

transfectants. Quoiqu'il en soit, cette nouvelle génération d'AON compatibles avec un traitement systémique et accédant à l'ensemble des compartiments de l'organisme, y compris le système nerveux central, ouvre des perspectives vers de nombreuses applications thérapeutiques, et en particulier pour les maladies génétiques du système neuromusculaire. Enfin, ces travaux confortent le rationnel de l'approche de « saut d'exon » dans le cadre de la myopathie de Duchenne, pour laquelle une grande majorité de patients est théoriquement éligible. Il est toutefois important de souligner que la mise en application de ces traitements, en particulier pour les mutations singulières ou pour les cohortes de patients extrêmement petites, se heurtera aux coûts de développement des différents oligonucléotides antisens qu'il conviendra de considérer à juste titre comme des médicaments différents. Aussi, sans une réflexion éthique et un accompa-

gnement réglementaire appropriés, on peut craindre que certaines applications possibles et rationnelles soient abandonnées faute de débouchés économiques suffisants, générant de graves inégalités et désillusions au sein des populations de malades. ♦

Functional correction and cognitive improvement in dystrophic mice using splice-switching tricyclo-DNA oligomers

LIENS D'INTÉRÊT

Luis Garcia déclare avoir des liens durables avec l'entreprise Synthena qui produit les tricyclo-ADN.

Les autres auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- 1 Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, et al. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987 ; 50 : 509-17.
- 2 Kenrick S, Patterson M, Speer A, et al. Molecular analysis of the Duchenne muscular dystrophy region using pulsed field gel electrophoresis. *Cell* 1987 ; 48 : 351-7.
- 3 Goemans NM, Tulinius M, van den Akker JT, et al. Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 2011 ; 364 : 1513-22.
- 4 Cirak S, Arechavala-Gomez V, Guglieri M, et al. Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet* 2011 ; 378 : 595-605.
- 5 Goyenvallé A, Griffith G, Babbs A, et al. Functional correction in mouse models of muscular dystrophy using exon-skipping tricyclo-DNA oligomers. *Nat Med* 2015 ; 21 : 270-5.
- 6 Renneberg D, Boulioung E, Reber U, et al. Antisense properties of tricyclo-DNA. *Nucleic Acids Res* 2002 ; 30 : 2751-7.
- 7 Renneberg D, Leumann CJ. Watson-Crick base-pairing properties of tricyclo-DNA. *J Am Chem Soc* 2002 ; 124 : 5993-6002.
- 8 Kohler M, Clarenbach CF, Boni L, et al. Quality of life, physical disability, and respiratory impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Am J Respir Crit Care Med* 2005 ; 172 : 1032-6.
- 9 Perronnet C, Vaillend C. Dystrophins, utrophins, and associated scaffolding complexes: role in mammalian brain and implications for therapeutic strategies. *J Biomed Biotechnol* 2010 ; 2010 : 849426.
- 10 Deconinck AE, Rafael JA, Skinner JA, et al. Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 1997 ; 90 : 717-27.

NOUVELLE

Transplantation d'hépatocytes humains dérivés de cellules souches dans le foie de souris

Un nouveau modèle murin d'infection par le virus de l'hépatite C

Arnaud Carpentier, T. Jake Liang

National institute of diabetes and digestive and kidney diseases, liver diseases branch, 9000 Rockville Pike, Bethesda, MD 20892, États-Unis.

arnaud.carpentier@nih.gov

> Le développement de modèles expérimentaux d'infection par le virus de l'hépatite C (VHC) prenant en compte le patrimoine génétique de l'hôte est nécessaire. En effet, de récentes études ont démontré l'influence du patrimoine génétique du patient aussi bien sur l'histoire naturelle de l'infection que sur la réponse aux traitements antiviraux [1]. Le modèle expérimental le plus utilisé est basé sur l'infection par le VHC

de cellules de la lignée Huh7 [2], issues d'un hépatocarcinome ; il ne permet donc pas l'analyse de l'infection dans le contexte d'un patrimoine génétique particulier. De plus, ces cellules transformées ne reproduisent que très imparfaitement la physiologie des hépatocytes humains adultes (HH). Les cultures primaires d'hépatocytes humains peuvent être infectées par le VHC [3] et, dans une certaine mesure,

permettraient d'étudier l'importance du génome de l'hôte dans l'infection. Cependant, les hépatocytes primaires ne permettent qu'une répllication limitée du virus, comparés aux cellules Huh7, et, de plus, ils ne peuvent être maintenus en culture que quelques jours, et, surtout, sont difficiles à obtenir (ils proviennent de résections hépatiques). Les hépatocytes humains peuvent aussi être greffés dans le foie de différents



modèles de souris immunodéficientes transgéniques (modèles uPA, FAH¹) (→) [10], où ils sont permissifs à l'infection *in vivo* par différents virus hépatotropiques [4].

