

UNIVERSITE MONTPELLIER 1
BIOLOGIE SANTE

T H E S E

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER 1

Discipline : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Ecole Doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

présentée et soutenue publiquement

par **Natalie Funakoshi**

le 6 décembre 2011

Titre : Différenciation des cellules souches embryonnaires humaines vers l'hépatocyte

JURY

Dr Christiane Guguen-Guillouzo, INSERM UMR991
Pr Valérie Gouon-Evans, Mt Sinai School of Medicine
Dr Karim Si-Tayeb, INSERM U972
Pr Pierre Blanc, Université Montpellier 1
Dr Michaël Bismuth, CHU Montpellier
Dr Patrick Maurel, INSERM U1040
Dr Sabine Gerbal-Chaloin, INSERM U1040

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Co-directeur de thèse

ABBREVIATIONS.....	4
INTRODUCTION.....	11
I. LE FOIE ADULTE.....	13
1. Anatomie et organisation tissulaire	13
a) Anatomie et vascularisation.....	13
b) Organisation tissulaire	14
c) Le tissu conjonctif	16
2. Types cellulaires du foie	17
3. Fonctions physiologiques.....	18
a) Synthèse des protéines plasmatiques et d'hormones	19
b) Production de la bile	20
c) Métabolisme des lipides	20
d) Métabolisme du glucose	21
e) Le métabolisme des acides aminés et la formation d'urée	22
f) Métabolisme des xénobiotiques.....	24
g) Stockage de vitamines et de minéraux	26
4. Zonation fonctionnelle des hépatocytes	26
II. L'ONTOGENESE HEPATIQUE	31
1. L'induction de l'endoderme définitif	31
2. La spécification hépatique.....	34
3. La maturation hépatique.....	37
a) Développement du système vasculaire.....	37
b) Cellules d'Ito (cellules stellaires) et cellules de Kupffer.....	38
c) Développement des voies biliaires	38
d) Maturation hépatocytaire	40
4. Différences entre l'homme et la souris	47
III. LES MODELES CELLULAIRES HEPATIQUES	49

1. Cultures primaires d'hépatocytes humains	49
a) Caractéristiques	49
b) Définition d'un hépatocyte adulte	50
2. Lignées hépatocytaires	55
3. Cultures primaires d'hépatocytes fœtaux	57
IV. LES CELLULES SOUCHES.....	58
1. Les cellules souches embryonnaires humaines	59
a) Origine	59
b) Propriétés des cellules souches embryonnaires humaines.....	60
c) Les déterminants de la pluripotence et de l'autorenouvellement	61
2. Les cellules souches adultes hépatiques et les progéniteurs	65
a) Données chez les rongeurs	66
b) Données chez l'homme	67
V. SOURCES ALTERNATIVES D'HEPATOCYTES HUMAINS	74
1. Génération d'hépatocytes à partir de cellules souches embryonnaires humaines.....	75
a) Différenciation par formation de corps embryoïdes.....	75
b) Différenciation en mono-couche sous l'action de facteurs solubles	76
c) Utilisation d'agents modifiants la structure de la chromatine	78
d) Supports de culture cellulaire	79
e) Optimisation du rendement des cultures	81
f) Expression de marqueurs hépatiques.....	82
g) Fonctionnalité in vitro	84
h) Fonctionnalité in vivo	86
2. Génération d'hépatocytes humains à partir de cellules souches pluripotentes induites (iPS).....	99
3. Génération d'hépatocytes à partir de cellules extrahépatiques	103

a) Différenciation vers l'hépatocyte à partir de multipotent adult progenitor cells (MAPCs) isolés à partir de la moelle osseuse	104
b) Différenciation vers l'hépatocyte à partir de cellules souches hématopoïétiques ...	105
c) Différenciation vers l'hépatocyte à partir de cellules souches mésenchymateuses.	105
d) Différenciation vers l'hépatocyte à partir de cellules adultes.....	108
4. Génération d'hépatocytes par reprogrammation directe de cellules adultes	110
VI. TRAVAUX EXPERIMENTAUX	112
1. Elaboration du protocole de différenciation.....	113
a) 1 ^e étape : Induction de l'endoderme définitif	113
b) 2 ^e étape : Spécification hépatique	117
c) 3 ^e étape : La maturation hépatique	120
2. Article.....	128
VII. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	153
1. Amélioration des cultures de hES-Hep	153
2. Perspectives pour les hES-Hep	156
a) Etudes pharmacologiques	156
b) Applications thérapeutiques	158
BIBLIOGRAPHIE	167

ABBREVIATIONS

AAT: α -1 antitrypsine

ABC: ATP Binding Cassette

ADH1A: Alcooldéshydrogénase 1

AFP: α -foetoprotéine

AhR: Aryl Hydrocarbon Receptor

AL: Adult Liver

Alb: Albumine

APC: Adenomatous Polyposis Coli

Apo: Apolipoprotéine

ASPGR: Asialoglycoprotein Receptor

BCRP: Breast Cancer Resistant Protein

BMP: Bone Morphogenetic Protein

CAR: Constitutive Androstane Receptor

CD: Cluster of Differentiation

CE : Corps Embryoïde

CEBP: CCAAT/enhancer Binding Protein

CER: Cerberus

CF: Cytométrie de Flux

CK: Cytokératine

CPR: cytochrome P450 réductase

CPS: Carbamoyl Phosphate Synthétase

CSM: Cellules Souches Mésenchymateuses

CXCR4: C-X-C Chemokine Receptor type 4

CYP450: Cytochromes P450

DDC: Diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine

Dex: Dexaméthasone

DMSO: Diméthylsulphoxyde

ECM: Extra-Cellular Matrix

EGF: Epithelial Growth Factor

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

EpCAM: Epithelial Cell Adhesion Molecule

EROD: Ethoxyrésorufine-O-dééthylase

ES: cellules souches embryonnaires

FII: Facteur de coagulation II

FV: Facteur de coagulation V

FF: Foie Foetal

Fg: Fibrinogène

FGF: Fibroblast Growth Factor

FL: Foetal Liver

FoxA: Forkhead box A

G6P: Glucose-6-Phosphatase

G-CSF: Granulocyte Colony Stimulating Factor

GFP: Green Fluorescent Protein

GM-CSF: Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

GGT: Gamma Glutamyl Transpeptidase

GK: Glucokinase

GRE: Glucocorticoid Responsive Element

GS: Glutamine Synthase

GSC: Goosecoid

GST: Glutathion-S-Transférase

HDGF: Hepatoma-Derived Growth Factor

HDL: High Density Lipoprotein

HepPar1: Hepatocyte Paraffin 1

hES: cellules souches embryonnaires humaines

Hes-1: Homolog of hairy/enhancer-of-split 1

hES-Hep: cellules souches embryonnaires humaines différenciées vers l'hépatocyte

HGF: Hepatocyte Growth Factor

HHCP: Hépatocytes Humains adultes en Culture Primaire

HMG: High Mobility Group

HMGCS2: 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A synthase 2

HNF: Hepatocyte Nuclear Factor

ICC: Immunocytochimie

ICG: Indocyanine Green (vert d'indocyanine)

Id3: Inhibitor of differentiation 3

IF: Immunofluorescence

IL1: Interleukine 1

iPS: cellules souches pluripotentes induites

ITS: Insuline-Transferrine-Sélénium

Klf4: Kruppel-like factor 4

KOSR: Knock Out Serum Replacement

LDL: Low Density Lipoprotein

LFABP: Liver Fatty Acid Binding Protein

LIF: Leukemia Inhibitory Factor

LRH1 : Liver Receptor Homolog-1

LXR: Liver X Receptor

MAPC: Multipotent Adult Progenitor Cells

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MCI: Masse Cellulaire Interne

MCP1: Monocyte Chemotactic Protein 1

MDR: Multi Drug Resistance

miARN: micro-ARN

MIXL1: Mix1 homeobox-like 1

MPC: 2-methacryloylxyéthylphosphorylcholine

MRM: Multiple Reaction Monitoring

NCAM: Neural Cell Adhesion Molecule

NGF: Nerve Growth Factor

NPE-Hep: cellules non-parenchymateuses épithéliales

OATP: Organic Anion-Transporting Polypeptide

OC-2: Onecut 2

OCT4: Octamer-binding transcription factor 4

OSM: Oncostatine M

PAU: Poly-Amino-Uréthane

PCHH: Primary Cultures of adult Human Hepatocytes

PDGR α : Platelet-Derived Growth Factor Receptor α

PEPCK: Phosphoénolpyruvate Carboxykinase

PGC1 α : Peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 α

PI3K: Phosphatidylinositol-3-kinase

PKL: Pyruvate Kinase of the Liver

POR: Cytochrome P450 réductase

PROD: 2-methacryloylxyéthylphosphorylcholine

PTFE: Polytétrafluoroéthylène

PXR: Pregnane X Receptor

qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction

RT-PCR: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

RXR: Retinoid X Receptor

SCID: Severe Combined Immuno Deficient

SDF1: Stromal cell-derived factor-1

Shh: Sonic hedgehog

SLC21A6: Solute Carrier Organic Anion Transporter Family 21 member A6

SOX: SRY (sex determining region Y)-box

SRC1: Steroid Receptor Coactivator 1

SSEA: Stage-Specific Embryonic Antigen

ST: Sulphotransférase

T3: Triiodothyronine

TAT: Tyrosine aminotransférase

TC: Transplantation Cellulaire

TCF/LEF: T cell factor/ lymphoid enhancer factor

TERT: Telomerase Reverse Transcriptase

TGF β : transforming growth factor β

TO : Tryptophane 2,3 dioxygénase

TNF α : Tumour Necrosis Factor α

TTR : Transthyréline

TWEAK: TNF-like weak inducer of apoptosis

UGT : UDP glucuronyltransférase

uPA: Urokinase-type Plasminogen Activator

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VHC: Virus de l'Hépatite C

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

WB : Western Blot

XBP1: X-box Binding Protein 1

ZBTB20: (Zinc finger and BTB domain-containing protein 20)

Zhx2: Zinc finger and homeoboxes factor 2

ZIC1: Zinc finger protein 1

INTRODUCTION

Le foie est le plus grand organe interne du corps humain, et est impliqué dans de nombreux processus vitaux avec plus de 500 fonctions assurées. Le foie peut être affecté par de multiples pathologies, dont les hépatites (virales, alcooliques, toxiques, auto-immunes), la cirrhose (développement excessif de tissu fibreux au sein du parenchyme hépatique, conséquence d'une agression au long cours), la stéatose (surcharge en graisse), le cancer (carcinome hépato-cellulaire) et les maladies génétiques (hémochromatose, maladie de Wilson). Ces maladies peuvent fortement perturber les fonctions hépatiques, et par conséquent affecter le pronostic vital lors des atteintes sévères. La prévalence des maladies hépatiques est estimée à 6% au sein de l'Union Européenne, et les maladies chroniques du foie étaient la 5^e cause de mortalité en Europe en 2004 (EASL). Dans le monde, il est estimé que 170 millions de personnes présentent une maladie chronique du foie (Russo and Parola, 2011).

En raison de la multiplicité et la complexité des fonctions du foie, l'insuffisance hépatique engendrée par ces diverses pathologies est difficile à traiter. Lorsque l'atteinte est sévère, le seul recours thérapeutique est la transplantation hépatique orthotopique. Cependant, cette technique est limitée par la pénurie chronique de greffons : en 2008, seul 56% des patients sur liste d'attente de transplantation hépatique en France ont pu être greffés (Centre Hepato-biliaire Paul Brousse). Des thérapeutiques alternatives sont en cours de développement et permettraient de pallier à l'insuffisance hépatique en attendant une greffe, notamment la transplantation hépatocytaire et le foie bioartificiel. Ces deux techniques sont moins invasives que la transplantation hépatique, peuvent être répétées au cours du temps et laissent en place le foie natif, ce qui permet d'attendre une éventuelle récupération de la fonction hépatique dans le cas de l'hépatite fulminante. Le foie bioartificiel est constitué d'un système d'hémodialyse contre un milieu contenant des hépatocytes, permettant la détoxification et le maintien des fonctions hépatiques. A l'heure actuelle, huit systèmes différents ont été développés et testés sur des patients en insuffisance hépatique. Certains essais ont démontré que le foie bioartificiel pouvait améliorer les paramètres biologiques et neurologiques de patients en insuffisance hépatique (Ellis et al., 1999; Samuel et al., 2002), voire augmenter leur survie dans certains cas (Demetriou et al., 2004). La plupart de ces systèmes utilisent des hépatocytes issus de lignées cellulaires tumorales, ou d'hépatocytes d'origine porcine, dont la

sécurité d'utilisation n'a pas été formellement établie (risque de transmission de zoonoses, ou de passage dans la circulation de cellules tumorales), ce qui limite l'utilisation de ces systèmes à grande échelle. La transplantation hépatocytaire est une autre technique prometteuse dans le traitement des maladies hépatiques, dont la faisabilité et l'efficacité a été démontrée dans des modèles murins d'insuffisance hépatique (Soltys et al., 2010). Cette technique a été appliquée à petite échelle chez l'homme, avec des résultats encourageants chez les patients atteints de déficits métaboliques hépatiques (Dhawan et al., 2010). Même si les résultats de la transplantation hépatocytaire dans le contexte d'insuffisance hépatique aiguë sont plus hétérogènes, la preuve de concept a été établie, notamment dans une étude qui a utilisé la transplantation hépatocytaire comme solution « d'attente » chez cinq patients, en attendant une transplantation hépatique (Strom et al., 1999). Cependant, le développement du foie bioartificiel et de la transplantation hépatocytaire sont freinés par la faible disponibilité d'hépatocytes humains frais en grande quantité, qui sont le type cellulaire idéal dans le traitement de la pathologie hépatique humaine.

Les cultures primaires d'hépatocytes humains sont actuellement obtenues à partir de pièces de lobectomies (exérèse d'un lobe hépatique le plus souvent en raison d'une atteinte tumorale) ou de foies de donneurs non transplantables, qui sont des sources limitées en quantité. Les cellules obtenues ont une durée de vie limitée en culture, avec une perte progressive des fonctions cellulaires au cours du temps. A l'heure actuelle, il n'est pas possible de faire multiplier des hépatocytes humains adultes en culture. De plus, l'utilisation de cellules hépatiques prélevées à partir de pièces de lobectomie chez des patients porteurs de tumeurs hépatiques pose le risque d'une éventuelle contamination par des cellules cancéreuses, alors que les cellules extraites de greffons non transplantables auront probablement une fonctionnalité sous-optimale si le greffon lui-même est de moindre qualité, ce qui est le plus souvent le cas. Le développement de nouvelles stratégies d'obtention d'hépatocytes humains est donc nécessaire. Les cellules souches embryonnaires humaines (hES) sont une source prometteuse d'hépatocytes adultes en raison de leur capacité de différenciation et de prolifération. Le but de ce travail est donc de développer un modèle *in vitro* de différenciation de hES en hépatocytes matures et fonctionnels. La stratégie employée consiste à reproduire *in vitro* l'ontogenèse hépatique en mimant à chaque étape l'environnement de l'hépatocyte par l'ajout séquentiel de facteurs de croissance et l'utilisation de milieux et de supports de culture variés. Les cellules obtenues pourraient non seulement avoir des applications en biothérapie,

mais également dans l'étude de la physio-pathologie hépatique, dans la recherche pharmacologique (étude du métabolisme et de la toxicité des médicaments) et dans l'élaboration *in vitro* de nouvelles stratégies thérapeutiques dans les maladies hépatiques, notamment virales et parasitaires.

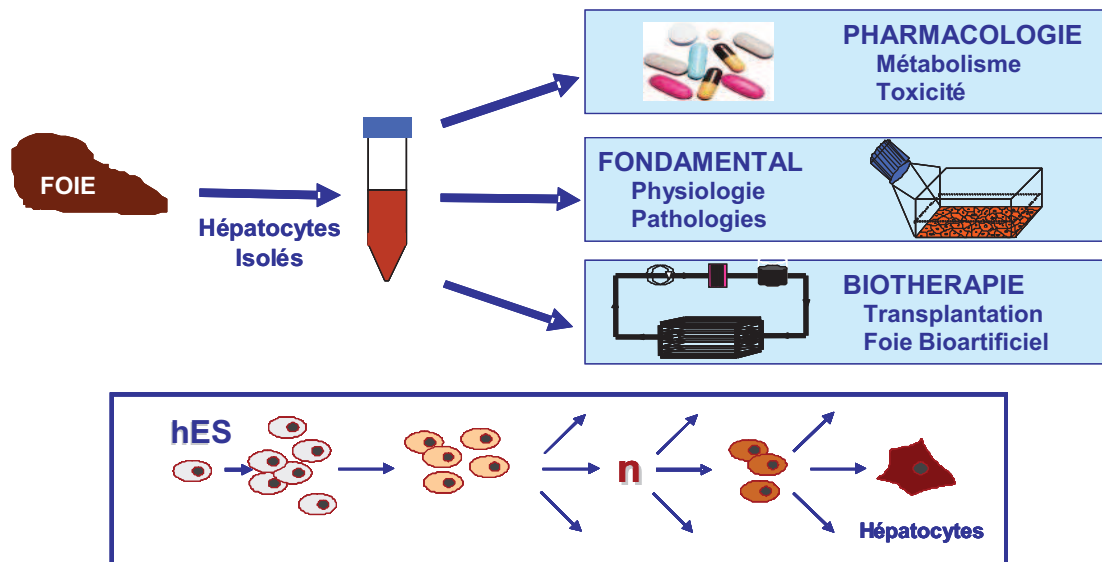


Figure 1. Résumé schématique des applications des cultures primaires d'hépatocytes humains

I. LE FOIE ADULTE

1. Anatomie et organisation tissulaire

a) Anatomie et vascularisation

Le foie est situé dans le quadrant supérieur droit de l'abdomen, sous le diaphragme et au-dessus des intestins. Recouvert par la capsule de Glisson, il est composé de deux lobes, qui sont eux-mêmes composés de plusieurs segments. Chaque segment est composé de lobules, qui sont des structures microscopiques orientées autour d'une veine centrale. On compte au total 50 000 à 100 000 lobules dans un foie adulte, ce qui constitue environ 2% du poids total de l'organe, soit 1 400 à 1 800 g.

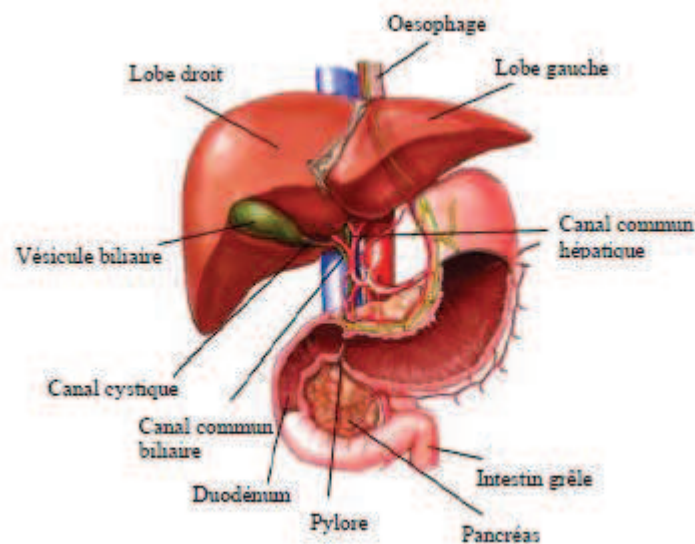


Figure 2. Anatomie hépatique

Le foie est un organe très vascularisé : il reçoit environ 1,5 litres de sang par minute et stocke en permanence 10% du volume sanguin total (0,5 litres). Le sang qui arrive au foie a une origine double : environ 25% de l'apport sanguin provient de l'artère hépatique, qui ramène du sang riche en oxygène, alors que 75% provient de la veine porte, qui ramène du sang du tube digestif contenant les métabolites de la digestion : acides aminés, monosaccharides, lipides, vitamines et acides biliaires. Le sang retourne vers la circulation générale via la veine sus-hépatique qui se jette dans la veine cave inférieure.

La bile sécrétée par les canalicules biliaires quitte le foie via le canal hépatique commun avant d'être stockée dans la vésicule biliaire. Lors de la digestion, elle est déversée dans l'intestin grêle, où elle aide à la digestion du bol alimentaire.

b) Organisation tissulaire

Un lobule hépatique est constitué d'environ une vingtaine de travées d'hépatocytes bordées de capillaires sinusoïdaux, qui sont disposés de façon radiale et drainent le sang vers une veine centrale efférente, formant ainsi une structure tridimensionnelle qui ressemble à une éponge (Figure 3B). Les lobules hépatiques ont une forme plus ou moins hexagonale, et chacun des six angles est marqué par une triade portale constituée d'une veine porte, un canal biliaire et une artère hépatique. Les 6 à 8 hépatocytes proches des espaces portes (et donc de la circulation afférente) sont dits péri-portaux, ceux proches des veines centrales (circulation

efférente) sont dits péri-centraux ou péri-veineux et entre les deux se situent les hépatocytes centro-lobulaires (Figure 3A). Les fonctions métaboliques des hépatocytes varient selon leur localisation au sein du lobule hépatique (Fausto and Campbell, 2003) (cf chapitre I.4).

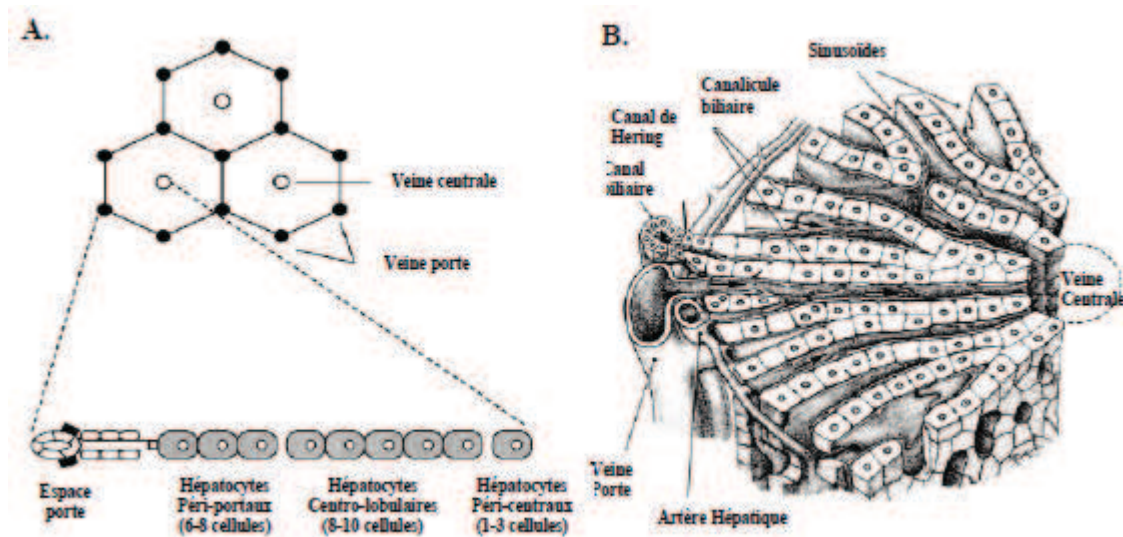


Figure 3. Histologie et organisation du lobule hépatique (d'après Fausto et al (Fausto and Campbell, 2003))

Les travées d'hépatocytes ont habituellement l'épaisseur d'une seule cellule. Le sang qui arrive des veines du système porte circule entre ces travées dans les capillaires sinusoidaux avant de regagner la veine centro-lobulaire. Les sinusoides sont bordés par les cellules endothéliales sinusoïdales qui sont séparées des hépatocytes par un petit espace appelé espace de Disse, lieu d'échange entre les hépatocytes et le plasma à travers les fenestrations des cellules endothéliales sinusoïdales. Le côté baso-latéral des hépatocytes est bordé de nombreuses microvillosités se jetant dans l'espace de Disse, augmentant considérablement l'espace d'échanges métaboliques.

La bile synthétisée par les hépatocytes est drainée par un système de canalicules biliaires, qui sont des conduits fins ménagés entre les hépatocytes aux domaines apicaux, les parois des canalicules étant formées par les membranes cytoplasmiques de deux hépatocytes adjacents. La bile dans les canalicules se draine au niveau des canaux biliaires des espaces portes, qui se jettent dans le réseau des canaux biliaires intra-hépatiques avant d'être acheminée en dehors du foie via le canal hépatique principal. Le canal de Hering, bordé par un épithélium cubique, fait la jonction entre les canalicules biliaires et le canal biliaire au niveau de l'espace porte, et constitue la connexion entre les hépatocytes et le système biliaire.

Les hépatocytes et les cellules bordant les sinusoides sont soutenus par un fin réseau de fibres réticuliniques qui irradient depuis la veine centro-lobulaire pour se fondre avec la trame collagénique lâche du tissu conjonctif de soutien des espaces portes et des limites du lobule.

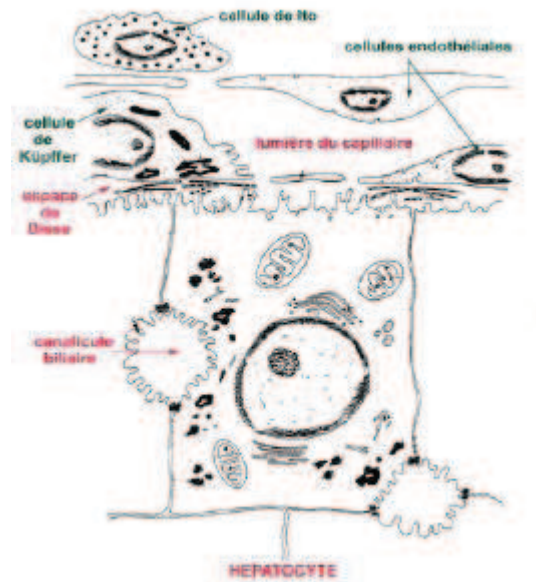


Figure 4 : L'espace de Disse (Polycopies Santé Université Lyon 1)

c) Le tissu conjonctif

Le tissu conjonctif est composé d'éléments cellulaires (cellules d'Ito, cellules de Kupffer . . .), et de matrice extra-cellulaire. La matrice extra-cellulaire est une structure en 3 dimensions qui joue un rôle mécanique (maintien de la structure parenchymateuse) mais également physiologique, étant impliqué dans la prolifération cellulaire, la différenciation, la migration et la régulation de l'expression génique (Bedossa and Paradis, 2003). Elle favorise la circulation des molécules de signalisation et des nutriments, ainsi l'évacuation des déchets. La matrice extra-cellulaire est composée principalement de protéoglycanes, composées d'une chaîne protéique centrale sur laquelle sont branchées les glycosaminoglycanes. Elle contient également des structures fibrillaires, dont le collagène principalement (types I, II, V, VI), et l'élastine qui confère aux structures hépatiques leur élasticité. Les glycoprotéines adhésives (nectines), dont la fibronectine et la laminine, assurent le contact entre la matrice extra-cellulaire, les hépatocytes et les cellules non-parenchymateuses (Kuntz, 2008b).

