem cells to adult liver fates. *Hepatology.* 52(4):1443-54.

Turner R, Lozoya O, Wang Y, Cardinale V, Gaudio E, Alpini G, Mendel G, Wauthier E, Barbier C, Alvaro D, Reid LM. (2011). Human hepatic stem cell and maturational liver lineage biology. *Hepatology.* 53(3):1035-45.

Goldstein J, Hobbs H, Brown M. (2001). Familial hypercholesterolemia. In *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. Scriver C., Beaudet A., Sly W., Valle D., editors. McGraw-Hill. New York, New York, USA 2863–913.

Müller C. (1938). Xanthomata, hypercholesterolemia, angina pectoris. *Acta Med Scand* 89:75.

Thannhauser SJ, Magendantz H. (1938). The different clinical groups of xanthomatous diseases: A clinical physiological study of 22 cases. *Ann Intern Med*.11:1662.

Khachadurian AK. (1964). The Inheritance Of Essential Familial Hypercholesterolemia. *Am J Med* 37:402-7.

Fredrickson DS, Levy RI, Lees RS. (1967). Fat transport in lipoprotein—An integrated approach to mechanisms and disorders. *N Engl J Med* 276(3) 148-56.

Goldstein JL, Brown MS. (1974). Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem* 249(16):5153-62.

Schneider WJ, Beisiegel U, Goldstein JL, Brown MS. (1982). Purification of the low density lipoprotein receptor, an acidic glycoprotein of 164,000 molecular weight. *J Biol Chem* 257(5):2664-73.

Russell DW, Yamamoto T, Schneider WJ, Slaughter CJ, Brown MS, Goldstein JL. (1983). cDNA cloning of the bovine low density lipoprotein receptor: feedback regulation of a receptor mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(24):7501-5.

Südhof TC, Goldstein JL, Brown MS, Russell DW. (1985). The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science* 228(4701):815-22.

Fass D, Blacklow S, Kim PS, Berger JM. (1997). Molecular basis of familial hypercholesterolaemia from structure of LDL receptor module. *Nature* 388(6643):691-3.

Brown MS, Goldstein JL. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89(3):331-40.

Buja LM, Kovanen PT, Bilheimer DW. (1979). Cellular pathology of homozygous familial hypercholesterolemia. *Am J Pathol* 97(2):327-57.

Kwiterovich PO Jr, Fredrickson DS, Levy RI. (1974). Familial hypercholesterolemia (one form of familial type II hyperlipoproteinemia). A study of its biochemical, genetic and clinical presentation in childhood. *J Clin Invest* 53(5):1237-49.

Brown MS, Goldstein JL. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232(4746):34-47.

Goldstein JL, Brown MS. (1977). The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 46:897-930.

Brown MS, Goldstein JL. (1983). Lipoprotein receptors in the liver. Control signals for plasma cholesterol traffic. *J Clin Invest* 72(3):743-7.

Schneider WJ, Beisiegel U, Goldstein JL, Brown MS. (1982). Purification of the low density lipoprotein receptor, an acidic glycoprotein of 164,000 molecular weight. *J Biol Chem* 257(5):2664-73.

Cummings RD, Kornfeld S, Schneider WJ, Hobgood KK, Tolleshaug H, Brown MS, Goldstein JL. (1983). Biosynthesis of N- and O-linked oligosaccharides of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 258(24):15261-73.

Hobbs HH, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. (1990). The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet* 24:133-70.

Soria LF, Ludwig EH, Clarke HR, Vega GL, Grundy SM, McCarthy BJ. (1989). Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(2):587-91.

Innerarity TL, Mahley RW, Weisgraber KH, Bersot TP, Krauss RM, Vega GL, Grundy SM, Friedl W, Davignon J, McCarthy BJ. (1990). Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 31(8):1337-49.

Varret M, Abifadel M, Rabès JP, Boileau C. (2008). Genetic heterogeneity of autosomal dominant hypercholesterolemia. *Clin Genet* 73(1):1-13.

Abifadel M, Varret M, Rabès JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D, Derré A, Villéger L, Farnier M, Beucier I, Bruckert E, Chambaz J, Chanu B, Lecerf JM, Luc G, Moulin P, Weissenbach J, Prat A, Krempf M, Junien C, Seidah NG, Boileau C. (2003). Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet.* 34(2):154-6.

Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, Stifani S, Basak A, Prat A, Chretien M. (2003). The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(3):928-33.

Li H, Dong B, Park SW, Lee HS, Chen W, Liu J. (2009). Hepatocyte nuclear factor 1alpha plays a critical role in PCSK9 gene transcription and regulation by the natural hypocholesterolemic compound berberine. *J Biol Chem.* 284(42):28885-95

Ouguerram K, Chetiveaux M, Zair Y, Costet P, Abifadel M, Varret M, Boileau C, Magot T, Krempf M. (2004). Apolipoprotein B100 metabolism in autosomal-dominant hypercholesterolemia related to mutations in PCSK9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(8):1448-53.

Khachadurian AK, Uthman SM. (1973). Experiences with the homozygous cases of familial hypercholesterolemia. A report of 52 patients. *Nutr Metab* 15(1):132-40.

Gotthardt M, Trommsdorff M, Nevitt MF, Shelton J, Richardson JA, Stockinger W, Nimpf J, Herz J. (2000). Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction. *J Biol Chem* 275(33):25616-24.

Arca M, Zuliani G, Wilund K, Campagna F, Fellin R, Bertolini S, Calandra S, Ricci G, Glorioso N, Maioli M, Pintus P, Carru C, Cossu F, Cohen J, Hobbs HH. (2002). Autosomal recessive hypercholesterolaemia in Sardinia, Italy, and mutations in ARH: a clinical and molecular genetic analysis. *Lancet* 359(9309):841-7.

Daniels SR, Greer FR; Committee on Nutrition. (2008). Lipid screening and cardiovascular health in childhood. *Pediatrics* 122(1):198-208.

Hashim SA, Vanitallie TB. (1965). Cholestyramine resin therapy for hypercholesterolemia: Clinical and metabolic studies. *JAMA* 192:289-93.

Bays HE, Davidson M, Jones MR, Abby SL. (2006). Effects of colesevelam hydrochloride on low-density lipoprotein cholesterol and high-sensitivity C-reactive protein when added to statins in patients with hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 97, 1198–1205.

Rudling MJ, Reihner E, Einarsson K, Ewerth S, Angelin B. (1990). Low density lipoprotein receptor-binding activity in human tissues: quantitative importance of hepatic receptors and evidence for regulation of their expression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(9):3469-73.

Brorholt-Petersen JU, Jensen HK, Raungaard B, Gregersen N, Faergeman O. (2001). LDL-receptor gene mutations and the hypocholesterolemic response to statin therapy. *Clin Genet* 59(6):397-405.

Goldberg IJ, Holleran S, Ramakrishnan R, Adams M, Palmer RH, Dell RB, Goodman DS. (1990). Lack of effect of lovastatin therapy on the parameters of whole-body cholesterol metabolism. *J Clin Invest* 86(3):801-8.

Bruckert E, Giral P, Tellier P. (2003). Perspectives in cholesterol-lowering therapy: the role of ezetimibe, a new selective inhibitor of intestinal cholesterol absorption. *Circulation*. 107(25):3124-8.

Rader DJ, Cohen J, Hobbs HH. (2003). Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment. *J Clin Invest* 111(12):1795-803.

Wiegman A, Hutten BA, de Groot E, Rodenburg J, Bakker HD, Büller HR, Sijbrands EJ, Kastelein JJ. (2004). Efficacy and safety of statin therapy in children with familial hypercholesterolemia: a randomized controlled trial. *JAMA* 292(3):331-7.