Récemment, il a été décrit que les cellules souches pluripotentes induites (iPS, pour *induced pluripotent stem cells*) [5], obtenues après reprogrammation nucléaire de cellules somatiques – les fibroblastes dermiques ou les cellules sanguines constituant des types cellulaires relativement aisés à obtenir – peuvent être différenciées en cellules hépatocytaires appelées HLC (pour *hepatocyte-like cells*) [6, 7, 11]. Ces hépatocytes-*like* représentent un modèle de choix pour analyser aussi bien le métabolisme cellulaire (maladies hépatiques d'origine génétique, par exemple), que l'infection par des virus hépatotropes dans le contexte du fond génétique du donneur.

Différenciation hépatique *in vitro*

La différenciation de cellules iPS en cellules de type hépatocytes est basée sur un traitement séquentiel avec différents facteurs de croissance et molécules, et, dans notre protocole, suit trois étapes : Première étape : induction des cellules pluripotentes vers l'endoderme définitif, sous l'influence de l'activine A et du FGF2 (*fibroblast growth factor*), ce qui induit l'expression de facteurs de transcription typiques des cellules d'endoderme définitif (SOX17 et FOXA2).

Seconde étape : spécification hépatique, en présence de HGF (*hepatocyte growth factor*, 100 ng/ml) et 0,1 % de

diméthylsulfoxyde (DMSO) pour induire l'expression de gènes associés au métabolisme hépatique. En particulier, le gène *HNF4A* (*hepatocyte nuclear factor 4A*) est fortement induit, et agit comme un régulateur central de la différenciation hépatique, induisant l'expression par exemple de l'alpha-fœtoprotéine (AFP) et de l'antitrypsine A1 (AAT).

Troisième étape : maturation hépatique par traitement avec de la dexaméthasone, ce qui provoque un important changement de morphologie (cellules polygonales, parfois binucléées, petits noyaux ronds, très similaires à des hépatocytes humains en culture primaire). Surtout, ce traitement induit l'expression de marqueurs hépatiques matures, tels que l'albumine, le facteur de coagulation FVII, et différentes isoformes des enzymes de détoxification dont le cytochrome P450. Bien que reproduisant différents processus biologiques et métaboliques typiques d'hépatocytes humains primaires (stockage du glycogène et de lipides, capture et sécrétion de lipoprotéines), les hépatocytes-*like* issus des iPS restent immatures comparés aux hépatocytes humains primaires, comme le montre la persistance de l'expression de marqueurs fœtaux comme l'AFP.

Infection *in vitro* par le VHC

L'infection productive par le VHC est strictement limitée aux hépatocytes humains adultes. Dans notre expérience, les hépatocytes-*like* issus d'iPS étaient susceptibles à l'infection *in vitro* par le VHC, qu'il s'agisse de virus produits en culture cellulaire (isolat JFH1, de génotype 2a) ou du sérum de patients chroniquement infectés par des virus de différents génotypes, comme cela a été décrit récemment [8]. Cependant, le niveau de réplication virale était très bas, et la production de particules infectieuses faible, en raison peut-être de la maturation incomplète des hépatocytes. De plus, il est important de noter que le niveau de réplication virale tendait à diminuer après deux semaines, ce qui

correspondait à une dédifférenciation des hépatocytes *in vitro*.

Nous avons aussi observé le déclenchement d'une réponse cellulaire de type interféron, suggérant que ce système constitue un modèle intéressant pour l'étude de la réponse immune innée au virus.

