

Repopulation sélective du foie par des hépatocytes résistants à l'apoptose relayée par Fas/CD95

La transplantation d'hépatocytes pourrait s'avérer une nouvelle alternative à la transplantation hépatique dans un futur proche. Cette technique, récemment testée avec un succès notable chez une jeune fille atteinte de la maladie de Crigler-Najjar [1], aurait de nombreux avantages: elle serait moins difficile sur le plan technique, moins coûteuse et, surtout, un seul foie permettrait de greffer plusieurs receveurs, une avancée non négligeable quand on connaît la cruelle pénurie d'organes [2]. Il est connu depuis quelques années que des hépatocytes injectés dans la pointe de la rate sont capables de migrer dans le courant veineux portal, de s'implanter et de survivre dans les espaces péri-portaux [3]. Une des principales limites de cette approche est le nombre restreint d'hépatocytes qu'on peut transplanter par la veine porte ou même dans la rate.

Deux séries de travaux relativement récentes ont permis de mettre en avant un nouveau concept: celui de la possibilité de repeupler *ad integrum* un foie murin à partir d'un très petit nombre d'hépatocytes présentant un avantage sélectif par rapport aux hépatocytes de l'animal. Dans le premier modèle développé par Brinster et Palmiter (Philadelphie, PN, USA), le gène de l'urokinase est exprimé spécifiquement dans le tissu hépatique de la souris. Cette expression est hépatotoxique et crée un déficit fonctionnel, induisant le foie à se régénérer de façon chronique. L'injection d'hépatocytes normaux congéniques et même xénogéniques (hépatocytes de rat) permet d'observer

un avantage sélectif de ces derniers sur les hépatocytes transgéniques et une repopulation progressive du foie. L'aspect histologique du foie et les constantes biologiques recouvrent tous les critères de la normalité [4, 5]. Le second modèle est un modèle expérimental murin de déficit enzymatique des hépatocytes en fumaryl-acétoacétate-hydrolase (*FAH*^{-/-}), enzyme terminale du métabolisme de la tyrosine, dans lequel l'accumulation intracellulaire de fumarylacétoacétate et de son précurseur, le maléylacétoacétate, induit une cytolysé hépatique (par apoptose) mortelle en l'absence de transplantation hépatique ou de traitement par le NTBC 2-(2-nitro-4-trifluoro-méthylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione). L'équipe de Grompe (Portland, OR, USA) a donc injecté un petit contingent d'hépatocytes syngéniques non mutés chez une souris *FAH*^{-/-}. L'injection d'un nombre aussi restreint que 1000 hépatocytes suffit à obtenir une réversion complète du phénotype et une repopulation du foie à plus de 90 % [6].

A la suite de ces travaux, nous avons fait l'hypothèse qu'on pourrait repeupler des foies normaux par des hépatocytes génétiquement modifiés, ayant un avantage sélectif sur les hépatocytes résidents et proliférant sélectivement à la place de ces derniers après un stimulus de régénération comme celui induit par une substance hépatotoxique. Des souris transgéniques surexprimant le gène humain anti-apoptotique *Bcl-2* dans le foie (qui ne l'exprime pas constitutivement) avaient été créées au laboratoire et présentées dans *m/s*

(*m/s* 1996, n° 1, p. 84); ces souris sont protégées de l'apoptose mortelle induite par Jo2, l'anticorps agoniste de Fas/CD95 [7]. Un tel avantage sélectif a donc été mis à profit pour tenter la repopulation hépatique, à l'instar des deux expériences précédentes, mais, à la différence de celles-ci, d'un foie totalement normal au départ. Environ un million d'hépatocytes mâles allogéniques surexprimant *Bcl-2* ont été réimplantés par voie splénique chez des souris femelles normales recevant un traitement immunosuppresseur (FK506). Les souris ainsi greffées ont été traitées par des doses non mortelles de l'anticorps anti-Fas Jo2 pour induire la lyse des hépatocytes résidents très sensibles à l'apoptose relayée par Fas/CD95, et la régénération sélective par les hépatocytes *Bcl-2* greffés résistants à cette même apoptose. Une repopulation entre 2 % et 10 % a été estimée par PCR génomique sur le foie, en mettant en évidence la présence d'ADN de *Bcl-2* et de *Sry*, un marqueur masculin de différenciation. Sachant que les hépatocytes ne représentent que 60 % de la masse totale du foie, cette repopulation correspond en fait à environ 16 % de la totalité des cellules parenchymateuses hépatiques, comme l'attestent les expériences d'immuno-marquage sur coupe de foie [8] (figure 1). Comme attendu, des animaux ayant reçu des hépatocytes mâles mais non transgéniques n'ont pas vu leur foie repeuplé par ces cellules à la suite du traitement par l'anticorps anti-Fas. De même, chez les animaux ayant reçu des hépatocytes *Bcl-2*, mais non traités par l'anticorps anti-Fas, l'avan-