2. Types cellulaires du foie

Le foie est constitué de plusieurs types cellulaires. Les hépatocytes du parenchyme hépatique sont la population cellulaire majoritaire (environ 60-65% de la population cellulaire hépatique, soit 80% du volume parenchymateux) et sont responsables des fonctions majeures assurées par le foie. Les hépatocytes sont de grandes cellules polyédriques caractérisées par la présence d'un ou de plusieurs noyaux (30 à 80% de cellules polyploïdes), et sont riches en organites cellulaires (mitochondries, réticulum endoplasmique, lysosomes, vésicules de glycogène et de lipides) qui assurent leur activité métabolique. Elles ont une durée de vie d'au moins 150 à 200 jours *in vivo* chez l'homme.

Les cholangiocytes ou cellules épithéliales biliaires (3,5% de la population cellulaire hépatique) forment l'épithélium des canaux biliaires. Leur taille et leur morphologie varient suivant leur localisation au sein de l'arbre biliaire. Elles régulent le débit biliaire et modifient la composition de la bile en réabsorbant certains composés comme le glucose, la glutathione ou les acides aminés, ou en sécrétant de l'eau ou des bicarbonates.

Les cellules endothéliales sinusoïdales forment la paroi des capillaires sinusoïdaux et constituent 15-20% de la population cellulaire hépatique, mais seulement 2,5% du volume du parenchyme hépatique. Elles sont de forme plate, avec un noyau bombant dans la lumière du sinusoïde et ne possèdent pas de membrane basale. Elles facilitent les échanges entre les hépatocytes et le plasma grâce à leurs fenestrations et jouent un rôle d'éboueur grâce à leur richesse en vésicules de pinocytose. Elles produisent et sécrètent des cytokines (IL1 (interleukine 1), IL6, TNF α (tumeur necrosis factor α), des composants de la matrice extra-cellulaire (collagène, fibronectine), des facteurs de croissance (HGF (hepatocyte growth factor), EGF (epithelial growth factor), IGF (insulin-like growth factor)) et des molécules vasoactives (NO, endothéline) (Kuntz, 2008b).

Les cellules de Kupffer (environ 8-12% de la population cellulaire hépatique, soit 2,1% du volume parenchymateux) sont des cellules macrophagiques qui sont localisées dans les capillaires sinusoïdaux. Elles assurent la fonction de phagocytose et épurent ainsi le sang sinusoïdal d'impuretés non arrêtées par la barrière intestinal (endotoxines bactériennes, particules minérales ou virales par exemple). Elles sont également impliquées dans les

réactions inflammatoires au niveau du foie et sont capables de sécréter un certain nombre de cytokines et de protéases (Jones, 1996; Kuntz, 2008b).

Les cellules d'Ito, ou cellules stellaires, constituent environ 3-8% de la population cellulaire hépatique, soit 1,4% du volume parenchymateux total. Ce sont des cellules de morphologie fibroblastique qui sont présentes autour des sinusoides et dans l'espace de Disse. Elles sont impliquées dans la synthèse de la matrice extra-cellulaire, et sont capables de synthétiser le collagène I, III et IV ainsi que la fibronectine et la laminine. Elles jouent également un rôle dans le stockage des graisses et de la vitamine A et dans la régulation du tonus microvasculaire au sein du foie. Elles sont capables de se transdifférencier en myofibroblaste après activation cellulaire dans des situations pathologiques, et jouent un rôle clé dans la régénération hépatique et dans le développement de la fibrose hépatique (Jones, 1996; Kuntz, 2008b).

Enfin, les cellules de Pit sont des lymphocytes natural killer spécifiques du foie. Elles sont présentes en faible nombre et résident au niveau des sinusoides. Elles ont une activité cytotoxique et agissent en synergie avec les cellules de Kupffer pour éliminer les cellules tumorales (Wisse et al., 1997).

3. Fonctions physiologiques

Le foie régule de nombreux processus physiologiques et est responsable d'activités métaboliques vitales. Il possède à la fois une fonction exocrine (sécrétion de bile) et une fonction endocrine (sécrétion d'hormones plasmatiques). Le foie joue un rôle essentiel dans la sécrétion de protéines plasmatiques et de bile, le métabolisme glucidique (stockage et mise à disposition du glucose), la synthèse du cholestérol et le métabolisme lipidique, le métabolisme de l'urée, l'élimination des xénobiotiques et le stockage et métabolisme de certaines vitamines et minéraux.

a) Synthèse des protéines plasmatiques et d'hormones

Le foie sécrète de nombreuses protéines plasmatiques indispensables à l'organisme, par exemple :

- Les facteurs de la coagulation (fibrinogène, prothrombine, facteurs V, VII, IX et X)
- L'albumine, qui représente 50% de la synthèse protéique du foie et par conséquent la protéine plasmatique principale. Elle régule la pression oncotique du sang et assure le transport de nombreuses substances (hormones liposolubles, acides gras, calcium, bilirubine, drogues) et contribue à maintenir le pH sanguin.
- Les apolipoprotéines (ApoA, ApoB, ApoE, ApoF, ApoH . . .), protéines transporteurs des lipides agissant également comme cofacteurs enzymatiques
- D'autres protéines transporteurs : transthyrétine (transport des hormones thyroïdiennes et la vitamine A), transferrine (transport du fer), céruléoplasmine (transport du cuivre), hémopexine (transport de l'hème) . . .
- Les inhibiteurs de protéases : l' α -1 antitrypsine AAT, l'antithrombine, l' α -2 macroglobuline, qui protègent les cellules des enzymes sécrétées lors de processus inflammatoires
- Certaines protéines impliquées dans la modulation de l'inflammation et des complexes immuns : protéine C-réactive, complément

Certaines de ces protéines sont utilisées comme marqueurs de la fonction hépatique, notamment l'albumine et le facteur V. Leurs taux sanguins diminuent en cas d'insuffisance hépatique.

Le foie sécrète également certaines hormones (hgh.org), dont :

- L'insulin-like growth factor 1 (IGF-1), qui joue un rôle important dans la croissance chez l'enfant et a un effet anabolisant chez l'adulte
- La thrombopoïétine, qui régule la production des plaquettes par la moelle osseuse

- L'angiotensinogène, précurseur de l'angiotensine, hormone qui régule la pression artérielle par plusieurs mécanismes différents.

b) Production de la bile

Les hépatocytes produisent et sécrètent la bile, qui aide à la digestion et l'absorption des graisses, et permet également d'éliminer des déchets de la circulation sanguine. La bile contient de l'eau, des bicarbonates et d'autres ions, qui neutralisent l'acidité du bol digestif en provenance de l'estomac, ainsi que des sels biliaires, qui permettent la digestion des vitamines liposolubles et des lipides en formant des micelles, qui sont ensuite absorbés par l'intestin grêle. Elle contient également du cholestérol (voie d'élimination du cholestérol en excès de l'organisme), de la bilirubine (un produit de la dégradation de l'hémoglobine) et éventuellement des produits de dégradation issus du métabolisme des xénobiotiques. La sécrétion biliaire est de l'ordre de 800 à 1000 ml par jour chez l'homme. Cette bile est évacuée via les voies biliaires où elle est stockée dans la vésicule biliaire avant d'être déversée dans le duodénum.

c) Métabolisme des lipides

Comme vu précédemment, le foie joue un rôle essentiel dans l'absorption des lipides en sécrétant de la bile. Le foie synthétise du cholestérol et ses dérivés (lipoprotéines, HDL (high density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein), acides biliaires, etc.) à partir des acides gras. L'enzyme cholestérol 7 α -hydroxylase (aussi appelé CYP7A1) est impliquée dans la synthèse des acides biliaires à partir du cholestérol. Le foie régule également les taux d'acides gras et de triglycérides circulants. Il peut synthétiser les triglycérides et les acides gras à partir de composés glucidiques ou protéiques en excès, avant de les stocker ou les envoyer dans la circulation générale pour être mis en réserve dans le tissu adipeux. Il peut également oxyder les triglycérides et les acides gras à des fins énergétiques, avec la libération de corps cétoniques dans la circulation sanguine, qui peuvent être utilisés par d'autres tissus.

d) Métabolisme du glucose

Le foie joue un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie du glucose. C'est le seul organe capable de libérer du glucose dans la circulation pour être utilisé par d'autres tissus. Le foie gère le métabolisme du glucose par trois mécanismes :

- La glycogénèse : le foie synthétise du glycogène, forme de stockage du glucose, à partir du glucose, fructose et galactose présents en excès.
- La glycogénolyse : quand le taux de glucose sanguin diminue, le foie libère du glucose à partir de la dégradation du glycogène. La glucose-6-phosphatase (G6P) est impliquée dans ce processus. Le transporteur Glut2 (SLC2A2) est nécessaire pour la libération du glucose dans le sang.
- La néoglucogenèse : le foie peut synthétiser le glucose à partir de l'acide lactique, du glycérol et de certains acides aminés. Ce processus nécessite le phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK).

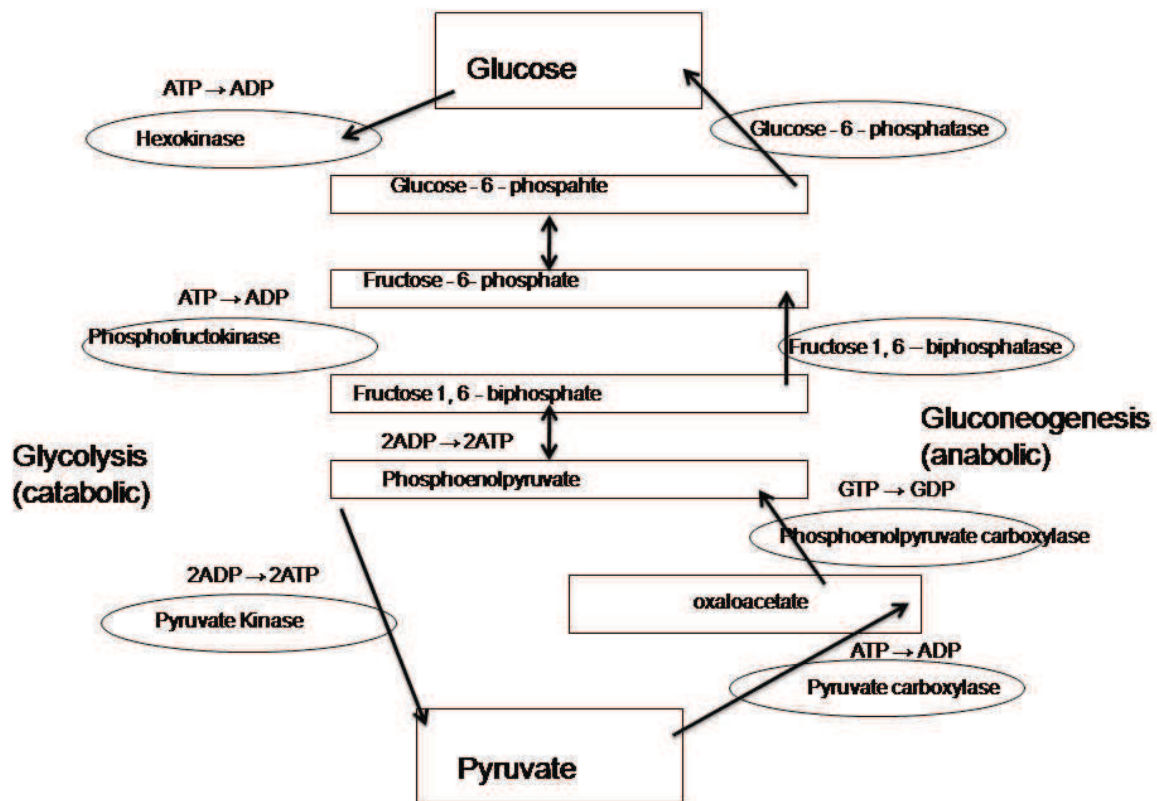


Figure 5. Représentation schématique des principales étapes de la néoglucogénèse et la glycolyse (d'après (Glycolysis and Gluconeogenesis Concept Map))

Ces mécanismes sont sous contrôle hormonal : l'insuline diminue la glycémie et favorise la formation de glycogène hépatique, alors que le glucagon et l'adrénaline induisent la glycogénolyse et l'élévation de la glycémie. Le foie métabolise également l'acide pyruvique et lactique, qui sont produits par l'utilisation de glucose au niveau du muscle et d'autres tissus.

e) Le métabolisme des acides aminés et la formation d'urée

Lors de la digestion, les protéines alimentaires sont dégradées en acides aminés, qui sont absorbés au niveau de l'intestin avant d'arriver au foie via la veine porte. Ces acides aminés sont utilisés pour la synthèse protéique, mais peuvent également être transformés en glucose pour fournir de l'énergie. A l'inverse, si l'apport en acides aminés est insuffisant, l'organisme

peut les synthétiser par la transformation d'un acide aminé en un autre ou par amination d'hydrates de carbone. La désamination oxydative est le processus par lequel un acide aminé est dégradé en acide cétonique et en ammoniacque, et se fait principalement dans le foie. L'acide cétonique formé sera utilisé pour former de l'énergie ou sera transformé en un autre acide aminé. L'ammoniacque relargué est transformé par le foie en urée avant d'être excrété dans les urines, impliquant entre autre l'enzyme carbamoyl phosphate synthétase (CPS). La désamination peut être couplée avec l'amination simultanée d'un acide cétonique pour former un autre acide aminé, grâce aux enzymes appelés transaminases (ex. tyrosine aminotransférase, alanine aminotransférase . . .). D'autres enzymes comme la glutamine synthétase (GS) ou la tryptophane 2,3 dioxigénase (TO) interviennent également dans le métabolisme des acides aminés.

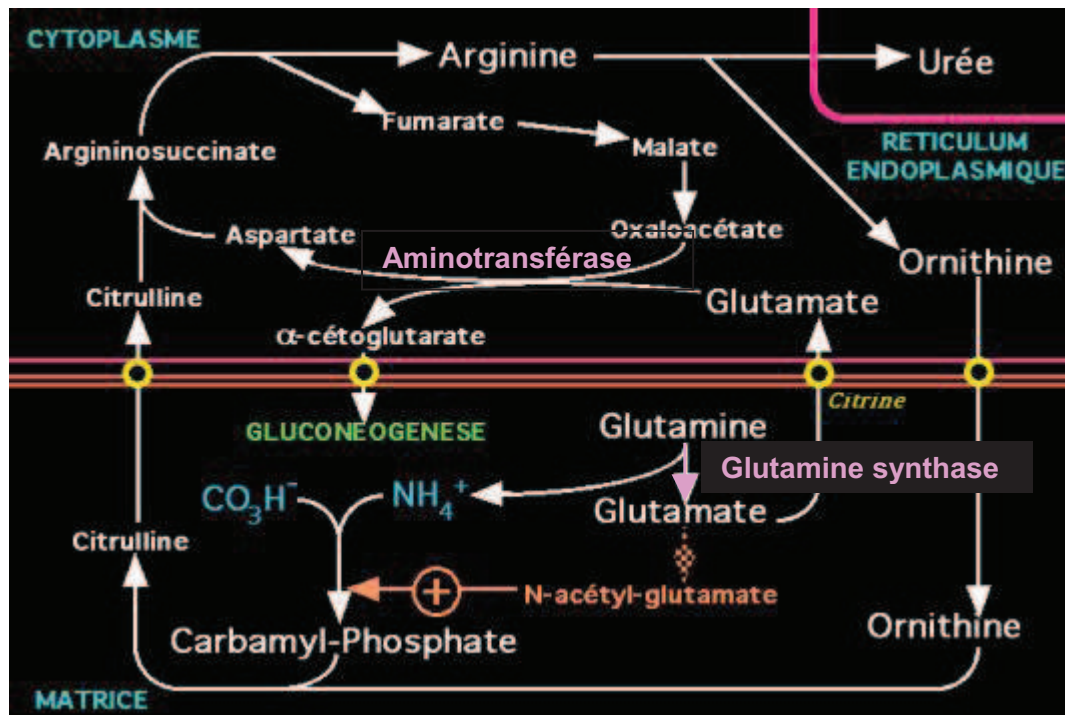


Figure 6. Schéma de l'uréogénèse (d'après (Schéma de l'uréogénèse))

f) Métabolisme des xénobiotiques

- Généralités

Le foie est responsable de l'élimination de nombreuses substances toxiques endogènes et exogènes, notamment les médicaments et les polluants environnementaux (par exemple, les toxines d'origine végétale, animale ou fongique, les pesticides, les herbicides, les solvants, les colorants, les conservateurs, etc.) appelés xénobiotiques. Ces substances sont généralement hydrophobes et ont potentiellement des effets toxiques si elles ne sont pas transformées en molécules plus facilement excrétables. Le foie assure cette fonction de détoxification grâce à diverses enzymes qui permettent d'éliminer les xénobiotiques dans la bile ou dans l'urine.

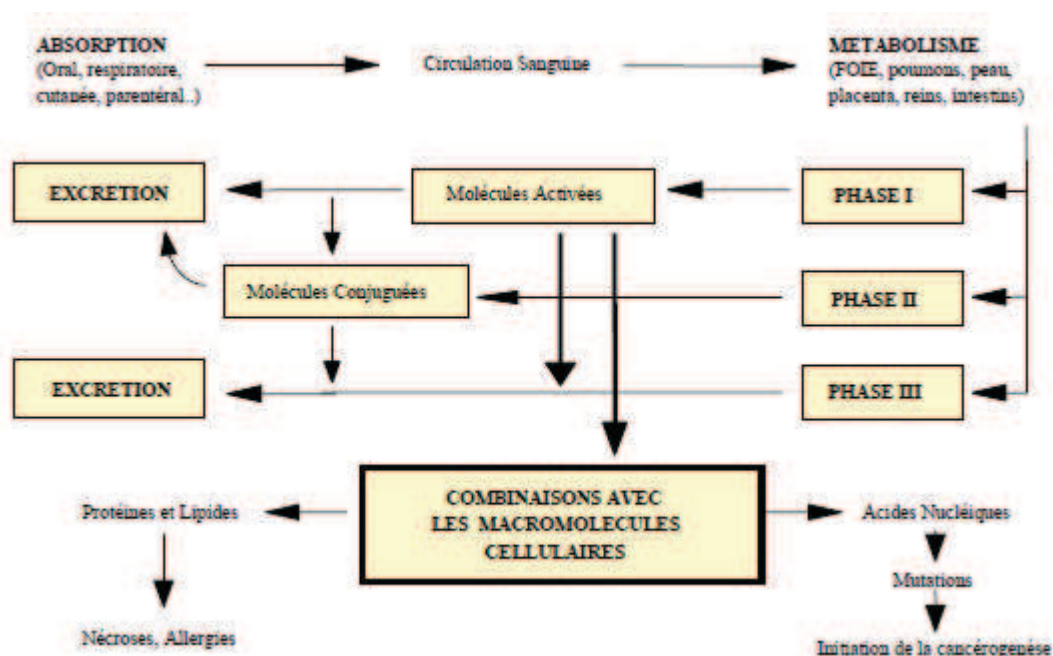


Figure 7. Schéma général du métabolisme des xénobiotiques

Ce processus fait appel à plusieurs familles de protéines et se déroule en plusieurs étapes :

- Les réactions de phase I ou fonctionnalisation augmentent la solubilité des molécules hydrophobes par ajout d'entités chimiques polaires (groupement $-OH$, NH_2 , $COOH$). Ces réactions peuvent faire appel aux mécanismes d'hydrolyse ou de réduction, mais ce sont le plus souvent des réactions d'oxydation catalysées par les cytochromes P450.

Les cytochromes P450 (CYP450) sont une famille de mono-oxygénases, dont les plus abondants sont la sous-famille CYP3A, qui possède une grande variété de substrats. Le CYP3A4 à lui seul métabolise 50 à 60% des médicaments (Guengerich, 1999; Li et al., 1995). Les sous-familles CYP1A, CYP2B et CYP2C jouent également un rôle important.

- Les réactions de phase II ou de conjugaison augmentent encore le degré hydrophile des molécules, facilitant ainsi leur transport et leur élimination. Ces réactions concernent les xénobiotiques natifs, ou les métabolites générés par la phase I. Les réactions de phase II sont catalysées par les UDP glucuronyltransférases (UGT), les sulphotransférases et les glutathion-S-transférases (GST) (Zamek-Gliszczynski et al., 2006).
- Les réactions de la phase III sont réalisées par des transporteurs enzymatiques se situant sur la membrane cytoplasmique de l'hépatocyte et permettent l'élimination des conjugués hydrophiles hors de la cellule. Ces enzymes appartiennent aux familles de transporteurs de type MDR (Multi Drug Resistance), ABC (ATP Binding Cassette) ou BCRP (Breast Cancer Resistant Protein), OATP (organic anion-transporting polypeptide) (Klaassen and Slitt, 2005).

- Rôle de CAR et PXR

Afin d'assurer une réponse métaboliques adaptative lors d'une exposition aux xénobiotiques, l'expression des CYP450 peut être induite en présence de ceux-ci. Cette induction est régulée entre autre par les récepteurs nucléaires pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR) et aryl hydrocarbon receptor (AhR) qui sont eux-mêmes activés en présence de xénobiotiques (Pascussi et al., 2008).

Lors de leur activation, PXR et CAR forment des hétérodimères avec RXR (retinoid X receptor) et active la transcription de gènes cibles en se fixant sur leurs promoteurs. Les premières études ont démontré que PXR active l'expression des CYP3A, alors que CAR active l'expression de CYP2B en présence de phénobarbital. Cependant, des études ultérieures ont révélé que CAR et PXR ont de nombreux cibles communs et sont capables de

réguler l'activité d'un grand nombre de gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques comme les CYP3A, CYP2A, CYP2C, UGTs, GSTs, sulphotransférases et transporteurs enzymatiques (MRPs, MDR1, OATPs) (Tolson and Wang, 2010). CAR et PXR interagissent avec d'autres récepteurs nucléaires et facteurs de transcription qui contrôlent les voies de signalisation régulant l'homéostasie des acides biliaires, des lipides, des hormones, des vitamines, du glucose et de l'inflammation (Pascussi et al., 2008). Ainsi, le métabolisme des xénobiotiques peut être influencé par de nombreux stimuli physiopathologiques (inflammation, hormones, état du métabolisme énergétique, etc.). Un exemple de « cross-talk » est l'interaction entre les glucocorticoïdes et CAR et PXR, dont l'expression est dépendant des glucocorticoïdes (Pascussi et al., 2000a; Pascussi et al., 2001; Pascussi et al., 2000b). La présence d'un glucocorticoid responsive element (GRE) a été identifié au niveau du promoteur de CAR chez l'homme. Ainsi, la présence de dexaméthasone, un glucocorticoïde de synthèse, active CAR et PXR, et majore l'induction des CYP450 secondaire aux xénobiotiques. A concentrations basses, le dexaméthasone active PXR et CAR en agissant sur GR qui induit leur expression. A des concentrations plus fortes, le dexaméthasone agit directement sur PXR, induisant une activation plus forte (Pascussi et al., 2001).

g) Stockage de vitamines et de minéraux

Le foie contient 80% des réserves de vitamine A de l'organisme, qui sont stockées dans les vacuoles lipidiques des cellules stellaires. Le foie joue également un rôle important dans le métabolisme de la vitamine D, du fer et du cuivre, et stocke 50% des réserves en vitamine B12 (Kuntz, 2008a).

4. Zonation fonctionnelle des hépatocytes

Certaines des fonctions hépatocytaires décrites précédemment sont assurées par l'ensemble des hépatocytes, alors que d'autres ne sont assurées que par un sous-groupe d'hépatocytes. En effet, les hépatocytes n'expriment pas les mêmes enzymes selon leur localisation au sein du lobule hépatique, et leurs fonctions enzymatiques dépendent de leur distribution spatiale, un phénomène appelé zonation (Gebhardt, 1992; Jungermann and Kietzmann, 1996). Certains

enzymes prédominent dans la zone périportale (zone d'entrée dans les sinusoides du sang en provenance de la veine porte) alors que d'autres prédominent dans la zone péricentrale (ou périveineuse), zone où le sang est collecté avant de regagner la veine sus-hépatique et la circulation générale. La régulation zonale peut être de type « gradient », où le niveau d'expression d'un enzyme varie progressivement entre les régions périportale et péricentrale, ou de type « compartimental », où l'expression d'un enzyme ne concerne que les hépatocytes d'une zone bien délimitée (Christoffels et al., 1999). La zonation se met en place au cours du période péri-natal (Spear et al., 2006).

Les hépatocytes de la zone périportale (zone 1), en contact avec du sang riche en oxygène et nutriments, assurent les fonctions de glycogénolyse et néoglucogenèse, synthétisent l'urée et le cholestérol, et catabolisent les acides aminés. Inversement, les hépatocytes de la zone péricentrale (zone 3), qui reçoivent peu d'oxygène, assurent la glycolyse, la formation de glutamine, la céto-genèse, la néolipogenèse, les réactions de biotransformation et le métabolisme des xénobiotiques (Oinonen and Lindros, 1998). Les hépatocytes centrolobulaires (zone 2) ont un phénotype intermédiaire et sont moins bien définis (Jungermann and Kietzmann, 1996), mais ils synthétisent l'albumine en grande quantité (Lindros et al., 1997).

La zonation implique également les cellules non-hépatocytaires, puisqu'il existe un gradient quantitatif au sein du lobule hépatique pour les cellules endothéliales, cellules de Kupffer, cellules d'Ito et cellules de Pit, toutes ces cellules étant plus nombreuses dans la région périportale (Sasse, 1996). La taille des cholangiocytes s'accroît entre la région périportale et péricentrale (Turner et al., 2011). La matrice extra-cellulaire de la zone périportale est riche en collagène III, IV et en laminine, favorisant l'adhésion des cellules, alors que la celle de la zone péricentrale est riche en collagène I et fibronectine, qui inhibent l'attachement (McClelland et al., 2008).