Mabuchi H, Sakai T, Sakai Y, Yoshimura A, Watanabe A, Wakasugi T, Koizumi J, Takeda R. (1983). Reduction of serum cholesterol in heterozygous patients with familial hypercholesterolemia. Additive effects of compactin and cholestyramine. *N Engl J Med* 308(11):609-13.

Guyton JR. (2007). Niacin in cardiovascular prevention: mechanisms, efficacy and safety. *Curr Opin Lipidol* 18, 415–420.

Rosenson RS. (2007). Effects of peroxisome proliferator-activated receptors on lipoprotein metabolism and glucose control in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 99 (Suppl.), 96B–104B.

Chaves FJ, Real JT, García-García AB, Civera M, Armengod ME, Ascaso JF, Carmena R. (2001). Genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia in a South European outbreed population: influence of low-density lipoprotein (LDL) receptor gene mutations on treatment response to simvastatin in total, LDL, and high-density lipoprotein cholesterol. *J Clin Endocrinol Metab* 86(10):4926-32.

Jacobson TA, Armani A, McKenney JM & Guyton JR. (2007). Safety considerations with gastrointestinally active lipid-lowering drugs. *Am J Cardiol* 99 (Suppl.), 47C–55C.

Beil U, Crouse JR, Einarsson K, Grundy SM. (1982). Effects of interruption of the enterohepatic circulation of bile acids on the transport of very low density-lipoprotein triglycerides. *Metabolism* 31(5):438-44.

Bradford RH, Shear CL, Chremos AN, Dujovne C, Downton M, Franklin FA, Gould AL, Hesney M, Higgins J, Hurley DP, et al. (1991). Expanded Clinical Evaluation of Lovastatin (EXCEL) study results. I. Efficacy in modifying plasma lipoproteins and

adverse event profile in 8245 patients with moderate hypercholesterolemia. *Arch Intern Med* 151(1):43-9.

Jones PH, Davidson MH. (2005). Reporting rate of rhabdomyolysis with fenofibrate + statin versus gemfibrozil + any statin. *Am J Cardiol* 95, 120–122.

Soedamah-Muthu SS, Colhoun HM, Thomason MJ, Betteridge DJ, Durrington PN, Hitman GA, Fuller JH, Julier K, Mackness MI, Haw N. (2003). The CARDS investigators. The effect of atorvastatin on serum lipids, lipoproteins and NMR-spectroscopy defined lipoprotein subclasses in type 2 diabetic patients with ischaemic heart disease. *Atherosclerosis* 167, 243–255.

Charlton-Menys V, Durrington PN. (2008). Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. *Exp Physiol*. 2008 Jan;93(1):27-42.

Uauy R, Vega GL, Grundy SM, Bilheimer DM. (1988). Lovastatin therapy in receptor-negative homozygous familial hypercholesterolemia: lack of effect on low-density lipoprotein concentrations or turnover. *J Pediatr* 113(2):387-92.

Bilheimer DW. (1989). Portacaval shunt and liver transplantation in treatment of familial hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis* 9(1 Suppl):158-63.

Postiglione A, Thompson GR. (1985). Experience with plasma-exchange in homozygous familial hypercholesterolaemia. *Prog Clin Biol Res* 188:213-20.

Zwiener RJ, Uauy R, Petruska ML, Huet BA. (1995). Low-density lipoprotein apheresis as long-term treatment for children with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Pediatr* 126(5 Pt 1):728-35.

Szczepiorkowski ZM, Winters JL, Bandarenko N, Kim HC, Linenberger ML, Marques MB, Sarode R, Schwartz J, Weinstein R, Shaz BH; Apheresis Applications Committee of the American Society for Apheresis. (2010). Guidelines on the use of therapeutic apheresis in clinical practice--evidence-based approach from the Apheresis Applications Committee of the American Society for Apheresis. *J Clin Apher* 25(3):83-177.

Starzl TE, Bilheimer DW, Bahnson HT, Shaw BW Jr, Hardesty RL, Griffith BP, Iwatsuki S, Zitelli BJ, Gartner JC Jr, Malatack JJ, et al. (1984). Heart-liver transplantation in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Lancet* 1(8391):1382-3.

Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, Stein EA, Engelhardt JF, Muller D, Lupien PJ, Wilson JM. (1994). Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat Genet* 6(4):335-41.

Cellules souches et choix éthiques-Rapport au Premier ministre de Pierre-Louis FAGNIEZ, député, 2006.

Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, Glaise D, Morel F, Guguen-Guillouzo C. (2007). The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem Biol Interact*. 168(1):66-73.

Guguen-Guillouzo C, Corlu A, Guillouzo A. (2010). Stem cell-derived hepatocytes and their use in toxicology. *Toxicology*. 270(1):3-9.

Yamanaka S, Blau HM. (2010). Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 465(7299):704-12.

Briggs R, King TJ. (1952). Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 38(5):455-63.

Bromhall JD. (1975). Nuclear transplantation in the rabbit egg. *Nature* 258(5537):719-22.

Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-813.

Thuan NV, Kishigami S, Wakayama T. (2010). How to improve the success rate of mouse cloning technology. *J. Reprod. Dev* 56, 20–30.

Miller RA, Ruddle FH. (1976). Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids. *Cell* 9(1):45-55.

Schneuwly S, Klemenz R, Gehring WJ. (1987). Redesigning the body plan of *Drosophila* by ectopic expression of the homoeotic gene *Antennapedia*. *Nature* 325, 816–818.

Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51, 987–1000.

Takahashi K, Yamanaka S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.

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.

Yu J, Vodianik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917–1920.

Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122(6):947-56.

Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang W, Chen X, Bourque G, George J, Leong B, Liu J, Wong KY, Sung KW, Lee CW, Zhao XD, Chiu KP, Lipovich L, Kuznetsov VA, Robson P, Stanton LW, Wei CL, Ruan Y, Lim B, Ng HH. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 38(4):431-40.

Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Araújo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, Ko K, Ruau D, Ehrich M, van den Boom D, Meyer J, Hübner K, Bernemann C, Ortmeier C, Zenke M, Fleischmann BK, Zaehres H, Schöler HR. (2009). Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* 136(3):411-9.

Heng JC, Feng B, Han J, Jiang J, Kraus P, Ng JH, Orlov YL, Huss M, Yang L, Lufkin T, Lim B, Ng HH. (2010). The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells. *Cell Stem Cell* 6(2):167-74.

Gidekel S, Pizov G, Bergman Y, Pikarsky E. (2003). Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant. *Cancer Cell*. 4(5):361-70.

Schoenhals M, Kassambara A, De Vos J, Hose D, Moreaux J, Klein B. (2009). Embryonic stem cell markers expression in cancers. *Biochem Biophys Res Commun.* 383(2):157-62.

Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, Robson P. (2005). Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem* 280(26):24731-7.

Gangemi RM, Griffiero F, Marubbi D, Perera M, Capra MC, Malatesta P, Ravetti GL, Zona GL, Daga A, Corte G. (2009). SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem Cells.* 27(1):40-8.

Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26(1):101-6.

Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, Egli D, Loh KM, Carter AC, Di Giorgio FP, Koszka K, Huangfu D, Akutsu H, Liu DR, Rubin LL, Eggan K. (2009). A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell* 5(5):491-503.

Hanke JH, Gardner JP, Dow RL, Changelian PS, Brissette WH, Weringer EJ, Pollok BA, Connelly PA. (1996). Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem* 271(2):695-701.

Chambers I, Silva J, Colby D, Nichols J, Nijmeijer B, Robertson M, Vrana J, Jones K, Grotewold L, Smith A. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* 450(7173):1230-4.

Vallier L, Mendjan S, Brown S, Chng Z, Teo A, Smithers LE, Trotter MW, Cho CH, Martinez A, Rugg-Gunn P, Brons G, Pedersen RA. (2009). Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression. *Development* 136(8):1339-49.