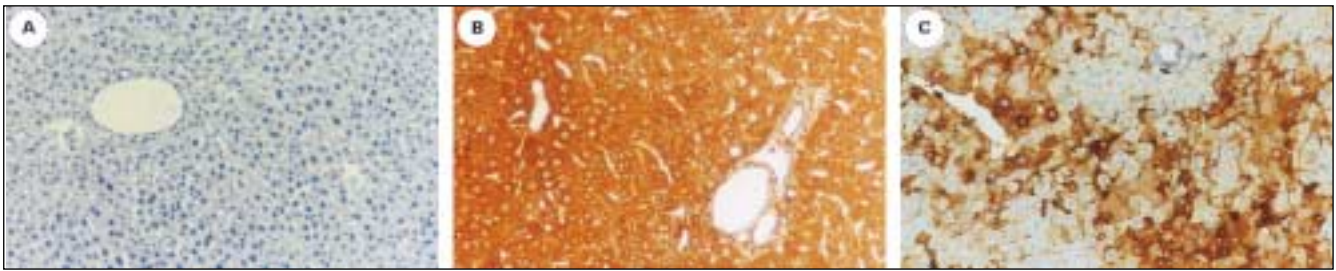


Figure 1. **Coupes de foie marquées par un anticorps anti-Bcl-2.** **A.** foie de souris normale (n'exprimant donc pas Bcl-2). **B.** foie de souris transgénique exprimant de manière constitutive Bcl-2 dans le foie (sous le contrôle du promoteur du gène de la pyruvate kinase hépatique). **C.** foie de souris normale ayant reçu une greffe d'hépatocytes transgéniques surexprimant Bcl-2 et traitée par une dose sublétales d'anticorps anti-Fas. Les hépatocytes transgéniques ont un avantage sélectif par rapport aux hépatocytes murins normaux très sensibles à l'apoptose par la voie de Fas, et repeuplent le foie.

tage et l'expansion sélective ne sont pas observés. Ces résultats représentent une amélioration très significative de ce qui a pu être obtenu par transfert de gènes jusqu'à maintenant. Ils démontrent la faisabilité d'une repopulation d'un foie normal dans un contexte de greffe allogénique, donc dans les conditions immunologiques *a priori* les plus défavorables et à l'aide d'un couple (Bcl-2/anticorps agoniste de la voie de Fas) qui ne permet qu'une pression de sélection discontinuée. Ces résultats ouvrent d'incontestables possibilités thérapeutiques. En effet, les approches de thérapie génique de maladies spécifiquement hépatiques ou, plus largement, d'affections pour lesquelles la sécrétion d'une enzyme circulante est une option thérapeutique souhaitable, étaient jusqu'à présent grandement limitées par la faible efficacité des vecteurs de type rétroviraux ou l'efficacité très transitoire des vecteurs adénoviraux. Le bon couple reste néanmoins à trouver, car il est bien sûr tout à fait inconcevable de traiter des êtres humains avec un agent aussi dangereux que l'anticorps anti-Fas, de même que de faire exprimer par les hépatocytes une molécule comme Bcl-2 au pouvoir oncogénique potentiel (pas dans le foie à ce jour néanmoins). Ce couple pourrait être un médicament exclusivement hépatotoxique dont la pharmacocinétique et pharmacodynamique seraient parfaitement maîtrisées, et un gène codant pour une enzyme détoxifiante. Il pourrait s'agir également d'un gène codant pour un ribozyme

capable de dégrader l'ARN messager de virus hépatotropes, et ainsi de faire régénérer sélectivement le foie de malades atteints d'hépatites chroniques par des hépatocytes résistants à l'infection virale, empêchant ainsi la fatale évolution vers la cirrhose et l'hépatocarcinogénèse. Un champ nouveau d'investigation est ouvert ! ■

Alexandre Mignon
Jacques-Emmanuel Guidotti
Claudia Mitchell
Monique Fabre
Hélène Gilgenkrantz

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

RÉFÉRENCES

1. Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SK, *et al.* Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* 1998; 338: 1422.
2. Lake JR. Hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* 1998; 328: 1463.
3. Ponder KP, Gupta S, Leland F, *et al.* Mouse hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intrasplenic transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1217-21.
4. Rhim JA, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, Brinster RL. Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science* 1994; 263: 1149-52.
5. Rhim JA, Sandgren EP, Palmiter RD, Brinster RL. Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4942-6.

6. Overturf K, Al-Dhalimy M, Tanguay R, *et al.* Hepatocytes corrected by gene therapy are selected *in vivo* in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. *Nat Genet* 1996; 12: 266-73.

7. Lacronique V, Mignon A, Fabre M, *et al.* Bcl-2 protects from lethal hepatic apoptosis induced by an anti-Fas antibody in mice. *Nat Med* 1996; 2: 80-6.

8. Mignon A, Guidotti JE, Mitchell C, *et al.* Selective repopulation of normal mouse liver by Fas/CD95-resistant hepatocytes. *Nat Med* 1998; 4 (sous presse).

TIRÉS À PART

A. Mignon.

Colloque Biologie et qualité des semences

1-2 décembre 1998

Programme scientifique

Mardi 1^{er} décembre (après-midi)

Résultats appliqués à la qualité des semences

Session de présentation de posters

Mercredi 2 décembre (matin)

Aspects fondamentaux de la biologie des semences

Le Colloque se tiendra à l'Université d'Angers, Campus de Belle-Beille, Amphithéâtre M.-Curie

Renseignements et inscription :

Mme Véronique Binoit,
 Geves - SNES, BP 24,
 49071 Beaucouze Cedex, France
 Tél. : 33 02 41 22 58 03
 Fax : 33 02 41 22 58 01
 E-mail : veronique.binoit@geves.fr