

Cellules souches pluripotentes humaines et modélisation de maladies hépatiques

Noushin Dianat^{1,2,3}, Anne Weber^{1,2,3} et Anne Dubart-Kupperschmitt^{1,2,3}

¹ INSERM U1193, Hôpital Paul Brousse, 94807 Villejuif, France

² UMR S1193, Université Paris-Sud, Hôpital Paul Brousse, 94800 Villejuif, France

³ Département hospitalo-universitaire Hepatinov, Hôpital Paul Brousse, 94807 Villejuif, France

Auteurs correspondants : Noushin Dianat, noushin.dianat@espci.fr ; Anne Dubart Kupperschmitt, anne.dubart@inserm.fr

Reçu 11 février 2016

Résumé – Le foie est associé à de nombreuses pathologies parmi lesquelles les maladies métaboliques et cholestatiques, les cirrhoses, les hépatites chroniques et aiguës. Toutefois, la connaissance des mécanismes impliqués dans la physiopathologie de ces maladies reste limitée du fait de la restriction des biopsies hépatiques et de l'absence de modèles cellulaires dérivés des patients qui en résulte. Le foie est aussi l'organe principal pour l'élimination des xénobiotiques et de ce fait les hépatocytes jouent un rôle clef en toxicologie et en pharmacocinétique. Les cellules souches pluripotentes induites générées à partir de patients atteints de maladies métaboliques monogéniques, pour lesquelles le gène correspondant est connu, représentent un modèle *in vitro* pertinent, d'une part pour l'étude des mécanismes impliqués dans la maladie ciblée, et d'autre part pour le criblage de médicaments pour sa correction. À cet effet, des protocoles efficaces pour générer des cellules hépatiques, les hépatocytes et les cholangiocytes, sont essentiels. Notre étude a porté sur la modélisation de l'hypercholestérolémie familiale, et sur l'établissement d'un protocole de différenciation des cellules souches pluripotentes en cholangiocytes fonctionnels.

Mots clés : Cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC) / différenciation cellulaire guidée / modélisation de maladies *in vitro* / hypercholestérolémie familiale / cholangiocytes

Abstract – Human pluripotent stem cells and liver disorders.

The liver is associated with many diseases including metabolic and cholestatic diseases, cirrhosis as well as chronic and acute hepatitis. However, knowledge about the mechanisms involved in the pathophysiology of these diseases remains limited due to the restricted access to liver biopsies and the lack of cellular models derived from patients. The liver is the main organ responsible for the elimination of xenobiotics and thus hepatocytes have a key role in toxicology and pharmacokinetics. The induced pluripotent stem cells generated from patients with monogenic metabolic disorders, for which the corresponding gene is identified, are relevant *in vitro* models for the study of the mechanisms involved in generation of pathologies and also for drug screening. Towards this aim, robust protocols for generating liver cells, such as hepatocytes and cholangiocytes, are essential. Our study focused on familial hypercholesterolemia disease modeling, as well as on establishing a protocol for generation of functional cholangiocytes from pluripotent stem cells.

Key words: Induced pluripotent stem cells (iPSCs) / directed differentiation / *in vitro* disease modeling / familial hypercholesterolemia / cholangiocytes

Depuis la génération des premières cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC) par les équipes de Yamanaka (Takahashi *et al.*, 2007) et Thomson (Yu *et al.*, 2007), de nombreuses équipes se sont intéressées à la génération de ces cellules pour mettre en place des protocoles de différenciation en divers types cellulaires à des fins cognitives mais aussi pour des applications thérapeutiques (thérapie cellulaire et génique et découverte de nouveaux médicaments). Un certain nombre de laboratoires, dont le nôtre, se sont orientés vers la modélisation de maladies métaboliques hépatiques et des approches précliniques de thérapie cellulaire et génique.

L'hypercholestérolémie familiale (HF) de type IIA est une maladie métabolique du foie entraînant des atteintes cardiovasculaires mortelles. La modélisation *in vitro* de cette pathologie à l'aide des iPSC de patients permet d'étudier les mécanismes impliqués dans la génération de la pathologie et également d'évaluer différentes approches de correction génique.

Enfin les hiPSC permettent de générer les cellules épithéliales biliaires, les cholangiocytes, qui jouent un rôle fondamental dans la régulation de la sécrétion biliaire et la dégradation du cholestérol. Ces cellules sont en outre les cibles d'un groupe de maladies, les cholangiopathies, dont certaines sont d'origine génétique.

Notre projet a eu pour buts : (i) de modéliser la maladie d'hypercholestérolémie familiale par la génération des iPSC de patients homozygotes et hétérozygotes, et de différencier ces cellules en hépatocytes ; (ii) de mettre au point une approche originale permettant de générer des cholangiocytes à partir d'hépatoblastes différenciés eux-mêmes à partir de cellules souches humaines pluripotentes embryonnaires (hESC) et induites (hiPSC).

Différenciation biliaire des cellules souches pluripotentes

Les cholangiocytes ou cellules épithéliales biliaires représentent environ 3 % des cellules du parenchyme du foie. Au cours du développement embryonnaire, elles dérivent de cellules progénitrices bipotentes qui se différencient soit en hépatocytes soit en cholangiocytes. Ces cellules épithéliales bordent la paroi des canaux biliaires (Kanno *et al.*, 2000). Dans la bile, le foie élimine des métabolites toxiques pour l'organisme et sécrète des acides biliaires nécessaires à l'absorption digestive des graisses. La fonction principale des cholangiocytes consiste en régulation active de la composition de la bile par la modification des composés biliaires sécrétés par les hépatocytes *via* des mécanismes de sécrétion et de réabsorption. Les caractéristiques morphologiques et les propriétés fonctionnelles des cholangiocytes ne sont pas identiques

tout au long de l'arbre biliaire et on les distingue, selon la taille des canaux et la distance au hile, en petits et grands cholangiocytes (Benedetti *et al.*, 1996).