Yamanaka S. (2007). Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 1(1):39-49.

Rowland BD, Bernards R, Peeper DS. (2005). The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nat Cell Biol.* 7(11):1074-82.

Feng B, Jiang J, Kraus P, Ng JH, Heng JC, Chan YS, Yaw LP, Zhang W, Loh YH, Han J, Vega VB, Cacheux-Rataboul V, Lim B, Lufkin T, Ng HH. (2009). Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nat Cell Biol* 11(2):197-203.

Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. (2007). Generation of germline competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448: 313–317.

Peng S, Maihle NJ, Huang Y. (2010). Pluripotency factors Lin28 and Oct4 identify a sub-population of stem cell-like cells in ovarian cancer. *Oncogene.* 29(14):2153-9.

Zhong X, Li N, Liang S, Huang Q, Coukos G, Zhang L. (2010). Identification of microRNAs regulating reprogramming factor LIN28 in embryonic stem cells and cancer cells. *J Biol Chem.* 285(53):41961-71.

Lin YL, Han ZB, Xiong FY, Tian LY, Wu XJ, Xue SW, Zhou YR, Deng JX, Chen HX. (2011). Malignant transformation of 293 cells induced by ectopic expression of human Nanog. *Mol Cell Biochem.* 351(1-2):109-16.

Viswanathan SR, Powers JT, Einhorn W, Hoshida Y, Ng TL, Toffanin S, O'Sullivan M, Lu J, Phillips LA, Lockhart VL, Shah SP, Tanwar PS, Mermel CH, Beroukhi R, Azam M, Teixeira J, Meyerson M, Hughes TP, Llovet JM, Radich J, Mullighan CG, Golub TR, Sorensen PH, Daley GQ. (2009). Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nat Genet.* 2009 Jul;41(7):843-8.

Shi Y, Desponts C, Do JT, Hahm HS, Schöler HR, Ding S. (2008). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell.* 3(5):568-74.

Kubicek S, O'Sullivan RJ, August EM, Hickey ER, Zhang Q, Teodoro ML, Rea S, Mechtler K, Kowalski JA, Homon CA, Kelly TA, Jenuwein T. (2007). Reversal of H3K9me2 by a small-molecule inhibitor for the G9a histone methyltransferase. *Mol Cell* 25(3):473-81.

Feldman N, Gerson A, Fang J, Li E, Zhang Y, Shinkai Y, Cedar H, Bergman Y. (2006). G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nat Cell Biol* 8(2):188-94.

Schramm M, Thomas G, Towart R, Franckowiak G. (1983). Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of Ca²⁺ channels. *Nature* 303(5917):535-7.

Tosti E. (2006). Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. *Reprod Biol Endocrinol* 4, 26.

Heo JS, Lee YJ, Han HJ. (2006). EGF stimulates proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of Ca²⁺ influx and p44/42 MAPKs. *Am. J. Physiol. Cell Physiol* 290, C123–C133.

Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, Muhlestein W, Melton DA. (2008). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 26(11):1269-75.

Li W, Wei W, Zhu S, Zhu J, Shi Y, Lin T, Hao E, Hayek A, Deng H, Ding S. (2009). Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell* 4(1):16-9.

Anokye-Danso F, Trivedi CM, Jühr D, Gupta M, Cui Z, Tian Y, Zhang Y, Yang W, Gruber PJ, Epstein JA, Morrissey EE. (2011). Highly Efficient miRNA-Mediated Reprogramming of Mouse and Human Somatic Cells to Pluripotency. *Cell Stem Cell.* 8(4):376-88.

Judson RL, Babiarz JE, Venere M, Blueloch R. (2009). Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol.* 27(5):459-61.

Card DA, Hebbar PB, Li L, Trotter KW, Komatsu Y, Mishina Y, Archer TK. (2008). Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* 28(20):6426-38.

Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ. (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature.* 451(7175):141-6.

Ramji DP, Foka P. (2002). CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* 365(Pt 3):561-75.

Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, Carey BW, Beard C, Wernig M, Creighton MP, Steine EJ, Cassady JP, Foreman R, Lengner CJ, Dausman JA, Jaenisch R. (2008). Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* 133(2):250-64.

Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, Stadtfeld M, Yachechko R, Tchieu J, Jaenisch R, Plath K, Hochedlinger K. (2007). Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 1(1):55-70.

Tsai SY, Clavel C, Kim S, Ang YS, Grisanti L, Lee DF, Kelley K, Rendl M. (2010). Oct4 and klf4 reprogram dermal papilla cells into induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 28: 221–228.

Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V, Arauzo-Bravo MJ, Ruau D, Han DW, Zenke M, Schöler HR. (2008). Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 454: 646–650.

Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE, Jaenisch R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448: 318–324.

Lei H, Oh SP, Okano M, Juttermann R, Goss KA, Jaenisch R, Li E. (1996). De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development* 122: 3195–3205.

Matsui T, Leung D, Miyashita H, Maksakova IA, Miyachi H, Kimura H, Tachibana M, Lorincz MC, Shinkai Y. (2010). Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature* 464: 927–931.

Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, Ku M, Wernig M, Schorderet P, Bernstein BE, Jaenisch R, Lander ES, Meissner A. (2008). Dissecting direct reprogramming through integrative genomic Analysis. *Nature* 454: 49–55.

Sridharan R, Tchieu J, Mason MJ, Yachechko R, Kuoy E, Horvath S, Zhou Q, Plath K. (2009). Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. *Cell* 136: 364–377.

Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, Svendsen CN. (2009). Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457(7227):277-80.

Sun N, Panetta NJ, Gupta DM, Wilson KD, Lee A, Jia F, Hu S, Cherry AM, Robbins RC, Longaker MT, Wu JC. (2009). Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(37):15720-5.

Carey BW, Markoulaki S, Hanna J, Saha K, Gao Q, Mitalipova M, Jaenisch R. (2009). Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci* 106: 157–162.

Sommer CA, Stadtfeld M, Murphy GJ, Hochedlinger K, Kotton DN, Mostoslavsky G. (2009). Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells* 27: 543–549.

Brambrink T, Foreman R, Welstead GG, Lengner CJ, Wernig M, Suh H, Jaenisch R. (2008). Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* 2: 151–159.

Sommer CA, Sommer AG, Longmire TA, Christodoulou C, Thomas DD, Gostissa M, Alt FW, Murphy GJ, Kotton DN, Mostoslavsky G. (2010). Excision of reprogramming transgenes improves the differentiation potential of iPS cells generated with a single excisable vector. *Stem Cells* 28: 64–74.

Maherali N, Ahfeldt T, Rigamonti A, Utikal J, Cowan C, Hochedlinger K. (2008). A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 3(3):340–345.

Stadtfield M, Brennand K, Hochedlinger K. (2008). Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr Biol* 18(12):890-4.

Eminli S, Foudi A, Stadtfield M, Maherali N, Ahfeldt T, Mostoslavsky G, Hock H, Hochedlinger K. (2009). Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat Genet* 41(9):968-76.

Hockemeyer D, Soldner F, Cook EG, Gao Q, Mitalipova M, Jaenisch R. (2008). A drug-inducible system for direct reprogramming of human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 3: 346–353.

Stadtfield M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322: 945–949.

Zhou W, Freed CR. (2009). Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27: 2667–2674.

Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. (2009). 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* 85: 348–362.

Nishimura K, Sano M, Ohtaka M, Furuta B, Umemura Y, Nakajima Y, Ikehara Y, Kobayashi T, Segawa H, Takayasu S, Sato H, Motomura K, Uchida E, Kanayasu-Toyoda T, Asashima M, Nakauchi H, Yamaguchi T, Nakanishi M. (2011). Development of defective and persistent sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. *J Biol Chem* 286(6):4760-71.

Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322: 949–953.

Si-Tayeb K, Noto FK, Sepac A, Sedlic F, Bosnjak ZJ, Lough JW, Duncan SA. (2010). Generation of human induced pluripotent stem cells by simple transient transfection of plasmid DNA encoding reprogramming factors. *BMC Dev Biol.* 10:81.

Jia F, Wilson KD, Sun N, Gupta DM, Huang M, Li Z, Panetta NJ, Chen ZY, Robbins RC, Kay MA, Longaker MT, Wu JC. (2010). A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat Methods* 7: 197–199.

Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324: 797–801.

Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K. (2009). Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458: 771–775.

Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, Hargus G, Blak A, Cooper O, Mitalipova M, Isacson O, Jaenisch R. (2009). Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 136(5):964-77.

Yusa K, Rad R, Takeda J, Bradley A. (2009). Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat Methods* 6: 363–369.

Stadtfield M, Hochedlinger K. (2009). Without a trace? PiggyBac-ing toward pluripotency. *Nat Methods* 6(5):363-9.

Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Schöler HR, Duan L, Ding S. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4(5):381-4.

Cho HJ, Lee CS, Kwon YW, Paek JS, Lee SH, Hur J, Lee EJ, Roh TY, Chu IS, Leem SH, Kim Y, Kang HJ, Park YB, Kim HS. (2010). Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation. *Blood* 116(3):386-95.

Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, Kim KS. (2009). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4(6):472-6.

Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, Daley GQ, Brack AS, Collins JJ, Cowan C, Schlaeger TM, Rossi DJ. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7(5):618-30.

Maherali N, Hochedlinger K. (2008). Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 3(6):595-605.

Haase A, Olmer R, Schwanke K, Wunderlich S, Merkert S, Hess C, Zweigerdt R, Gruh I, Meyer J, Wagner S, Maier LS, Han DW, Glage S, Miller K, Fischer P, Schöler HR, Martin U. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. *Cell Stem Cell* 2;5(4):434-41.

Giorgetti A, Montserrat N, Aasen T, Gonzalez F, Rodríguez-Pizà I, Vassena R, Raya A, Boué S, Barrero MJ, Corbella BA, Torrabadella M, Veiga A, Izpisua Belmonte JC. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell Stem Cell* 2;5(4):353-7.

Sugii S, Kida Y, Kawamura T, Suzuki J, Vassena R, Yin YQ, Lutz MK, Berggren WT, Izpisua Belmonte JC, Evans RM. (2010). Human and mouse adipose-derived cells support feeder-independent induction of pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 107: 3558–3563.

Kim JB, Greber B, Araúzo-Bravo MJ, Meyer J, Park KI, Zaehres H, Schöler HR. (2009). Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 461: 649–643.

Chang MY, Kim D, Kim CH, Kang HC, Yang E, Moon JI, Ko S, Park J, Park KS, Lee KA, Hwang DY, Chung Y, Lanza R, Kim KS. (2010). Direct Reprogramming of Rat

Neural Precursor Cells and Fibroblasts into Pluripotent Stem Cells. *PLoS One* 5(3): e9838.

Utikal J, Maherali N, Kulalert W, Hochedlinger K. (2009). Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci* 122: 3502–3510.

Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilić J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boué S, Izpisua Belmonte JC. (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 26(11):1276-84.

Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Chiba T, Yamanaka S. (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 321:699–702.

Li W, Wei W, Zhu S, Zhu J, Shi Y, Lin T, Hao E, Hayek A, Deng H, Ding S. (2009). Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell* 4: 16–19.

Li C, Zhou J, Shi G, Ma Y, Yang Y, Gu J, Yu H, Jin S, Wei Z, Chen F, Jin Y. (2009). Pluripotency can be rapidly and efficiently induced in human amniotic fluid-derived cells. *Hum Mol Genet* 18(22):4340-9.

Liao J, Cui C, Chen S, Ren J, Chen J, Gao Y, Li H, Jia N, Cheng L, Xiao H, Xiao L. (2009). Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells. *Cell Stem Cell* 4(1):11-5.

Esteban MA, Xu J, Yang J, Peng M, Qin D, Li W, Jiang Z, Chen J, Deng K, Zhong M, Cai J, Lai L, Pei D. (2009). Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig. *J Biol Chem* 284(26):17634-40.

Bao L, He L, Chen J, Wu Z, Liao J, Rao L, Ren J, Li H, Zhu H, Qian L, Gu Y, Dai H, Xu X, Zhou J, Wang W, Cui C, Xiao L. (2011). Reprogramming of ovine adult fibroblasts to pluripotency via drug-inducible expression of defined factors. *Cell Res*.

Wu Y, Zhang Y, Mishra A, Tardif SD, Hornsby PJ. (2010). Generation of induced pluripotent stem cells from newborn marmoset skin fibroblasts. *Stem Cell Res* 4(3):180-8.

Liu H, Zhu F, Yong J, Zhang P, Hou P, Li H, Jiang W, Cai J, Liu M, Cui K, Qu X, Xiang T, Lu D, Chi X, Gao G, Ji W, Ding M, Deng H. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell* 3(6):587-90.

Wernig M, Meissner A, Cassady JP, Jaenisch R. (2008). c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2: 10–12.

Liu H, Ye Z, Kim Y, Sharkis S, Jang YY. (2010). Generation of endoderm-derived human induced pluripotent stem cells from primary hepatocytes. *Hepatology* 51: 1810–1819.

Stadtfield M, Maherali N, Breault DT, Hochedlinger K. (2008). Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell* 2: 230–240.

Marion RM, Strati K, Li H, Tejera A, Schoeftner S, Ortega S, Serrano M, Blasco MA. (2009). Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 4(2):141-54.

Zhao XY, Li W, Lv Z, Liu L, Tong M, Hai T, Hao J, Guo CL, Ma QW, Wang L, Zeng F, Zhou Q. (2009). iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature* 461(7260):86-90.

Tchieu J, Kuoy E, Chin MH, Trinh H, Patterson M, Sherman SP, Aimiwu O, Lindgren A, Hakimian S, Zack JA, Clark AT, Pyle AD, Lowry WE, Plath K. (2010). Female human iPSCs retain an inactive X chromosome. *Cell Stem Cell* 7(3):329-42.

Guenther MG, Frampton GM, Soldner F, Hockemeyer D, Mitalipova M, Jaenisch R, Young RA. (2010). Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 7(2):249-57.

Newman AM, Cooper JB. (2010). Lab-specific gene expression signatures in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 258–262.

Chin MH, Mason MJ, Xie W, Volinia S, Singer M, Peterson C, Ambartsumyan G, Aimiwu O, Richter L, Zhang J, Khvorostov I, Ott V, Grunstein M, Lavon N, Benvenisty N, Croce CM, Clark AT, Baxter T, Pyle AD, Teitell MA, Pelegriani M, Plath K, Lowry WE. (2009). Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell* 5(1):111-23.

Marchetto MC, Yeo GW, Kainohana O, Marsala M, Gage FH, Muotri AR. (2009). Transcriptional signature and memory retention of human-induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 4(9):e7076.

Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, Kim J, Aryee MJ, Ji H, Ehrlich LI, Yabuuchi A, Takeuchi A, Cuniff KC, Hongguang H, McKinney-Freeman S, Naveiras O, Yoon TJ, Irizarry RA, Jung N, Seita J, Hanna J, Murakami P, Jaenisch R, Weissleder R, Orkin SH, Weissman IL, Feinberg AP, Daley GQ. (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467(7313):285-90.

Polo JM, Liu S, Figueroa ME, Kulalert W, Eminli S, Tan KY, Apostolou E, Stadtfeld M, Li Y, Shioda T, Natesan S, Wagers AJ, Melnick A, Evans T, Hochedlinger K. (2010). Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 28(8):848-55.