	Région périportale	Région péricentrale
Activités métaboliques	Synthèse d'urée (CPS1) Hydrolyse de glutamine Dégradation d'acides aminés (TAT) Néoglucogenèse (PEPCK, G6P) Glycogénolyse Synthèse de cholestérol Oxydation d'acides gras Sulphation	Synthèse de glutamine (GS) Glycolyse (GK, PKL) Néolipogenèse Cétogenèse Métabolisme des xénobiotiques (monoxydation, glucuronidation) (CYP P450, GST, CAR, AhR, POR) Production d'acides biliaires Synthèse albumine
Caractéristiques morphologiques des hépatocytes	Hépatocytes de petite taille Riches en glycogène Grandes mitochondries	Hépatocytes de grande taille Riches en réticulum lisse Riches en lysosomes Petites mitochondries
Capillaires sinusoides	Peu de fenestrations	Beaucoup de fenestrations
Autres cellules	Nombreuses cellules de Kupffer, grandes Nombreuses cellules d'Ito, cellules de Pit	Peu de cellules de Kupffer, petites
Matrice extra-cellulaire	Collagènes type III, IV et V Laminines, hyaluronanes Protéoglycanes de chondroïtine sulphate, héparane sulphate	Collagènes type II, IV Protéoglycanes d'héparine

Tableau 1. Caractéristiques de la zonation hépatique. D'après (Kuntz, 2008a), (Torre et al., 2011), (Turner et al., 2011), (Oinonen and Lindros, 1998). TAT: Tyrosine aminotransférase, GK: glucokinase, PKL: pyruvate kinase of the liver.

L'expression des gènes codant pour chaque activité enzymatique est gouvernée au niveau transcriptionnelle et post-transcriptionnelle (Braeuning et al., 2007). Certaines activités enzymatiques ont une zonation fixe (par exemple, la métabolisation de l'ammoniaque), alors que d'autres ont une zonation « dynamique » (par exemple, métabolisme des glucides ou des xénobiotiques) pouvant s'adapter aux stimuli extérieurs (Torre et al., 2011). Plusieurs hypothèses existent quant à la nature des mécanismes gouvernant l'expression différentielle des gènes qui soutend la zonation hépatique. Il a été suggéré que l'exposition des hépatocytes à différentes concentrations sanguines d'oxygène, de métabolites ou d'hormones (insuline, glucagon, hormones thyroïdiennes) pourrait influencer le phénotype des hépatocytes (Oinonen and Lindros, 1998) et ainsi réguler la zonation « dynamique ». Lors de la circulation du sang de la région périportale vers la région péricentrale, certains de ces composés sont captés ou excrétés par les hépatocytes ou les cellules non-parenchymateuses, créant ainsi un gradient au sein du lobule hépatique. La présence d'un gradient au niveau des composés de la matrice extra-cellulaire (Reid et al., 1992), ou des interactions intercellulaires (Kuo and Darnell, 1991) pourraient également être des déterminants de la zonation fonctionnelle. L'environnement extra-cellulaire peut induire des signaux mécaniques (forces d'étirement) qui sont transduits aux cellules hépatiques via le cytosquelette et les intégrines. Ainsi certaines voies de signalisation peuvent être activées par des signaux mécaniques, comme TGF β (transforming growth factor β)/Activine/Nodal (Sakata et al., 2004). Des signaux mécaniques peuvent également être transduits par les cils primaires, qui détectent les mouvements de flux de liquides au niveau de la face apicale des cellules. Des modifications de la tonicité de la bile lors de son écoulement entre les régions péricentrale et périportale peuvent activer des voies de signalisation au niveau des cils primaires comme Hedgehog ou PDGR α (platelet-derived growth factor receptor α) (Turner et al., 2011). Des facteurs nerveux peuvent entrer en jeu, puisque l'acétylcholine stimule la prolifération de progéniteurs (Woo et al., 2008), et la régénération des progéniteurs est diminuée chez le rat vagotomisé (Cassiman et al., 2002).

Des données récentes ont démontré le rôle primordial de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans la zonation fonctionnelle (Torre et al., 2011). L'activation de cette voie augmente les niveaux de β -caténine non phosphorylé au sein des cellules, qui est transloqué dans le noyau où il s'associe avec les facteurs de transcription Lef/Tcf (lymphoid enhancer factor, T-cell factor), qui interagit avec le récepteur nucléaire HNF4 α (hepatocyte nuclear

factor 4 α) (Colletti et al., 2009) et active les gènes cibles. La forme active de la β -caténine se trouve dans les hépatocytes péricentraux, alors que la protéine APC (adenomatous polyposis coli), un inhibiteur de la β -caténine est exprimée préférentiellement dans la région périportale. Ainsi, l'activation de la voie Wnt/ β -caténine induit le phénotype péricentral alors que la répression de cette voie induit le phénotype périportale (Benhamouche et al., 2006). Il a été démontré que la voie Wnt/ β -caténine a un effet positif sur l'expression de gènes péricentraux comme la GS ou des transporteurs de glutamate (SLC1A2) et d'ammoniaque (RhBg), alors qu'elle a un effet négatif sur l'expression de gènes périportaux comme la CPS1, arginase 1 et glutaminase 2, des enzymes du cycle de l'urée (Benhamouche et al., 2006; Cadoret et al., 2002). La β -caténine régule également l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques, comme CYP2E1, CYP1A2, AhR et CAR (Braeuning et al., 2007; Hailfinger et al., 2006; Sekine et al., 2006). La voie Wnt/ β -caténine peut donc être considérée comme le « gardien de la zonation » (Torre et al., 2011).

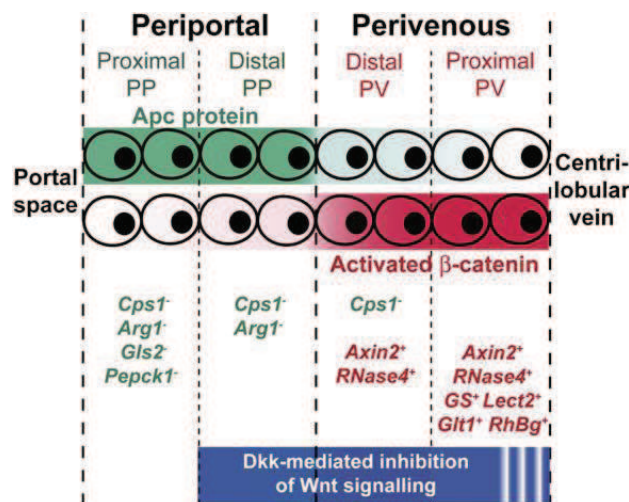


Figure 8. Organisation de la zonation fonctionnelle au sein du lobule hépatique sous l'influence de la voie Wnt/ β -caténine. D'après Benhamouche et al (Benhamouche et al., 2006). Gls2 : glutaminase 2, Arg1 : arginase1, Glt1 : transporter-1 of glutamate.

La zonation est considérée par certains auteurs comme la conséquence de différences dans l'état de maturation des hépatocytes. Selon cette hypothèse, il existerait un gradient de

différenciation le long de l'axe porto-central, et les hépatocytes de la région périportale seraient les moins différenciés, alors que ceux de la région péricentrale auraient atteint un état de différenciation avancé (Sigal et al., 1992). Dans le modèle du « streaming liver », la différenciation se ferait au cours de la migration des hépatocytes de la région périportale vers la région péricentrale (Zajicek et al., 1985). Cependant, cette théorie reste débattue car un certain nombre d'études (Bralet et al., 1994), (Kennedy et al., 1995), (Shiojiri et al., 2000) ne retrouvent pas d'évidence en faveur d'une migration hépatocytaire au cours du développement ou lors de la régénération.

II. L'ONTOGENESE HEPATIQUE

L'ontogenèse hépatique est un processus complexe au cours duquel les cellules embryonnaires pluripotentes se différencient progressivement en hépatocytes. Elle peut être découpée schématiquement en trois étapes : l'induction de l'endoderme définitif, la spécification hépatique et la maturation. Chaque étape est gouvernée par diverses voies de signalisation qui agissent séquentiellement ou en synergie afin d'aboutir à l'hépatocyte mature. Dans la majorité des cas, les rôles de ces voies de signalisation ont été identifiés grâce aux études sur l'embryon de souris, avant d'être transposés au développement de cellules souches embryonnaires humaines. Des études sur les embryons de souris, poulet, poisson zèbre et le xénotopus indiquent que les processus fondamentaux de l'ontogenèse hépatique sont globalement conservés entre les espèces (Roberts, 2000).

1. L'induction de l'endoderme définitif

Au cours du développement embryonnaire précoce, la masse cellulaire interne du blastocyste se différencie en endoderme primitif, à l'origine des tissus extra-embryonnaires, et en épiblaste, qui est à l'origine des trois couches germinales, l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme définitif. L'ectoderme est la couche germinale la plus externe, qui donnera naissance aux phanères et au système nerveux. Le mésoderme est la couche intermédiaire, à partir de laquelle se développent le sang, le cœur, les reins, les muscles et les os. Enfin, l'endoderme définitif, entouré par le mésoderme, donne naissance aux couches épithéliales

des voies digestives et respiratoires, ainsi qu'aux organes associés, dont la thyroïde, les poumons, le foie, la vésicule biliaire et le pancréas.

L'endoderme définitif se forme lors de la gastrulation vers le jour embryonnaire 7 (J7) chez la souris, lorsque les cellules pluripotentes de l'épiblaste migrent à travers la strie primitive de l'embryon, qui apparaît au niveau de l'épiblaste postérieur. Lors de cette migration, les cellules épiblastiques subissent une transition épithélio-mésenchymateuse et se transforment en mésendoderme, précurseur commun, avant de se différencier en mésoderme ou endoderme définitif (Shook and Keller, 2003). L'induction de la strie primitive est sous le contrôle des voies de signalisation Wnt/ β -caténine et TGF (transforming growth factor)/Nodal/Activine (Gadue et al., 2006). Le facteur de croissance Nodal, un membre de la superfamille TGF β , joue un rôle essentiel dans la spécification de l'endoderme définitif chez la souris, avec un fort niveau de signalisation induisant la différenciation vers l'endoderme définitif, alors qu'un faible taux de signalisation induit la différenciation vers le mésoderme (Lowe et al., 2001; Vincent et al., 2003). La signalisation Nodal a pour cible les gènes clés du développement de l'endoderme antérieur, comme SOX17 et FoxA2 (aussi appelé HGF3 β) (Shen, 2007). *In vitro*, de fortes concentrations d'activine A, un membre de la famille TGF β se liant aux récepteurs Nodal, induit la différenciation de hES en endoderme définitif (D'Amour et al., 2005). L'inhibition de la voie de signalisation phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), impliqué dans le maintien de l'état indifférencié et activé par l'insuline et l'insulin growth factor, est également nécessaire pour l'induction de l'endoderme définitif (McLean et al., 2007).

L'endoderme définitif est caractérisé par l'expression de marqueurs caractéristiques (SOX17, CXCR4, GSC et CER) distincts de ceux de la strie primitive (MIXL1), du mésendoderme (Brachyury), de l'ectoderme (ZIC1) et de l'endoderme viscéral (SOX7). Ces marqueurs permettent de suivre l'état de différenciation des cellules *in vitro*.

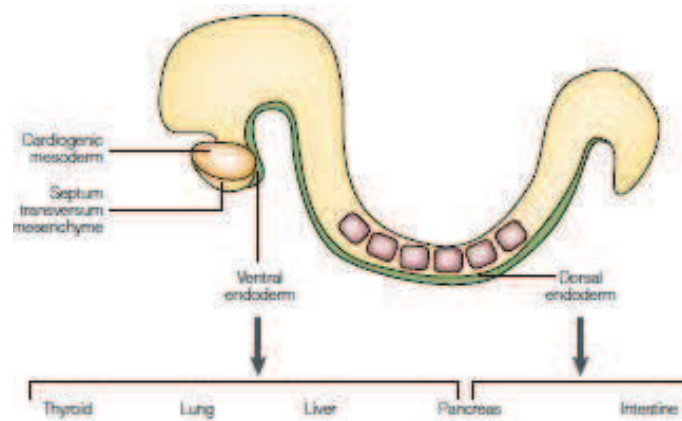


Figure 9. Formation et devenir de l'endoderme définitif (d'après Zaret et al (Zaret, 2002). Représentation d'un embryon de souris (coupe sagittale) à J8.

Après la gastrulation, l'embryon est soumis à des changements morphologiques considérables, et la couche cellulaire de l'endoderme définitif se transforme en tube intestinal primitif. Au sein de l'endoderme définitif, deux domaines sont distingués selon un axe antéro-postérieur : l'endoderme antérieur, ou ventral, qui donne naissance à la thyroïde, au poumon, au foie et à une partie du pancréas, et l'endoderme postérieur, ou dorsal, qui donne naissance aux intestins et à une partie du pancréas. Il a été démontré que ces domaines sont gouvernés par un gradient antéro-postérieur de l'expression de Wnt/ β -caténine (McLin et al., 2007): la répression de Wnt/ β -caténine dans l'endoderme antérieur définit l'endoderme antérieur et permet le développement hépatique, alors qu'une forte expression de Wnt/ β -caténine dans l'endoderme postérieur permet le développement des intestins.

Après la mise en place de l'endoderme définitif, les cellules destinées à devenir l'endoderme hépatique acquièrent une compétence leur permettant de répondre aux signaux de la spécification hépatique. L'expression des premiers marqueurs spécifiques du foie, l'albumine (Alb), la transthyréline (TTR) et l' α -foetoprotéine (AFP), apparaît vers J8 chez la souris (entre la 3^e et la 4^e semaine de gestation chez l'homme), au niveau de l'endoderme définitif antérieur. Les facteurs de transcription FoxA et GATA4, exprimés dans l'endoderme antérieur, sont capables de se fixer au promoteur de l'albumine avant l'expression de celle-ci (Bossard and Zaret, 1998; Gualdi et al., 1996), et induisent la décompaction de la chromatine, permettant ainsi la fixation d'autres facteurs de transcription essentiels au développement hépatique, comme C/EBP β , ainsi déclenchant l'expression de l'albumine. FoxA et GATA4 jouent donc le rôle de facteurs de transcription « pionniers », en permettant aux cellules de

l'endoderme antérieur d'acquérir une compétence leur permettant de répondre aux signaux de la spécification hépatique. HNF1 β stimule l'expression de FoxA1 et de FoxA2 dans l'endoderme définitif antérieur, et son absence induit la disparition de l'expression de l'albumine chez la souris (Lokmane et al., 2008). Au total, les facteurs de transcription HNF1 β , FoxA1, FoxA2 et GATA4 paraissent donc essentiels à l'initiation du développement hépatique. L'endoderme hépatique exprime entre autre les marqueurs FoxA2 et HEX.

2. La spécification hépatique

Après l'acquisition de la compétence, les cellules de l'endoderme définitif antérieur subissent la spécification hépatique, une étape déterminant pour le devenir ultérieur des cellules qui a lieu avant l'organogénèse proprement dite. La spécification hépatique est gouvernée par deux familles de facteurs de croissance sécrétés par les tissus environnants, les Fibroblast Growth Factors (FGF) et les Bone Morphogenetic Proteins (BMP). Le mésoderme cardiaque, un tissu adjacent à l'endoderme définitif antérieur, sécrète les FGF 1, 2, 4 et 8 (Zaret, 2002), qui jouent un rôle essentiel dans la spécification hépatique (Jung et al., 1999). L'induction des gènes hépatiques par le FGF est médié par la voie de signalisation mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) (Calmont et al., 2006), et est dépendant de concentrations basses de FGF. Au début de la spécification, le mésenchyme cardiaque est au contact de l'endoderme définitif antérieur et sécrète des FGF en faible quantité. Par la suite, les concentrations des FGF sécrétés par le mésenchyme cardiaque augmentent, mais le développement du septum transversum, tissu mésodermal adjacent à l'endoderme définitif à l'origine du diaphragme, sépare l'endoderme hépatique du mésenchyme cardiaque, l'empêchant ainsi d'être exposé à de fortes concentrations en FGF. En effet, de fortes concentrations de FGF induisent l'expression de marqueurs pulmonaires (Serls et al., 2005). En absence de la sécrétion de FGF, l'endoderme définitif se différencie vers le phénotype pancréatique par défaut (Deutsch et al., 2001).

Les FGF ne peuvent pas induire à eux seuls la spécification hépatique. Ils nécessitent l'action synergique des BMP 2 et 4 (Bone Morphogenetic Protein), sécrétés par le septum transversum (Rossi et al., 2001; Shin et al., 2007; Zaret, 2002). Les BMP agissent en partie en stimulant l'expression du facteur de transcription GATA4 (Lemaigre, 2009), qui joue un rôle dans

l'acquisition de la compétence (cf précédemment) et la spécification de l'endoderme pré-hépatique.

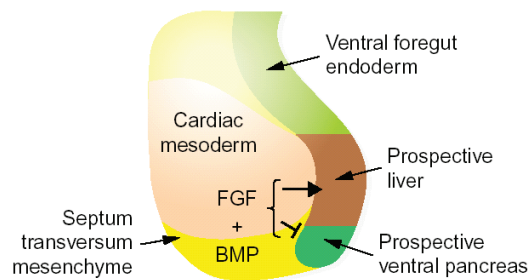


Figure 10. La spécification hépatique

Une étude plus récente a permis de mettre en évidence le rôle des cellules endothéliales dans la spécification hépatique (Han et al., 2011). Ces cellules sont étroitement associées à l'endoderme définitif lors de l'organogénèse, et la coculture de ces cellules avec l'endoderme définitif stimule la spécification hépatique. Les cellules endothéliales contrôlent la spécification en régulant les voies de signalisation Wnt et Notch, qui doivent être inhibées lors de la spécification hépatique. L'inhibition des voies Wnt et Notch augmente l'expression des marqueurs de la spécification hépatique en diminuant la prolifération des cellules de l'endoderme, alors que leur activation induit l'effet contraire (Han et al., 2011).

A ce stade de la spécification hépatique, l'HNF4 α joue également un rôle important. Un modèle de différenciation hépatique *in vitro* à partir de hES a montré que l'HNF4 α était exprimé dès J10 de culture, après exposition des hES au BMP4 et FGF2. La perte de l'expression de HNF4 α a entraîné une inhibition de l'expression des gènes caractéristiques du phénotype hépatique, ainsi qu'une inhibition des gènes impliqués dans l'acquisition de la compétence hépatique, comme FoxA1, FoxA2, FoxA3, HNF1 β , GATA4 et HEX, qui sont exprimés en amont. Ainsi, l'HNF4 α est nécessaire pour l'initiation et le maintien d'un réseau de facteurs de transcription qui gouvernent la spécification et la différenciation hépatique (DeLaForest et al., 2011).

Vers J9 chez la souris et J22 chez l'homme, les cellules de l'endoderme hépatique forment un diverticule qui bourgeonne au sein du septum transversum. Ce diverticule est bordé d'hépatoblastes, les cellules précurseurs du foie, qui adoptent une morphologie épithéliale pseudostratifiée (Bort et al., 2006). Les hépatoblastes prolifèrent, formant un bourgeon hépatique, puis migrent à travers la membrane basale et envahissent le septum transversum.

Ce stade est gouverné par un réseau de plusieurs facteurs de transcription : HEX est nécessaire à l'organisation des hépatoblastes en épithélium pseudo-stratifié et à leur prolifération (Bort et al., 2006; Martinez Barbera et al., 2000; Zhao and Duncan, 2005), GATA6 assure le maintien de l'état différencié des hépatoblastes (Zhao et al., 2005), alors que HNF6, Onecut (OC)-2 et Prox-1 jouent un rôle essentiel dans la migration des hépatoblastes (Margagliotti et al., 2008; Sosa-Pineda et al., 2000).

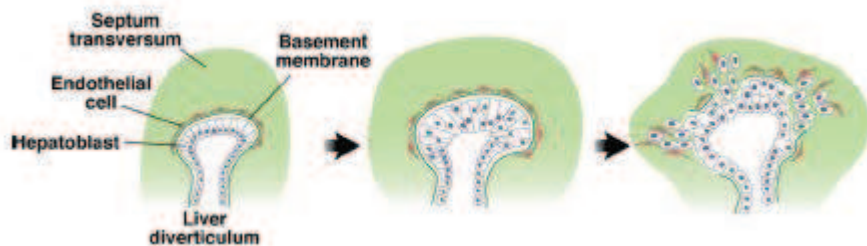


Figure 11. Schématisation du bourgeonnement hépatique. D'après Lemaigre (Lemaigre, 2009)

La prolifération des hépatoblastes au stade de bourgeon hépatique est gouvernée par plusieurs facteurs. Les hépatoblastes sont étroitement associés avec des cellules endothéliales qui les entourent et sécrètent des signaux essentiels au bourgeonnement hépatique, dont le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Matsumoto et al., 2001; Shiojiri and Sugiyama, 2004). Le VEGF activerait la sécrétion d'autres molécules par le mésenchyme du septum transversum favorisant la prolifération hépatocytaire comme l'IL6, l'EGF, le TGF β , le TNF α et notamment le HGF, qui est également sécrété par les hépatoblastes, porteurs de son récepteur, c-met. Sa voie de signalisation interagit avec celle de TGF β (Weinstein et al., 2001) pour assurer le développement hépatique. La β -caténine, qui médie la voie de signalisation Wnt, est également nécessaire pour la prolifération et la différenciation hépatique (Tan et al., 2008). Cette voie de signalisation est particulièrement complexe au sein du foie, puisqu'il existe au moins 11 ligands Wnt et 8 récepteurs Frizzled différents chez la souris (Matsumoto et al., 2008). Des études *in vitro* ont mis en évidence le rôle du Hepatoma-derived growth factor (HDGF), qui est produit par les hépatoblastes et stimule leur prolifération. Cependant, son expression diminue lors de la maturation des hépatoblastes en hépatocytes (Enomoto et al., 2002), et il n'est pas indispensable au développement hépatique *in vivo* (Gallitzendoerfer et al., 2008). Enfin, de nombreux autres signaux sont impliqués, comme les facteurs de

transcription Prox-1, Inhibitor of differentiation 3 (Id3), N-Myc, Hlx, et l'acide rétinoïque, qui agirait via les cellules mésodermiques (Lemaigre, 2009).

3. La maturation hépatique

a) Développement du système vasculaire

Le foie fœtal est en contact avec deux systèmes veineux, les systèmes ombilical et vitellin. Le système veineux vitellin participe dans la formation du système veineux efférent, alors que la veine ombilicale est la veine afférente principale dans le foie fœtal. A la naissance, la veine ombilicale s'affaïsse et est remplacée par la veine porte, qui devient la seule veine afférente du foie (Collardeau-Frachon and Scoazec, 2008). Le système veineux hépatique se met en place entre la 4^e et la 6^e semaine de gestation, alors que le système artériel se met en place plus tardivement, à partir de la 8^e semaine. Les branches artérielles s'étendent progressivement du centre vers la périphérie du foie entre les 10^e et 15^e semaines de gestation (Gouysse et al., 2002). Le développement artériel serait sous le contrôle de la sécrétion de VEGF par les plaques ductales, qui se développent au même moment (Gouysse et al., 2002).

Les sinusoides sont les premiers vaisseaux qui apparaissent au cours de l'organogénèse hépatique, et se forment dès le stade du bourgeonnement hépatique, vers la 4^e semaine de gestation. Les cellules endothéliales sinusoidales proviennent de vaisseaux pré-existants du mésenchyme du septum transversum, et se développent par angiogenèse (Collardeau-Frachon and Scoazec, 2008). Les sinusoides subissent un processus de maturation tout au long de la vie fœtale, qui est associé à des modifications de la matrice extracellulaire pouvant réguler cette maturation (Couvelard et al., 1996). Les cellules endothéliales acquièrent progressivement leurs fenestrations, entre le 10^e et le 17^e semaine de gestation (Collardeau-Frachon and Scoazec, 2008), sous l'action de VEGF (Carpenter et al., 2005; Yokomori et al., 2003), avant d'acquérir leurs marqueurs caractéristiques entre le 12^e et le 20^e semaine de gestation (Couvelard et al., 1996). Il est probable que la maturation des sinusoides se poursuit au cours de la période post-natale avant d'atteindre leur structure définitive (Barbera-Guillem et al., 1986). Même si les signaux gouvernant la croissance et la maturation des cellules endothéliales sinusoidales restent mal connus, plusieurs études ont démontré que la voie Wnt

joue un rôle dans leur prolifération et différenciation (Klein et al., 2008; Matsumoto et al., 2008; Zeng et al., 2007), via une interaction entre Wnt2 et VEGF (Klein et al., 2008).

b) Cellules d'Ito (cellules stellaires) et cellules de Kupffer

Les cellules d'Ito ont pour origine probable les cellules mésenchymateuses du septum transversum (Loo and Wu, 2008; Perez-Pomares et al., 2004), et sont détectables dès la 8^e semaine de gestation (Collardeau-Frachon and Scoazec, 2008). Des études chez la souris suggèrent que les cellules d'Ito influencent la prolifération hépatocytaire via l'expression de la protéine homeobox Hlx, qui est exprimé par les dérivés du septum transversum mais pas par les cellules dérivées de l'endoderme. Les foies de souris Hlx^{-/-} sont sévèrement hypoplasiques (Hentsch et al., 1996). Les cellules d'Ito stockent la vitamine A (rétinol), qui sous sa forme oxydée (acide rétinoïque) agit comme facteur de croissance gouvernant la morphogénèse (Ijpenberg et al., 2007).

Le rôle des cellules de Kupffer dans l'organogenèse hépatique est mal connu (Si-Tayeb et al., 2010a). Cependant, certaines données ont suggéré que les cellules de Kupffer jouent un rôle dans la maturation des érythrocytes au cours de l'hématopoïèse fœtale (Naito et al., 2004). La déplétion selective des cellules de Kupffer après hépatectomie partielle chez le rat prolonge la durée de la régénération hépatique (Meijer et al., 2000).

c) Développement des voies biliaires

Les voies biliaires extra-hépatiques dérivent d'un diverticule de l'endoderme qui est situé caudalement au foie, étant en étroite association avec le bourgeon pancréatique. Au sein de ce diverticule apparaît une population de progéniteurs pancréatico-biliaires dont la voie de différenciation est déterminée par SOX17, sous l'influence de Hes-1 (homolog of hairy/enhancer-of-split 1) (Spence et al., 2009).