En plus du rôle de modification de la bile, les cholangiocytes participent à la détoxification des xénobiotiques. Ils sont aussi la cible de maladies touchant les voies biliaires intrahépatiques, appelées « cholangiopathies », représentant des pathologies hépatiques génétiques (syndrome d'Alagille, mucoviscidose, ...) ou acquises, autoimmunes ou infectieuses, de la cholangite à la cirrhose biliaire primitive, affectant des patients de tous âges.

Les cholangiopathies représentent encore une indication importante pour la transplantation du foie, de 10 % à 20 % des indications chez les adultes (Strazzabosco *et al.*, 2005). Malgré l'importance physiologique et pathologique des cholangiocytes, leur nombre limité et leur localisation intrahépatique ont freiné le développement de modèles cellulaires *in vitro* pour l'étude de ces cellules et de leurs mécanismes moléculaires. Les modèles cellulaires disponibles sont peu nombreux et/ou peu pertinents : les lignées humaines disponibles sont immortalisées par le virus SV40 ou dérivées de cholangiocarcinomes et la plupart des cellules utilisées dérivent des cholangiocytes de rat. Or ceux-ci diffèrent significativement des cholangiocytes humains, en particulier les petits cholangiocytes de rat n'expriment pas le CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) (Alpini *et al.*, 1997).

Jusqu'à ce jour, contrairement à la différenciation des cellules souches pluripotentes en hépatocytes, la différenciation en cholangiocytes a été très peu explorée. Une partie des études réalisées concerne la différenciation biliaire des progéniteurs/cellules souches hépatiques isolées du foie fœtal chez la souris (HPPL, BMEL) (Strick-Marchand, 2004 ; Tanimizu, 2004 ; Tanimizu *et al.*, 2007) ou chez l'Homme (Wang *et al.*, 2010). Ces études ayant pour but de valider la bipotence des progéniteurs, les protocoles se limitent à cultiver des cellules sur une matrice extracellulaire en 3D tels que le collagène I, le Matrigel, la laminine ou le hyaluronane en présence d'HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), d'EGF (*Epidermal Growth Factor*) ou de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), pour induire la différenciation biliaire et la formation de cystes ou de structures tubulaires en fonction de la matrice utilisée. Les cholangiocytes obtenus exprimaient la cytokératine (CK) 19, l'aquaporine (AQP1), l'intégrine $\alpha 6$, l'intégrine $\beta 4$ et le récepteur de la sécrétine (SCTR) et internalisaient la rhodamine 123 fluorescente dans la lumière des cystes. Les mêmes caractéristiques ont été mises en évidence sur des hépatoblastes différenciés à partir des hESC (Zhao *et al.*, 2009) et après reprogrammation de fibroblastes murins en cellules souches hépatiques

(Yu *et al.*, 2013). Aucun de ces travaux n'a montré de caractérisation extensive des cellules incluant des marqueurs spécifiques, en particulier de récepteurs et de facteurs de transcription, ni de fonctionnalité.

Le but de notre travail a été de mettre au point des conditions chimiquement définies permettant de générer des cholangiocytes bien caractérisés et fonctionnels à partir de progéniteurs hépatiques humains dérivés de plusieurs types cellulaires (Dianat *et al.*, 2014).

Pour induire la différenciation des cellules souches en cholangiocytes *in vitro*, nous avons d'abord testé des facteurs de croissance ou des cytokines comme le VEGF, le BMP4 (*Bone Morphogenic Protein 4*), le TGF β (*Transforming Growth Factor*), l'activine A et tenté d'induire la voie de Notch connue pour jouer un rôle dans la différenciation de la plaque ductale au cours de l'embryogenèse. Avec ces facteurs, nous avons constaté l'induction d'expression de CK7 dans une partie des cellules. Les autres marqueurs biliaires comme TGR5, CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Receptor*), SCTR (*Secretin Receptor*) ou SOX9 étaient absents. Ainsi nous avons cherché d'autres facteurs moins étudiés qui pourraient induire la différenciation biliaire.

Des études réalisées sur les cholangiocytes cultivés *in vitro* ou chez la souris suggèrent que les cholangiocytes prolifèrent en réponse à l'hormone de croissance (GH, *Growth hormone*) *via* l'expression et la sécrétion d'IGF-1 (*Insulin-like growth factor-1*), aux estrogènes, qui potentialisent l'effet d'IGF-1, et à l'histamine qui stimule préférentiellement la prolifération des petits cholangiocytes (Alvaro *et al.*, 2005, 2007; Francis *et al.*, 2011; Strazzabosco & Fabris, 2012). L'IGF-1 joue également un rôle dans la protection des cholangiocytes contre la cytotoxicité induite par les sels biliaires dans le cas des cholestases (Drudi Metalli *et al.*, 2007).

