

Modulation expérimentale de la mort cellulaire *in vivo* : implications physiopathologiques et thérapeutiques

par Claudia Mitchell, Vincent Mallet, Jacques-Emmanuel Guidotti, Alexandre Mignon, Dominique Couton, Axel Kahn & Hélène Gilgenkrantz

Institut Cochin, Département de Génétique, Développement et Pathologie Moléculaires, U567 INSERM, CNRS 8101 UMR, Université R. Descartes, 24, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

E-mail : gilgenkrantz@cochin.inserm.fr

Reçu le 24 novembre 2004

RÉSUMÉ

L'apoptose joue un rôle essentiel dans la physiopathologie hépatique. La voie de Fas a notamment été impliquée dans certaines maladies autoimmunes comme la cirrhose biliaire primitive, les hépatites qu'elles soient d'origine autoimmune ou virale ou enfin le rejet de greffe. De plus l'apoptose hépatocytaire est significativement augmentée chez des patients présentant une hépatite alcoolique, une stéatose non alcoolique ou une hépatite fulminante. Nous avons tiré profit de cette susceptibilité particulière du foie à

l'apoptose pour promouvoir une approche de thérapie cellulaire visant à conférer aux hépatocytes transplantés un avantage de survie à un stimulus apoptotique Fas-dépendant. Par ailleurs, l'induction contrôlée d'un programme de mort cellulaire dans ces cellules nous a permis de développer un modèle murin d'ablation spécifique des hépatocytes par dimérisation induite de la pro-caspase-3. Ce modèle pourrait servir de base d'étude de la régénération ou de l'apoptose hépatiques *in vivo*.

SUMMARY Experimental modulation of apoptosis: physiopathological and therapeutic targets

In the liver, the importance of apoptosis is not only evident during development and homeostasis of the biliary tree but plays also a prominent role in liver pathogenesis. Ligand binding to cell surface death receptors such as Fas activates the extrinsic pathway. This pathway predominates in autoimmune liver diseases, viral hepatitis, liver allograft rejection. Hepatocyte apoptosis is also significantly increased in patients with alcoholic hepatitis and nonalcoholic

steatohepatitis and correlates with disease severity and hepatic fibrosis. We have used this specific susceptibility of the liver to apoptosis to develop two different approaches: 1) a cell therapy strategy based on a survival advantage to an apoptotic stimulus conferred to transplanted hepatocytes and 2) a new model of hepatocyte conditional ablation based on a controlled activation of the cell death program.

L'APOPTOSE : UNE VOIE ESSENTIELLE DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE HÉPATIQUE

L'apoptose est une forme hautement régulée de mort cellulaire qui a été décrite dans de nombreuses pathologies hépatiques dont les hépatites virales, les hépatites alcooliques, la cirrhose biliaire primitive, le rejet de greffe, ainsi que dans certaines maladies métaboliques comme la maladie de Wilson, ou les lésions ischémiques. Certaines de ces atteintes hépatiques peuvent aboutir à une hépatite fulminante dont le pronostic dépendra de la capacité du foie lésé à se régénérer. Dans de nombreux cas, l'implication des récepteurs à domaines de mort et

en particulier la voie de Fas (CD-95) a été démontrée. L'hépatocyte est classiquement classé comme une cellule privilégiant, après activation des récepteurs à domaine de mort comme CD-95, la voie mitochondriale avec relargage du cytochrome c et activation, *via* l'apoptosome, des caspases effectrices comme la caspase-3.

LE CONCEPT D'AVANTAGE DE SURVIE

L'injection à la souris d'anticorps agonistes anti-Fas entraîne des lésions apoptotiques, majoritairement dans le foie et les organes lymphoïdes. En fonction de la dose