Lister R, Pelizzola M, Kida YS, Hawkins RD, Nery JR, Hon G, Antosiewicz-Bourget J, O'Malley R, Castanon R, Klugman S, Downes M, Yu R, Stewart R, Ren B, Thomson JA, Evans RM, Ecker JR. (2011). Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature*. 471(7336):68-73.

Pick M, Stelzer Y, Bar-Nur O, Mayshar Y, Eden A, Benvenisty N. (2009). Clone- and gene-specific aberrations of parental imprinting in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27(11):2686-90.

Murry CE, Keller G. (2008). Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* 132(4):661–680.

Yang D, Zhang ZJ, Oldenburg M, Ayala M, Zhang SC. (2008). Human embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons reverse functional deficit in parkinsonian rats. *Stem Cells* 26(1):55–63.

Kim JH, Auerbach JM, Rodríguez-Gómez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sánchez-Pernaute R, Bankiewicz K, McKay R. (2002). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 418(6893):50-6.

Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R. (2007). Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 318(5858):1920-3.

Raya A, Rodríguez-Pizà I, Guenechea G, Vassena R, Navarro S, Barrero MJ, Consiglio A, Castellà M, Río P, Sleep E, González F, Tiscornia G, Garreta E, Aasen T, Veiga A, Verma IM, Surrallés J, Bueren J, Izpisua Belmonte JC. (2009). Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 460(7251):53-9.

Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, Constantine-Paton M, Isacson O, Jaenisch R. (2008). Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(15):5856-61.

Xu D, Alipio Z, Fink LM, Adcock DM, Yang J, Ward DC, Ma Y. (2009). Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(3):808-13.

Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Yamada S, Perez-Terzic C, Ikeda Y, Terzic A. (2009). Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. *Circulation* 120(5):408-16.

Montini E, Cesana D, Schmidt M, Sanvito F, Bartholomae CC, Ranzani M, Benedicenti F, Sergi LS, Ambrosi A, Ponzoni M, Doglioni C, Di Serio C, von Kalle C, Naldini L. (2009). The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy. *J Clin Invest*. 119(4):964-75.

Rubin LL. (2008). Stem cells and drug discovery: the beginning of a new era? *Cell* 132(4):549-52.

Lee G, Papapetrou EP, Kim H, Chambers SM, Tomishima MJ, Fasano CA, Ganat YM, Menon J, Shimizu F, Viale A, Tabar V, Sadelain M, Studer L. (2009). Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 461(7262):402-6.

Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321(5893):1218-21.

Carvajal-Vergara X, Sevilla A, D'Souza SL, Ang YS, Schaniel C, Lee DF, Yang L, Kaplan AD, Adler ED, Rozov R, Ge Y, Cohen N, Edelmann LJ, Chang B, Waghray A, Su J, Pardo S, Lichtenbelt KD, Tartaglia M, Gelb BD, Lemischka IR. (2010). Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature* 465(7299):808-12.

Maehr R, Chen S, Snitow M, Ludwig T, Yagasaki L, Goland R, Leibel RL, Melton DA. (2009). Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(37):15768-73.

Moretti A, Bellin M, Welling A, Jung CB, Lam JT, Bott-Flügel L, Dorn T, Goedel A, Höhnke C, Hofmann F, Seyfarth M, Sinnecker D, Schömig A, Laugwitz KL. (2010). Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl J Med* 363(15):1397-409.

Tolar J, Park IH, Xia L, Lees CJ, Peacock B, Webber B, McElmurry RT, Eide CR, Orchard PJ, Kyba M, Osborn MJ, Lund TC, Wagner JE, Daley GQ, Blazar BR. (2011). Hematopoietic differentiation of induced pluripotent stem cells from patients with mucopolysaccharidosis type I (Hurler syndrome). *Blood* 117(3):839-47.

Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch MW, Cowan C, Hochedlinger K, Daley GQ. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134(5):877-86.

Saha K, Jaenisch R. (2009). Technical challenges in using human induced pluripotent stem cells to model disease. *Cell Stem Cell* 5, 584–595.

Sterling RK, Fisher RA. (2001). Liver transplantation. Living donor, hepatocyte, and xenotransplantation. *Clin Liver Dis* 5, 431-460, vii.

Soltys KA, Soto-Gutiérrez A, Nagaya M, Baskin KM, Deutsch M, Ito R, Shneider BL, Squires R, Vockley J, Guha C, Roy-Chowdhury J, Strom SC, Platt JL, Fox IJ. (2010). Barriers to the successful treatment of liver disease by hepatocyte transplantation. *J Hepatol.* 53(4):769-74.

Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, Dorko K, Sauter BV, Strom SC. (1998). Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med.* 338(20):1422-6.

Waelzlein JH, Puppi J, Dhawan A. (2009). Hepatocyte transplantation for correction of inborn errors of metabolism. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 18(6):481-8.

Muraca M, Gerunda G, Neri D, Vilei MT, Granato A, Feltracco P, Meroni M, Giron G, Burlina AB. (2002). Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a. *Lancet.* 359(9303):317-8.

Stéphenne X, Najimi M, Sibille C, Nassogne MC, Smets F, Sokal EM. (2006). Sustained engraftment and tissue enzyme activity after liver cell transplantation for argininosuccinate lyase deficiency. *Gastroenterology.* 130(4):1317-23.

Puppi J, Strom SC, Hughes RD, Bansal S, Castell JV, Dagher I, Ellis EC, Nowak G, Ericzon BG, Fox IJ, Gómez-Lechón MJ, Guha C, Gupta S, Mitry RR, Ohashi K, Ott M, Reid LM, Roy-Chowdhury J, Sokal E, Weber A, Dhawan A. (2011). Improving the Techniques for Human Hepatocyte Transplantation: Report from a Consensus Meeting in London. *Cell Transplant.*

Donato MT, Lahoz A, Montero S, Bonora A, Pareja E, Mir J, Castell JV, Gómez-Lechón MJ. (2008). Functional assessment of the quality of human hepatocyte preparations for cell transplantation. *Cell Transplant.* 17(10-11):1211-9.

Bhogal RH, Afford SC. (2010). Factors affecting hepatocyte isolation, engraftment, and replication in an in vivo model. *Liver Transpl.* 16(12):1444.

Terry C, Dhawan A, Mitry RR, Lehec SC, Hughes RD. (2010). Optimization of the cryopreservation and thawing protocol for human hepatocytes for use in cell transplantation. *Liver Transpl.* 16(2):229-37.

Bonora-Centelles A, Donato MT, Lahoz A, Pareja E, Mir J, Castell JV, Gómez-Lechón MJ. (2010). Functional characterization of hepatocytes for cell transplantation: customized cell preparation for each receptor. *Cell Transplant.* 19(1):21-8.

Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, Stein EA, Engelhardt JF, Muller D, Lupien PJ, Wilson JM. (1994). Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat Genet.* 6(4):335-41.

Koenig S, Stoesser C, Krause P, Becker H, Markus PM. (2005). Liver repopulation after hepatocellular transplantation: integration and interaction of transplanted hepatocytes in the host. *Cell Transplant.* 14(1):31-40.

Gupta S, Rajvanshi P, Lee CD. (1995). Integration of transplanted hepatocytes into host liver plates demonstrated with dipeptidyl peptidase IV-deficient rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(13):5860-4.

Gupta S, Rajvanshi P, Sokhi R, Slehria S, Yam A, Kerr A, Novikoff PM. (1999). Entry and integration of transplanted hepatocytes in rat liver plates occur by disruption of hepatic sinusoidal endothelium. *Hepatology.* 29(2):509-19.