Par ailleurs, une étude immunohistologique de l'expression du récepteur de l'hormone de croissance sur des coupes d'embryon humain à différents stades de développement montrait que l'expression du GHR (*GH Receptor*) apparaît dans les étapes précoces du développement (8,5 semaines de gestation) au moment de la ségrégation de la lignée biliaire et de la formation de la plaque ductale dans le foie fœtal (Simard *et al.*, 1996). Cette étude montrait également qu'à ce moment précis, le GHR est plus fortement exprimé dans les cellules localisées autour de la veine porte, où se retrouvent les cholangiocytes dans le foie adulte. L'étude du rôle de l'hormone de croissance sur le foie adulte de rat montre que la GH stimule l'expression de HNF6 non seulement par l'induction de STAT5, FoxA2 et HNF4 α mais aussi par la suppression de l'effet inhibiteur de C/EBP α (Lahuna *et al.*, 2000; Rastegar *et al.*, 2000). La combinaison de ces observations nous

suggérait que la GH jouerait également un rôle dans l'engagement biliaire des hépatoblastes autour de la veine porte en induisant l'expression d'HNF6 et en supprimant l'expression de C/EBP α .

L'interleukine-6 (IL-6) est un stimulateur clé de la prolifération des canaux biliaires et dans le foie fœtal son expression doit être inhibée par l'ensemble de FoxA1, FoxA2 et le récepteur des glucocorticoïdes (GR) pour permettre aux cellules de devenir quiescentes et ainsi de mettre fin à l'expansion des canaux biliaires (Okada *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1998; Yokomuro *et al.*, 2000a, 2000b; Li *et al.*, 2009). Dans le foie, l'IL-6 et ses récepteurs sont exprimés par les cholangiocytes et les hépatocytes. L'étude de Li *et al.*, a démontré que l'IL-6 exerce son effet mitogène sur les cholangiocytes *via* STAT3 et la voie de p42/44 MAPK.

Dans la période post-natale, les acides biliaires et leur rôle dans l'induction de la prolifération et l'expression des transporteurs spécifiques des cholangiocytes ont été étudiés par plusieurs équipes. Le taurocholate et le tauroolithocholate induisent la prolifération des grands et des petits cholangiocytes chez le rat ainsi que l'expression du transporteur ASBT (*Apical Na⁺-dependent Bile Acid Transporter*) (Alpini *et al.*, 2001). Les acides biliaires induisent également l'expression de SCTR, qui provoque l'augmentation d'AMP cyclique (AMPc) intracellulaire et par conséquent le flux et la concentration de bicarbonate biliaire (Baiocchi *et al.*, 1999).

Nous avons établi un protocole pour différencier des hESC et des hiPSC en hépatoblastes et ensuite en cholangiocytes avec l'hormone de croissance, l'EGF, l'IL-6 et le taurocholate de sodium (Dianat *et al.*, 2014). Les cellules différenciées de cette manière acquièrent une morphologie épithéliale et polarisée caractéristique des cholangiocytes. L'étude des marqueurs biliaires a confirmé le caractère cholangiocytaire de ces cellules avec une augmentation de l'expression de SOX9, CK7, AE2 (*Anion Exchanger 2*), AQP1, CFTR, TGR5 et SCTR au cours de la différenciation. Ces résultats ont été complétés par la mise en évidence des protéines spécifiques des cholangiocytes : des facteurs de transcription biliaires comme HNF6, HNF1 β et SOX9, les CK7, 18 et 19, la forme sécrétée de l'ostéopontine (OPN) et les récepteurs et transporteurs spécifiques des cholangiocytes comme SCTR, TGR5, CFTR, ASBT et KDR, le récepteur du VEGF.

Les cholangiocytes différenciés à partir des hESC et des hiPSC ont un cil primaire, organite sensoriel localisé au pôle apical des cholangiocytes bordant les canaux biliaires, qui détecte des modifications de la composition, de l'osmolalité et du flux biliaire. Une deuxième fonction des cholangiocytes intrahépatiques est la régulation de la composition de la bile en réponse aux stimulants *via* la signalisation

calcique ou l'AMPc. Nous avons mis en évidence l'expression génique des récepteurs spécifiques des cholangiocytes humains comme P2RY1 (*Purinergic Receptor P2 Y1*), AChR M3 (*M3 Muscarinic Cholinergic Receptor*), SSTR2, le récepteur de la somatostatine 2 et l'InsP3R type III (Inositol 1,4,5-Triphosphate récepteur de type III) qui sont impliqués dans la signalisation calcique. Les cholangiocytes différenciés ont montré une réponse calcique après la stimulation avec l'ATP, l'acétylcholine et la somatostatine, démontrant la fonctionnalité des récepteurs correspondants.

Une autre fonction des cholangiocytes intrahépatiques est la formation des canaux biliaires. Nous avons démontré que les cholangiocytes différenciés à partir des hESC et des hiPSC forment des cystes biliaires qui bourgeonnent et construisent des structures canalaire lorsqu'on les ensemence dans une matrice tridimensionnelle. Organisés en cystes, les cholangiocytes dérivés des cellules souches sont capables de transporter la Rhodamine 123 et un acide biliaire fluorescent du milieu de culture vers la lumière du cyste *via* le transporteur MDR1 (*Multidrug Resistance Protein 1*).