injectée, l'induction d'une apoptose hépatique massive peut être létale en quelques heures. Des travaux antérieurs du laboratoire avaient démontré que l'expression de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, comme Bcl-2 elle-même ou la surexpression de Bcl-xL dans les hépatocytes, suffisait à protéger l'animal d'une dose létale d'anticorps anti-Fas (Lacronique *et al.*, 1996). Nous avons alors émis l'hypothèse qu'il était possible de mettre à profit cet avantage sélectif pour repeupler un foie murin à partir d'un petit nombre d'hépatocytes. Ce concept de repeuplement du foie est basé sur deux notions : l'extraordinaire capacité régénérative des hépatocytes dans des conditions d'agression, et la propension qu'ont des hépatocytes transplantés, lorsqu'ils sont dotés d'un avantage sur les hépatocytes résidents, à proliférer au sein du parenchyme hépatique receveur. Des travaux avaient déjà montré dans un modèle de maladie humaine, la tyrosinémie familiale de type I, la capacité de reconstituer un foie pathologique en constant processus de lyse/régénération à la seule condition que les hépatocytes transplantés soient protégés de la cytolyse. Afin de démontrer qu'il était possible de créer une situation d'expansion sélective d'hépatocytes portant *de novo* un avantage de survie, nous avons transplanté les hépatocytes transgéniques Bcl-2 dans le foie de souris normales, soumises à des injections répétées subléthales de l'anticorps agoniste de la voie de Fas. Les hépatocytes génétiquement modifiés se sont implantés puis, sous la pression de sélection induite par des injections subléthales répétées de l'agoniste CD-95, ont proliféré pour repeupler partiellement le foie des receveurs (Mignon *et al.*, 1998). Les membres de la famille Bcl-2 sont différenciellement exprimés dans le foie : Bcl-2 est essentiellement présente dans le système biliaire hépatique alors que Bcl-xL est facilement détectée dans les hépatocytes. Nous avons par la suite démontré qu'une surexpression de Bcl-xL d'un facteur deux suffisait à conférer aux hépatocytes cet avantage de survie à l'apoptose Fas-dépendante leur permettant de repeupler efficacement le foie (Mitchell *et al.*, 2002). Nous avons alors voulu suivre la cinétique de repeuplement du foie. Dans ce but, nous avons construit un vecteur rétroviral bicistronique exprimant le transgène Bcl-2 et une protéine traceur, la GFP (*green fluorescent protein*), que nous avons directement injecté à l'animal. Dans les conditions expérimentales, une très petite proportion des hépatocytes est transduite (environ 1 %). On peut alors suivre la cinétique de prolifération clonale des hépatocytes transduits après chaque induction apoptotique dans le foie. Après 2 mois d'une injection hebdomadaire de l'anticorps, le foie présente des macro-nodules fluorescents et l'analyse histologique démontre que plus de 80% des hépatocytes proviennent de la petite population initialement transduite (Guidotti *et al.*, 2001).

UNE APPROCHE THÉRAPEUTIQUE

Afin de démontrer la valeur thérapeutique de cette approche, nous avons choisi de la tester sur un modèle murin d'hypercholestérolémie par déficit en apolipopro-

téine E (ApoE). Ces animaux présentent des lésions artérielles typiques d'athérosclérose sous régime normal. La transplantation d'hépatocytes transgéniques Bcl-2, qui expriment constitutivement l'ApoE, par voie splénique chez des souris déficientes ApoE^{-/-} permet d'obtenir une repopulation d'environ 30 % après 2 mois d'un traitement hebdomadaire pro-apoptotique. Les animaux ainsi traités présentent une baisse significative du cholestérol sérique deux mois après le début du traitement et la progression des lésions d'athérosclérose diminue de façon significative et stable quatre mois après l'arrêt du traitement (Mitchell *et al.*, 2000). Ces résultats démontrent donc non seulement que les hépatocytes transplantés réimplantés sont fonctionnels mais qu'il est possible d'atteindre des niveaux thérapeutiques d'expression d'une protéine majoritairement sécrétée par le foie. Néanmoins, cette approche n'est pas directement applicable en clinique même si aucun processus tumorigène n'a été noté chez l'ensemble des animaux traités un an après la transplantation. En effet, les transgènes Bcl-2 et Bcl-xL peuvent diminuer significativement les lésions hépatiques induites par l'expression de l'oncogène myc (De la Coste *et al.*, 1999).

UN MODELE D'ÉTUDE DES CELLULES SOUCHES HÉPATIQUES...

La stratégie de modulation de l'apoptose que nous avons développée nous a également permis d'étudier la validité de la notion de plasticité des cellules souches hématopoïétiques. En effet, différents travaux tendaient à démontrer la capacité de cellules médullaires à la transdifférenciation en hépatocytes (Lagasse *et al.*, 2000; Krause *et al.*, 2001). L'expression du transgène Bcl-2 étant dans notre modèle dirigée par le promoteur hépatospécifique de la pyruvate kinase de type L, nous avons émis l'hypothèse que, s'il existait dans la moelle des cellules capables de se différencier en hépatocytes, nous devrions obtenir, sous la pression de sélection induite par l'anticorps agoniste de la voie de Fas, un repeuplement partiel du foie de souris ayant reçu une transplantation de moelle transgénique pour Bcl-2. Nous avons transplanté des cellules médullaires mâles transgéniques chez des souris femelles normales irradiées léthalement et recherché la présence d'hépatocytes exprimant Bcl-2 en absence d'induction d'apoptose ou après plusieurs cures pro-apoptotiques. Nous avons obtenu une expression faible du transgène Bcl-2 et confirmé la nature hépatocytaire des cellules qui l'expriment (Mallet *et al.*, 2002). Les résultats que nous avons obtenus soulignent deux points : 1) la transdifférenciation en l'absence de lésion hépatique autre que l'irradiation est un événement rare, 2) il est possible d'amplifier ces cellules *in vivo* en leur conférant un avantage sélectif. Néanmoins, l'obtention d'un niveau thérapeutique est encore un Graal bien lointain à atteindre ! C'est ce que semblent d'ailleurs confirmer d'élégants résultats obtenus chez la souris non irradiée (Wagers *et al.*, 2002).