Andreoletti M, Loux N, Vons C, Nguyen TH, Lorand I, Mahieu D, Simon L, Di Rico V, Vingert B, Chapman J, Briand P, Schwall R, Hamza J, Capron F, Bargy F, Franco D, Weber A. (2001). Engraftment of autologous retrovirally transduced hepatocytes after intraportal transplantation into nonhuman primates: implication for ex vivo gene therapy. *Hum Gene Ther.* 12(2):169-79.

Vons C, Loux N, Simon L, Mahieu-Caputo D, Dagher I, Andreoletti M, Borgnon J, Di Rico V, Bargy F, Capron F, Weber A, Franco D. (2001). Transplantation of hepatocytes in nonhuman primates: a preclinical model for the treatment of hepatic metabolic diseases. *Transplantation.* 72(5):811-8.

Grompe M. (2006). Principles of therapeutic liver repopulation. *J Inherit Metab Dis.* 29(2-3):421-5.

Laconi E, Oren R, Mukhopadhyay DK, Hurston E, Laconi S, Pani P, Dabeva MD, Shafritz DA. (1998). Long-term, near-total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine. *Am J Pathol.* 153(1):319-29.

De Vree JM, Ottenhoff R, Bosma PJ, Smith AJ, Aten J, Oude Elferink RP. (2000). Correction of liver disease by hepatocyte transplantation in a mouse model of progressive familial intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology.* 119(6):1720-30.

Overturf K, Al-Dhalimy M, Manning K, Ou CN, Finegold M, Grompe M. (1998). Ex vivo hepatic gene therapy of a mouse model of Hereditary Tyrosinemia Type I. *Hum Gene Ther.* 9(3):295-304.

Overturf K, Al-Dhalimy M, Tanguay R, Brantly M, Ou CN, Finegold M, Grompe M. (1996). Hepatocytes corrected by gene therapy are selected in vivo in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. *Nat Genet.* 12(3):266-73.

Sandgren EP, Palmiter RD, Heckel JL, Daugherty CC, Brinster RL, Degen JL. (1991). Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. *Cell.* 66(2):245-56.

Rhim JA, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, Brinster RL. (1994). Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science*. 263(5150):1149-52.

Rhim JA, Sandgren EP, Palmiter RD, Brinster RL. (1995). Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92(11):4942-6.

Suzuki A, Zheng YW, Kaneko S, Onodera M, Fukao K, Nakauchi H, Taniguchi H. (2002). Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. *J Cell Biol*. 156(1):173-84.

Dan YY, Riehle KJ, Lazaro C, Teoh N, Haque J, Campbell JS, Fausto N. (2006). Isolation of multipotent progenitor cells from human fetal liver capable of differentiating into liver and mesenchymal lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(26):9912-7.

Mahieu-Caputo D, Allain JE, Branger J, Coulomb A, Delgado JP, Andreoletti M, Mainot S, Frydman R, Leboulch P, Di Santo JP, Capron F, Weber A. (2004). Repopulation of athymic mouse liver by cryopreserved early human fetal hepatoblasts. *Hum Gene Ther*. 15(12):1219-28.

Delgado JP, Vanneaux V, Branger J, Touboul T, Sentilhes L, Mainot S, Lainas P, Leclerc P, Uzan G, Mahieu-Caputo D, Weber A. (2009). The role of HGF on invasive properties and repopulation potential of human fetal hepatic progenitor cells. *Exp Cell Res*. 315(19):3396-405.

Cheng K, Benten D, Bhargava K, Inada M, Joseph B, Palestro C, Gupta S. (2009). Hepatic targeting and biodistribution of human fetal liver stem/progenitor cells and adult hepatocytes in mice. *Hepatology*. 50(4):1194-203.

Haridass D, Yuan Q, Becker PD, Cantz T, Iken M, Rothe M, Narain N, Bock M, Nörder M, Legrand N, Wedemeyer H, Weijer K, Spits H, Manns MP, Cai J, Deng H, Di Santo JP, Guzman CA, Ott M. (2009). 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(4):1483-92.

Fausto N, Campbell JS. (2003). The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev*. 120(1):117-30.

Roskams TA, Libbrecht L, Desmet VJ. (2003). Progenitor cells in diseased human liver. *Semin Liver Dis*. 23(4):385-96.

Schmelzer E, Zhang L, Bruce A, Wauthier E, Ludlow J, Yao HL, Moss N, Melhem A, McClelland R, Turner W, Kulik M, Sherwood S, Tallheden T, Cheng N, Furth ME, Reid LM. (2007). Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med*. 204(8):1973-87.

Schmelzer E, Reid LM. (2009). Human telomerase activity, telomerase and telomeric template expression in hepatic stem cells and in livers from fetal and postnatal donors. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 21(10):1191-8.

Zhang L, Theise N, Chua M, Reid LM. (2008). The stem cell niche of human livers: symmetry between development and regeneration. *Hepatology*. 48(5):1598-607.

Amariglio N, Hirshberg A, Scheithauer BW, Cohen Y, Loewenthal R, Trakhtenbrot L, Paz N, Koren-Michowitz M, Waldman D, Leider-Trejo L, Toren A, Constantini S,

Rechavi G. (2009). Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med.* 6(2):e1000029.

Aurich H, Sgodda M, Kaltwasser P, Vetter M, Weise A, Liehr T, Brulport M, Hengstler JG, Dollinger MM, Fleig WE, Christ B. (2009). Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut.* 58(4):570-81.

Sharma AD, Cantz T, Richter R, Eckert K, Henschler R, Wilkens L, Jochheim-Richter A, Arseniev L, Ott M. (2005). Human cord blood stem cells generate human cytokeratin 18-negative hepatocyte-like cells in injured mouse liver. *Am J Pathol.* 167(2):555-64.

Kuo TK, Hung SP, Chuang CH, Chen CT, Shih YR, Fang SC, Yang VW, Lee OK. (2008). Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells. *Gastroenterology.* 134(7):2111-21, 2121.e1-3.

Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kato T, Okochi H, Ochiya T. (2009). Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. *J Gastroenterol Hepatol.* 24(1):70-7.

Okabe M, Tsukahara Y, Tanaka M, Suzuki K, Saito S, Kamiya Y, Tsujimura T, Nakamura K, Miyajima A. (2009). Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse liver. *Development.* 136(11):1951-60.6.

Brulport M, Schormann W, Bauer A, Hermes M, Elsner C, Hammersen FJ, Beerheide W, Spitkovsky D, Härtig W, Nussler A, Horn LC, Edelmann J, Pelz-Ackermann O, Petersen J, Kamprad M, von Mach M, Lupp A, Zulewski H, Hengstler JG. (2007). Fate of extrahepatic human stem and precursor cells after transplantation into mouse livers. *Hepatology.* 46(3):861-70.

Nussler A, König S, Ott M, Sokal E, Christ B, Thasler W, Brulport M, Gabelein G, Schormann W, Schulze M, Ellis E, Kraemer M, Nocken F, Fleig W, Manns M, Strom SC, Hengstler JG. (2006). Present status and perspectives of cell-based therapies for liver diseases. *J Hepatol.* 45(1):144-59.

Vallier L, Touboul T, Brown S, Cho C, Bilican B, Alexander M, Cedervall J, Chandran S, Ahrlund-Richter L, Weber A, Pedersen RA. (2009). Signaling pathways controlling pluripotency and early cell fate decisions of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells.* 27(11):2655-66.

Ruiz S, Panopoulos AD, Herrerias A, Bissig KD, Lutz M, Berggren WT, Verma IM, Izpisua Belmonte JC. (2011). A high proliferation rate is required for cell reprogramming and maintenance of human embryonic stem cell identity. *Curr. Biol.* 21(1): 45-52.