Analyse de l'infection par le VHC *in vivo*

Étape 1 : transplantation d'hépatocytes-*like*

Afin d'étudier leur implantation *in vivo*, 4 x 10⁶ hépatocytes-*like* ont été injectés par voie intrasplénique dans des souris immunodéficientes (SCID/Bg²) exprimant le gène codant pour l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) sous le contrôle du promoteur des protéines urinaires majeures (MUP) [4]. L'expression du transgène uPA dans les hépatocytes murins provoque leur cytolyse et donne ainsi un avantage sélectif aux hépatocytes humains implantés dans un environnement hépatique favorable à la prolifération hépatocytaire. L'implantation des hépatocytes-*like* a été suivie par la quantification de l'albumine humaine dans le sang des souris ; celle-ci était détectable dès les premiers jours suivant l'injection et augmentait avec le temps. Deux semaines après injection, les hépatocytes-*like* pouvaient être visualisés dans le parenchyme hépatique murin après marquage immunohisto chimique avec le marqueur humain Hep Par1 et détection en immunofluorescence de l'albumine humaine, confirmant l'implantation intrahépatique des cellules humaines autour des veines centrales. L'albumine humaine sérique pouvait être détectée pendant au moins 100 jours après l'injection, suggérant la persistance des hépatocytes-*like* humains. De fait, 100 jours après l'injection, l'analyse immunohisto chimique a révélé un degré variable (de 0,1 à 15 %) de repopulation du foie murin par les cellules humaines, corrélé à la concentration d'albumine

¹ « Les deux modèles existants, la souris transgénique uPA (*urokinase plasminogen activator*) et la souris tyrosinémique (FAH^{-/-}) fonctionnent sur le même concept : dans les deux cas, les hépatocytes résidents sont continuellement détruits par le produit d'un transgène toxique dans le cas du modèle uPA, et par un défaut constitutif d'une enzyme du cycle de l'urée, la fumaryl-acide-acéto-hydrolase, dans le cas de la souris FAH^{-/-}. Cette cytolysé induit un stimulus de prolifération, ce qui confère aux hépatocytes transplantés un avantage prolifératif sur les hépatocytes résidents, puisqu'ils ne subissent pas la pression de sélection négative de ces derniers.» (tiré de [10]).

² Souris SCID-Bg : *severe combined immunodeficient-beige*.

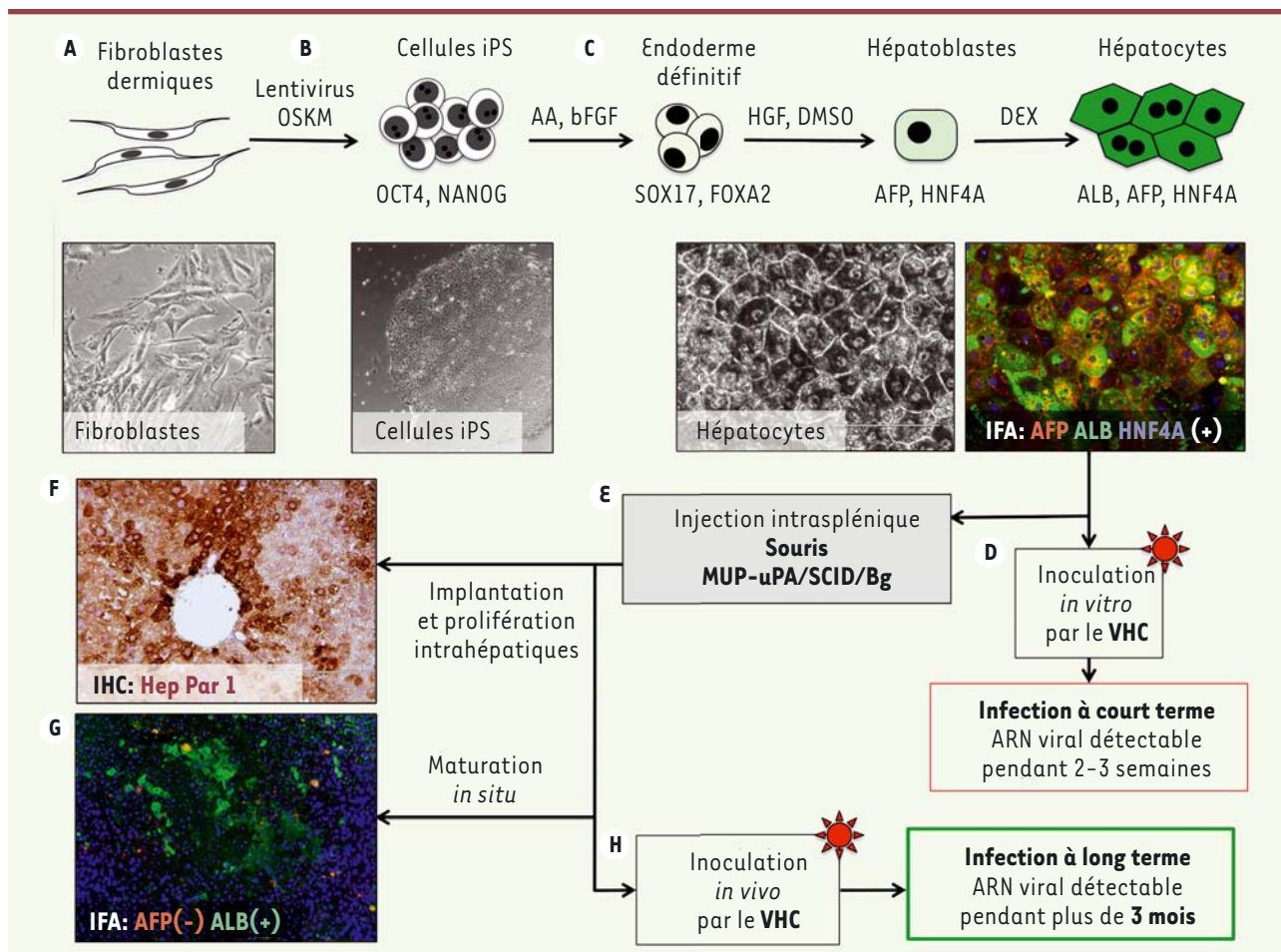


Figure 1. Stratégie expérimentale d'obtention d'hépatocytes-like humains à partir d'iPS. Des fibroblastes isolés de biopsies de peau (A) sont reprogrammés en cellules iPS (B), puis différenciés en cellules hépatocytaires hépatocytes-like (C). Ces hépatocytes-like sont permissifs à l'infection par le VHC *in vitro* (D) et peuvent être transplantés dans le parenchyme hépatique de souris MUP-uPA/SCID/Bg (E-F), où ils prolifèrent et développent un phénotype plus mature (G). Les hépatocytes-like peuvent aussi être infectés *in vivo* par différents génotypes de VHC (H). OSKM : lentivirus porteurs des ADNc codant pour OCT4 (O), SOX2 (S) KLF4 (K) et cMYC (M), les 4 facteurs de transcription nécessaires à la reprogrammation en iPS.

humaine dans le sang des souris greffées. Surtout, l'analyse par immunofluorescence de sections de foies repeuplés par des cellules humaines a montré que les hépatocytes humains greffés prolifèrent et présentent un niveau de maturation hépatique plus élevé que celui des hépatocytes-like humains au moment de l'injection. Par exemple, ils perdent l'expression de marqueurs fœtaux (AFP), et gagnent celle de marqueurs d'hépatocytes matures, par exemple différentes isoformes du cytochrome P450.

Étape 2 : infection *in vivo* par le VHC

Afin de confirmer la permissivité des hépatocytes-like humains issus d'iPS à

l'infection *in vivo* par le VHC, des souris greffées ayant un taux sérique d'albumine humaine supérieur à 100 ng/ml 10 jours après la greffe ont été inoculées par voie intraveineuse avec des sérums de chimpanzés porteurs d'une infection chronique par différents génotypes de VHC. La réplication du VHC était ensuite mesurée par la quantification de l'ARN viral dans le sang des souris inoculées. Deux semaines après l'infection virale, l'ARN viral n'était détectable chez aucune souris, et seulement chez la moitié d'entre elles un mois après inoculation. Les raisons de ce délai sont inconnues, peut-être liées au temps de matu-

ration et de prolifération *in situ* des cellules humaines. Cependant, trois mois après l'inoculation virale, toutes les souris avaient un taux mesurable d'ARN viral dans le sang, compris entre 4 et 7 log de copies par millilitre. La virémie pouvait aussi être détectée par ELISA (anticorps détectant l'antigène de capsid du VHC). Ces résultats confirment que l'infection par le VHC peut être maintenue à un niveau détectable pendant plus de 100 jours.

Conclusion

L'infection *in vivo* d'hépatocytes-like humains différenciés à partir de cellules iPS dérivées de cellules somatiques



de patients constitue une approche unique permettant d'étudier l'infection à long terme de cellules hépatocytaires matures par le VHC dans le contexte du patrimoine génétique du patient [9]. Cette approche pourrait constituer un outil important non seulement pour analyser l'influence du génome du patient sur la primo-infection par le VHC et le passage à la chronicité de l'infection, mais aussi pour la validation de traitements antiviraux adaptés au patient. ♦

Transplantation of iPS-derived hepatocytes into a mouse liver: a new murine model of hepatitis C virus infection

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Horner SM, Gale M Jr. Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus. *Nat Med* 2013 ; 19 : 879-88.
2. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 2005 ; 11 : 791-6.
3. Povedin P, Carpentier A, Pène V, et al. Production of infectious hepatitis C virus in primary cultures of human adult hepatocytes. *Gastroenterology* 2010 ; 139 : 1355-64.
4. Tesfaye A, Stift J, Maric D, et al. Chimeric mouse model for the infection of hepatitis B and C viruses. *PLoS One* 2013 ; 8 : e77298.
5. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007 ; 131 : 861-72.
6. Basma H, Soto-Gutiérrez A, Yannam GR, et al. Differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived hepatocytes. *Gastroenterology* 2009 ; 136 : 990-9.
7. Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, et al. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology* 2010 ; 51 : 297-301.
8. Wu X, Robotham JM, Lee E, et al. Productive hepatitis C virus infection of stem cell-derived hepatocytes reveals a critical transition to viral permissiveness during differentiation. *PLoS Pathog* 2012 ; 8 : e1002617.
9. Carpentier A, Tesfaye A, Chu V, et al. Engrafted human stem cell-derived hepatocytes establish an infectious HCV murine model. *J Clin Invest* 2014 ; 124 : 4953-64.
10. Gilgenkrantz H. Des souris humanisées pour l'étude du virus de l'hépatite C. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 587-9.
11. Touboul T, Vallier L, Weber A. Cellules souches embryonnaires humaines et iPS : une source fiable d'hépatocytes fœtaux. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 1061-6.



Toujours d'actualité
volume 23
www.medecinesciences.org

ANTICORPS MONOCLONAUX EN THÉRAPEUTIQUE

De la conception à la production
La réalité clinique
Un futur en développement
Coordinateurs : Alain Beck, Jean-Luc Teillaud, Hervé Watier



Tout ce que vous avez toujours voulu savoir sur les anticorps monoclonaux en thérapeutique... dans M/S



Tout ce que vous avez toujours voulu savoir sur les anticorps monoclonaux en thérapeutique... dans *Médecine/Sciences*. Pourquoi un numéro spécial de *Médecine/Sciences* sur les anticorps monoclonaux thérapeutiques ? Il nous a semblé que le moment était venu de dresser un état des lieux de ces biomédicaments qui prennent désormais une place considérable - et croissante - dans les traitements de maladies souvent lourdes et désespérantes. Ce voyage que nous vous proposons de la découverte du monde des anticorps thérapeutiques nous a appris, ou plutôt rappelé, une évidence : les compétences en France sont fortes et nombreuses, qu'elles soient académiques ou industrielles, biotechnologiques ou cliniques. Le paysage français, trop longtemps discret, bruisse désormais de mille initiatives balayant de multiples aspects des anticorps thérapeutiques : études précliniques et cliniques menées avec de nouveaux anticorps dirigés contre des cibles originales, développement de nouveaux formats d'anticorps ou d'anticorps optimisés reposant sur des études structurales et fonctionnelles sophistiquées, recherche active de cibles pertinentes, mise au point de méthodologies de bioproduction, de couplage, etc. L'expansion industrielle rapide de ce champ est un défi que peut et doit relever notre pays, défi tant scientifique qu'économique, avec ses combats pour la propriété intellectuelle et pour l'emploi de nos jeunes scientifiques.

Alain Beck, Jean-Luc Teillaud, Hervé Watier

Bon de commande

À retourner à EDK, 109, avenue Aristide Briand, 92541 Montrouge Cedex, France

Tél. : 01 41 17 74 05 - Fax : 01 49 85 03 45 - E-mail : edk@edk.fr

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir M/S n° 12 - décembre 2009 (Anticorps monoclonaux en thérapeutique) : 25 € + 3 € de port = 28 € TTC

en exemplaire, soit un total de €

Par chèque, à l'ordre de **EDK**

Par carte bancaire : Visa Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | |

Date d'expiration : | | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | | |

Signature :