Contrairement aux cholangiocytes extra-hépatiques, les cholangiocytes tapissant les voies biliaires intra-hépatiques sont dérivés des hépatoblastes. Les canalicules biliaires se forment vers la 6^e semaine de gestation. Les cellules précurseurs des cholangiocytes forment une structure tubulaire autour des branches de la veine porte, appelée plaque ductale. Ces cellules expriment SOX9, un facteur de transcription régulant le développement des canalicules biliaires (Antoniou et al., 2009). L'expression de SOX9 serait le premier indicateur d'une

différenciation vers le phénotype biliaire (Lemaigre, 2009). Les hépatoblastes s'apposent aux plaques ductales se formant transitoirement des structures ductulaires asymétriques, car du côté portal elles sont délimitées par des cholangiocytes, et du côté parenchymateux par des hépatoblastes (Lemaigre, 2009). Les hépatoblastes des structures ductulaires se différencient vers un phénotype cholangiocytaire. Cette différenciation implique la voie de signalisation TGF β , qui induit la différenciation d'hépatoblastes vers le phénotype biliaire et réprime la différenciation hépatocytaire. Il existe un gradient d'expression de TGF β au sein du lobule hépatique en cours de développement, avec une expression forte dans la région périportale et une expression plus faible dans la zone parenchymateuse (Antoniou et al., 2009; Clotman et al., 2005). Les facteurs de transcription HNF6 et OC-2 (oncut 2) sont exprimés de façon prédominante dans les cholangiocytes, et contrôlent la différenciation biliaire en modulant l'activité TGF β . La différenciation vers le phénotype biliaire serait également régulée par la voie de signalisation Jagged/Notch, dont le rôle a été démontré in vitro (Tanimizu and Miyajima, 2004; Zong et al., 2009). La voie Notch jouerait un rôle dans la restriction de la différenciation biliaire à la zone périportale (Si-Tayeb et al., 2010a). La voie Wnt/ β -caténine serait également impliquée dans la différenciation biliaire (Hussain et al., 2004; Monga et al., 2003), mais ses mécanismes exacts d'action restent mal connus dans ce contexte (Lemaigre, 2009).

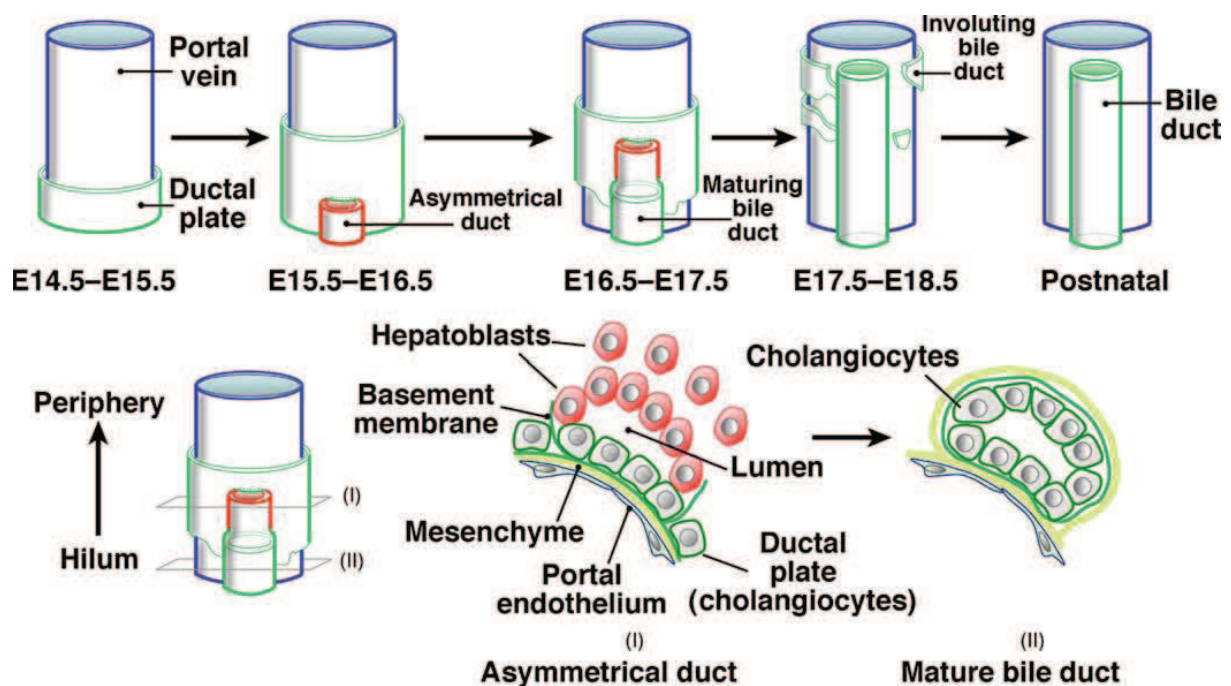


Figure 12. Morphogenèse des voies biliaires intra-hépatiques. D'après Lemaigre (Lemaigre, 2009).

Seule une minorité de cellules de la plaque ductale participe à la formation de canalicules biliaires. Il a été proposé que les cellules résiduelles de la plaque ductale régressent par apoptose (Terada and Nakanuma, 1995). Cependant, des données récentes indiquent que les cellules de la plaque ductale ne subissent pas d'apoptose, mais se différencient en cholangiocytes tapissant les canaux de Hering, les canalicules et les canaux biliaires, ou en hépatocytes périportaux. Chez la souris, les cellules de la plaque ductale donneraient naissance aux cellules ovales (Carpentier et al., 2011). Le remodelage des plaques ductales se fait à partir de la 12^e semaine de gestation. La sécrétion de bile commence vers la 16^e semaine. La morphogenèse du système biliaire s'achève vers la 28^e semaine, mais les étapes de maturation ultimes des canalicules n'ont lieu qu'après la naissance (Kuntz, 2008b).

d) *Maturation hépatocytaire*

- Période embryonnaire et fœtal

Les hépatocytes s'engagent vers le phénotype hépatocytaire sous l'influence de plusieurs facteurs. Le HGF stimule l'expression de C/EBP α , favorisant ainsi la différenciation vers

l'hépatocyte (Suzuki et al., 2003). Le facteur de transcription C/EBP α stimule à son tour l'expression de HNF6, qui régule la différenciation hépatocytaire, puisqu'en son absence les hépatoblastes se différencient rapidement vers le phénotype biliaire (Clotman et al., 2002). Comme vu précédemment, HNF6 et OC-2 modulent l'expression de TGF β , un facteur sécrété qui favorise la différenciation vers le cholangiocyte (Clotman et al., 2005).

Une fois que les hépatoblastes sont engagés vers le phénotype hépatocytaire, ils subissent le processus de maturation, au cours duquel les cellules acquièrent les fonctions physiologiques et la morphologie d'hépatocytes matures. Ce processus se poursuit tout au long du développement fœtal, et continue même après la naissance. La maturation est régulée par un groupe de six facteurs de transcription principaux (HNF1 α , HNF1 β , FoxA2, HNF4 α 1, HNF6 et LRH1 (liver receptor homolog-1)) qui forment un réseau dynamique, au sein duquel existent des boucles d'auto-régulation et de régulation croisée (core transcriptional network). L'augmentation de l'expression de ces facteurs de transcription au cours du temps s'accompagne d'une augmentation du nombre et de la complexité des interactions au sein du réseau (Kymizi et al., 2006), avec le recrutement progressif de co-activateurs permettant l'activation de gènes cibles du développement au moment approprié. Diverses études chez la souris ont mises en évidence le rôle de chacun des facteurs de transcription dans la maturation du métabolisme hépatique : HNF1 α et HNF4 α contrôle le métabolisme des glucides, des lipides et des acides aminés, HNF1 β est essentiel à l'oxydation des acides gras et à la régulation des sels biliaires (Coffinier et al., 2002), LRH1 régule le métabolisme des acides biliaires et du cholestérol (Fayard et al., 2004; Lee and Moore, 2008), FoxA1 et FoxA2 régulent le métabolisme glucidique (Friedman and Kaestner, 2006), HNF6 est le médiateur de certains effets de l'hormone de croissance (Lahuna et al., 1997), inhibe l'activité du récepteur des glucocorticoïdes (Pierreux et al., 1999), stimule l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme glucidique et des acides biliaires (Beaudry et al., 2006; Lannoy et al., 2002; Wang et al., 2004) et favorise la prolifération hépatocytaire (Tan et al., 2006). Enfin, même s'ils ne font pas partie du réseau principal, la famille des facteurs de transcription C/EBP joue également un rôle dans la régulation métabolique de l'hépatocyte, puisque C/EBP α est impliqué dans le métabolisme glucidique et lipidique et dans la prolifération hépatocytaire, alors que C/EBP β régule la néoglucogenèse (Lemaigre, 2009).

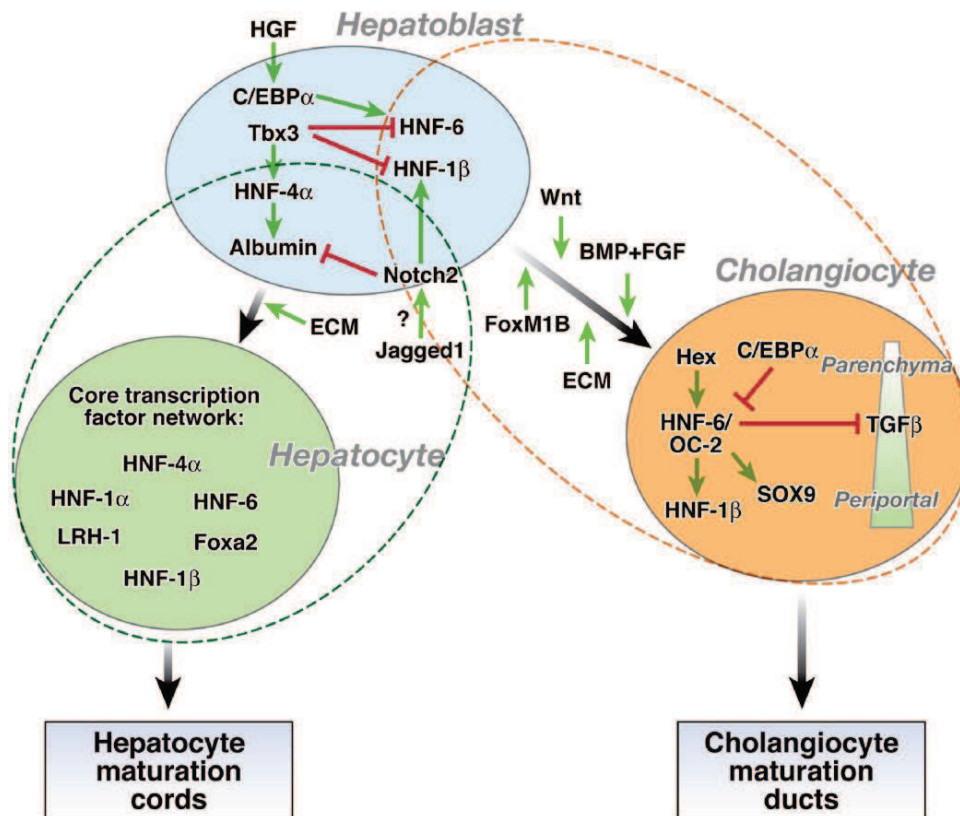


Figure 13. Mécanismes gouvernant la différenciation des hépatoblastes en cholangiocytes ou hépatocytes, d'après Lemaigre (Lemaigre, 2009). ECM: extra-cellular matrix.

Parmi les facteurs gouvernant la maturation hépatique, les signaux provenant de l'environnement extra-cellulaire jouent un rôle clé. Au cours de la vie fœtale, le foie est le siège de l'hématopoïèse de la 6^e semaine au 7^e mois de gestation. Le tissu hépatique est colonisé par des cellules souches hématopoïétiques qui sont étroitement associés aux hépatocytes en cours de différenciation. Les cellules hématopoïétiques différenciées gagnent la circulation sanguine en migrant à travers les cellules endothéliales sinusoides. Les cellules souches hématopoïétiques sécrètent l'oncostatine M (OSM) (Yoshimura et al., 1996), une cytokine qui a un rôle primordial dans la maturation hépatique, induisant l'expression de marqueurs hépatiques, ainsi que des changements morphologiques et l'apparition de fonctions cellulaires spécifiques au foie (Kamiya et al., 1999; Kinoshita and Miyajima, 2002). L'effet de l'OSM est optimisé par la présence de glucocorticoïdes in vitro (Kinoshita and Miyajima, 2002). Les glucocorticoïdes auraient un effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire (Heng et al., 2005; Michalopoulos et al., 2003) et induiraient les enzymes de la néoglucogénèse (Lavon and Benvenisty, 2005). D'autres facteurs solubles seraient impliqués dans la maturation

comme l'insuline, qui régule le métabolisme hépatique et favorise l'expression de certaines enzymes de l'hépatocyte mature (Noda et al., 1983; Spagnoli et al., 1983). Il a été démontré *in vivo* que la présence de laminine et de collagène I et IV favorise la différenciation vers l'hépatocyte (Suzuki et al., 2003), ce qui met en évidence le rôle des composants de la matrice extra-cellulaire dans le développement hépatique. Enfin, l'amélioration de la différenciation de cultures primaires d'hépatocytes fœtaux dans des milieux à haute densité cellulaire (Kojima et al., 2000) indique que l'interaction et la coopération directe entre cellules jouent également un rôle dans le processus de maturation, même si leurs mécanismes restent mal connus.

La maturation se caractérise non seulement par l'acquisition de gènes liés aux fonctions de l'hépatocyte mature, mais également par la perte d'expression de certains gènes fœtaux, comme l' α -foetoprotéine, dont l'expression diminue de façon importante après la naissance chez la souris mais qui est indétectable à mi-gestation chez l'homme (Brizard et al., 2009; Le Carrou, 2010). Le Zhx2 (zinc finger and homeobox factor 2) est un répresseur transcriptionnel de l'AFP, dont l'expression est majorée dans le foie adulte par rapport au foie fœtal. La perte de fonction de Zhx2 est responsable de la persistance de l'expression d'AFP en période post-natal chez la souris (Perincheri et al., 2005). Le facteur doigt de zinc ZBTB20 (Zinc finger and BTB domain-containing protein 20) réprime la transcription d'AFP en se fixant sur son promoteur. Il n'est exprimé dans le foie qu'après la naissance, et n'est pas spécifique au foie, tout comme Zhx2. D'autres protéines d'expression hépatique ont des isoformes fœtales, qui sont remplacées par des isoformes adultes après la naissance, comme le cytochrome CYP3A7 qui est remplacé par le CYP3A4, ou le glutathione S-transferase π 1 (GSTP1), enzyme de la détoxification, qui est remplacé par le GSTP3 en période post-fœtal.

La maturation hépatocytaire au période embryonnaire et fœtal est donc un long processus complexe, qui met en jeu des facteurs sécrétés, des interactions avec le milieu extra-cellulaire et des interactions intercellulaires qui influencent le réseau central de facteurs de transcription au niveau de l'hépatocyte en voie de différenciation.

- Période néo-natale et post-natale

Le nouveau-né ne possède que 20% du nombre d'hépatocytes présents chez l'adulte (Pineiro-Carrero and Pineiro, 2004). Tout au long de l'enfance et l'adolescence, les hépatocytes vont proliférer et acquérir progressivement leur phénotype adulte.

A la naissance, le foie est affecté par plusieurs modifications physiologiques. La circulation sanguine dans le placenta représente 50% du débit cardiaque. Lorsque cette circulation cesse, le flux sanguin sera redistribué, et le retour veineux du foie augmente. Chez le fœtus, le ductus venosus relie la veine ombilicale et la veine cave inférieure, créant un shunt vasculaire du foie au sein duquel circule jusqu'à 50% du sang oxygéné du placenta. Une à deux semaines après la naissance, le ductus venosus se ferme et l'ensemble du sang du système porte transite par le foie. L'afflux sanguin au niveau de la veine porte est également augmenté par le début de l'alimentation.

La naissance va entraîner de nombreuses modifications au niveau du métabolisme énergétique. Au cours de la vie fœtale, le glucose est le principal substrat énergétique, alors que les lipides ne sont pas une source majeure d'énergie. Les réserves en glycogène hépatique augmentent progressivement au cours de la gestation, avec une augmentation plus marquée au période pré-natal (vers 36 semaines de gestation) (Kalhan, 2011). Lors de la naissance, le nouveau-né ne reçoit plus de glucose par la circulation maternelle, ce qui provoque une baisse de la glycémie, qui atteint un nadir 30 à 90 minutes après la naissance. Par conséquent, les taux circulants de glucagon, d'adrénaline et de noradrénaline vont considérablement augmenter, stimulant la néoglucogenèse et la mobilisation des réserves de glycogène, qui vont considérablement diminuer dans les 24 heures qui suivent la naissance (Kalhan, 2011; Perinatal Physiology). En parallèle, on assiste à une augmentation de l'activité de G6P, qui atteint son niveau le plus élevé dans le période post-natal (Kalhan, 2011; Perinatal Physiology). Avec l'alimentation, la quantité de graisses dans le régime du nouveau-né va considérablement augmenter, stimulant ainsi l'oxydation des acides gras et la production des corps cétoniques au niveau du foie (Van Aerde, 2011).

Si certaines fonctions du foie atteignent déjà des niveaux adultes au cours de la vie fœtale (synthèse d'urée (Rattenbury et al., 1980), synthèse de cholestérol et d'apolipoprotéines (Erickson et al., 1988), synthèse d'albumine (Beath, 2003)), d'autres ne sont stimulées

qu'après la naissance. Les taux plasmatiques des protéines de la coagulation sont faibles à la naissance et augmentent progressivement pour atteindre des niveaux adultes quelques jours plus tard. Le taux plasmatique de céruloplasmine augmente également après la naissance, et atteint des niveaux adultes vers 3 mois. Une augmentation du taux sanguin de bilirubine non conjuguée est quasi-physiologique au cours des deux premières semaines de vie, puisque à la naissance l'activité de conjugaison est faible. L'activité de l'UGT augmente progressivement et les capacités de glucuronidation atteignent le niveau adulte vers deux semaines (Beath, 2003). Les capacités de synthèse et d'excrétion de la bile sont limitées chez le nouveau-né par rapport à l'adulte (Pineiro-Carrero and Pineiro, 2004), car le transit intestinal, dernière étape d'excrétion, n'est pas encore complètement établi les premiers jours de la vie (Cashore, 2011).

Le métabolisme des xénobiotiques semble être une des fonctions hépatiques qui varie le plus au cours de la période post-natale. La concentration des protéines CYP450 est plus faible chez le nouveau-né (0,3 nmol/mg de protéine microsomale) que chez l'adulte (0,5 nmol/mg). Par conséquent, la métabolisation des xénobiotiques est plus lente chez le nouveau-né. La maturation du métabolisme des xénobiotiques se produit au cours de la première année de vie avec notamment l'augmentation de l'activité des CYP1, 2 et 3. Chez l'enfant, les capacités de métabolisation des xénobiotiques excèdent celles de l'adulte, avant de diminuer au cours de l'adolescence. Le profil des réactions de détoxification de phase 2 diffère chez l'adulte et l'enfant, avec une prédominance de la sulphation sur la glucuronidation chez l'enfant, le profil adulte n'étant acquis que vers l'âge de 12 ans (Pineiro-Carrero and Pineiro, 2004). Le métabolisme des xénobiotiques subit à nouveau des modifications importantes à l'adolescence, avec l'acquisition du niveau d'activité enzymatique adulte sous l'influence de facteurs hormonaux (hormones sexuelles, hormone de croissance) (Kennedy, 2008). Par exemple, les androgènes, les oestrogènes et le progéstérone sont tous capables de modifier l'activité des CYP450 (Blackham and Spencer, 1969; Kennedy, 2008; Mackinnon et al., 1977; Nakamura et al., 2002), et ces modifications semblent marquées lors de périodes de fluctuation hormonale importante (Laine et al., 2000; Nayak et al., 1988; Palovaara et al., 2003; Zhang et al., 2006).

Les modifications physiologiques de la période néo-natale et lors de l'adolescence semblent jouer un rôle clé dans la maturation des fonctions hépatiques. Cependant, il existe très peu de données sur les mécanismes à la base de la maturation post-natale, qui se prolonge jusqu'à

l'âge adulte. L'élucidation de ces mécanismes sera essentielle pour l'élaboration de modèles de développement hépatocytaire *in vitro*.

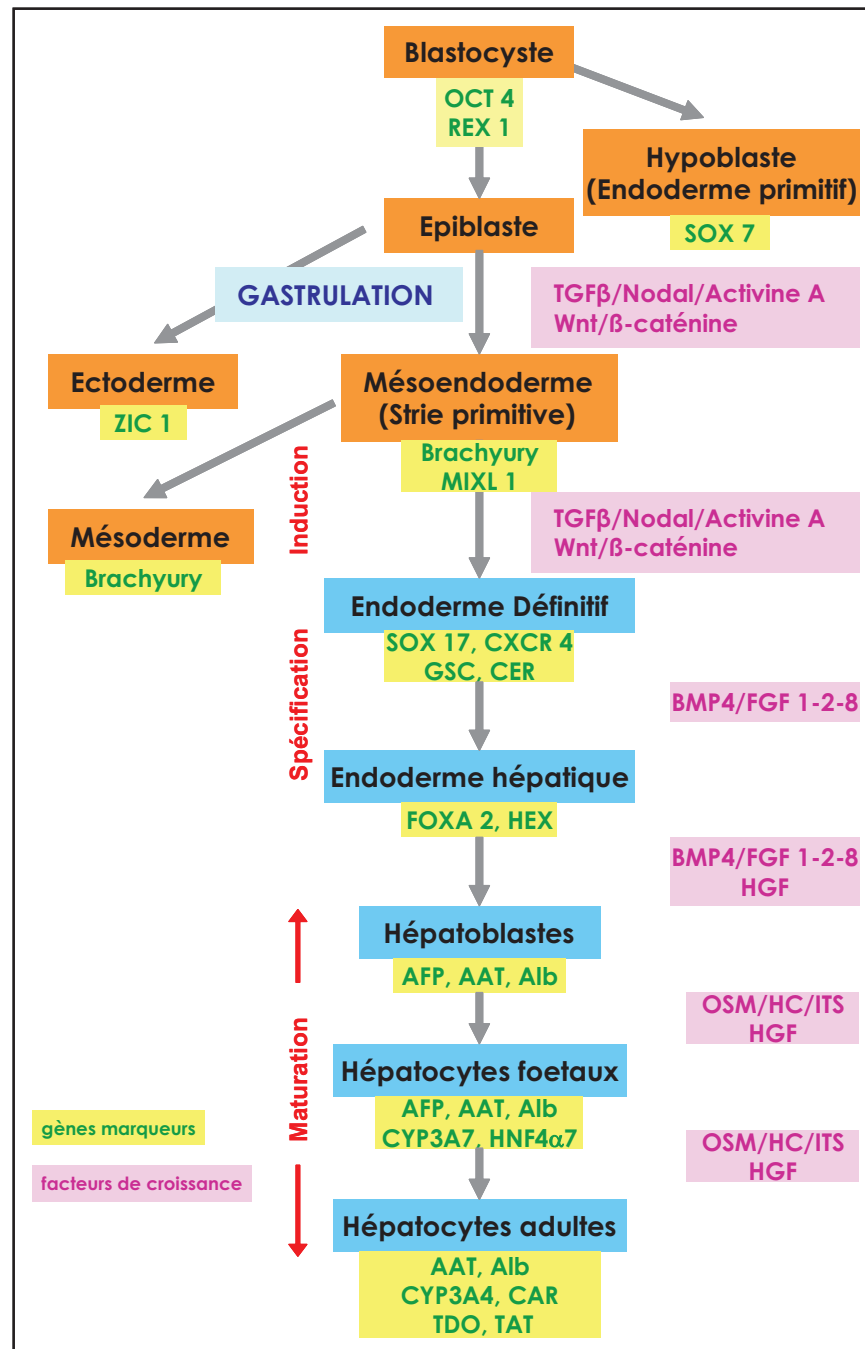


Figure 14. Résumé de l'ontogenèse hépatique

4. Différences entre l'homme et la souris

Les études menées chez la souris ont permis de comprendre les mécanismes du développement hépatique. Cependant, peu de données existent chez l'homme, et même si les grandes lignes du développement présentent des similitudes, il est difficile de transposer l'ontogenèse hépatique de la souris chez l'homme pour plusieurs raisons. La durée de gestation chez la souris est de 18 à 21 jours, contre 39 semaines chez l'homme.

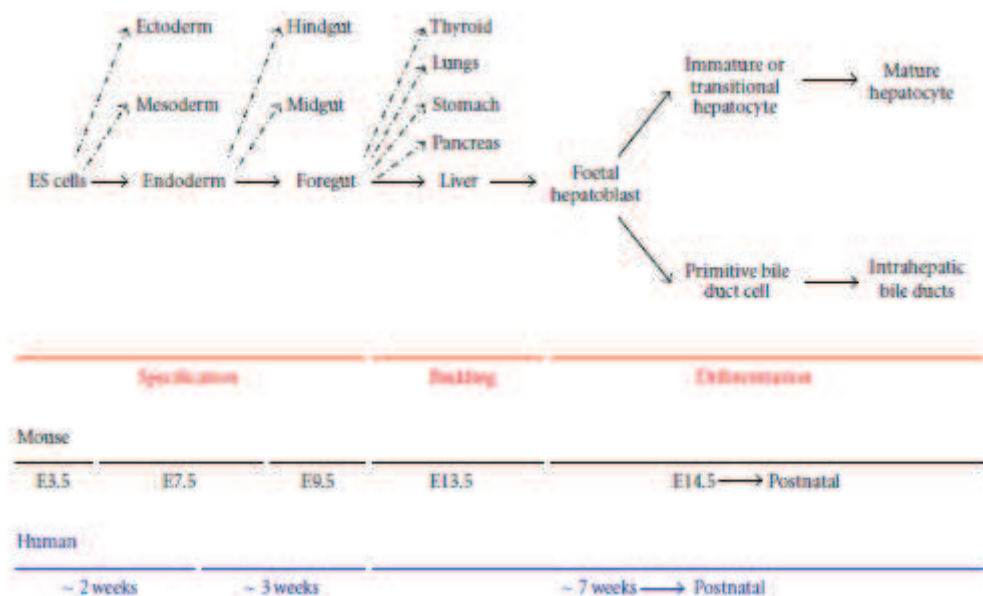


Figure 15. Récapitulatif l'ontogenèse hépatique chez la souris et chez l'homme. D'après Kung et al (Kung et al., 2010).