Ce protocole de différenciation cholangiocytaire à partir des hESC et des hiPSC pourrait ainsi servir à modéliser des cholangiopathies et ciliopathies héréditaires et à en étudier les mécanismes physiopathologiques. Il existe plusieurs maladies génétiques touchant la formation des canaux biliaires au cours du développement du foie : le syndrome d'Alagille (AGS), caractérisé par un nombre réduit des canaux biliaires intrahépatiques (Alagille *et al.*, 1987; Hofmann *et al.*, 2010); la maladie autosomique dominante polykystique du foie (ADPLD) caractérisée par une malformation des canaux biliaires et une dilatation des cystes biliaires, due à la mutation des gènes *SEC63* et *PRKCSH* (*Protein Kinase C Substrate 80K-H*) affectant la transmission des signaux par les cils (Drenth *et al.*, 2003; Davila *et al.*, 2004; Fedeles *et al.*, 2011); le syndrome de Meckel lié à un dysfonctionnement des cils primaires au cours des phases précoces d'embryogenèse et caractérisé par des anomalies du système nerveux central et des malformations de la plaque ductale, avec des canaux biliaires hypertrophiés et anormaux (Chen, 2007) et la mucoviscidose (*Cystic Fibrosis*, CF), qui affecte les cellules épithéliales du poumon, ainsi que le pancréas, le foie chez 20 % des malades, et l'intestin. La mucoviscidose est caractérisée par un transport anormal de chlore et de sodium à travers l'épithélium, en raison de mutations du gène *CFTR*. Dans les cholangiocytes CF, le flux et l'alcalinisation de la bile ainsi que la tolérance aux endotoxines sont réduits (Lecchi *et al.*, 2010; Fiorotto *et al.*, 2011).

Depuis la publication de ces résultats, d'autres protocoles ont été proposés :

- culture des cellules en 2D avec ajout de TGF β (De Assuncao *et al.*, 2015);
- culture en 3D dans le Matrigel (obtention de cystes) avec addition de FGF10, d'acide rétinoïque, d'activine A et d'EGF (Sampaziotis *et al.*, 2015);
- culture en 3D dans le Matrigel avec ajout de TGF β , HGF et EGF et en co-culture avec des cellules stromales OP9 sécrétant Jagged 1 (Ogawa *et al.*, 2015).

Les deux dernières équipes ont utilisé leurs protocoles de différenciation biliaire sur des iPSC générées à partir de patients atteints de mucoviscidose porteurs de la mutation *CFTR* Δ F508, qui entraîne l'apparition d'une protéine déficiente. Le travail d'Ogawa *et al.* a montré que la formation des cystes biliaires est plus lente à partir de cellules de patient que de cholangiocytes normaux. Dans ces deux études, il apparaît que ces cystes ne se dilatent plus en réponse à des concentrations croissantes d'AMPc, confirmant que le *CFTR* n'est pas fonctionnel.

L'émergence des protocoles qui permettent de différencier des iPSC en cholangiocytes fonctionnels fournit de nouveaux outils pour étudier les mécanismes impliqués dans la génération des cholangiopathies et le criblage de médicaments.

Modélisation *in vitro* de l'hypercholestérolémie familiale (HF)

L'hypercholestérolémie familiale ([OMIM#143890](#)) est une maladie autosomique dominante caractérisée par un taux élevé de LDL-cholestérol (LDL-C). Sa prévalence est évaluée entre 1,8 et 4,5 millions d'individus en Europe. Les dépôts de LDL-C dans les vaisseaux sanguins conduisent à des maladies cardiovasculaires prématurées (Khachadurian, 1988; Goldstein *et al.*, 2001). Une transmission autosomique récessive moins commune a également été décrite dans certaines familles libanaises (Khachadurian, 1964). En 1986, des mutations du récepteur des LDL (RLDL) ont été identifiées comme responsables de l'hypercholestérolémie autosomique dominante (ADH) ([OMIM#606945](#)) (Brown & Goldstein, 1986). Pendant des années, l'ADH a été considérée comme une maladie monogénique. Cependant, le génotypage de plusieurs patients avec le phénotype HF a montré qu'il existait des cas où aucune mutation RLDL ne pouvait être mise en évidence et la recherche d'autres gènes a conduit à la découverte du gène de l'apolipoprotéine B (ApoB) en 1987 (Innerarity *et al.*, 1987), et de la *Proprotein Convertase Subtilin/Kexin 9* (PCSK9) en 2003 (Abifadel *et al.*, 2003), comme autres gènes candidats responsables de l'ADH. Le gène *LDLRAP1*, à l'origine de l'hypercholestérolémie autosomique récessive (ARH), a également été découvert

en 2001 (Garcia *et al.*, 2001). Ces avancées ont ainsi établi la nature polygénique de l'HF chez certains patients.

Des iPSC spécifiques de patients ont été générées pour plusieurs défauts génétiques affectant les fonctions des hépatocytes comme la maladie de stockage du glycogène, le syndrome de Crigler-Najjar, la tyrosinémie familiale de type I, le déficit en α 1-anti-trypsine (A1ATD), la maladie de Niemann-Pick de type C (NPC), la maladie de Wilson, l'amylose familiale de la transthyréine (FTA) et également l'hypercholestérolémie familiale (Ghodsizadeh *et al.*, 2010; Rashid *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Leung *et al.*, 2013; Maetzel *et al.*, 2014; Si-Tayeb *et al.*, 2016). Les iPSC de patients HF sont un modèle unique pour étudier *in vitro* les voies de signalisation impliquées dans la synthèse et la dégradation du cholestérol et pour envisager un criblage à haut débit de petites molécules potentiellement thérapeutiques.