Nienhuis AW, Dunbar CE, Sorrentino BP. (2006). Genotoxicity of retroviral integration in hematopoietic cells. *Mol Ther.* 13(6):1031-49.

Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F,

Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*. 302(5644):415-9.

Howe SJ, Mansour MR, Schwarzwaelder K, Bartholomae C, Hubank M, Kempinski H, Brugman MH, Pike-Overzet K, Chatters SJ, de Ridder D, Gilmour KC, Adams S, Thornhill SI, Parsley KL, Staal FJ, Gale RE, Linch DC, Bayford J, Brown L, Quaye M, Kinnon C, Ancliff P, Webb DK, Schmidt M, von Kalle C, Gaspar HB, Thrasher AJ. (2008). Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest*. 118(9):3143-50.

Stein S, Ott MG, Schultze-Strasser S, Jauch A, Burwinkel B, Kinner A, Schmidt M, Krämer A, Schwäble J, Glimm H, Koehl U, Preiss C, Ball C, Martin H, Göhring G, Schwarzwaelder K, Hofmann WK, Karakaya K, Tchatchou S, Yang R, Reinecke P, Kühlcke K, Schlegelberger B, Thrasher AJ, Hoelzer D, Seger R, von Kalle C, Grez M. (2010). Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat Med*. 16(2):198-204.

Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomae CC, Veres G, Schmidt M, Kutschera I, Vidaud M, Abel U, Dal-Cortivo L, Caccavelli L, Mahlaoui N, Kiermer V, Mittelstaedt D, Bellesme C, Lahlou N, Lefrère F, Blanche S, Audit M, Payen E, Leboulch P, l'Homme B, Bougnères P, Von Kalle C, Fischer A, Cavazzana-Calvo M, Aubourg P. (2009). Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science*. 326(5954):818-23.

Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, Wang G, Hehir K, Fusil F, Down J, Denaro M, Brady T, Westerman K, Cavallese R, Gillet-Legrand B, Caccavelli L, Sgarra R, Maouche-Chrétien L, Bernaudin F, Girot R, Dorazio R, Mulder GJ, Polack A, Bank A, Soulier J, Larghero J, Kabbara N, Dalle B, Gourmel B, Socie G, Chrétien S, Cartier N, Aubourg P, Fischer A, Cornetta K, Galacteros F, Beuzard Y, Gluckman E, Bushman F, Hacein-Bey-Abina S, Leboulch P. (2010). Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia. *Nature*. 467(7313):318-22.

Wang GP, Berry CC, Malani N, Leboulch P, Fischer A, Hacein-Bey-Abina S, Cavazzana-Calvo M, Bushman FD. (2010). Dynamics of gene-modified progenitor cells analyzed by tracking retroviral integration sites in a human SCID-X1 gene therapy trial. *Blood*. 115(22):4356-66.

Martins-Taylor K, Nisler BS, Taapken SM, Compton T, Crandall L, Montgomery KD, Lalande M, Xu RH. (2011). Recurrent copy number variations in human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 29(6):488-91.

Huang P, He Z, Ji S, Sun H, Xiang D, Liu C, Hu Y, Wang X, Hui L. (2011). Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature*.

Fox IJ, Roy-Chowdhury J. (2004). Hepatocyte transplantation. *J Hepatol*. 40(6):878-86.

Ding J, Yannam GR, Roy-Chowdhury N, Hidvegi T, Basma H, Rennard SI, Wong RJ, Avsar Y, Guha C, Perlmutter DH, Fox IJ, Roy-Chowdhury J. (2011). Spontaneous

hepatic repopulation in transgenic mice expressing mutant human α 1-antitrypsin by wild-type donor hepatocytes. *J Clin Invest.* 121(5):1930-4.

Nguyen TH, Birraux J, Wildhaber B, Myara A, Trivin F, Le Coultre C, Trono D, Chardot C. (2006). Ex vivo lentivirus transduction and immediate transplantation of uncultured hepatocytes for treating hyperbilirubinemic Gunn rat. *Transplantation.* 82(6):794-803.

Chowdhury JR, Grossman M, Gupta S, Chowdhury NR, Baker JR Jr, Wilson JM. (1991). Long-term improvement of hypercholesterolemia after ex vivo gene therapy in LDLR-deficient rabbits. *Science.* 254(5039):1802-5.

Grompe M, Laconi E, Shafritz DA. (1999). Principles of therapeutic liver repopulation. *Semin Liver Dis.* 19(1):7-14.

Jiang J, Salido EC, 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(9):1253-60.

Lainas P, Boudechiche L, Osorio A, Coulomb A, Weber A, Pariente D, Franco D, Dagher I. (2008). Liver regeneration and recanalization time course following reversible portal vein embolization. *J Hepatol.* 49(3):354-62.

Dagher I, Nguyen TH, Groyer-Picard MT, Lainas P, Mainot S, Guettier C, Pariente D, Franco D, Weber A. (2009). Efficient hepatocyte engraftment and long-term transgene expression after reversible portal embolization in nonhuman primates. *Hepatology.* 49(3):950-9.

Dagher I, Boudechiche L, Branger J, Coulomb-Lhermine A, Parouchev A, Sentilhes L, Lin T, Groyer-Picard MT, Vons C, Hadchouel M, Pariente D, Andreoletti M, Franco D, Weber A. (2006). Efficient hepatocyte engraftment in a nonhuman primate model after partial portal vein embolization. *Transplantation.* 82(8):1067-73.

Blin G, Nury D, Stefanovic S, Neri T, Guillevic O, Brinon B, Bellamy V, Rücker-Martin C, Barbry P, Bel A, Bruneval P, Cowan C, Pouly J, Mitalipov S, Gouadon E, Binder P, Hagège A, Desnos M, Renaud JF, Menasché P, Pucéat M. (2010). A purified population of multipotent cardiovascular progenitors derived from primate pluripotent stem cells engrafts in postmyocardial infarcted nonhuman primates. *J Clin Invest.* 120(4):1125-39.

Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. (1999). Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(22):12766-71.

Monazahian M, Kippenberger S, Muller A, Seitz H, Bohme I, Grethe S, Thomssen R. (2000). Binding of human lipoproteins (low, very low, high density lipoproteins) to recombinant envelope proteins of hepatitis C virus. *Med Microbiol Immunol.* 188 (4), 177–184.

Chang KS, Jiang J, Cai Z, Luo G. (2007). Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol.* 81 (24), 13783–13793.

ABREVIATIONS

6-OH-DA : 6-hydroxy dopamine
AAT : alpha-1-antitrypsine
ABCA : ATP-binding cassette sub-family A transporter
ABCD1 : ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 1
ACAT : acyl-coenzyme A : cholesterol acyltransferase
ADA : adenosine deaminase
AFP : alpha-fetoprotein
AFSSaPS : agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
Alb : albumine
Alk : activin receptor-like kinase
ALP : alkaline phosphatase
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
APC : adenomatous polyposis coli
Apo : apoprotéine
Arf : ADP ribosylation factor
ASGPR : asialoglycoprotein receptor
BMP : bone morphogenetic protein
BSA : bovin serum albumin
BUGT : bilirubine UDP-glucuronosyltransferase
BVDV : bovine virus diarrhoea virus
CDM : chemically defined medium
CDKN2A : cyclin-dependent kinase 2A
CDX2 : caudal type homeobox transcription factor 2
C/EBP : CCAAT-enhancer binding protein
CERP : cholesterol efflux regulatory protein
CK : cytokératine
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CMI : cellules de la masse interne
CMRL : Connaught medical research laboratories
CN-1 : syndrome de Crigler-Najjar de type 1
CNIL : commission nationale informatique et libertés
CPP : comité de protection des personnes
CREB : CRE recombinase-binding protein
CS-PG : chondroïtin sulfate proteoglycan
CSD : cold shock domains
CXCR4 : C-X-C chemokine receptor type 4
Cyp : cytochrome p450
DID : diabète insulino-dépendant
Dil : 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate
DMEM : Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium
DMSO : diméthyl sulfoxyde
DPPIV : dipeptidyl peptidase IV
DS-PG : dermatan sulfate proteoglycan
DxSDE : Asp-X-Ser-Asp-Glu
EB : embryoid body
EBNA1 : Epstein-Barr nuclear antigen-1
EDNR : endothelin receptor