Chez la souris, l'architecture hépatique n'est établie qu'à la naissance, alors que chez l'homme elle est déjà présente à la 20-22^e semaine de gestation, ce qui peut affecter l'expression d'activités métaboliques, qui sont dépendants de l'architecture lobulaire (Collardeau-Frachon and Scoazec, 2008; Yu et al., 2001). Par conséquent, il existe des différences notables entre le métabolisme du foie fœtal murin et humain. Par exemple, chez l'homme les acides aminés sont catabolisés à des fins énergétiques, alors que ce n'est pas le cas chez le rongeur. En conséquence, le foie humain exprime au cours de la gestation certaines enzymes impliquées dans ce processus, comme le tryptophane dioxygénase (TO) et la tyrosine aminotransférase (TAT), qui sont exprimés à la mi-gestation (Andersson et al., 1980; Le Carrou, 2010), alors que chez la souris elles ne sont exprimées qu'à la naissance (Greengard, 1969; Kaltschmidt et al., 1994). L'activité de carbamoylphosphatase synthase 1

(CPS1) est détectée chez les rongeurs à la période périnatale et augmente pendant les 4 premières semaines en post-partum avant d'atteindre le niveau d'activité adulte (Lamers and Mooren, 1980), alors que chez l'homme l'expression de la CPS1 peut être détectée à la 5^e semaine de gestation (Moorman et al., 1989), associé à la présence d'une activité enzymatique correspondante (Mukarram Ali Baig, 1992). Le PEPCK, enzyme de la néoglucogénèse, est présent à un stade précoce du développement fœtal chez l'homme, mais n'apparaît qu'après la naissance chez le rat (Kalhan, 2011). Le transporteur SLC21A6 est détectable dans le foie fœtal chez l'homme, alors que l'expression de la forme orthologue (SLC21A5) augmente progressivement après la naissance chez le rat. (Guo et al., 2002). Ainsi, plusieurs gènes à expression post-natal qui sont considérés comme des marqueurs de maturation chez le rongeur ne peuvent pas être considérés comme marqueurs du phénotype adulte chez l'homme.

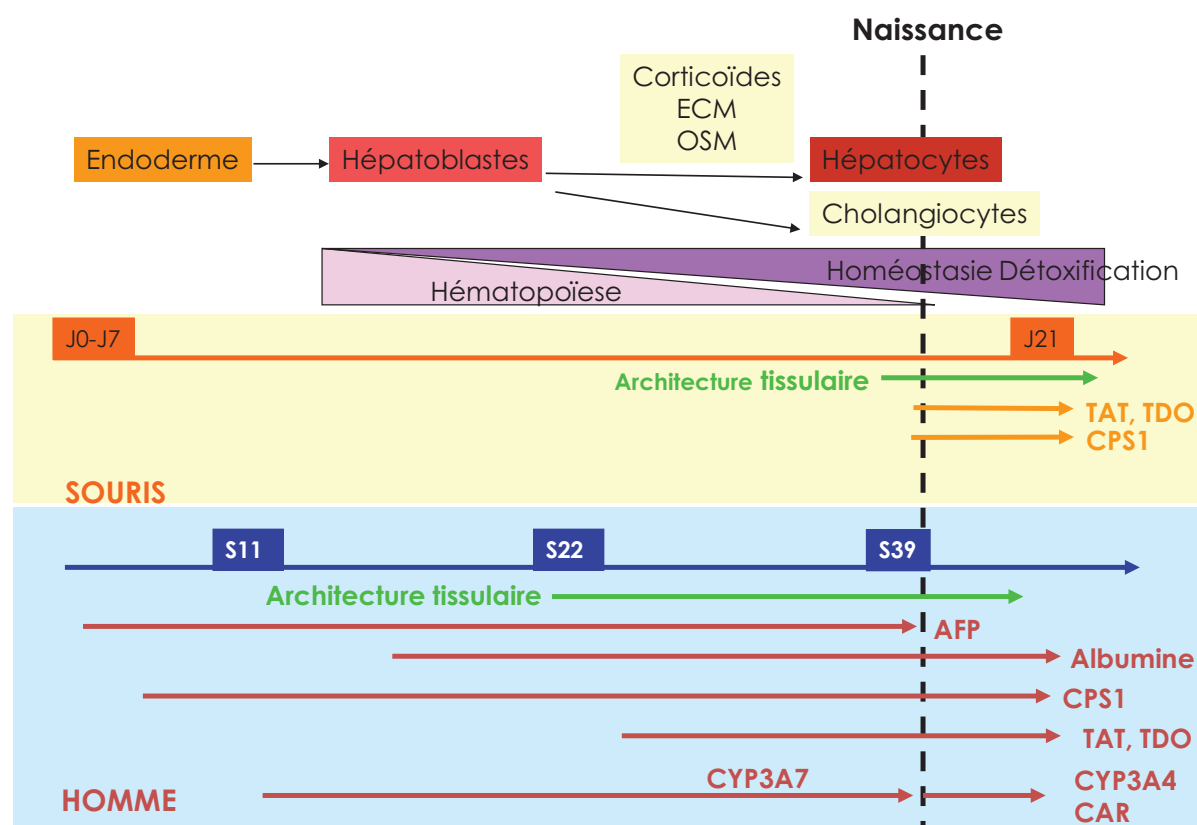


Figure 16. Différences entre le développement hépatique chez la souris et l'homme.

III. LES MODELES CELLULAIRES HEPATIQUES

1. Cultures primaires d'hépatocytes humains

a) Caractéristiques

Les cultures primaires d'hépatocytes humains proviennent de pièces d'hépatectomie ou de foies de donneurs non transplantables. Le foie est perfusé en deux étapes : une première perfusion avec une solution dépourvue en cations divalents affaiblit les interactions cellulaires, et une deuxième perfusion avec de la collagénase dissocie les cellules (Seglen, 1976). Les hépatocytes ainsi fraîchement isolés conservent la même structure et les mêmes fonctions que les hépatocytes *in vivo*, mais ils perdent leurs domaines membranaires spécifiques (canalicules biliaires, jonctions intercellulaires) et ne peuvent pas survivre au-delà de quelques heures en suspension. Les hépatocytes doivent donc être ensemencés sur un substrat approprié, constitué de matrice extra-cellulaire. Contrairement aux hépatocytes de rat, les hépatocytes humains ont une capacité variable d'adhésion à une matrice extra-cellulaire, avec des pourcentages d'adhésion variant de 40 à 85% (Waring et al., 2003). En raison des modifications de leurs conditions de survie, les hépatocytes en culture subissent des modifications phénotypiques, avec une diminution importante de l'expression de facteurs de transcription hépato-spécifiques, de la production des protéines plasmatiques et l'expression des enzymes hépato-spécifiques impliquée dans le métabolisme des xénobiotiques et du glucose (Castell et al., 2006; Guguen-Guillouzo, 2002; Padgham et al., 1993). Par conséquent, les hépatocytes perdent certaines de leurs fonctions spécifiques au cours du temps de culture.

Dans des conditions de culture standards, les hépatocytes ne peuvent survivre que quelques jours. Il a donc été nécessaire d'établir des conditions de culture pouvant maintenir la survie et les fonctions des hépatocytes en modulant la composition du milieu de culture, la nature de la matrice extra-cellulaire ou la présence d'autres types cellulaires. Aujourd'hui, de multiples approches ont été développées afin d'optimiser le maintien en culture des hépatocytes : supplémentation des milieux en facteurs de croissance (EGF, HGF), en hormones (insuline, glucagon), en cofacteurs (nicotinamide, AMPc), en agents remodelant la chromatine

(diméthylsulphoxyde (DMSO), trichostatine A), utilisation de matrices extra-cellulaires (matrigel, collagène de type I), culture en sandwich, en agrégats ou en 3 dimensions, co-cultures avec d'autres cellules non parenchymateuses (cellules biliaires, cellules stellaires). (Gomez-Lechon et al., 2003; Guguen-Guillouzo and Guillouzo, 2010). Dans notre laboratoire, nous pouvons maintenir les hépatocytes humains en culture jusqu'à 35 jours sans perte significative de marqueurs phénotypiques et fonctionnels (Ferrini et al., 1997; Pichard-Garcia et al., 2002).

Les hépatocytes adultes en culture ont une durée de vie limitée et on ne sait pas les faire proliférer *in vitro*, d'où la nécessité de re préparer des cultures à partir de foie frais. Or, la disponibilité de pièces de lobectomie ou de foies de donneurs non transplantables est limitée et imprévisible. De plus, la qualité des cellules obtenues est variable, et dépend de facteurs liés au donneur (pathologie hépatique sous-jacente, âge, prise de xénobiotiques) et aux conditions de prélèvement (durée d'ischémie chaude et froide). Des techniques de cryopréservation des hépatocytes humains ont été développées, mais même dans des conditions bien définies environ la moitié des hépatocytes décongelés perdent leur capacité d'adhérence au substrat et la qualité des cellules décongelées est très variable. La cryopréservation des hépatocytes encapsulés dans de la gelée d'alginate semble donner de meilleurs résultats (Guguen-Guillouzo and Guillouzo, 2010).

Les cultures primaires d'hépatocytes humains ont de nombreuses applications dans l'étude des fonctions hépatiques, notamment le métabolisme des médicaments et des xénobiotiques. Elles ont l'avantage d'être le modèle le plus proche des hépatocytes humains *in vivo*, contrairement aux cultures d'hépatocytes d'origine animale qui présentent de nombreuses différences liées à l'espèce. Ainsi, en raison des inconvénients cités précédemment, le développement d'alternatives à ces cultures a été nécessaire.

b) Définition d'un hépatocyte adulte

Une des premières alternatives aux cultures d'hépatocytes adultes humains développées ont été les lignées hépatocytaires, développées à partir de tumeurs hépatiques. Ensuite, depuis la fin des années 1990 de nombreux équipes ont rapporté la génération d'hépatocytes adultes à

partir de sources cellulaires diverses : cellules souches embryonnaires (Snykers et al., 2009), cellules souches pluripotentes induites (iPS) (Asgari et al., 2010), progéniteurs (Sangan and Tosh, 2010), cellules extra-hépatiques transdifférenciées (Piscaglia et al., 2010), etc. Le caractère hépatocytaire de ces cellules a été évalué de plusieurs façons.

- Expression de marqueurs hépatiques

Le foie produit un certain nombre de protéines qui sont utilisées couramment comme marqueurs hépatiques. Ces protéines peuvent être des facteurs de transcription (les HNF, les c/EBP), des marqueurs cytosquelettiques (cytokératine 8 (CK8), CK18) ou des protéines en rapport avec les fonctions physiologiques du foie : sécrétion protéique (albumine, AAT, TTR, fibrinogène, facteurs de la coagulation, apolipoprotéines), métabolisme glucidique (G6P, PEPCK), métabolisme de acides aminés (TAT, TO), métabolisme de l'urée (CPS1), métabolisme des xénobiotiques (CYP450, GST, UGT, CAR, PXR, etc). Ces marqueurs peuvent être détectés au niveau de l'ARNm (par RT-PCR) ou de la protéine correspondante (Western blot, immunocytochimie, immunofluorescence). Le taux d'expression de ces marqueurs par des hépatocytes humains adultes en culture primaire (HHCP) ou par le tissu hépatique doit servir de niveau de référence. Ainsi, afin d'avoir une comparaison pertinente, il est donc nécessaire d'évaluer les niveaux d'expression des marqueurs par des méthodes quantitatives (qPCR, ELISA, etc.) et de les comparer aux niveaux d'expression des hépatocytes humains en culture primaire ou au tissu hépatique.

Cependant, aucun de ces marqueurs ne peut être considéré comme étant strictement spécifique au tissu hépatique. Par exemple, la TAT, la PEPCK et les facteurs de transcription hépatiques sont également exprimés dans d'autres tissus comme le poumon, l'intestin, le pancréas et la rate (Snykers et al., 2009), alors que les CYP sont exprimés de façon constitutive et inductible dans le poumon, le colon, l'intestin grêle et le tissu adipeux (Hengstler et al., 2005) (Bieche et al., 2007). Au cours du développement, les marqueurs hépatiques peuvent être exprimés par d'autres types cellulaires : par exemple, l'AFP et la TTR sont tous les deux exprimés au niveau du sac vitellin (tissu extra-embryonnaire) (Gulbis et al., 1998), alors que l'expression de CYP2B6 et de PXR a été détectée dans les hES (données personnelles). L'étude de l'expression d'un nombre limité de marqueurs non hépato-spécifiques peut ainsi induire en erreur. L'évaluation du caractère hépatocytaire d'une population cellulaire repose sur la détection d'un éventail de marqueurs qui doit être le plus large possible. Il est également

souhaitable de démontrer que plusieurs marqueurs hépatiques sont exprimés au sein d'une même cellule, afin d'éviter des interprétations erronées liées à la présence de populations cellulaires hétérogènes.

Comme vu précédemment, la maturation hépatique est caractérisée par la perte de certains marqueurs fœtaux, comme l'AFP et le CYP3A7, et l'apparition de marqueurs adultes, comme le CYP3A4 ou le GSTP3. Il est donc intéressant de suivre la cinétique d'apparition et de disparition des marqueurs au cours de la différenciation. La démonstration de l'expression séquentielle des marqueurs correspondant aux étapes successives du développement hépatique est un argument important pour affirmer la véritable nature hépatocytaire des cellules différenciées (Sancho-Bru et al., 2009).

Cellules	Marqueurs
hES	NANOG, OCT4, SOX2
Strie primitive/mésendoderme	MIXL, Brachyury
Endoderme définitif	GSC, CXCR4, SOX17, CER
Endoderme hépatique	FoxA2 (HNF3 β), HEX, GATA4, C/EBP β
Hépatoblaste	HNF4 α , AFP, TTR, CK19, Albumine
Hépatocyte foetal	HNF4 α 7, Albumine, AAT, G6P, PEPCCK1, CK18, CYP3A7, CPS1, TDO, TAT , GST π
Hépatocyte adulte	CYP3A4, CAR, PXR, GST α , CYP7A1, UGT1A1

Tableau 2. Marqueurs de la différenciation

- Caractéristiques morphologiques

Les hépatocytes en culture ont une morphologie épithéliale et une forme polygonale. Ils sont souvent polyploïdes et possèdent des gap junctions délimitant les canalicules biliaires. Ils sont riches en mitochondries et en réticulum endoplasmique lisse et stockent du glycogène, les granules intracellulaires pouvant être mis en évidence par la coloration PAS (Periodic Acid-Schiff). Ces caractères morphologiques ont été étudiés par de nombreuses équipes ayant différencié des populations cellulaires vers l'hépatocyte, mais ne peuvent pas être considérés à eux seuls comme spécifiques et discriminants (par exemple, le tissu musculaire est également capable de stocker le glycogène).

- Etudes de fonctionnalité

D'après Hengstler et al (Hengstler et al., 2005), une cellule candidate à l'appellation d'hépatocyte doit posséder un nombre minimum de caractéristiques fonctionnelles :

- Métabolisme des xénobiotiques et de substances endogènes (hormones, ammoniacque) ;
- Synthèse et sécrétion d'albumine, de facteurs de la coagulation, du complément, de protéines transporteurs, de bile, de lipides et de lipoprotéines ;
- Stockage de glycogène, de vitamines liposolubles (A, D, E et K), de folates, de vitamine B12, de cuivre et de fer.

En pratique, les auteurs proposent comme critères définissant un hépatocyte l'étude des paramètres suivants :

- Synthèse d'albumine, d'urée, de fibrinogène
- Etude du métabolisme de phase 1 : activité CYP1A1-2, 2A6, 2C8/9/19, 2D6, 2E1, 3A4/5, avec et sans induction (rifampicine, phénobarbital, 3-méthylcholanthrène)
- Etude du métabolisme de phase 2 : UDP-glucuronyltransférase (UGT), glutathione-S-transférase (GST), sulphotransférase (ST)

Même si l'albumine est majoritairement sécrétée par le foie, elle ne suffit pas à elle seule à définir la fonctionnalité d'une cellule, puisqu'elle peut être également sécrétée par des cellules d'origine tumorale (adénocarcinome pancréatique, par exemple (Hengstler et al., 2005)). Il est donc souhaitable d'évaluer d'autres activités métaboliques en parallèle.

La plupart des enzymes de la détoxification ne deviennent fonctionnelles qu'à la naissance. La capacité de métabolisation des xénobiotiques est donc un marqueur important de la maturité fonctionnelle. La métabolisation des xénobiotiques (et également la sécrétion protéique) doit être de préférence quantifiée, et exprimée en nmol de produit synthétisé/minute/nombre de cellules par exemple, afin de pouvoir comparer le taux de sécrétion aux taux de référence des hépatocytes humains en culture primaire. Le CYP3A4 est considéré comme un des marqueurs les plus importants des hépatocytes adultes, car il s'agit de l'isoforme la plus abondante dans le foie. Il est essentiel de déterminer le niveau d'activité basale (et non seulement l'activité après induction) car comme mentionné précédemment, les cytochromes P450 sont présents dans d'autres types cellulaires (Hengstler et al., 2005).

De nombreuses équipes ont utilisé la captation et l'excrétion du vert d'indocyanine (ICG) ou des LDL comme marqueurs de fonctionnalité hépatocytaire. La capture et l'excrétion de ces composés nécessitent la présence de récepteurs et de transporteurs spécialisés. Cependant, les cellules trophoblastiques sont également capables de capter le vert d'indocyanine, alors que les LDL peuvent également être captés par les cellules spléniques et surrénales.

- Transplantation *in vivo*

La transplantation *in vivo* vise à déterminer si les cellules générées *in vitro* sont capables de repeupler le foie d'un modèle animal (généralement murin) d'insuffisance hépatique et d'en restaurer les fonctions. Les cellules transplantées doivent traverser l'endothélium sinusoidal et s'intégrer au sein de parenchyme hépatique, où elles prolifèrent aux dépens des hépatocytes de l'hôte. Deux conditions sont nécessaires pour ceci : « faire de la place » pour que les hépatocytes transplantés puissent proliférer, en réalisant une hépatectomie ou en induisant une nécrose et/ou apoptose des hépatocytes de l'hôte, et donner un avantage prolifératif aux hépatocytes transplantés (par exemple, en administrant la rétrovirusine, qui inhibe la prolifération hépatocytaire de l'hôte) (Sancho-Bru et al., 2009). L'incorporation des cellules au sein du foie murin, leur prolifération et maturation au sein du foie sont étudiées par des techniques

d'imagerie moléculaire, d'hybridation *in situ* et d'immunocytochimie (marquage de cellules transplantées exprimant des marqueurs d'hépatocytes matures). Leur fonctionnalité est généralement évaluée par le dosage de protéines humaines sécrétées par les cellules hépatocytaires transplantées dans le sérum de l'animal transplanté, mais la survie ou non de l'animal transplanté dans les modèles d'insuffisance hépatique aiguë est également un bon indicateur de fonctionnalité. Il est attendu que des hépatocytes matures transplantés soient capables de repeupler le foie et d'être fonctionnels, mais la transplantation de cellules immatures pourrait également conduire à un résultat équivalent si les cellules sont capables de se différencier *in vivo* au sein du microenvironnement hépatique. La transplantation cellulaire peut démontrer qu'une population cellulaire est capable de se différencier *in vivo*, mais ne permet pas d'affirmer que la population cellulaire transplantée atteindra le même degré de différenciation *in vitro* (Hengstler et al., 2005). Il existe aussi la possibilité de phénomènes de fusion cellulaire, de transdifférenciation partielle, de transfert génique et d'effet « bystander » (sécrétion de facteurs par les cellules transplantées aidant à la régénération des cellules natives), qui pourraient gêner l'interprétation des résultats de la transplantation cellulaire. Plusieurs techniques peuvent être utilisés pour exclure la présence de phénomènes de fusion : identification du chromosome Y pour des transplantations en provenance de donneurs de sexe opposé, recherche de séquences ALU pour les transplantations xénogéniques, exclusion de la présence d'ARNm et de protéines spécifiques du donneur et du receveur dans la même cellule, et l'utilisation de systèmes Cre-Lox.

2. Lignées hépatocytaires

Plusieurs lignées cellulaires ont été développées à partir de carcinomes hépato-cellulaires, comme les lignées HepG2, Huh-7 et Hep3B. Ces lignées ont un fort potentiel prolifératif et une durée de survie infinie, tout en gardant un phénotype relativement stable. Elles sont facilement disponibles, et les conditions de culture sont plus simples, et donc plus facilement reproductibles. Cependant, le niveau de différenciation des cellules est relativement faible, puisque ces cellules présentent un caryotype anormal avec de nombreux réarrangements chromosomiques. Elles présentent un phénotype hépatique anormal, avec notamment une prolifération dérégulée, des déficits d'expression génique, des voies de signalisation perturbées, des fonctions métaboliques déficitaires et des réponses anormales aux stimuli

extérieurs (facteurs de croissance, cytokines, agents infectieux, etc.). Ces lignées cellulaires ont été utilisées pour étudier les promoteurs de gènes hépatospécifiques et de gènes de la réponse inflammatoire (Agellon et al., 1992; Ramji et al., 1993), mais elles présentent peu d'intérêt dans les études de métabolisme des xénobiotiques car elles n'expriment pas ou très peu les enzymes du métabolisme (Castell et al., 2006). Plus récemment, une lignée cellulaire appelée HepaRG (Parent et al., 2004) a été isolée à partir d'un foie humain en hépatite fulminante infecté par le VHC, et constitue un modèle unique à ce jour de cellules progénitrices bipotentielles : à confluence et en présence de DMSO elles se différencient en cellules de phénotype hépatocytaire et cholangiocytaire (Guguen-Guillouzo et al., 2010). Elles sont également capables de se transdifférencier vers l'un ou l'autre phénotype après détachement enzymatique et culture à densité faible (Cerec et al., 2007). Après 2 semaines de culture en confluence en présence de DMSO à 2%, elles expriment les cytochromes P450 de façon stable et inductible, atteignant des niveaux comparables à ceux d'HHCP (Aninat et al., 2006). Elles expriment également des enzymes du métabolisme du glucose et sont permissives à l'infection par le virus de l'hépatite B (Marion et al., 2010). Leur phénotype reste stable sur plusieurs passages et elles peuvent être cryopréservées facilement. Ainsi, les HepaRG sont la lignée cellulaire hépatocytaire d'origine tumorale la plus proche des HHCP sur le plan métabolique, et leur intérêt dans l'étude du métabolisme et la toxicité des xénobiotiques a été démontré (Kanebratt and Andersson, 2008; McGinnity et al., 2009).

Une autre approche a été d'immortaliser des hépatocytes matures par transfert de gènes. Les hépatocytes humains peuvent être immortalisés par la transfection de gènes viraux ou de gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire (par exemple, simian virus (SV) 40 large T antigen, télomérase reverse transcriptase, etc.). Les lignées hépatocytaires immortalisées par l'antigène T de SV40 ont été utilisées pour étudier la régulation de l'expression génique, certaines voies de signalisation, le développement du carcinome hépatocellulaire et le métabolisme des xénobiotiques (Castell et al., 2006). Cependant, des modifications phénotypiques et caryotypiques ont été observées lorsque ces lignées cellulaires sont cultivées sur le long terme, avec une tendance à évoluer vers un phénotype dédifférencié. Cette instabilité génétique limite leur utilisation à grande échelle.

3. Cultures primaires d'hépatocytes fœtaux

Les hépatocytes fœtaux, de part leur capacité de prolifération accrue, pourrait constituer une source intéressante d'hépatocytes. Les hépatocytes fœtaux sont obtenus à partir de fœtus issus d'interruption volontaire de grossesse aux 1^e et 2^e trimestres. Un certain nombre d'études a permis d'isoler des cellules fœtales hépatiques exprimant à la fois des marqueurs hépatocytaires (AFP, parfois l'albumine) et biliaires (CK19) (Begum et al., 2010; Lazaro et al., 2003; Mahieu-Caputo et al., 2004; Malhi et al., 2002). Ces cellules prolifèrent de façon spontanée, pouvant être maintenu jusqu'à 6 mois en culture dans des conditions sans sérum (Begum et al., 2010). Mahieu-Caputo et al ont réalisé une transplantation des cellules fœtales hépatiques chez la souris sans atteinte hépatique préalable, et a démontré que ces cellules étaient capables de s'y intégrer et d'y proliférer, en exprimant le CYP3A4 et le GST et en sécrétant de l'albumine humaine (Mahieu-Caputo et al., 2004). Lazaro et al (Lazaro et al., 2003) ont différencié les cellules fœtales hépatiques in vitro sous l'action d'OSM et ont constaté une augmentation de la taille des cellules accompagnée d'une augmentation de l'expression de HNF4 α et de GST α et de l'activité de la G6P, ainsi que l'apparition de canalicules biliaires et de dépôts de glycogène. En parallèle, l'expression d'AFP, de CK19 et de GST π , forme fœtale de GST α , diminuait. Iacovacci (Iacovacci et al., 1997) et al ont démontré que les hépatocytes fœtaux cultivés dans le milieu décrit par Lanford sont sensibles à l'infection et à la réplication du virus de l'hépatite C et qu'ils supportent la production de particules virales.

D'autres équipes ont isolé des populations de cellules progéniteurs à partir de foie fœtal. Dan et al ont remarqué que lors des cultures de cellules hépatiques fœtales à partir de fœtus âgés de 10 à 15 semaines, une sous population de cellules plus petites « blast-like » apparaissait après 1 mois de culture (Dan et al., 2006). Ces cellules exprimé à la fois des marqueurs des cellules souches (CD34, CD117), des marqueurs épithéliaux (Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM), CK18, CK19) et mésenchymateux (CD44, vimentine). Elles sont capables de se différencier vers le phénotype hépatocyttaire lorsqu'elles sont ensemencées sur collagène ou transplantées dans le foie de souris, mais elles peuvent également se différencier vers le cholangiocyte, l'adipocyte, l'ostéocyte, le chondrocyte et la cellule endothéliale en fonction des conditions de culture. Nowak et al (Nowak et al., 2005) ont isolé par cytométrie de flux à partir de foies de fœtus de 6 à 9 semaines de gestation une population de cellules

exprimant les marqueurs de cellules souche CD117 et CD34, mais négatifs pour Lin, CK19 et l'albumine. Après 2 semaines de culture in vitro en présence de HGF et d'EGF, 85% des cellules se différenciaient vers le phénotype hépatique et exprimaient l'albumine et le CK19. Lorsque les cellules étaient transplantées chez la souris, elles exprimaient des marqueurs hépatocytaires (albumine, AFP, AAT, G6P) mais également biliaires (dipeptidyl peptidase IV et gamma glutamyl transpeptidase (GGT)).

Comme l'a démontré Iacovacci, les cultures d'hépatocytes fœtaux peuvent être utilisées dans le cadre d'études sur le virus de l'hépatite C, mais elles présentent un intérêt limité pour les études de métabolisme des xénobiotiques, car elles expriment les formes fœtales immatures des enzymes de détoxification. Plusieurs études ont démontré que la différenciation vers le phénotype hépatocyttaire à partir de cellules hépatiques fœtales ou de progéniteurs extraits du foie fœtal est possible, mais la fonctionnalité et le degré de maturité des cellules obtenues restent à définir. Enfin, le développement des cultures à partir du foie fœtal est confronté aux problèmes de disponibilité de tissus fœtaux, auxquels s'ajoutent dans certains pays des problèmes éthiques.

IV. LES CELLULES SOUCHES

Une cellule souche est une cellule indifférenciée, issue de l'embryon, du fœtus ou de tissus adultes, qui possède à la fois la capacité de se multiplier par divisions successives pendant une période indéfinie (autorenouvellement), et celle de donner naissance, dans des conditions définies, à un ou plusieurs types cellulaires différenciés.

On distingue trois catégories de cellules souches :

- Les cellules souches totipotentes, qui sont totalement indifférenciées et peuvent donner un organisme entier. Elles proviennent de l'ovule fécondé jusqu'au quatrième jour de développement chez l'homme (stade morula).
- Les cellules souches pluripotentes, qui sont capables de donner toutes les lignées cellulaires constituant un individu (plus de 200 types tissulaires différents).

Contrairement aux cellules totipotentes, elles ne permettent pas le développement d'un organisme entier. Les cellules souches embryonnaires font partie de cette catégorie de cellules souches, et sont présentes du 5^e au 7^e jour de la fécondation (stade blastocyste).

- Les cellules souches multipotentes, qui sont déjà engagées dans un programme tissulaire spécifique, et peuvent se différencier en différents types cellulaires d'une lignée cellulaire donnée. Elles sont retrouvées dans les tissus fœtaux ou adultes.

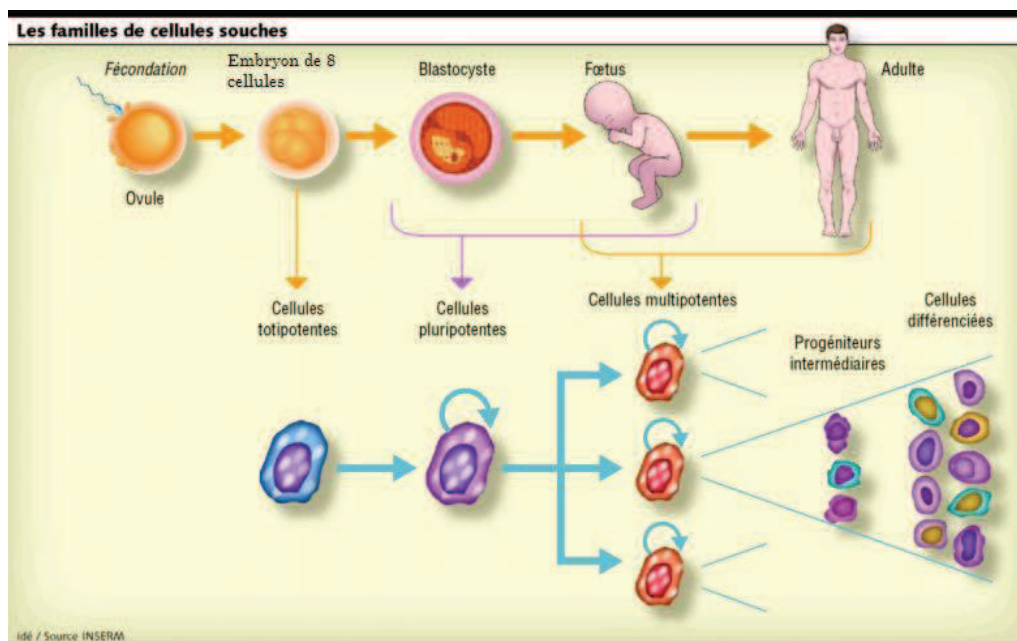


Figure 17. Les familles de cellules souches (d'après (Stem Cells for dummies))

1. Les cellules souches embryonnaires humaines

a) Origine

Les cellules souches embryonnaires humaines (hES) proviennent d'embryons surnuméraires issus de la fécondation *in vitro*, sans projet parental. Elles ont été dérivées pour la première fois en 1998, par l'équipe de Thomson (Thomson et al., 1998). Elles sont dérivées de la masse cellulaire interne du blastocyste, terme utilisé pour désigner un embryon entre le 5^e et le 7^e jour post-fécondation. Le blastocyste se présente sous forme d'une sphère creuse, comprenant

une couche externe de cellules (le trophoblaste), ainsi qu'un agglomérat d'une trentaine de cellules à une extrémité de la sphère, appelé masse cellulaire interne (MCI), qui contient 16 à 40 cellules issues des divisions de l'ovocyte fécondé. La dérivation des hES nécessite la séparation de la MCI, soit par immunochirurgie (lyse du trophoctoderme par réaction anticorps/complément), soit par séparation mécanique (Strom et al., 2007). Les cellules obtenues de la dissection de la MCI sont cultivées dans des boîtes tapissées de cellules nourricières (feeders) qui sont généralement des fibroblastes (murins ou humains) qui ont été mitotiquement inactivés, soit par irradiation, soit par traitement à la mitomycine C. Elles assurent l'ancrage des hES et sécrètent des facteurs nutritifs dans le milieu de culture. Le milieu de culture comporte du sérum de veau fœtal ou des substituts du sérum comme le knock out serum replacement (KO-SR), et des facteurs de croissance, en particulier du basic fibroblast growth factor (bFGF, aussi appelé FGF2). Le bFGF est nécessaire pour le maintien de l'état indifférencié des hES à la différence des cellules souches embryonnaires murines, chez lesquelles il induit une différenciation.

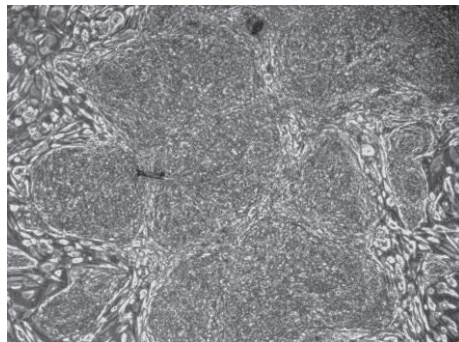


Figure 18. Colonies de hES en culture sur feeders de fibroblastes murins

b) Propriétés des cellules souches embryonnaires humaines

- L'autorenouvellement

L'auto-renouvellement désigne la capacité d'expansion illimitée des hES, qui sont capables de se multiplier à l'infini, tout en maintenant un phénotype et un caryotype normal (Fluckiger et al., 2003).

- La pluripotence

La pluripotence est la capacité que possèdent les hES de se différencier en tous les types cellulaires issus des trois feuillets embryonnaires (ectoderme, endoderme, mésoderme). Les hES peuvent donc se différencier en n'importe quel type cellulaire de l'organisme adulte (plus de 200 types cellulaires différents). Cette propriété est spécifique aux cellules souches embryonnaires et aux cellules de la MCI, et persiste même après une période de prolifération indifférenciée prolongée.

- La formation de tératomes

Les caractères de pluripotence et d'autorenouvellement se traduisent *in vivo* par la formation de tératomes. L'injection de hES chez une souris immuno-déficiente (en sous cutanée, intra-rénale ou intra-testiculaire) conduit à l'apparition de tératomes, qui sont des tumeurs solides comportant des cellules provenant des trois feuillets embryonnaires, ainsi que des cellules indifférenciées (Fluckiger et al., 2003; Thomson et al., 1998). La formation de tératomes représente un des inconvénients majeurs de l'utilisation de hES en biothérapie.

c) Les déterminants de la pluripotence et de l'autorenouvellement

La compréhension des mécanismes moléculaires qui sous-tendent la pluripotence et l'autorenouvellement est fondamentale au développement des applications médicales et biologiques des hES. Plusieurs mécanismes participant à la pluripotence ont été mis en évidence, dont les facteurs de transcription, l'état de la chromatine, les micro-ARN, les facteurs de croissance et les particularités du cycle cellulaire.

- Les facteurs de transcription

Le maintien de la pluripotence est gouverné par le contrôle transcriptionnel des gènes du développement. Il a été mis en évidence trois gènes codant pour des facteurs de transcription qui sont directement impliqués dans le maintien de la pluripotence : OCT4 (également appelé OCT3 ou POUF1), NANOG et SOX2 (Chambers et al., 2007; Masui et al., 2007; Niwa et al., 2000). OCT4 et NANOG sont des facteurs de transcription à homéodomaine (famille de

facteurs de transcription hautement conservé au cours de l'évolution jouant un rôle primordial dans la détermination cellulaire) alors que SOX2 est un facteur de transcription contenant un domaine de liaison à l'ADN HMG (high mobility group) box. Il a été démontré qu'OCT4 réprime la différenciation vers le trophoblaste (Niwa et al., 2000), alors que NANOG inhibe la différenciation vers l'endoderme primitif (Boheler, 2009). L'étude de Boyer et al (Boyer et al., 2005), a démontré que ces facteurs agissent de façon coopérative, puisque plus de 90% des régions promotrices occupés par OCT4 et SOX2 étaient également occupés par NANOG. Au total, ces trois facteurs occupent ensemble au moins 353 gènes différents dans les hES. Ces gènes peuvent soit être activés, soit être réprimés, et comprennent des gènes qui codent pour des complexes de remodelage de la chromatine et des protéines modificateurs d'histones (gènes activés), ainsi que des gènes qui codent pour des facteurs de transcription impliqués dans la spécification des lignées cellulaires (gènes activés ou réprimés) (Boyer et al., 2005; Kim et al., 2008; Wang et al., 2006). Ainsi, OCT4, NANOG et SOX2 collaborent ou fonctionnent indépendamment pour former un circuit de régulation comportant des boucles d'auto-régulation et de rétro-contrôle (feed-forward loops) qui induisent la pluripotence en réprimant les programmes de différenciation cellulaire (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003; Niwa et al., 2000). La génération de cellules souches pluripotentes induites (iPS) utilisant OCT4, SOX2 et NANOG en association avec LIN28 chez l'humain a contribué à démontrer le rôle de ces facteurs de la transcription dans le maintien de la pluripotence (Yu et al., 2007).

- L'état de la chromatine

Au cours du développement, les cellules pluripotentes donnent naissance à toutes les lignées cellulaires de l'organisme. Puisque la séquence primaire d'ADN n'est pas modifiée pendant ce processus, il en ressort que les modifications épigénétiques jouent un rôle clé dans la régulation du développement et de la différenciation. Chez les eukaryotes, la chromatine est organisée en structures qui sont régulées de façon dynamique, et influencent directement l'activité du génome en modifiant l'accessibilité des protéines régulatrices à leurs sites cibles, et en modulant l'affinité des régulateurs transcriptionnels avec leurs cibles (Gasser, 2002; Misteli, 2001).

Au cours de la différenciation des hES, plusieurs modifications de l'état épigénétique des cellules ont été constatées. L'euchromatine, forme transcriptionnellement active de la

chromatine prédominant dans les hES, se condense progressivement pour former des foyers d'hétérochromatine (forme inactive) qui augmentent en nombre au fur et à mesure de la différenciation (Arney and Fisher, 2004; Francastel et al., 2000). Parallèlement, on retrouve des modifications histoniques qui reflètent une diminution de l'activité transcriptionnelle, avec une majoration des modifications inhibitrices (tri-méthylation sur la lysine 9 de l'histone H3), et une diminution des modifications activatrices (baisse du taux d'histones H3 et H4 acétylés) (Keohane et al., 1996; Lee et al., 2004a; Meshorer et al., 2006), mais aussi la présence de modifications particulières, dites bivalentes, car à la fois activatrices (triméthylation sur la lysine 4 de l'histone H3) et inhibitrices (triméthylation sur la lysine 27 de l'histone H3) (Bernstein et al., 2006). Ces méthylations sont en partie modulées par les protéines des groupes Polycomb et trithorax, qui sont eux-mêmes associées aux facteurs de transcription de la pluripotence SOX2, OCT4 et NANOG (Lee et al., 2006). Ces protéines se fixent sur plus de 1000 gènes, dont la plupart sont spécifiques du développement (Boyer et al., 2006; Lee et al., 2006). L'activation de ces gènes induirait le début de la différenciation, alors que les protéines Polycomb les répriment tout en les maintenant dans un état silencieux, mais prêt à être activés si nécessaire. Il est à noter également que la liaison des protéines à la chromatine est hyperdynamique dans les hES, et ce turn-over diminue avec la perte de la pluripotence (Meshorer et al., 2006). Ce caractère hyperdynamique de liaison de protéines à la chromatine pourrait faciliter la liaison de facteurs régulateurs aux séquences nécessaires pour l'activation de programmes d'expression génique d'une lignée cellulaire donnée (Meshorer and Misteli, 2006). Les hES sont donc caractérisées par une chromatine beaucoup plus active que celle des cellules différenciées, permettant à la cellule de s'engager vers n'importe quel type cellulaire. Au fur et à mesure de la différenciation la chromatine devient de plus en plus inactive, avec une diminution de l'activité transcriptionnelle qui ne concerne que les gènes spécifiques du type cellulaire en cours de genèse (Efroni et al., 2008).

- Les micro-ARN

Plusieurs études récentes ont démontré que les micro-ARN (mi-ARN), une famille de transcrits ARN de 20-25 nucléotides ne codant pas pour des protéines, joue un rôle essentiel dans la régulation de l'expression génique (Bartel, 2009; Gangaraju and Lin, 2009). Un sous groupe de mi-ARN est exprimé de façon préférentielle dans les cellules souches embryonnaires (Houbaviy et al., 2003), et il a été montré que ces mi-ARN ont un rôle

primordial dans la prolifération, la pluripotence et la différenciation (Barroso-delJesus et al., 2008; Wang et al., 2008). Dans les cellules souches embryonnaires, on retrouve un groupe de mi-ARN dont les promoteurs sont préférentiellement occupés par SOX2, OCT4 et NANOG, les facteurs de transcription de la pluripotence (Marson et al., 2008). Parmi ces mi-ARN, on distingue deux groupes : un groupe dont l'expression est activée et est particulièrement élevée dans les cellules souches embryonnaires, et un autre groupe dont l'expression est inhibée par les protéines du groupe Polycomb, mais qui sont exprimés plus tard lors de la différenciation en lignées cellulaires spécifiques (Marson et al., 2008). Les mi-ARN coopèrent donc avec les facteurs de transcription de la pluripotence et avec le groupe de protéines Polycomb afin de réguler les réponses transcriptionnelles nécessaires pour maintenir l'équilibre entre l'autorenouvellement et la différenciation (Kashyap et al., 2009).

- Les facteurs de croissance

Contrairement aux cellules souches embryonnaires murines, les voies de signalisation FGF et TGF β /Activine/Nodal sont essentiels à l'autorenouvellement des cellules souches embryonnaires humaines. La présence de bFGF est nécessaire dans le milieu de culture pour le maintien de la pluripotence des hES. Le bFGF agit en partie en inhibant la voie de signalisation BMP, qui est connu pour induire la différenciation des hES (Xu et al., 2005). Cependant, la suppression de l'activité BMP n'est pas suffisante pour maintenir l'état indifférencié des hES (Xu et al., 2005), indiquant que le bFGF agit par d'autres mécanismes. Il a été démontré que le bFGF induit l'expression de ligands du TGF β dans les hES mais également dans les cellules feeders, ce qui pourrait également promouvoir l'autorenouvellement (Greber et al., 2007). En effet, plusieurs études ont démontré que la voie de signalisation TGF β /Activine est essentielle pour l'autorenouvellement des hES (Beattie et al., 2005; James et al., 2005; Vallier et al., 2005). Cette voie agit en partie en inhibant la voie BMP (Greber et al., 2007), mais aussi en induisant l'expression de bFGF (Xiao et al., 2006), ce qui montre qu'il existe de multiples interactions entre ces voies de signalisation dans les hES. Cependant, les mécanismes d'action de ces voies de signalisation ne sont qu'incomplètement élucidés à l'heure actuelle, et il reste sûrement à découvrir d'autres voies importantes impliquées dans le maintien de la pluripotence et l'autorenouvellement (Yu and Thomson, 2008).

- Le cycle cellulaire

Les hES ont une vitesse de prolifération élevée par rapport aux cellules somatiques, avec un cycle cellulaire qui dure 15 à 16 heures, alors que le cycle cellulaire d'une cellule somatique dure 24 à 32 heures environ (Becker et al., 2006). Le cycle cellulaire des hES se caractérise par une phase G1 raccourcie (Becker et al., 2006; Fluckiger et al., 2006). Des études ont suggéré que c'est pendant cette phase G1 que les cellules souches sont les plus sensibles aux signaux de différenciation (Calegari et al., 2005; Calegari and Huttner, 2003). Il est probable que le raccourcissement de G1 dans les hES soit secondaire aux niveaux élevés d'ARNm de Cyclin2/Cyclin dependent kinase 4 (CDK), ayant comme effet une accélération du cycle cellulaire, et aussi aux niveaux faibles de certaines protéines inhibitrices du cycle cellulaire, p21, p27 et p57 (Becker et al., 2006; Becker et al., 2007). Les spécificités du cycle cellulaire des cellules souches embryonnaires jouent sans doute un rôle important dans l'autorenouvellement et les capacités de prolifération de cette population cellulaire.

2. Les cellules souches adultes hépatiques et les progéniteurs

Au cours du développement, les cellules souches totipotentes se différencient en sous-populations distinctes donnant naissance à des progéniteurs multipotents qui peuvent se différencier en un nombre limité de cellules matures. Contrairement aux « vraies » cellules souches, les progéniteurs ne possèdent pas la capacité d'autorenouvellement. Ces cellules ont un rôle central dans le maintien, la réparation et la reconstitution des tissus en réponse aux signaux de la régénération et l'homéostasie.

L'existence de cellules souches hépatiques ou de progéniteurs dans le foie adulte a longtemps été mise en cause. En effet, les hépatocytes adultes sont capables de se diviser tout en maintenant leur état différencié. Chaque hépatocyte serait capable de se diviser une trentaine de fois (Kuntz, 2008b). Lors d'une hépatectomie partielle, le foie restant augmente de volume afin de compenser la perte tissulaire, pour atteindre au final un volume équivalent au volume de départ. Ce processus prend 5 à 7 jours chez les rongeurs, et de 1 à 2 mois chez l'homme. Cette régénération serait secondaire à une prolifération des hépatocytes matures, indépendamment de cellules souches ou de progéniteurs (Michalopoulos, 2007). Cependant, l'inhibition de la prolifération des hépatocytes matures et/ou une atteinte hépatique sévère conduit à la multiplication d'une population de petites cellules peu différenciées, les

progéniteurs hépatiques, appelés cellules ovales chez les rongeurs et cellules hépato-biliaires chez l'homme. Le fait que ces progéniteurs soient rares et leur rôle facultatif dans la régénération hépatique explique la difficulté à les observer (Newsome et al., 2004) et à les caractériser.

a) Données chez les rongeurs

Les premières études mettant en évidence l'existence de progéniteurs hépatiques dans le foie adulte ont été réalisées chez les rongeurs, et notamment le rat. Une atteinte hépatique (par hépatectomie partielle ou traitement par CCl₄) en association avec un traitement inhibant la prolifération des hépatocytes matures (par exemple, 2-aceto-aminofluorine, allyl alcool, diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC). . .) conduit à la prolifération de petites cellules de forme ovale autour de la région péri-portale, appelées cellules ovales en raison de leur morphologie (Sell, 2001). Ces cellules sont de petite taille et ont un rapport nucléocytoplasmique élevé. Elles siègent dans les espaces portes au niveau du canal de Hering, un espace délimité par la terminaison des canalicules biliaires et la première rangée d'hépatocytes adjacents au niveau de la région périportale à proximité de la triade portale (Sell, 1994). Elles sont bipotentielles et peuvent se différencier soit en hépatocyte, soit en cholangiocyte (Evarts et al., 1987). Lorsque leur prolifération est stimulée, elles envahissent le parenchyme hépatique sous forme de structures ductulaires irrégulières et adoptent dans un premier temps un phénotype hépatocytaire intermédiaire immature (Evarts et al., 1987; Evarts et al., 1989). Elles s'intègrent dans le parenchyme hépatique afin de restaurer l'architecture et la fonctionnalité du foie endommagé. *In vitro*, les progéniteurs de rongeurs sont capables de se différencier vers l'hépatocyte mature sous l'action de facteurs de croissance comme l'HGF, l'EGF (He et al., 2003), l'OSM (Okaya et al., 2005), le BMP4 (Fan et al., 2009) ou le T3 (triiodothyronine) (Laszlo et al., 2008). Les progéniteurs hépatiques de rongeurs seraient également capables de se différencier vers des lignées cellulaires non hépatocytaires, comme les cellules pancréatiques (Leite et al., 2007; Yang et al., 2002) ou intestinales (Tatematsu et al., 1985). Les cellules ovales expriment à la fois des marqueurs hépatiques (albumine, CK 8/18) et des marqueurs biliaires (CK7). Leur phénotype se rapproche de celui des hépatoblastes foetaux bipotentiels, avec l'expression de certains marqueurs foetaux (alpha-foetoprotéine (AFP), albumine, CK19 et CK8/18), et également l'expression de marqueurs communs aux cellules souches hématopoïétiques (c-kit, CD 34) (Newsome et al., 2004).

Cependant, l'utilisation de différents modèles d'hépatotoxicité *in vivo* conduit à des cellules ovales ayant des phénotypes variables (Gordon et al., 2000; Sell, 1997; Yavorkovsky et al., 1995), ce qui met en évidence le caractère phénotypique hétérogène des progéniteurs. En effet, à l'heure actuelle il n'existe pas de marqueur ou de combinaison de marqueurs spécifique de cette population (Schwartz and Verfaillie, 2010).

Les mécanismes d'activation des cellules ovales ne sont pas complètement élucidés, mais l'activation passerait par 4 phases différentes : l'activation, sous l'influence de cytokines (LIF (leukemia inhibitory factor), OSM, IL6, TWEAK (TNF-like weak inducer of apoptosis)), la prolifération sous l'action de facteurs de croissance (TGFs, FGFs, HGF), la migration sous l'influence de chémokines (SDF1 (stromal cell-derived factor-1), CXCR4), et la différenciation, sous l'action de facteurs de croissance (LIF, OSM) (Erker and Grompe, 2007). Les signaux d'activation et de maturation semblent varier en fonction du caractère aiguë ou chronique de l'agression, et du caractère biliaire ou parenchymateux de l'atteinte (Jones and Wagers, 2008; Scadden, 2006). Mise à part leur rôle dans la régénération hépatique, les progéniteurs ont également été impliqués dans la carcinogénèse, puisque les composés qui provoquent leur apparition sont des carcinogènes reconnus, donnant lieu à des populations de cellules ovales qui peuvent avoir un potentiel tumorigène (Suzuki et al., 2008). Leur capacité de transdifférenciation fait que ces cellules peuvent générer des métaplasies, qui sont des précurseurs de néoplasies (Quinlan et al., 2007; Slack and Tosh, 2001). Les progéniteurs ont ainsi été impliqués dans l'apparition de carcinomes hépatocellulaires et de cholangiocarcinomes chez les rongeurs (Sell, 1998; Sell and Leffert, 1982).

b) Données chez l'homme

- Caractéristiques et capacités de différenciation des progéniteurs hépatiques

Etant données les capacités régénératives de l'hépatocyte adulte, l'existence de progéniteurs hépatiques chez l'homme a été longtemps débattue. Les progéniteurs humains ont été mis en évidence lors des réactions ductulaires atypiques, qui surviennent en réponse à une nécrose hépatocellulaire sévère. On retrouve au sein des structures ductulaires la présence de cellules d'aspect biliaire à une extrémité, la présence de cellules d'aspect hépatocytaire à l'autre, et entre les deux des cellules de phénotype intermédiaire hépato-biliaire (Gerber et al., 1983;

Roskams and Desmet, 1998; Thung, 1990). Ces cellules hépatobiliaires seraient des progéniteurs hépatiques, l'équivalent des cellules ovales chez le rongeur. Elles ont d'abord été observées dans diverses situations pathologiques où le foie est le siège d'une nécrose tissulaire (hépatites virales chroniques, maladies biliaires chroniques, stéato-hépatites alcooliques et non alcooliques (Crosby et al., 1998; Roskams et al., 2003; Sell, 1998), mais elles ont également été mises en évidence dans le foie normal et le foie cirrhotique (Crosby et al., 2001). Le nombre de progéniteurs augmente avec la sévérité de l'atteinte hépatique (Lowe et al., 1999) et est corrélé à l'importance de l'infiltrat inflammatoire (Libbrecht et al., 2000). Des études en trois dimensions et en microscopie électronique ont permis de conforter l'hypothèse que les progéniteurs résident dans ou à proximité du canal de Hering (Schmelzer et al., 2007; Theise et al., 1999), au sein d'une niche cellulaire. Cet emplacement bénéficie d'un débit sanguin riche en oxygène et nutriments, et c'est au sein de cette niche que les progéniteurs interagissent avec les cellules environnantes (cellulaires stellaires, hépatocytes, cholangiocytes, myofibroblastes) et des composants du milieu extracellulaire (membrane basale), qui gouvernent leur auto-renouvellement et leur différenciation, sous l'influence de facteurs de croissance et de certaines cytokines du système immunitaire.