ABLATION CONDITIONNELLE HÉPATOCTYTAIRE PAR CONTRÔLE DE LA DIMÉRISATION DE LA CASPASE-3

L'induction de la mort apoptotique hépatique par la voie de Fas n'est pas purement hépatocytaire. Il a en effet été montré que l'injection de l'anticorps agoniste anti-CD45 entraînait une réaction inflammatoire (Faouzi *et al.*, 2001) ainsi qu'une atteinte endothéliale (Janin *et al.*, 2002) d'ailleurs non limitée au foie. Nous avons cherché à créer un nouveau modèle d'apoptose pure hépatocytaire inductible à façon. De nombreux facteurs de la cascade apoptotique, allant du récepteur à domaine de mort aux caspases, sont activés par homo- ou hétéro-dimérisation (Yang *et al.* 1998). D. Spencer (Houston, Tx) avait précédemment développé des vecteurs chimériques comprenant une pro-caspase associée à un ou plusieurs sites de liaison *FKBP-like*, capables de s'agrèger après injection d'un agent non toxique dérivé du FK506, mais ayant perdu ses capacités immunosuppressives. Cette dimérisation provoque l'auto-activation de la caspase correspondante dont l'induction est dose-dépendante en culture cellulaire (Clarckson *et al.*, 1998).

Nous avons créé une lignée transgénique de souris exprimant une caspase 3 chimérique inductible par dimérisation sous la dépendance d'un promoteur hépato-spécifique. Le foie de ces animaux est normal en absence d'induction, soulignant l'absence de fuite du système. En revanche, quelques heures après injection de l'agent dimérisant, une cytolysse hépatique est détectée pouvant détruire 80 % des hépatocytes. L'apoptose est dose-dépendante et ne touche pas l'endothélium vasculaire ni le système biliaire hépatique. C'est sans doute la raison pour laquelle une destruction pourtant si massive n'entraîne pas la mort de l'animal, au contraire de l'injection de l'anticorps anti-Fas, pour des lésions équivalentes. Le foie retrouve une histologie normale 7 jours après induction. Cette approche d'ablation cellulaire conditionnelle présente donc sur les modèles inductibles précédemment décrits l'avantage de ne pas induire de toxicité en absence d'induction, ni d'effet "by-stander" notamment sur d'autres types cellulaires hépatiques (Mallet *et al.*, 2003). Il s'agit par conséquent d'un modèle cliniquement pertinent pour étudier la régénération hépatique ou l'apoptose *in vivo*. Il nous a par exemple permis de conforter directement *in vivo* l'existence d'une boucle de rétrocontrôle positif initiée par la caspase-3 activée qui peut alors cliver des cibles amont (comme BID, caspase-9, caspase-8, Bcl-2 ou Bcl-xL).

CONCLUSION

Le foie possède cette caractéristique très particulière d'être capable de se régénérer bien qu'étant quiescent à l'âge adulte. Les hépatocytes sont au cœur de ce processus de régénération. En utilisant la susceptibilité particulière du foie à l'apoptose médiée par la voie de Fas, retrouvée dans de nombreuses pathologies hépatiques,

nous avons apporté la preuve de principe qu'il était possible de repeupler un foie en conférant un avantage de survie à l'apoptose aux hépatocytes transplantés. Ceux-ci peuvent alors proliférer aux dépens des hépatocytes résidents, l'induction chronique d'un processus apoptotique entraînant à la fois la mort cellulaire des hépatocytes non modifiés et un stimulus de prolifération. C'est également cette sensibilité de l'hépatocyte à l'apoptose qui nous a permis de développer un modèle d'hépatite apoptotique inductible. Cette modulation expérimentale de la mort cellulaire programmée pourrait être appliquée à d'autres cibles cellulaires pour créer de nouveaux modèles de maladies où l'apoptose joue un rôle clé comme le diabète de type I, certaines maladies neurodégénératives ou certaines insuffisances cardiaques.