En 2010, Ghodsizadeh *et al.* ont dérivé des iPSC de patients atteints de tyrosinémie familiale de type I, de la maladie de stockage du glycogène (GSD1), du syndrome de Crigler-Najjar, de la cholestase héréditaire intrahépatique et également de l'hypercholestérolémie familiale. Cependant ni la différenciation des iPSC en hépatocytes ni le phénotype de ces maladies n'ont été étudiés dans ce travail (Ghodsizadeh *et al.*, 2010). En même temps, l'équipe de Vallier a dérivé des iPSC de patients atteints de déficit en α 1-anti-trypsine (A1ATD), ainsi que de la maladie du stockage de glycogène; enfin, en collaboration avec cette équipe, nous avons généré une lignée provenant d'un patient atteint d'hypercholestérolémie familiale (HF). Ces lignées d'iPSC ont été différenciées en hépatocytes immatures; dans les trois cas, les cellules reproduisaient *in vitro* l'aspect phénotypique de leurs pathologies respectives (Rashid *et al.*, 2010). Dans ces deux études concernant l'HF, la mutation à l'origine de cette pathologie et sa relation avec la fonction défectueuse des hépatocytes dérivés des iPSC n'est pas connue.

Cayo *et al.* ont généré des iPSC à partir des fibroblastes de J.D., un patient HF bien étudié par Brown et Goldstein (Cayo *et al.*, 2012). J.D. est un double hétérozygote pour le RLDL avec un allèle maternel contenant une délétion de 5 Kb qui couvre une partie de l'exon 13 et la totalité des exons 14 et 15 d'où résulte une protéine non fonctionnelle. L'allèle paternel contient une mutation ponctuelle dans l'exon 17 (Y807C) dans une séquence tétramérique conservée qui guide le RLDL vers les puits recouverts de clathrine et qui accélère l'internalisation du RLDL (Goldstein & Brown, 2009). La combinaison de ces deux mutations se manifeste par un phénotype de perte de fonction du RLDL. Les hépatocytes dérivés de ces lignées d'iPSC ont montré

une perte de la capacité à internaliser les LDL avec accumulation des LDL à la surface de la membrane cellulaire, ainsi qu'une augmentation de la sécrétion d'ApoB-100/VLDL, en accord avec les observations cliniques. Le traitement des cellules par la Lovastatine, un inhibiteur de l'HMG-CoA réductase n'a pas induit une augmentation de l'absorption des LDL.

Par ailleurs, Fattahi *et al.* ont caractérisé une autre mutation du RLDL à l'origine de l'hypercholestérolémie familiale (Fattahi *et al.*, 2012). Ils ont généré des iPSC à partir de fibroblastes de peau d'un enfant homozygote portant l'insertion d'une base dans la position 2411 dans l'exon 17 du RLDL, ce qui engendre un décalage du cadre de lecture et la création d'un codon stop 10 acides aminés en aval de l'insertion (Mohamadnejad *et al.*, 2010). Cette mutation code pour une protéine tronquée non fonctionnelle. Dans cette étude, les HF-iPSC ont été transfectées par un plasmide lentiviral codant pour le RLDL, ce qui permet une expression stable et de longue durée de ce récepteur. Les hépatocytes dérivés des iPSC corrigées ont été capables d'internaliser le LDL fluorescent. À ce jour, des études concernant la régulation de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol dans les hépatocytes corrigés ou non font encore défaut.

Dans notre étude, nous avons généré des iPSC à partir des fibroblastes de peau de deux patients, respectivement homozygote et hétérozygote, atteints d'hypercholestérolémie familiale. Les iPSC ont été ensuite différenciées en hépatocytes et la différenciation hépatocytaire a été validée par la présence de marqueurs hépatiques. Les iPSC des patients ont reproduit *in vitro* le phénotype de la maladie, à savoir le défaut d'internalisation des LDL. Les expériences de correction du défaut génétique par l'introduction d'une cassette d'expression du RLDL sous transduction lentivirale ou par recombinaison ciblée sont en cours.

Récemment, Si-Tayeb *et al.* ont généré des iPSC d'une patiente HF portant une mutation de gain de fonction dans le gène de PCSK9 (Si-Tayeb *et al.*, 2016). Cette protéine, synthétisée et sécrétée par les hépatocytes, se lie au RLDL et le guide vers les lysosomes où il sera dégradé. De cette manière, PCSK9 régule le métabolisme du cholestérol. Les iPSC de la patiente ont été différenciées en hépatocytes dans lesquels les auteurs ont démontré un niveau réduit d'internalisation des LDL et de sécrétion de PCSK9. Ce défaut a été aboli après le traitement des cellules avec la Pravastatine®, un inhibiteur de l'HMG-CoA réductase, suggérant que ce système serait un bon modèle d'étude de l'hypercholestérolémie familiale liée à une mutation de PCSK9.

La modélisation de l'hypercholestérolémie familiale, *via* des iPSC présentant une variété de mutations, permettra d'explorer plus profondément le

réseau complexe de la régulation de l'homéostasie du cholestérol. Ces cellules pourront également servir de nouveau modèle cellulaire pour le criblage de nouveaux médicaments et au développement d'approches de thérapie génique et cellulaire.

En conclusion, nos travaux ont permis d'établir à partir de cellules souches pluripotentes humaines deux modèles cellulaires pertinents.

Références

- Abifadel, M., Varret, M., Rabès, J.-P., 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, J.M., Luc, G., Moulin, P., Weissenbach, J., Prat, A., Krempf, M., Junien, C., Seidah, N.G., and Boileau, C. (2003). Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet*, 34, 154-156.
- Alagille, D., Estrada, A., Hadchouel, M., Gautier, M., Odièvre, M., and Dommergues, J.P. (1987). Syndromic paucity of interlobular bile ducts (Alagille syndrome or arteriohepatic dysplasia) : review of 80 cases. *J Pediatr*, 110, 195-200.
- Alpini, G., Ulrich, C., Roberts, S., Phillips, J.O., Ueno, Y., Podila, P.V., Colegio, O., LeSage, G.D., Miller, L.J., and LaRusso, N.F. (1997). Molecular and functional heterogeneity of cholangiocytes from rat liver after bile duct ligation. *Am J Physiol*, 272, G289-G297.
- Alpini, G., Ueno, Y., Glaser, S.S., Marzioni, M., Phinizy, J.L., Francis, H., and Lesage, G. (2001). Bile acid feeding increased proliferative activity and apical bile acid transporter expression in both small and large rat cholangiocytes. *Hepatology*, 34, 868-876.
- Alvaro, D., Metalli, V.D., Alpini, G., Onori, P., Franchitto, A., Barbaro, B., Glaser, S.S., Francis, H., Cantafora, A., Blotta, I., Attili, A.F., and Gaudio, E. (2005). The intrahepatic biliary epithelium is a target of the growth hormone/insulin-like growth factor 1 axis. *J Hepatol*, 43, 875-883.
- Alvaro, D., Macarri, G., Mancino, M.G., Marzioni, M., Bragazzi, M., Onori, P., Corradini, S.G., Invernizzi, P., Franchitto, A., Attili, A.F., Gaudio, E., and Benedetti, A. (2007). Serum and biliary insulin-like growth factor I and vascular endothelial growth factor in determining the cause of obstructive cholestasis. *Ann Intern Med*, 147, 451-459.
- Baiocchi, L., LeSage, G., Glaser, S., and Alpini, G. (1999). Regulation of cholangiocyte bile secretion. *J Hepatol*, 31, 179-191.
- Benedetti, A., Bassotti, C., Rapino, K., Marucci, L., and Jézéquel, A.M. (1996). A morphometric study of the epithelium lining the rat intrahepatic biliary tree. *J Hepatol*, 24, 335-342.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 232, 34-47.
- Cayo, M.A., Cai, J., DeLaForest, A., Noto, F.K., Nagaoka, M., Clark, B.S., Coltery, R.F., Si-Tayeb, K., and Duncan, S.A. (2012). JD induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes faithfully recapitulate the pathophysiology of familial hypercholesterolemia. *Hepatology*, 56, 2163-2171.
- Chen, C.-P. (2007). Meckel syndrome : genetics, perinatal findings, and differential diagnosis. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 46, 9-14.
- Davila, S., Furu, L., Gharavi, A.G., Tian, X., Onoe, T., Qian, Q., Li, A., Cai, Y., Kamath, P.S., King, B.F., Azurmendi, P.J., Tahvanainen, P., Kääriäinen, H., Höckerstedt, K., Devuyst, O., Pirson, Y., Martin, R.S., Lifton, R.P., Tahvanainen, E., Torres, V.E., and Somlo, S. (2004). Mutations in SEC63 cause autosomal dominant polycystic liver disease. *Nat Genet*, 36, 575-577.
- De Assuncao, T.M., Sun, Y., Jalan-Sakrikar, N., Drinane, M.C., Huang, B.Q., Li, Y., Davila, J.I., Wang, R., O'Hara, S.P., Lomberk, G.A., Urrutia, R.A., Ikeda, Y., and Huebert, R.C. (2015). Development and characterization of human-induced pluripotent stem cell-derived cholangiocytes. *Lab Invest*, 95, 684-696.
- Dianat, N., Dubois-Pot-Schneider, H., Steichen, C., Desterke, C., Leclerc, P., Raveux, A., Combettes, L., Weber, A., Corlu, A., and Dubart-Kupperschmitt, A. (2014). Generation of functional cholangiocyte-like cells from human pluripotent stem cells and HepaRG cells. *Hepatology*, 60, 700-714.
- Drenth, J.P.H., te Morsche, R.H.M., Smink, R., Bonifacino, J.S., and Jansen, J.B.M.J. (2003). Germline mutations in PRKCSH are associated with autosomal dominant polycystic liver disease. *Nat Genet*, 33, 345-347.
- Drudi Metalli, V., Mancino, M.G., Mancino, A., Torrice, A., Gatto, M., Attili, A.F., Alpini, G., and Alvaro, D. (2007). Bile salts regulate proliferation and apoptosis of liver cells by modulating the IGF1 system. *Dig Liver Dis*, 39, 654-662.
- Fattahi, F., Asgari, S., Pournasr, B., Seifinejad, A., Totonchi, M., Taei, A., Aghdami, N., Salekdeh, G.H., and Baharvand, H. (2012). Disease-Corrected Hepatocyte-Like Cells from Familial Hypercholesterolemia-Induced Pluripotent Stem Cells. *Mol Biotechnol*, 54, 863-873.
- Fedeles, S.V., Tian, X., Gallagher, A.-R., Mitobe, M., Nishio, S., Lee, S.H., Cai, Y., Geng, L., Crews, C.M., and Somlo, S. (2011). A genetic interaction network of five genes for human polycystic kidney and liver diseases defines polycystin-1 as the central determinant of cyst formation. *Nat Genet*, 43, 639-647.
- Fiorotto, R., Scirpo, R., Trauner, M., Fabris, L., Hoque, R., Spirli, C., and Strazzabosco, M. (2011). Loss of CFTR affects biliary epithelium innate immunity and causes TLR4-NF- κ B-mediated inflammatory response in mice. *Gastroenterology*, 141, 1498-1508.
- Francis, H.L., DeMorrow, S., Franchitto, A., Venter, J.K., Mancinelli, R.A., White, M.A., Meng, F., Ueno, Y., Carpino, G., Renzi, A., Baker, K.K., Shine, H.E.,

- Francis, T.C., Gaudio, E., Alpini, G.D., and Onori, P. (2011). Histamine stimulates the proliferation of small and large cholangiocytes by activation of both IP3/Ca²⁺ and cAMP-dependent signaling mechanisms. *Lab Invest*, 92, 282-294.
- Garcia, C.K., Wilund, K., Arca, M., Zuliani, G., Fellin, R., Maioli, M., Calandra, S., Bertolini, S., Cossu, F., Grishin, N., Barnes, R., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2001). Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science*, 292, 1394-1398.
- Ghodsizadeh, A., Taei, A., Totonchi, M., Seifinejad, A., Gourabi, H., Pournasr, B., Aghdami, N., Malekzadeh, R., Almadani, N., Salekdeh, G.H., and Baharvand, H. (2010). Generation of liver disease-specific induced pluripotent stem cells along with efficient differentiation to functional hepatocyte-like cells. *Stem Cell Rev*, 6, 622-632.
- Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2009). The LDL Receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29, 431-438.
- Goldstein J.L., Hobbs H.H., and Brown M.S. (2001) Familial hypercholesterolemia. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Scriver C.S. et al., eds., McGraw-Hill Book Co, New-York, edn 8, pp. 2863-2913.
- Hofmann, J.J., Zovein, A.C., Koh, H., Radtke, F., Weinmaster, G., and Iruela-Arispe, M.L. (2010). Jagged1 in the portal vein mesenchyme regulates intrahepatic bile duct development : insights into Alagille syndrome. *Development*, 137, 4061-4072.
- Innerarity, T.L., Weisgraber, K.H., Arnold, K.S., Mahley, R.W., Krauss, R.M., Vega, G.L., and Grundy, S.M. (1987). Familial defective apolipoprotein B-100 : low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84, 6919-6923.
- Kanno, N., LeSage, G., Glaser, S., Alvaro, D., and Alpini, G. (2000). Functional heterogeneity of the intrahepatic biliary epithelium. *Hepatology*, 31, 555-561.
- Khachadurian, A.K. (1964). The inheritance of essential familial hyper-cholesterolemia. *Am J Med*, 37, 402-407.
- Khachadurian, A.K. (1988). Clinical features, diagnosis and frequency of familial hypercholesterolemia. *Beitr Zur Infusionstherapie Contrib Infus Ther*, 23, 26-32.
- Lahuna, O., Rastegar, M., Maiter, D., Thissen, J.P., Lemaigre, F.P., and Rousseau, G.G. (2000). Involvement of STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) and HNF-4 (hepatocyte nuclear factor 4) in the transcriptional control of the hnf6 gene by growth hormone. *Mol Endocrinol*, 14, 285-294.
- Lecchi, S., Fabris, L., Spirli, C., Cadamuro, M., Fiorotto, R., and Strazzabosco, M. (2010). Cholangiocyte Biology as Relevant to Cystic Liver Diseases. In : K.F. Murray, and A.M. Larson (eds). *Fibrocystic Diseases of the Liver*, Humana Press, Totowa, N.J., pp. 23-43.
- Leung, A., Nah, S.K., Reid, W., Ebata, A., Koch, C.M., Monti, S., Genereux, J.C., Wiseman, R.L., Wolozin, B., Connors, L.H., Berk, J.L., Seldin, D.C., Mostoslavsky, G., Kotton, D.N., and Murphy, G.J. (2013). Induced Pluripotent Stem Cell Modeling of Multisystemic, Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *Stem Cell Rep*, 1, 451-463.
- Li, Z., White, P., Tuteja, G., Rubins, N., Sackett, S., and Kaestner, K.H. (2009). Foxa1 and Foxa2 regulate bile duct development in mice. *J Clin Invest*, 119, 1537-1545.
- Liu, Z., Sakamoto, T., Ezure, T., Yokomuro, S., Murase, N., Michalopoulos, G., and Demetris, A.J. (1998). Interleukin-6, hepatocyte growth factor, and their receptors in biliary epithelial cells during a type I ductular reaction in mice : interactions between the periductal inflammatory and stromal cells and the biliary epithelium. *Hepatology*, 28, 1260-1268.
- Maetzel, D., Sarkar, S., Wang, H., Abi-Mosleh, L., Xu, P., Cheng, A.W., Gao, Q., Mitalipova, M., and Jaenisch, R. (2014). Genetic and Chemical Correction of Cholesterol Accumulation and Impaired Autophagy in Hepatic and Neural Cells Derived from Niemann-Pick Type C Patient-Specific iPS Cells. *Stem Cell Rep*, 2, 866-880.
- Mohamadnejad, M., Pournasr, B., Bagheri, M., Aghdami, N., Shahsavani, M., Hosseini, L.A., Taghiabadi, E., Azizi, H., Heidari, I., Akhlaghpour, S., Calandra, S., Malekzadeh, R., and Baharvand, H. (2010). Transplantation of allogeneic bone marrow mesenchymal stromal cell-derived hepatocyte-like cells in homozygous familial hypercholesterolemia. *Cytotherapy*, 12, 566-568.
- Ogawa, M., Ogawa, S., Bear, C.E., Ahmadi, S., Chin, S., Li, B., Grompe, M., Keller, G., Kamath, B.M., and Ghanekar, A. (2015). Directed differentiation of cholangiocytes from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 33, 853-861.
- Okada, K., Shimizu, Y., Nambu, S., Higuchi, K., and Watanabe, A. (1994). Interleukin-6 functions as an autocrine growth factor in a cholangiocarcinoma cell line. *J Gastroenterol Hepatol*, 9, 462-467.
- Rashid, S.T., Corbineau, S., Hannan, N., Marciniak, S.J., Miranda, E., Alexander, G., Huang-Doran, I., Griffin, J., Ahrlund-Richter, L., Skepper, J., Semple, R., Weber, A., Lomas, D.A., and Vallier, L. (2010). Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. *J Clin Invest*, 120, 3127-3136.
- Rastegar, M., Rousseau, G.G., and Lemaigre, F.P. (2000). CCAAT/enhancer-binding protein-alpha is a component of the growth hormone-regulated network of liver transcription factors. *Endocrinology*, 141, 1686-1692.
- Sampaziotis, F., Cardoso de Brito, M., Madrugal, P., Bertero, A., Saeb-Parsy, K., Soares, F.A.C., Schruppf, E., Melum, E., Karlsten, T.H., Bradley, J.A., Gelson, W.T., Davies, S., Baker, A., Kaser, A., Alexander, G.J., Hannan, N.R., and Vallier, L. (2015). Cholangiocytes derived from human induced pluripotent stem cells for disease modeling and drug validation. *Nat Biotechnol*, 33, 845-852.

- Simard, M., Manthos, H., Giaid, A., Lefèbvre, Y., and Goodyer, C.G. (1996). Ontogeny of growth hormone receptors in human tissues : an immunohistochemical study. *J Clin Endocrinol Metab*, 81, 3097-3102.
- Si-Tayeb, K., Idriss, S., Champon, B., Caillaud, A., Pichelin, M., Arnaud, L., Lemarchand, P., May, C.L., Zibara, K., and Cariou, B. (2016). Urine-sample-derived human induced pluripotent stem cells as a model to study PCSK9-mediated autosomal dominant hypercholesterolemia. *Dis Model Mech*, 9, 81-90.
- Strazzabosco, M., and Fabris, L. (2012). Development of the bile ducts : Essentials for the clinical hepatologist. *J Hepatol*, 56, 1159-1170.
- Strazzabosco, M., Fabris, L., and Spirli, C. (2005). Pathophysiology of cholangiopathies. *J Clin Gastroenterol*, 39, S90-S102.
- Strick-Marchand, H. (2004). Bipotential mouse embryonic liver stem cell lines contribute to liver regeneration and differentiate as bile ducts and hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 8360-8365.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131, 861-872.
- Tanimizu, N. (2004). Notch signaling controls hepatoblast differentiation by altering the expression of liver-enriched transcription factors. *J Cell Sci*, 117, 3165-3174.
- Tanimizu, N., Miyajima, A., and Mostov, K.E. (2007). Liver Progenitor Cells Develop Cholangiocyte-Type Epithelial Polarity in Three-dimensional Culture. *Mol Biol Cell*, 18, 1472-1479.
- Wang, P., Cong, M., Liu, T.-H., Yang, A.-T., Cong, R., Wu, P., Tang, S.-Z., Xu, Y., Wang, H., Wang, B.-E., Jia, J.D., and You, H. (2010). Primary isolated hepatic oval cells maintain progenitor cell phenotypes after two-year prolonged cultivation. *J Hepatol*, 53, 863-871.
- Yokomuro, S., Tsuji, H., Lunz, J.G., Sakamoto, T., Ezure, T., Murase, N., and Demetris, A.J. (2000a). Growth control of human biliary epithelial cells by interleukin 6, hepatocyte growth factor, transforming growth factor β 1, and Activin A: Comparison of a cholangiocarcinoma cell line with primary cultures of non-neoplastic biliary epithelial cells. *Hepatology*, 32, 26-35.
- Yokomuro, S., Lunz, J.G., 3rd, Sakamoto, T., Ezure, T., Murase, N., and Demetris, A.J. (2000b). The effect of interleukin-6 (IL-6)/gp130 signalling on biliary epithelial cell growth, *in vitro*. *Cytokine*, 12, 727-730.
- Yu, B., He, Z.-Y., You, P., Han, Q.-W., Xiang, D., Chen, F., Wang, M.-J., Liu, C.-C., Lin, X.-W., Borjigin, U., Zi, X.Y., Li, J.X., Zhu, H.Y., Li, W.L., Han, C.S., Wangenstein, K.J., Shi, Y., Hui, L.J., Wang, X., and Hu, Y.P. (2013). Reprogramming fibroblasts into bipotential hepatic stem cells by defined factors. *Cell Stem Cell*, 13, 328-340.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I.I., and Thomson, J.A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318, 1917-1920.
- Zhao, D., Chen, S., Cai, J., Guo, Y., Song, Z., Che, J., Liu, C., Wu, C., Ding, M., and Deng, H. (2009). Derivation and Characterization of Hepatic Progenitor Cells from Human Embryonic Stem Cells. *PLoS One*, 4, e6468.
- Zhang, S., Chen, S., Li, W., Guo, X., Zhao, P., Xu, J., Chen, Y., Pan, Q., Liu, X., Zychlinski, D., et al. (2011). Rescue of ATP7B function in hepatocyte-like cells from Wilson's disease induced pluripotent stem cells using gene therapy or the chaperone drug curcumin. *Hum. Mol. Genet.*, 20, 3176-3187.