Les progéniteurs du foie adulte humain peuvent exprimer des marqueurs à la fois biliaires (CK7, CK19 et OV6) et hépatocytaires (albumine, AAT, occasionnellement AFP), mais comme pour les rongeurs, il n'existe pas de marqueur ou de groupe de marqueurs spécifiques des progéniteurs hépatiques. En effet, les progéniteurs représentent une population hétérogène de cellules de phénotypes intermédiaires hépato-biliaires (Roskams et al., 2004). Cette hétérogénéité couplée à l'absence de marqueur spécifique rend leur isolement difficile. Plusieurs équipes ont pu isoler et caractériser des populations de progéniteurs à partir du foie humain adulte qui étaient capables de proliférer *in vitro* sans modifications phénotypiques (Crosby et al., 2001; Duret et al., 2007; Herrera et al., 2006; Khoo et al., 2011; Najimi et al., 2007; Schmelzer et al., 2007; Selden et al., 2003). Crosby et al (Crosby et al., 2001) ont isolé à partir de foies cirrhotiques des cellules porteuses de marqueurs hématopoïétiques c-kit ou CD34, qui n'avaient pas de marqueurs hépatiques spécifiques, et étaient capables de se différencier vers le phénotype biliaire. Selden et al (Selden et al., 2003) ont isolé à partir d'un foie d'une patiente en insuffisance hépatique subaiguë des cellules ayant à la fois des caractéristiques hépatocytaires (sécrétion d'albumine et d'urée, expression de CK18) et biliaires (expression de GGT, CK7, CK19), mais qui exprimaient également le marqueur de

cellules souches OCT4. Les cellules isolées par Herrera et al (Herrera et al., 2006) à partir de foies sains n'exprimaient pas de marqueurs hématopoïétiques, mais exprimaient des marqueurs des cellules mésenchymateuses (CD73, CD90, CD29, CD44) et des marqueurs hépatiques (albumine, AFP, CK8, CK18). Elles étaient pluripotentes et capables de se différencier vers le phénotype ostéogénique, endothéliale et hépatique (sécrétion d'albumine et d'urée), mais ne pouvaient pas se différencier vers le phénotype adipogénique. Najimi et al (Najimi et al., 2007) ont également isolé à partir de foies adultes exprimant des marqueurs mésenchymateux (CD73, CD90, vimentine) et certains marqueurs hépatiques (albumine, AFP, G6P, CYP3A4, AAT entre autres), tout en étant négatif pour les marqueurs hématopoïétiques et pour OCT4. Contrairement aux cellules de Herrera et al (Herrera et al., 2006), elles n'exprimaient pas CK8 et CK18 et n'étaient pas capables de se différencier ni vers un phénotype ostéogénique ni adipogénique, à l'inverse des cellules souches mésenchymateuses. Après une période de différenciation de 22 jours sous l'effet de divers facteurs de croissance (EGF, HGF, OSM, dexaméthasone (Dex), insuline-transferrine-sélénium (ITS)), les cellules ont été transplantées chez des souris SCID (severe combined immunodeficient)/uPA (Urokinase-type Plasminogen Activator) hépatectomisées. L'analyse à 10 semaines post-transplantation a montré que ces cellules étaient capables d'intégrer le parenchyme hépatique de l'hôte, avec détection plasmatique d'albumine humaine. Une étude ultérieure (Khuu et al., 2011) a démontré que ces cellules étaient capables de synthétiser du glucose de novo, métaboliser l'ammoniaque et produire de l'urée. Elles avaient également une activité CYP1, 2 et 3 ainsi qu'une activité GST et UGT, mais l'ensemble de ces fonctions étaient d'un niveau relativement faible par rapport aux HHCP.

Les capacités de différenciation des progéniteurs vers un phénotype hépatocytaire adulte a également été étudié dans notre laboratoire par Duret et al (Duret et al., 2007). Les progéniteurs ont été isolés à partir de foies adultes à fonction hépatique normale et étaient négatifs pour OCT4 et les marqueurs hématopoïétiques, mais exprimaient à la fois des marqueurs hépatiques (albumine, AAT, CK18, HNF4 α mais pas AFP) et biliaires (CK19). Sous l'influence des facteurs de croissance FGF4 et HGF, ces cellules étaient capables de se différencier en cellules exprimant à la fois les marqueurs d'un phénotype hépatocytaire mature (CYP3A4, GST α , CPS1, TAT, TDO) et immature (CYP3A7, GST π , absence de G6P) (Duret et al., 2007). Le groupe de L. Reid (Schmelzer et al., 2007) ont isolé des cellules qu'ils dénomment cellules souches hépatiques de foies adultes et fœtaux en utilisant le marqueur

EpCAM, un marqueur épithélial présent sur des cellules proliférantes d'origine endodermale, mais également sur les cholangiocytes dans le foie adulte. Ainsi, les auteurs ont défini deux populations cellulaires : une population de cellules souches hépatiques (AFP-, CD133/1+, CK19+, expression faible d'albumine) constituant environ 0,5 à 2% du parenchyme hépatique, et une population d'hépatoblastes AFP+, très rares chez l'adulte (<0,01%) mais très nombreux chez le fœtus (>95%). Les cellules souches hépatiques n'exprimaient pas de marqueurs hématopoïétiques ou mésenchymateux, et n'exprimaient pas non plus les cytochromes P450 caractéristiques des hépatocytes matures. Quand ces cellules ont été amplifiées en culture, les auteurs ont constaté la présence de cellules mésenchymateuses « accompagnatrices », qui correspondaient à des angioblastes et à des cellules stellaires, ce qui met en évidence l'importance de coopérations cellulaires pour le maintien en culture. Les cellules EpCAM⁺ ont été transplantées chez des souris NOD-SCID traitées par CCl₄. Des analyses à 8 jours post-transplantation ont révélé que les cellules intégrées au sein du parenchyme hépatique avaient perdu l'expression d'EpCAM, et avaient acquis un phénotype partiellement mature, avec l'augmentation de l'expression d'albumine, l'apparition de l'expression de la transferrine mais aussi celle de l'AFP.

Plus récemment, Spee et al (Spee et al., 2010) ont isolé des progéniteurs par microdissection laser à partir de coupes de tissu hépatique de patients souffrant d'hépatite aiguë, de cirrhose biliaire primitive, et de cirrhose secondaire à l'infection par le virus de l'hépatite C. Ils ont mis en évidence une population de progéniteurs exprimant des marqueurs de cellules souches dont OCT4, NANOG, CD133, KIT, LIF et TERT (telomerase reverse transcriptase), ainsi que AFP, CK19 et CK7. Le phénotype des progéniteurs variaient en fonction de la maladie sous jacente : ainsi, dans l'hépatite aiguë l'expression de CD133 et d'AFP était plus forte, indiquant la présence de progéniteurs peu différenciés avec un fort potentiel prolifératif, alors que dans la cirrhose VHC et la cirrhose biliaire primitive, les progéniteurs étaient différenciés vers le phénotype hépatocytaire et biliaire respectivement. Les auteurs ont montré l'existence d'une forte signalisation Wnt dans les progéniteurs dans l'hépatite aiguë, ce qui suggère que Wnt joue un rôle dans l'activation et la prolifération de ces cellules lors d'atteintes parenchymateuses. Inversement, la voie de signalisation Notch était fortement activée chez les progéniteurs dans la cirrhose biliaire primitive, qui sont destinés à une différenciation biliaire.

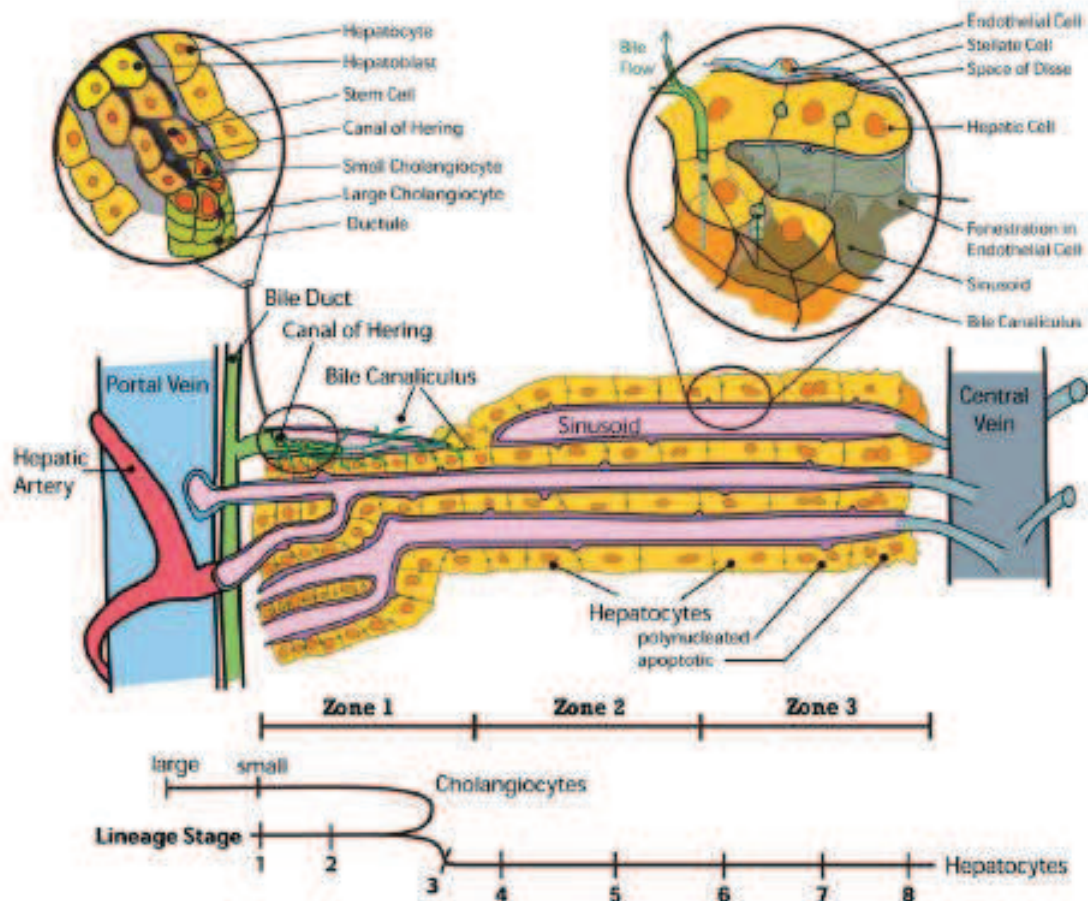
Une nouvelle technique d'isolement de progéniteurs hépatiques a récemment été rapporté par Dollé et al (Dolle et al., 2011), qui ont utilisé l'activité aldéhyde déshydrogénase, une enzyme caractéristique de cellules souches. Cette activité peut être détectée dans les canaux de Hering et son expression est majorée lors d'aggressions hépatiques chez la souris. Les cellules isolées par cette méthode chez l'homme expriment les marqueurs de cellules souches hépatiques EpCAM et CD133, ainsi que CK7 et CK19. Sous l'action de HGF, EGF et OSM, ces cellules pouvaient être différenciées vers l'hépatocyte et exprimaient l'albumine et le CK18, stockaient du glycogène et produisaient l'albumine et l'urée.

Au total, ces données démontrent le caractère variable du phénotype des progéniteurs hépatiques isolés à partir du foie adulte. Même si tous les auteurs rapportent l'expression simultanée de marqueurs hépatiques et biliaires, l'expression de marqueurs hématopoïétiques, mésenchymateux et de cellules souches n'est pas retrouvée de façon constante. Cette variabilité peut être soit liée aux conditions d'isolement qui diffèrent selon les laboratoires, soit liée aux pathologies sous-jacentes du tissu hépatique dont les cellules sont extraites, soit liée à un éventuel co-isolement d'autres types cellulaires (mésenchymateux, endothéliaux, hématopoïétiques, etc.), soit liée à l'hétérogénéité intrinsèque des progéniteurs eux-mêmes, qui seraient une population comprenant des cellules à des stades de différenciation variables.

- Rôle et stades de maturation des progéniteurs hépatiques

Il n'existe pas de consensus sur le rôle physiopathologique exact des progéniteurs au sein du foie adulte : pour certains auteurs, ils seraient « facultatifs », et n'interviendraient qu'en réponse à certains types d'agressions ou pathologies hépatiques données capables d'engendrer une réponse hyperplasique (Alison et al., 2004; Theise et al., 1999; Thorgerisson and Grisham, 2003). Pour d'autres auteurs, les progéniteurs participeraient de façon continue à la régénération hépatique au fur et à mesure de la sénescence des hépatocytes en état de maturation terminale (Schmelzer et al., 2006; Sigal et al., 1992; Sigal et al., 1999). Ainsi, ils pourraient régénérer le foie en envahissant le parenchyme hépatique à partir des espaces portes, selon l'hypothèse du « streaming liver » (De Alwis et al., 2009; Fellous et al., 2009; Roskams et al., 2004). L'expression différentielle de certains gènes entre les hépatocytes périportaux et péricentraux refléterait une progression de la maturation. L'hypothèse d'un gradient de maturation au sein du lobule hépatique a été particulièrement développée par l'équipe de L. Reid. Il existerait au sein du lobule hépatique 8 stades de maturation différents,

le long de l'axe porto-central (Turner et al., 2011). Le canal de Hering dans la région périportale serait la niche des cellules souches hépatiques (stade 1), des cellules exprimant CD133, EpCAM, NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule), CK8, 18 et 9, mais n'exprimant pas l'AFP et n'exprimant que très faiblement l'albumine (Schmelzer et al., 2007). Ces cellules seraient les précurseurs des hépatoblastes (stade 2), qui sont bipotents (différenciation possible vers le phénotype hépatocytaire ou cholangiocytaire). Ils sont positifs pour l'AFP et ont une expression d'albumine plus forte que les cellules souches hépatiques (Schmelzer et al., 2007). Ainsi, les hépatoblastes ne se trouveraient pas uniquement au niveau du parenchyme du foie fœtal, mais seraient également présents dans le foie adulte. Ces cellules s'amplifient en réponse à certaines situations pathologiques, représentant les « transit amplifying cells » (Schmelzer et al., 2007; Zhang et al., 2008), et correspondant aux cellules de phénotype intermédiaire hépato-biliaire observées lors des réactions ductulaires chez l'adulte. Les hépatoblastes donnent naissance aux progéniteurs hépatiques unipotents (stade 3), qui perdent l'expression des marqueurs de cellules souches, et expriment soit des marqueurs hépatocytaires, soit des marqueurs biliaires. Les progéniteurs hépatocytaires expriment l'albumine et les enzymes impliqués dans la glycogénèse (ex. G6P), mais n'expriment ni les marqueurs biliaires, ni l'AFP (Turner et al., 2011). Les cellules du stade 4 seraient des hépatocytes périportaux (zone 1), et celles du stade 5 des hépatocytes centrolobulaires (cf chapitre I.4). Au niveau de la zone 3 (péricentrale), on distingue des hépatocytes diploïdes (stade 6), exprimant fortement les CYP 450 ainsi que les glutathione transférases et UDP-glucuronyl-transférases (Jungermann, 1992). Les cellules du stade 7, siégeant également dans la zone 3, sont tétraploïdes et expriment la glutamine synthase en plus des CYP 450 et les enzymes de la glucuronidation. Elles ont des capacités de prolifération très faibles (Turner et al., 2011). Enfin, les cellules du stade 8, les plus proches de la veine centrolobulaire, sont apoptiques. C'est dans cette région que la concentration de macrophages est le plus élevé.



Stade de maturation	1	2	3	4	5	6	7
Cellules parenchymateuses	Cellules souches hépatiques	Hépatoblastes	Progéniteurs unipotents	Hépatocytes périportaux	Hépatocytes centro-lobulaires	Hépatocytes péricentraux diploïdes	Cellules parenchymateuses tétraploïdes

Figure 19. Stades de maturation intrahépatiques. D'après Turner et al. (Turner et al., 2011)

Les cellules matures dans la zone péricentrale produisent à l'état physiologique des signaux (facteurs solubles, sels biliaires, composants de la matrice extra-cellulaire) qui inhibent ou stimulent la prolifération des cellules souches et des progéniteurs (Turner et al., 2011), selon une boucle d'autorégulation (feedback loop). Ainsi, lorsque le foie subit une atteinte pathologique sélective des hépatocytes péricentraux, on assiste à une prolifération importante des cellules souches/progéniteurs hépatiques de la région périportale, ce qui entraîne les

réactions ductulaires. Inversement, lors d'une hépatectomie partielle, la boucle d'autorégulation reste intacte, et les phénomènes de régénération sont moins prononcés au niveau périportal (Turner et al., 2011).

Même si les mécanismes d'activation des progéniteurs sont partiellement connus chez les rongeurs, les données chez l'homme sont limitées à l'heure actuelle (Sancho-Bru et al., 2009). Il est intéressant à noter que la présence d'hépatoblastes, équivalents aux cellules hépatiques fœtales, au sein d'une « zonation maturationnelle » dans le foie adulte, peut présager d'un éventuel parallélisme au niveau des mécanismes du développement et de la régénération hépatique.

V. SOURCES ALTERNATIVES D'HEPATOCYTES HUMAINS

Au cours des dernières années, de nombreuses stratégies ont été développées afin d'obtenir des hépatocytes à partir de la différenciation des cellules souches (hES, cellules souches mésenchymateuses multipotentes, cellules souches pluripotentes induites) ou d'autres types cellulaires (transdifférenciation). Ces stratégies reposent essentiellement sur la reconstruction du microenvironnement *in vivo*, en agissant sur plusieurs facteurs de la culture cellulaire *in vitro* :

- Addition dans le milieu de culture de facteurs solubles (ex. facteurs de croissance, hormones, etc.)
- Reconstitution de la matrice extra-cellulaire (supports de culture variables)
- Reconstitution des interactions intercellulaires (grâce à des co-cultures par exemple)
- Modulation de la chromatine (rajout de substances modificatrices de la chromatine).

1. Génération d'hépatocytes à partir de cellules souches embryonnaires humaines

a) *Différenciation par formation de corps embryoïdes*

Les corps embryoïdes sont des agrégats de cellules souches embryonnaires qui se forment spontanément en culture. Ils forment une structure tridimensionnelle au sein de laquelle les cellules se différencient spontanément et de façon non contrôlée vers des types cellulaires dérivés des trois feuillets embryonnaires. Lorsque les corps embryoïdes sont dissociés et ensemencés en monocouche, de nombreuses lignées cellulaires sont retrouvées, dont la lignée hépatocytaire (Itskovitz-Eldor et al., 2000).

Les premières tentatives de différenciation des hES vers l'hépatocyte ont consisté à favoriser la différenciation des hES vers l'hépatocyte au sein des corps embryoïdes, en ajoutant des facteurs de croissance dans le milieu. Après avoir testé l'effet de 8 cytokines différentes sur la différenciation des corps embryoïdes, Schuldiner et al (Schuldiner et al., 2000) ont observé une optimisation de la différenciation vers l'hépatocyte sous l'influence de NGF (nerve growth factor) et de HGF, avec l'obtention de cellules hépatocytaires dérivées de hES (hES-Hep) exprimant l'albumine, l'AAT et l'AFP. Shirahashi et al (Shirahashi et al., 2004) ont été les premiers à obtenir des hES-Hep pouvant sécréter de l'albumine, sous l'action de HGF, NGF, FGF1 et 2, dexaméthasone, insuline, OSM et acide rétinoïque. Lavon et al (Lavon et al., 2004) ont comparé l'effet de FGF1, FGF2, BMP4 et HGF sur la différenciation de corps embryoïdes dans un milieu conditionné par des hépatocytes adultes, et ont trouvé que seul le FGF2 induisait l'apparition de cellules exprimant l'albumine. Après culture sur collagène de type 1 et sous l'action de FGF4 et HGF, Schwartz et al (Schwartz et al., 2005) ont obtenu des hES-Hep pouvant produire de l'urée et de l'albumine et ayant une activité CYP450 inductible, mais dont le niveau d'activité n'a pas été comparé aux HHCP. Par la suite, diverses équipes ont induit la différenciation de hES vers l'hépatocyte en simulant les étapes de l'ontogénèse *in vitro*, avec l'ajout séquentiel de facteurs de croissance (activine A, FGF, HGF, OSM, Dexaméthasone) (Baharvand et al., 2006; Ishii et al., 2008; Sasaki et al., 2009; Soto-Gutierrez et al., 2006; Zhou et al., 2007). La différenciation au sein des corps embryoïdes mime en quelque sorte la différenciation *in vivo*, car les cellules sont au contact de différents types cellulaires (facilitation des interactions intercellulaires) au sein d'une structure tridimensionnelle. Cependant, la technique de différenciation via les corps embryoïdes

présente un certain nombre de désavantages. La différenciation est moins spécifique du fait de la possibilité de la présence de cellules d'autres feuillets embryonnaires que l'endoderme, et les cellules obtenues en fin de différenciation sont hétérogènes. En cours de différenciation, les cellules sont exposées de façon inégale aux facteurs de croissance et aux composants de la matrice extra-cellulaire, du fait de la structure tridimensionnelle, et les cellules à l'intérieur des corps embryoïdes sont souvent apoptotiques. De ce fait, la reproductibilité de ces techniques ne peut être assurée. Il existe également la possibilité que des cellules de l'endoderme ventrale (tissus extra-embryonnaires) se développent au sein de ces cultures. Ces cellules sont homologues aux hépatocytes à plusieurs niveaux : elles ont une morphologie épithéliale, elles expriment des facteurs de transcription communs aux hépatocytes (les FoxA, C/EBP, GATA, HNF4), elles sécrètent des protéines (dont l'AFP) et elles sont impliquées dans le métabolisme du glucose et des lipides et dans l'hématopoïèse (Watt and Forrester, 2006). Il est donc nécessaire de différencier les hES-Hep des cellules de l'endoderme ventral, en étudiant l'expression de CYP7A1, par exemple, qui est exprimé par les hépatocytes mais pas par les cellules extra-embryonnaires. Or, ce marqueur n'a pas été étudié de façon systématique lors des premiers protocoles de différenciation (Lavon et al., 2004; Schwartz et al., 2005).

b) Différenciation en mono-couche sous l'action de facteurs solubles

En 2005, D'Amour et al (D'Amour et al., 2005) ont publié un protocole permettant de différencier les hES vers l'endoderme définitif sous l'action d'activine A, avec un rendement relativement élevé (80%). Des travaux menés par Jung et al (Jung et al., 1999) et Rossi et al (Rossi et al., 2001) ont mis en évidence le rôle des FGF et des BMP respectivement. Gouon-Evans et al (Gouon-Evans et al., 2006) a montré que le BMP pouvait induire la spécification hépatique *in vitro* de l'endoderme définitif produit à partir de cellules souches embryonnaires chez la souris. A partir de ces données, des protocoles de différenciation ont été développés récapitulant les différents étapes du développement par le rajout séquentiel de facteurs de croissance, avec d'abord l'induction de l'endoderme définitif sous l'action d'activine A, suivi par la spécification hépatique sous l'action des BMP et les FGF, puis la maturation sous l'effet de Oncostatine M, de glucocorticoïdes et d'insuline. Ainsi, plusieurs équipes ont étudié l'expression séquentielle de marqueurs du mésendoderme, puis de l'endoderme définitif, avec la disparition de marqueurs d'autres lignées (Agarwal et al., 2008; Brolen et al., 2010; Chen et

al., 2006; Duan et al., 2010; Hay et al., 2008b; Touboul et al., 2010). La durée de ce type de différenciation varie en général entre 18 et 28 jours. La culture en monocouche permet d'avoir une exposition uniforme des cellules aux facteurs de croissance, avec un contrôle précis de leurs durées d'exposition dans des conditions définies.

Les protocoles de différenciation des hES vers l'hépatocyte utilisent pour la plupart FGF1, FGF2 et FGF4, séparément ou ensemble, et BMP2 ou BMP4. Cai et al (Cai et al., 2007) ont utilisé FGF4 et BMP2 pour la spécification hépatique mais ont également testé FGF1, FGF2 et BMP4, sans trouver de différence significative entre les différentes familles de facteurs de croissance. Hay et al (Hay et al., 2008a) ont optimisé la différenciation précoce en rajoutant du Wnt3a dans le milieu de culture pendant les trois premiers jours en association avec l'activine A. Le Wnt3a a ainsi accéléré la transition mésendoderme-endoderme définitif et permis d'obtenir une différenciation plus rapide vers l'hépatocyte. Les travaux de McLean et al (McLean et al., 2007) ont démontré que la spécification de l'endoderme définitif est optimisée lors de l'inhibition de PI3K. Ainsi, le rajout de LY294002 de J2 à J5 en association avec l'activine A et le BMP4 a permis d'augmenter l'expression des marqueurs de l'endoderme définitif. Touboul et al (Touboul et al., 2010) ont également démontré que pendant la phase de spécification hépatique, la différenciation est optimisée sous l'action de FGF10 et d'acide rétinoïque par le rajout d'un inhibiteur du récepteur activine-nodal, SB431542. Inamura et al (Inamura et al., 2011) ont essayé d'optimiser la spécification hépatique en surexprimant HEX, un facteur de transcription exprimé dans l'endoderme hépatique et impliqué dans le bourgeonnement hépatique et la prolifération des hépatoblastes (cf chapitre II.2). Les hES en cours de différenciation au stade d'endoderme définitif ont été transduites par un adénovirus exprimant HEX, puis la différenciation a été poursuivie par l'ajout séquentiel de facteurs de croissance. Cette technique a permis d'induire l'expression de l'albumine à partir du 12^e jour de différenciation, mais les auteurs n'ont pas fait de comparaison avec des cellules non transduites. Au stade de maturation hépatique, à part les facteurs solubles « classiques » comme l'OSM, les glucocorticoïdes et l'insuline, on retrouve dans la littérature l'utilisation d'autres facteurs solubles comme l'EGF (Brolen et al., 2010; Touboul et al., 2010), le VEGF (Sasaki et al., 2009) et la follistatine-288, qui favoriserait la différenciation hépatocytaire par rapport à la différenciation biliaire (Roelandt et al., 2010). Enfin, il est intéressant de noter que Zamule et al (Zamule et al., 2011) ont pu différencier les hES vers l'hépatocyte avec un protocole très minimaliste, en utilisant comme seuls facteurs solubles la dexaméthasone et insuline-transferrine-sélénium, dans des conditions sans sérum

sur collagène de type I. Avec ce protocole, 60-70% des hES-Hep adoptent une morphologie hépatique en fin de différenciation et expriment un certain nombre de marqueurs hépatiques (dont les CYP), sécrètent l'albumine et captent le vert d'indocyanine, mais l'activité CYP3A4 n'est pas inductible. Les facteurs de croissance utilisés pour mimer l'ontogénèse hépatique *in vivo* ne semblent donc pas être indispensables dans certaines situations qui dépendent entre autres des conditions de culture et peut être de la lignée de hES utilisée. Il ne faut pas non plus négliger l'effet de l'utilisation de sérum d'origine animale par de nombreux auteurs, qui contient des facteurs de croissance et des hormones ainsi que d'autres substances non identifiées qui peuvent jouer sur le processus de différenciation et rajoutent des incertitudes sur le caractère véritablement dirigé et contrôlé de celui-ci (Chen and Zeng, 2011). Par conséquent, plusieurs auteurs ont élaboré des protocoles de différenciation n'utilisant pas de sérum (Baharvand et al., 2008; Basma et al., 2009; Hay et al., 2008b; Inamura et al., 2011; Si-Tayeb et al., 2010b; Zamule et al., 2011).

c) Utilisation d'agents modifiants la structure de la chromatine

Un certain nombre d'auteurs ont utilisé des agents modifiants la structure de la chromatine afin d'optimiser la différenciation des hES. Le butyrate de sodium inhibe l'acétylation des histones, et a été utilisé comme seul facteur soluble par Rambhatla et al (Rambhatla et al., 2003). Il a été constaté une mortalité significative des cellules, et le rendement n'était de 10 à 15%, avec une caractérisation des cellules en fin de différenciation limitée. Le butyrate de sodium a été également utilisé par d'autres auteurs en début de différenciation (Duan et al., 2010; Hay et al., 2008b). Hay et al (Hay et al., 2008a) ont comparé l'activine et le butyrate de sodium à l'activine et le Wnt3a pendant les trois premiers jours de la différenciation et ont constaté que la présence de Wnt3a accélérât le passage à travers la strie primitive, et induisait une différenciation plus rapide et plus homogène des cellules.