BIBLIOGRAPHIE

- De la Coste A., Fabre M., McDonell N., Porteu A., Gilgenkrantz H., Perret C., Kahn A. & Mignon A., Differential protective effects of Bcl-xL and Bcl-2 on apoptotic liver injury in transgenic mice. *Am. J. Physiol.*, 1999, 277, G702-G708.
- Clarckson T., Yang W., Rozamus L. W., Hatada M., Amara J. F., Rollins C. T., Stevenson L. F., Magari S. R., Wood S. A., Courage N. L., Lu X., Cerasoli E. J., Gilman M. & Holt D. A., Redesigning an FKBP-ligand interface to generate chemical dimerizers with novel specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 10437-10442.
- Faouzi S., Burckhardt B. E., Hanson J. C., Campe C. B., Schrum L. W., Rippel R. A. & Maher J. J., Anti-Fas induces hepatic chemokines and promotes inflammation by an NF- κ B-independent caspase-3-dependent pathway. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 49077-49082.
- Guidotti J., Mallet V., Mitchell C., Fabre M., Schoevaert D., Opolon P., Parlier D., Lambert M., Kahn A. & Gilgenkrantz H., Selection of *in vivo* retrovirally transduced hepatocytes leads to efficient and predictable mouse liver repopulation. *FASEB J.*, 2001, 15, 1849-1851.
- Janin A., Deschaumes C., Daneshpouy M., Estaquier J., Micic-Polianski J., Rajagopalan-Levasseur P., Akarid K., Mounier N., Gluckman E., Socie G. & Ameisen J. C., CD95 engagement induces disseminated endothelial cell apoptosis *in vivo*: immunopathologic implications. *Blood*, 2002, 99, 2940-2947.
- Lacronique V., Mignon A., Fabre M., Viollet B., Rouquet N., Molina T., Porteu A., Henrion A., Bouscary D., Varlet P., Joulin V., Kahn A., Bcl-2 protects from lethal hepatic apoptosis induced by an anti-Fas antibody in mice. *Nat. Med.*, 1996, 2, 80-86.
- Lagasse E., Connors H., Al-Dhalimy M., Reitsma M., Dohse M., Osborne L., Wang X., Finegold M., Weissman I. L. & Grompe M., Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat. Med.*, 2000, 6, 1229-1234.
- Krause D. S., Theise N. D., Collector M. I., Henegariu O., Hwang S., Gardner R., Neutzel S. & Sharkis S. J., Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 2001, 105, 369-377.
- Mallet V. O., Mitchell C., Mezey E., Fabre M., Guidotti J. E., Renia L., Coulombel L., Kahn A. & Gilgenkrantz H., Bone marrow transplantation in mice leads to a minor population of hepatocytes that can be selectively amplified *in vivo*. *Hepatology*, 2002, 35, 799-804.

- Mallet V. O., Mitchell C., Guidotti J. E., Jaffray P., Fabre M., Spencer D., Arnoult D., Kahn A. & Gilgenkrantz H., Conditional cell ablation by tight control of caspase-3 dimerization in transgenic mice. *Nat. Biotech.*, 2003, 20, 1234-1239.
- Mignon A., Guidotti J. E., Mitchell C., Fabre M., Wernet A., De La Coste A., Soubrane O., Gilgenkrantz H. & Kahn A., Selective repopulation of normal mouse liver by Fas/CD95-resistant hepatocytes. *Nat. Med.*, 1998, 4, 1185-1188.
- Mitchell C., Mignon A., Guidotti J. E., Besnard S., Fabre M., Duverger N., Parlier D., Tedgui A., Kahn A., Gilgenkrantz H., Therapeutic liver repopulation in a mouse model of hypercholesterolemia. *Hum. Mol. Genet.*, 2000, 9, 1597-1602.
- Mitchell C., Mallet V. O., Guidotti J. E., Goulenok C., Kahn A. & Gilgenkrantz H., Liver repopulation by Bcl-xL transgenic hepatocytes. *Am. J. Pathol.*, 2002, 160, 31-35.
- Wagers A. J., Sherwood R. I., Christensen J. L. & Weissman I. L., Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science*, 2002, 297, 2256-2259.
- Yang X., Chang H. Y. & Baltimore D., Autoproteolytic activation of pro-caspases by oligomerization. *Mol. Cell.*, 1998, 1, 319-325.
-