EF1 α : elongation factor 1 α
 EGF : epidermal growth factor
 EGCG : epigallocatechin gallate
 Elf : E74-like factor
 ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay
 ELTR : european liver transplant registry
 EpCAM : epithelial cell adhesion molecule
 ERK : extracellular signal-regulated kinases
 ESC : embryonic stem cells
 Esrrb : estrogen-related receptor β
 EV1 : ecotropic viral integration site 1
 EVP : embolisation de la veine porte
 FAH : fumarylacétoacétate hydrolase
 FAST : transcription factor FoxH1
 FDB : fibrocystic disease in breast
 FGF : fibroblast growth factor
 FH : familial hypercholesterolaemia
 FISH : fluorescence in situ hybridization
 FLK1 : fetal liver kinase 1
 Fox : forkhead box
 FVIII : facteur VIII
 FXR : farnesoid X receptor
 G6P : glucose 6 phosphate
 GABA : γ -aminobutyric acid
 GAG : glycosaminoglycan
 GATA : facteurs de transcription capables de se lier à la séquence ADN « GATA »
 GBV-C/HGV : GB virus type C/Hepatitis G virus
 GFP : green fluorescent protein
 GMP : good manufacturing practices
 GSD : glycogen storage disease
 GSK : glycogen synthase kinase
 HAT : histone acetyl-transferases
 HDAC : histone deacetylase
 HDL : high density lipoprotein
 HEK293 : Human Embryonic Kidney 293 cells
 Hhex : hematopoetically-expressed homeobox protein
 HGF : hepatocyte growth factor
 HLA : human leucocyte antigen
 HLF : hepatic leukemia factor
 HMGA-2 : high-mobility group AT-hook 2
 HMG-CoA : 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA
 HNF : hepatocyte nuclear factor
 HP-PG : heparin proteoglycan
 HS-PG : heparan sulfate proteoglycan
 hTERT : human telomerase reverse transcriptase
 HuH : human hepatocarcinoma
 ICAM : intercellular adhesion molecule
 IDL : intermediate density lipoprotein
 IDUA : α -L-iduronidase
 IGF : insuline growth factor

IKBKAP : I- κ -B kinase complex associated protein
 IL : interleukine
 iPSC : induced pluripotent stem cells
 ISL1 : islet-1
 IVT : *in vitro* transcription
 KCNQ1 : potassium voltage-gated channel KQT-like subfamily, member 1
 Klf4 : (gut-enriched) Krüppel-like factor 4
 LDL : low density lipoprotein
 LDLRAP1 : low density lipoprotein receptor adapter protein 1
 LMO2 : LIM(Lin11, Isl-1, Mec-3)-domain-only-2
 LRH : liver receptor homolog
 MAPK : mitogen activated protein kinase
 MDR : multidrug resistance gene
 MEF : mouse embryonic fibroblast
 MEF2C : myocyte-specific enhancer factor 2C
 MEK : MAPK/ERK
 MESP1 : mesoderm posterior 1
 MLC : myosin light chain
 Mixl1 : Mix1 homeobox-like1
 MMP : matrix metalloproteases
 MOI : multiplicity of infection
 MSC : mesenchymal stem cells
 MYOCD : myocardin
 NCAM : neural cell-adhesion molecule
 NF1 : nuclear factor 1
 NOD/SCID : nonobese diabetic severe combined immunodeficiency disease
 NPC1 : Niemann-Pick disease type C1
 NR5A2 : nuclear receptor subfamily 5 group A member 2
 OC : oncut
 Oct4/POU5F1 : octamer-binding transcription factor 4/POU (pituitary-specific Pit-1, the octamer-binding proteins Oct-1 and Oct-2, and the neural Unc-86) domain class 5 homeobox 1
 OKSM : combinaison de facteurs de reprogrammation Oct4, Klf4, Sox2 et c-Myc
 ORF : open-reading frame
 ORMES : Oregon rhesus monkey embryonic stem cells
 OSM : oncostatine M
 OSNL : combinaison de facteurs de reprogrammation Oct4, Sox2, Nanog et Lin28
 PDGF : platelet-derived growth factor
 PDX1 : pancreatic and duodenal homeobox 1
 PFP : perforin
 PI3K : phosphoinositide 3-kinase
 PCSK9 : proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
 PEPCCK : phosphoenolpyruvate carboxykinase
 PPAR α : peroxisome proliferator-activated receptor α
 Prox1 : prospero-related homeobox 1
 PTD : phosphotyrosine-binding domain
 PTPN11 : protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
 PVA : polyvinyl alcohol
 PXR : pregnane X receptor
 RAG : recombination activating gene

RepSox : remplacement de Sox2
 RLDL : récepteur aux LDLs
 RPMI : Roswell park memorial institute
 SAHA : suberoylanilide hydroxamic acid
 SBDS : Shwachman-Bodian-Diamond syndrome
 SCNT : somatic cell nuclear transfert
 SeV : Sendai virus
 SLA : sclérose latérale amyotrophique
 Smad : mothers against decapentaplegic
 SMN1 : survival motor neuron 1
 SOD : super-oxide dismutase
 Sox17 : SRY (sex determining region Y)-box 17
 Sp1 : specificity protein 1
 SR : serum replacement
 SRE : sterol regulatory element
 SREBP : sterol regulatory element binding protein
 SSEA : stage specific embryonic antigen
 SV40 : simian vacuolating virus 40
 TAT : tyrosine aminotransferase
 TATA-box : séquence riche en adénine/thymine
 TBX 3 : T-box transcription factor 3
 TGF β : transforming growth factor
 TNF α : tumor necrosis factor
 TRA1-60 : tumor rejection antigen 1
 TSA : trichostatine A
 TTR : transthyretine
 uPA : urokinase-type plasminogen activator
 VLDL : very low density lipoprotein
 VPA : valproic acid
 WHHL : Watanabe Heritable Hyperlipidemic
 Wnt : wingless-type MMTV integration site family
 WT1 : Wilm's Tumor suppressor
 X-CGD : X-linked chronic granulomatous disease
 ZFM : zinc finger motifs

◆ Résumé de la thèse

La transplantation d'hépatocytes représente une alternative à la transplantation hépatique pour le traitement de certaines maladies métaboliques dont l'hypercholestérolémie familiale. Les cellules souches embryonnaires (ES) et les cellules souches pluripotentes induites (iPS) humaines représentent de nouvelles sources de cellules hépatiques. Nous avons mis au point une approche de différenciation des cellules souches humaines en cellules hépatiques et généré ainsi des cellules dérivées de cellules iPS de patients atteints d'hypercholestérolémie familiale.

◆ Mots clés

foie, hépatocytes, cellules souches embryonnaires, cellules souches pluripotentes induites, développement, différenciation, humain, primate, hypercholestérolémie familiale, récepteur aux *Low Density Lipoproteins*, criblage thérapeutique, thérapie génique *ex vivo*.

◆ Laboratoire de rattachement

INSERM U972 - Les cellules souches : de leurs niches à leurs applications thérapeutiques
Hôpital Kremlin-Bicêtre
Bâtiment Gregory Pincus
80, rue du Général Leclerc
94276 Le Kremlin-Bicêtre Cedex, France

PÔLE : PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »

5, rue Jean Baptiste Clément

92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex