

## Efficacité thérapeutique de la repopulation du foie dans un modèle murin d'hypercholestérolémie

Dans un certain nombre de pathologies liées à l'absence ou à l'insuffisance de production d'une protéine ou d'une enzyme, restaurer ne serait-ce que 10-30 % des taux normaux de la protéine ou de l'activité enzymatique suffirait à corriger les conséquences cliniques de ces déficits. C'est le cas dans l'hémophilie A et B, l'afibrinogénémie, les déficits des enzymes du cycle de l'urée, ou encore l'hypercholestérolémie par altération du récepteur des LDL (*Light Density Lipoproteins*). Pour accomplir cette mission, le foie est l'organe privilégié, même si physiologiquement il n'est pas le tissu producteur de la protéine endogène manquante. Néanmoins, la plupart des essais de transfert de gènes, soit utilisant des vecteurs le plus souvent viraux (oncorétrovirus, lentivirus, adénovirus, virus associé à l'adénovirus), ou de l'ADN complexé à des liposomes, se heurtent à deux inconvénients: le faible niveau de transduction des hépatocytes, et/ou le caractère transitoire de l'expression du gène thérapeutique.

Une autre approche thérapeutique consiste à réimplanter dans le foie des hépatocytes de donneurs normaux, ou des hépatocytes génétiquement modifiés *ex vivo*. Une telle stratégie a, par exemple, été bénéfique chez une patiente atteinte d'une maladie de Crigler-Najjar. Il est cependant rare d'obtenir une réelle efficacité thérapeutique, probablement en raison du faible pourcentage d'hépatocytes qui s'implantent et survivent au sein du parenchyme hépatique.

Un nouveau concept, fondé pourtant sur une observation ancienne qui valut à Prométhée un éternel sup-

plice, permet de contourner cette faible efficacité: il faudrait conférer aux hépatocytes porteurs du gène thérapeutique un avantage sélectif tel qu'ils repeupleraient progressivement le foie du receveur. Afin de démontrer la validité de cette approche, deux équipes ont alors utilisé un modèle de foie pathologique exprimant un facteur hépatotoxique (l'urokinase) ou déficient en une enzyme (la fumarylacétoacétate

hydrolase), créant une cytolysé hépatique par accumulation du métabolite précurseur [1, 2]. Si, dans ce contexte, des hépatocytes sont transplantés dans la rate de ces souris, ils migrent dans leur foie, s'y implantent et y prolifèrent spontanément aux dépens des hépatocytes résidents qui, eux, sont détruits par cette cytolysé continue. Néanmoins, ces modèles ne pouvaient être généralisés à d'autres affections. Nous avons

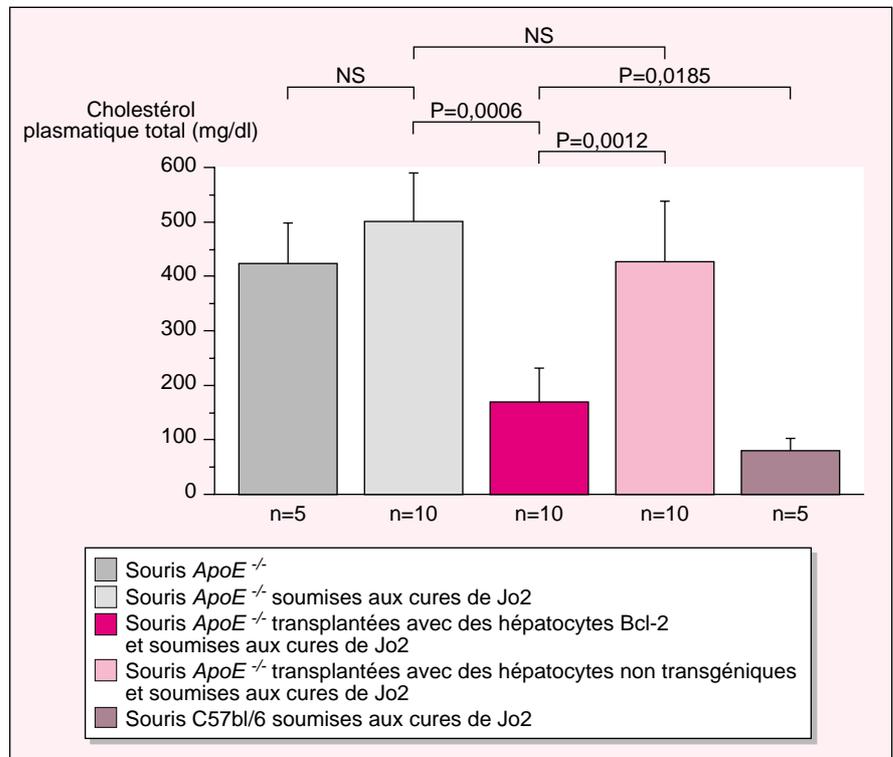


Figure 1. Effet de la repopulation sur les taux de cholestérol plasmatique au moment du sacrifice. Seules les souris ApoE<sup>-/-</sup> transplantées avec des hépatocytes Bcl-2 et traitées avec Jo2 montrent une baisse significative de leur taux de cholestérol.

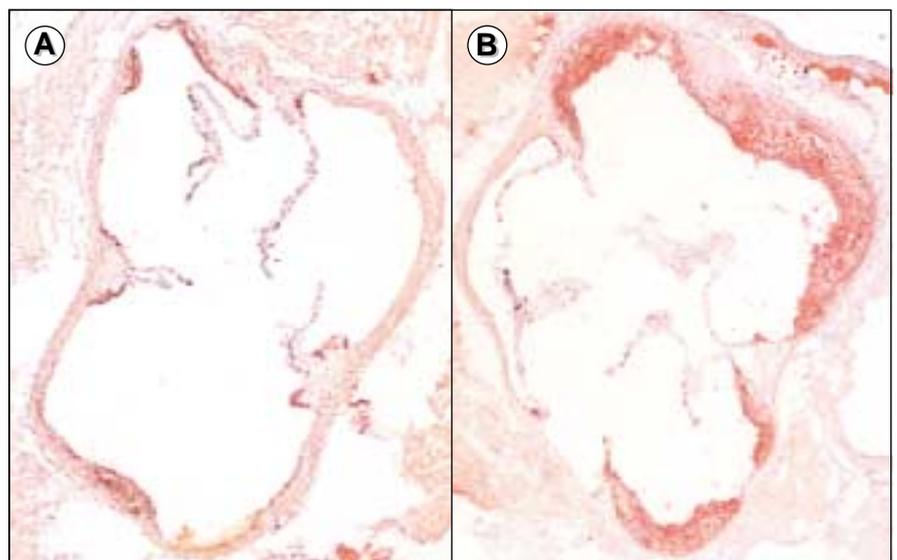
alors décrit une autre stratégie (*m/s*, 1998, n° 10, p. 1147-8), fondée sur la capacité d'hépatocytes exprimant de forts taux de Bcl-2 à résister à une apoptose induite par des cures hebdomadaire de Jo2, l'anticorps agoniste de Fas. Dans ces conditions, le taux maximal de repopulation du foie par les hépatocytes résistants était de 16 % après 8 cures [3]. Afin de démontrer la valeur thérapeutique de notre approche, nous avons appliqué le même protocole à des souris ayant une hypercholestérolémie par déficit en apolipoprotéine E (ApoE) [4]. L'ApoE, majoritairement synthétisée par le foie, intervient dans le métabolisme des lipoprotéines. Les animaux déficients présentent, en dehors d'une hypercholestérolémie sévère (plus de 10 fois la normale) sous régime normal, des lésions d'athérosclérose, semblables à celles observées chez l'homme. Ce modèle animal entre dans la catégorie des affections précédemment citées pour lesquelles une correction même partielle du déficit (10 % de la normale) suffit à corriger, au moins en partie, l'hypercholestérolémie.

Nous avons transplanté dans la rate de souris *ApoE*<sup>-/-</sup> un million d'hépatocytes, soit normaux, soit exprimant le transgène Bcl-2 humain sous la dépendance d'un promoteur, celui du gène de la pyruvate kinase, spécifique du tissu hépatique. Ces hépatocytes expriment constitutivement l'ApoE. Les deux groupes d'animaux ont ensuite été traités de façon hebdomadaire par l'anticorps Jo2 à doses sublétales. Un traitement immunosuppresseur a été administré afin d'éviter le rejet de greffe et la réaction immunologique induite par l'injection itérative de l'anticorps. Après 8 cures d'anticorps Jo2, la contribution des hépatocytes greffés à la repopulation du foie a été appréciée par PCR sur l'ADN extrait du foie des souris et par immunohistochimie. L'expression sérique d'ApoE, le taux de cholestérol plasmatique ainsi que l'évaluation de l'étendue des lésions d'athérosclérose ont constitué les trois critères d'efficacité thérapeutique. Le foie de tous les animaux greffés avec des hépatocytes transgéniques est repeuplé par ces

hépatocytes, jusqu'à un maximum de 30 % et on détecte une expression hépatique et sérique d'ApoE. *A contrario*, aucune expression n'est notée dans le groupe témoin. On note une baisse significative du taux de cholestérol plasmatique chez les animaux traités, en comparaison du groupe témoin (*figure 1*). L'animal présentant le taux maximal de repopulation et dont le taux d'ApoE est équivalent à 29 % du taux normal a même recouvré une valeur normale de cholestérol. De plus, alors que le profil lipidique du groupe témoin reste similaire à celui des animaux *ApoE*<sup>-/-</sup> non traités, celui des animaux ayant reçu des hépatocytes transgéniques pour Bcl-2 présente une diminution importante des VLDL (*very light density lipoproteins*) et des LDL ainsi qu'une augmentation des HDL (*high density lipoproteins*), démontrant que l'ApoE ainsi sécrétée est fonctionnelle. Les lésions d'athérosclérose aortique ont été évaluées chez des animaux ayant reçu le même traitement mais ayant été sacrifiés deux mois après l'arrêt des cures, soit 4 mois après le début du traitement. L'athérosclérose est considérablement diminuée dans le groupe expérimental (plus de deux

fois moins de lésions que dans le groupe témoin) (*figure 2*). Ces résultats apportent donc la preuve de l'efficacité thérapeutique d'une telle approche. Néanmoins, dans la mesure où la transplantation cellulaire est une approche lourde et grevée des inconvénients liés à l'allogreffe, il serait désormais intéressant d'obtenir des résultats équivalents à l'aide d'un vecteur viral transmettant aux hépatocytes à la fois l'avantage sélectif et le gène d'intérêt thérapeutique, délivré directement par voie générale chez l'animal.

En conclusion, cette notion d'avantage sélectif conféré aux cellules transduites constitue vraisemblablement une des approches les plus prometteuses en matière de thérapie génique. Elle permet en effet de compenser la faible efficacité de transduction de la plupart des vecteurs intégratifs, qui constitue le principal facteur limitant l'efficacité des essais cliniques menés à ce jour. La stratégie de thérapie génique utilisée avec succès par le groupe d'A. Fischer chez des enfants atteints de déficits immunitaires combinés sévères (*m/s*, 2000, n° 5, p. 681) utilise aussi cet avantage prolifératif des cellules corrigées *ex-vivo* par rapport aux



**Figure 2. Lésions d'athérosclérose présentes au niveau du sinus aortique des souris *ApoE*<sup>-/-</sup>.** **A.** Coupe représentative de l'aorte d'un animal *ApoE*<sup>-/-</sup> transplanté avec des hépatocytes Bcl-2 et soumis à 8 cures de l'anticorps Jo2, 2 mois après la fin du traitement. **B.** Coupe représentative de l'aorte d'un animal *ApoE*<sup>-/-</sup> transplanté avec des hépatocytes normaux non transgéniques et ayant subi le même traitement.

---

cellules résidentes. Dans le cadre d'atteintes hépatiques ou d'utilisation du foie comme organe de production d'une enzyme, il reste néanmoins une difficulté à surmonter: trouver le couple idéal, utilisable en clinique humaine, capable de conférer un avantage sélectif à des hépatocytes génétiquement modifiés.

- 
1. Overturf K. Hepatocytes corrected by gene therapy are selected *in vivo* in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. *Nat Genet* 1996; 12: 266-73.
  2. Rhim JA, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, Brinster RL. Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science* 1994; 263: 1149-52.
  3. Mignon A, Guidotti JE, Mitchell C *et al.* Selective repopulation of normal mouse liver by Fas:CD95-resistant hepatocytes. *Nat Med* 1998; 4: 1185-8.
  4. Mitchell C, Mignon A, Guidotti JE *et al.* Therapeutic liver repopulation in a mouse model of hypercholesterolemia. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 1597-602.

---

**Claudia Mitchell**  
**Jacques Emmanuel Guidotti**  
**Alexandre Mignon**  
**Hélène Gilgenkrantz**

*Inserm U. 129, ICGM, CHU Cochin,  
24, rue du Faubourg-Saint-  
Jacques, 75014 Paris, France.*

**Alain Tedgui**

*Inserm U. 141, Hôpital Lariboisière,  
41, boulevard de la Chapelle, 75010  
Paris, France.*

**Monique Fabre**

*Hôpital du Kremlin-Bicêtre,  
78, rue du Général-Leclerc, 94275 Le  
Kremlin-Bicêtre Cedex, France.*

---