Le DMSO (diméthylsulphoxyde) est un solvant organique qui modifie l'acétylation des histones, augmente la méthylation de l'ADN et stabilise les membranes cellulaires. Il aurait ainsi un rôle de modulateur épigénétique (Iwatani et al., 2006). Il a été utilisé par plusieurs auteurs en conjonction avec d'autres facteurs de croissance, souvent vers la phase de spécification hépatique (Basma et al., 2009; Duan et al., 2010; Hay et al., 2008b; Hay et al., 2007; Soto-Gutierrez et al., 2006).

d) Supports de culture cellulaire

La matrice extra-cellulaire joue un rôle important dans l'ontogénèse hépatique *in vivo*. Plusieurs équipes ont comparé l'efficacité de différents composés de la matrice extra-cellulaire pour la différenciation des hES *in vitro*. Schwartz et al (Schwartz et al., 2005) ont démontré une meilleure différenciation sur collagène de type 1 et sur Matrigel par rapport à la laminine et à la fibronectine. Les résultats d'Ishii et al (Ishii et al., 2008) étaient en faveur d'une meilleure différenciation sur Matrigel par rapport au collagène de type I, avec l'absence de fixation des cellules sur la laminine. Le Matrigel est une préparation soluble de membrane basale extrait de sarcome de souris. Il contient des composants de la matrice extra-cellulaire comme la laminine, du collagène IV, des protéoglycanes d'héparane sulfate et de l'entactine/nidogène, mais également des facteurs de croissance comme les FGF, l'EGF, le TGF- β , l'IGF et l'activateur tissulaire du plasminogène. Il est probable que ces facteurs de croissance jouent un rôle non négligeable dans le processus de différenciation. Le Matrigel a été utilisé par plusieurs auteurs (Baharvand et al., 2008; Basma et al., 2009; Hay et al., 2008b; Roelandt et al., 2010; Si-Tayeb et al., 2010b; Zhao et al., 2009).

Afin d'éviter l'utilisation de produits d'origine animale, d'autres équipes ont développé des substances inertes pour la culture cellulaire, comme le poly-amino-uréthane (PAU) et le polytetrafluoroéthylène (PTFE) (Soto-Gutierrez et al., 2006) ou les plaques 2-methacryloylxyéthylphosphorylcholine (MPC) (Sasaki et al., 2009). Une autre approche a été de différencier les hES dans un environnement en trois dimensions, s'approchant plus des conditions *in vivo* en facilitant les interactions entre cellules et avec la matrice extra-cellulaire. Baharvand et al (Baharvand et al., 2006) ont comparé la différenciation sur collagène en 2 dimensions et en 3 dimensions, et ont démontré que l'expression d'albumine et de G6P ainsi que la production d'AFP et d'urée étaient plus importantes dans le milieu 3D. Maguire et al (Maguire et al., 2007) ont encapsulé des hES au sein de microbilles d'alginate, et ont démontré que la différenciation des hES peut être modulée par la densité des cellules au sein des agrégats et par la concentration d'alginate, via l'expression d'E-cadhérine. Farzaneh et al (Farzaneh et al., 2010) ont démontré une meilleure fonctionnalité des hES-Hep si elles étaient cultivées sur une surface nanofibrillaire, mimant la structure tridimensionnelle de la matrice extra-cellulaire. Miki et al (Miki et al., 2011) ont comparé la différenciation de hES en culture monocouche à la culture 3D dynamique sous perfusion au sein d'un bioréacteur. La culture

3D a induit une expression plus importante d'albumine, d'AAT et de G6P, ainsi que certains enzymes du cycle de l'urée, et a favorisé la formation d'agglomérats de hES-Hep albumine⁺ associée à des structures tubulaires primitives de cellules CK19+/CK7+ pouvant s'apparenter à des canalicules biliaires.

Un autre moyen de reconstituer les interactions cellulaires *in vivo* a été de différencier les hES en co-culture. Huang et al (Huang et al., 2010) ont différenciée les hES en présence de cellules fibroblast-like dérivées de hES, avec l'obtention de cellules au centre des colonies exprimant des marqueurs hépatiques. Les auteurs ont démontré que les cellules fibroblast-like exprimaient un certain nombre de facteurs de croissance impliqués dans la différenciation des hES *in vivo*, comme la BMP4, FGF2, activine A, EGF et VEGF. Shiraki et al (Shiraki et al., 2008) ont différencié des hES en co-culture avec la lignée cellulaire mésodermique M15, extraite de mésonéphros de souris. Les cellules ont pu être différenciées jusqu'à 60 jours, sous l'action d'activine A, LY294002, HGF, OSM et Dexaméthasone, avec 80% des cellules exprimant AFP à J20, et 9% des cellules exprimant l'albumine à J40. Pei et al (Pei, 2009) ont cultivé des hES issus de corps embryoïdes avec des cellules stromales de foie fœtal transfectés pour sécréter le FGF2 de façon stable. Yu et al (Yu et al., 2011) ont cultivé des cellules issues de corps embryoïdes différenciées en endoderme définitif sur des feeders de fibroblastes murins inactivés (lignée 3T3-J2). Les cellules pouvaient être cultivées jusqu'à 30 jours après différenciation, mais leur état de différenciation a été peu évalué. Zhao et al (Zhao et al., 2009) ont utilisé des feeders stromales embryonnaires de souris afin d'obtenir sous l'action de facteurs de croissance séquentiels des cellules hépatocytaires qui avaient une activité médiée par les CYP inducibles par le phénobarbital, produisaient de l'albumine et pouvaient capter le vert d'indocyanine et les LDL. Ces cellules pouvaient être maintenues jusqu'à 100 jours en culture. L'ensemble de ces résultats suggère que les systèmes de co-culture peuvent allonger la durée de culture hES-Hep. Cependant, les co-cultures nécessitent la mise en œuvre de techniques spécifiques afin de séparer les deux populations cellulaires avant analyse, et la possibilité de fusions cellulaires éventuelles peut perturber l'interprétation des résultats.

e) Optimisation du rendement des cultures

Du fait de la pluripotentialité intrinsèque des hES, les protocoles de différenciation des hES vers l'hépatocyte mènent très souvent à des populations cellulaires hétérogènes, associant cellules différenciées vers l'hépatocyte, cellules différenciées vers des phénotypes non hépatocytaires, et des cellules indifférenciées. Le rendement des protocoles de différenciation a généralement été évalué en étudiant le pourcentage de cellules exprimant des marqueurs hépatocytaires (par exemple, l'albumine) au cours de la différenciation ou en fin de différenciation, généralement par immunofluorescence ou cytométrie de flux après marquage. Les auteurs des premiers protocoles de différenciation à partir de corps embryoïdes n'ont pas publié de données concernant le rendement et la proportion de cellules exprimant des marqueurs hépatocytaires, mais en tenant compte du caractère moins contrôlé de la différenciation, on peut supposer que les rendements auraient été inférieurs à ceux des protocoles de différenciation en monocouche. En ce qui concerne ces protocoles, la proportion de hES-Hep exprimant l'albumine en fin de différenciation varie selon les auteurs: Baharvand et al (Baharvand et al., 2006) ont estimé que 17,9% des hES-Hep exprimaient l'albumine, alors que ce chiffre était de 55% pour Basma et al (Basma et al., 2009), 67,4% pour Agarwal et al (Agarwal et al., 2008), 72,8% pour Moore et al (Moore and Moghe, 2009), 80% pour Si-Tayeb et al (Si-Tayeb et al., 2010b) et 90% pour Hay et al (Hay et al., 2008a). Certains auteurs ont rapporté des rendements élevés à un stade intermédiaire de la différenciation: ainsi, à J8 70% des hES-Hep exprimaient l'albumine dans le protocole de Cai et al (Cai et al., 2007), alors que Duan et al (Duan et al., 2010) ont observé qu'après 9 jours culture sur collagène sous l'action d'activine A et de butyrate de sodium, 90% des hES-Hep exprimaient l'AAT et 93% exprimaient l'AFP.

Plusieurs auteurs ont essayé d'améliorer le rendement des protocoles de différenciation par des techniques de tri cellulaire. Lavon et al (Lavon et al., 2004) ont transfecté les cellules en cours de différenciation au sein de corps embryoïdes par un plasmide porteur du gène GFP sous le contrôle du promoteur albumine au 20^e jour de culture. Initialement, le rendement de ces cultures étaient peu élevé (6% des cellules étaient positives pour le GFP), mais ces cellules ont pu être isolées et cultivées en monocouche homogène (>95% de cellules exprimant le GFP). Duan et al (Duan et al., 2007) ont transfecté les hES en cours de différenciation vers J10-J14 par un lentivirus hépato-spécifique porteur de GFP sous le

contrôle du promoteur AAT. Les cellules GFP⁺ (en moyenne 11,2%) ont été isolées par microdissection laser et catapultage laser. Ishii et al (Ishii et al., 2008) ont transfecté des hES avant différenciation afin d'obtenir l'expression de GFP sous le contrôle d'AFP. Cette technique leur a permis de tester l'efficacité de différentes combinaisons de facteurs de croissance. Ainsi, le meilleur rendement était obtenu sous l'influence d'activine A pendant 4 jours suivi de HGF pendant 5 jours, avec 21,7% des cellules positives à la fin de cette phase de différenciation. Les analyses des fractions GFP⁻ et GFP⁺ ont révélé que les cellules GFP-exprimaient toujours les marqueurs de hES Nanog et Oct4, alors que l'expression d'albumine, de TO et de TAT était plus élevée dans la fraction GFP⁺. Touboul et al (Touboul et al., 2010) ont eu une approche similaire en réalisant une transfection des hES indifférenciées par un lentivirus porteur de GFP sous le contrôle du promoteur ApoAII (apolipoprotéine AII). Les hES-Hep exprimaient la GFP au 13^e jour de différenciation, et les auteurs ont trié les hES-Hep GFP⁺ avant transplantation des hES-Hep dans un modèle animal. Basma et al (Basma et al., 2009) ont trié les hES-Hep par un marqueur de surface, ASPGR (asialoglycoprotéine récepteur), exprimé par les hépatocytes. Ce marqueur était exprimé par 18 à 26% des hES-Hep, et les auteurs ont démontré que la sécrétion d'urée, d'albumine et d'AAT était plus importante chez les hES-Hep sélectionnées après tri. Cette méthode de tri utilisant un marqueur cellulaire de surface présente l'avantage d'éviter la transfection des cellules par un matériel génétique étranger. Malgré une majoration de l'expression de G6P, TAT et albumine dans la population des hES-Hep ASPGR⁺, l'expression de OCT4 et d'AFP était toujours présente dans cette population, ce qui met en évidence les limites de cette technique. Au total, les méthodes d'optimisation du rendement des protocoles de différenciation sont intéressantes, mais leur impact réel sur les rendements en fin de différenciation a été peu évalué à l'heure actuelle (peu de comparaisons entre les populations triées et non triées par exemple). Le tri cellulaire sur un seul marqueur ne suffit probablement pas à éliminer la totalité des cellules immatures. Il sera nécessaire de développer des techniques de tri sans transfection de matériel génétique étranger, qui comporte un risque d'oncogénèse insertionnelle.

f) Expression de marqueurs hépatiques

L'expression de marqueurs hépatiques (cf chapitre IV.1.b) en fin de différenciation a été étudiée systématiquement dans tous les protocoles de différenciation par reverse transcriptase

PCR (RT-PCR) au niveau transcriptionnelle (ARNm), et par immunofluorescence, immunocytochimie ou Western Blot au niveau protéique.

En ce qui concerne l'étude des ARNm, les premières études n'ont utilisé que la PCR semi-quantitative (Agarwal et al., 2008; Baharvand et al., 2006; Cai et al., 2007; Duan et al., 2007; Hay et al., 2008b; Hay et al., 2007; Ishii et al., 2008; Soderdahl et al., 2007; Touboul et al., 2010; Zhou et al., 2007), avec dans certains cas un nombre de cycles élevé (>35) (Cai et al., 2007; Duan et al., 2010; Zhao et al., 2009), ce qui peut mettre en question le caractère significatif des signaux détectés. De plus, certains auteurs ont comparé l'expression génique des hES-Hep à des modèles cellulaires peu pertinents pour l'évaluation du degré de différenciation hépatocytaire, comme les HepG2 (Agarwal et al., 2008; Duan et al., 2007), ou les hES non différenciées (Baharvand et al., 2008; Chen et al., 2006; Schwartz et al., 2005). L'évaluation de l'expression protéique par rapport au modèle de référence, les hépatocytes humains en culture primaire, était donc difficile, voire impossible à évaluer. Des études ultérieures utilisant la qRT-PCR ont permis de comparer directement les hES-Hep aux HHCP. Les taux d'expression sont très variables selon les auteurs : Brolen et al (Brolen et al., 2010) rapportent un taux d'expression d'albumine de leurs hES-Hep de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-5} fois celle des HHCP, alors que ce taux est de 70% pour Basma et al (Basma et al., 2009) et 75% pour Duan et al (Duan et al., 2010). De même, le taux d'expression de CYP3A4 a été évalué à 10^{-3} celle des HHCP par Shiraki et al (Shiraki et al., 2008), et jusqu'à 50% des HHCP pour Basma et al (Basma et al., 2009) et Inamura et al (Inamura et al., 2011). Il faut noter que CYP3A7, la forme fœtale de CYP3A4, présente une grande homologie de séquence avec ce dernier, alors que l'étude de Basma et al (Basma et al., 2009) n'a pas fait d'analyse de l'expression de CYP3A7. Il existe donc une incertitude quant à la capacité des primers PCR utilisés dans cette étude à distinguer entre CYP3A7 et CYP3A4, la séquence du primer CYP3A4 n'ayant pas été précisée dans l'article.

Au lieu de caractériser leurs hES-Hep par les marqueurs conventionnels, Si-Tayeb et al (Si-Tayeb et al., 2010b) ont étudié l'expression d'un panel de 40 gènes hépato-spécifiques, identifiés par des études génomiques de profils d'expression. Ce panel de gènes inclut entre autres des apolipoprotéines et certains cytochromes (CYP2E1, CYP3A), et leur expression dans les hES-Hep a été comparée aux HHCP par des techniques de puce ADN. Cette technique a l'avantage d'analyser l'expression d'un grand nombre de gènes simultanément. Une étude ultérieure utilisant ce même protocole de différenciation a révélé que 92% des

ARNm présents dans les hépatocytes adultes et 93% des ARNm présents dans les hépatocytes fœtaux étaient détectables dans les hES-Hep (DeLaForest et al., 2011). Cependant, les hES-Hep exprimaient également un groupe d'ARNm ectopiques, non retrouvés dans les hépatocytes adultes ou fœtaux. La présence de ces ARNm est peut être le reflet d'une différenciation incomplète.

L'expression d'un ARNm ne se traduit pas toujours par une production protéique. Ainsi, Hay et al (Hay et al., 2008b) ont démontré que la protéine OCT4 n'est plus exprimé à J2 de différenciation, alors que l'ARNm reste détectable jusqu'à J11. De même, l'ARNm de l'albumine a été détecté à J11, mais l'expression protéique n'a été retrouvée qu'à J15. L'étude de l'expression protéique reste donc fondamentale pour confirmer l'état de différenciation des hES-Hep. Les marqueurs les plus souvent étudiés étaient l'albumine, l'AFP, l'AAT et les cytokératines 8, 18 et 19.

Globalement, les taux d'expression des marqueurs hépatiques des hES-Hep restent pour la plupart inférieurs à ceux des HHCP, ce qui indique une maturation incomplète des hES-Hep à l'heure actuelle. L'interprétation des niveaux d'expression évalués par PCR peut être perturbée par l'hétérogénéité des cultures, puisqu'une expression forte d'un marqueur par une sous population de cellules peut être « diluée » par l'absence d'expression de ce marqueur au sein d'autres sous populations de cellules. Il est également possible qu'un ensemble de marqueurs qu'on attribuait à une population cellulaire donnée résulte de l'expression séparée de chaque marqueur par des sous populations cellulaires différentes. La preuve idéale de génération d'hépatocytes matures serait donc de démontrer la co-expression de multiples gènes et/ou protéines caractéristiques d'un hépatocyte mature au sein d'une même cellule.

g) Fonctionnalité in vitro

La quasi totalité des auteurs ont estimé la capacité des hES-Hep à capter et à excréter le vert d'indocyanine, et à stocker le glycogène, propriétés qui ne sont cependant pas hépatospécifiques. La production d'urée et d'albumine, sécrétées par les hES-Hep dans le milieu de culture, ont été également étudiées de façon courante, mais peu d'auteurs ont comparée cette production à celle des HHCP. Basma et al (Basma et al., 2009) ont rapporté une production d'urée par les hES-Hep équivalente à 65% de celle des HHCP, alors que ce chiffre était à 75% pour l'albumine. La sécrétion d'autres protéines d'origine hépatocytaire par

les hES-Hep a été mise en évidence, comme l'AFP (Baharvand et al., 2008), le fibrinogène, la fibronectine, l' $\alpha 2$ macroglobuline (Hay et al., 2008b), l'haptoglobine, la pré-albumine (Hay et al., 2008a), le facteur VII, et l'AAT (Basma et al., 2009).

Le métabolisme des xénobiotiques et l'activité des cytochromes P450 ont été évalués en étudiant la métabolisation de divers substances connues en tant que substrats : pour les CYP3A, la testostérone (Basma et al., 2009; Hay et al., 2007), la pentoxyrésorufine-O-dééthylase (PROD assay) (Cai et al., 2007; Schwartz et al., 2005; Zhao et al., 2009), le midazolam (Brolen et al., 2010; Hay et al., 2008b) ; pour les CYP2, la tolbutamide (Hay et al., 2008b), le diclophénac (Brolen et al., 2010) ; pour les CYP1A, l'éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD assay) (Basma et al., 2009; Duan et al., 2007), la phénacétine (Brolen et al., 2010). L'inductibilité de l'activité CYP3A par le phénobarbital (Cai et al., 2007; Roelandt et al., 2010; Zhao et al., 2009) ou la rifampicine (Hay et al., 2008b; Hay et al., 2007; Inamura et al., 2011) a été démontré. Cependant, cette activité ne peut pas être imputée de façon certaine à la présence de CYP3A4, devant la possibilité de présence d'isoformes immatures comme le CYP3A7. Très peu d'études ont comparé directement l'activité des CYP des hES-Hep à celle des HHCP, mais cette activité est certainement faible par rapport aux hépatocytes adultes : Ek et al (Ek et al., 2007) retrouvent une activité CYP3A4 10^{-5} à 10^{-6} celle des HHCP, Roelandt et al (Roelandt et al., 2010) ont rapporté une activité CYP3A équivalente à 2,8% de celle des HHCP, alors que Hay et al (Hay et al., 2008b) trouvent une activité CYP1A2 à 24% de celle des HHCP. Seul Duan et al (Duan et al., 2010) ont retrouvé un taux de métabolisation de substrats de CYP1A2, CYP3A4 et CYP2D6 comparable ou légèrement inférieur aux taux des HHCP (de l'ordre de 70% environ). Par contre, les hES-Hep sont capables d'avoir une activité glutathione-S-transférase à des niveaux comparables à ceux de l'hépatocyte adulte, de l'ordre de 50% à 100% selon les lignées de hES utilisées pour Söderdahl et al (Soderdahl et al., 2007), et 80% pour Roelandt et al (Roelandt et al., 2010). Enfin, Duan et al (Duan et al., 2010) ont réalisé une analyse poussée des activités métaboliques des hES différenciées par des techniques de spectrométrie de masse (multiple reaction monitoring) et chromatographie en phase liquide (liquid chromatography retention time). Ils ont ainsi pu démontrer que les hES-Hep étaient capable d'assurer un certain nombre de réactions de métabolisation des xénobiotiques, comme l'oxydation, la déhydrogénation, la formation de cétones et la méthylation (réactions de phase 1), ainsi que la glucuronidation, et la conjugaison avec la glucose ou le glutathion (réactions de phase 2). Les taux de ces réactions seraient de 10 à 1000 fois moindre que dans les HHCP. Il faut cependant noter que plusieurs études mettant en

évidence une activité CYP450 (Basma et al., 2009; Brolen et al., 2010; Cai et al., 2007; Hay et al., 2008a; Roelandt et al., 2010; Zhao et al., 2009) n'ont pas recherché l'expression des récepteurs nucléaires impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques (CAR, PXR, AhR . .). Il n'est donc pas possible de savoir si les différents acteurs impliqués dans l'induction de l'activité CYP450 à l'état physiologique *in vivo* sont effectivement présents dans ces Hep-ES.

Mise à part les études de métabolisme, Cai et al (Cai et al., 2007) ont démontré que leurs hES-Hep à J8 et à J18 étaient permissifs à l'infection par les virus pseudotype VIH-VHC (incorporation de glycoprotéines de VHC dans des particules nucléaires dérivés du VIH). Les taux d'infection étaient comparables aux Huh-7 (lignée cellulaire dérivée de hépatome), et l'infection pouvait être neutralisée par l'anticorps anti-CD81. Au vu de la permissivité des hES en cours de différenciation intermédiaire (J8), les auteurs ont suggéré que les progéniteurs hépatiques pourraient être des cibles du VHC *in vivo*.

Au total, la capacité des hES-Hep de sécréter des protéines hépatocytaires et de métaboliser des cytochromes P450 n'est plus à démontrer, mais le peu d'études comparant ces activités aux HHCP montrent que les hES-Hep n'ont pas encore atteint le niveau d'activité de synthèse protéique et de métabolisation des hépatocytes matures. Les résultats de Duan et al (Duan et al., 2010) concernant l'activité des cytochromes sont prometteurs mais leur reproductibilité reste à être démontrée. Les hES-Hep pourraient éventuellement avoir des applications dans l'étude de substances antivirales, mais seule une équipe à l'heure actuelle (Cai et al., 2007) a réussi à infecter des hES-Hep par des virus pseudotype VIH-VHC *in vitro*.

h) Fonctionnalité in vivo

Les hES-Hep sont capables de s'implanter dans le foie après injection dans la rate, le parenchyme hépatique ou la veine porte chez des souris immunodéprimées (NOD (non obese diabetic)-SCID ou Alb-uPA (albumin-urokinase-type plasminogen activator)) ayant eu un traitement induisant une insuffisance hépatocellulaire (CCl4 (Agarwal et al., 2008; Cai et al., 2007; Payne et al., 2011), hépatectomie partielle (Basma et al., 2009), sans (Duan et al., 2007; Hay et al., 2008a; Payne et al., 2011) ou avec inhibition de la prolifération des hépatocytes natifs (rétrorsine (Agarwal et al., 2008; Basma et al., 2009), expression forcée du gène urokinase (Basma et al., 2009; Touboul et al., 2010)). Ceci a été démontré par des études utilisant des cellules marquées à la luciférase (Basma et al., 2009; Duan et al., 2007), mais

également par des marquages immunocytochimiques après dissection des foies de souris transplantées, qui mettent en évidence des cellules exprimant des marqueurs humains (AAT (Agarwal et al., 2008; Cai et al., 2007; Duan et al., 2007; Touboul et al., 2010)), albumine (Duan et al., 2007; Hay et al., 2008a; Touboul et al., 2010), CK 18 (Basma et al., 2009), transferrine, CYP1B1 (Duan et al., 2007)), jusqu'à 2 mois post-transplantation ((Cai et al., 2007)). La sécrétion de protéines humaines à des taux faibles a également été détectée dans le serum des souris transplantées, comme l'albumine ((Basma et al., 2009; Duan et al., 2007; Hay et al., 2008a; Payne et al., 2011; Touboul et al., 2010)) ou l'AAT (Touboul et al., 2010)). Basma et al (Basma et al., 2009) ont démontré la fonctionnalité des hES-Hep après transplantation dans 3 modèles animaux différents d'insuffisance hépatique (souris NOD-SCID ayant subi une hépatectomie partielle et traitement par rétrovirus, souris uPA-SCID, rat Nagase analbuminique). A 75 jours post-transplantation, les taux d'albumine et d'AAT dans le sérum des souris transplantés par des hES-Hep étaient de 1000-2000 ng/ml, alors les taux d'albumine sérique chez les animaux contrôles transplantés avec des HHCP variaient de 1000 ng/ml à plus de 1 mg/ml. Cependant, les taux d'intégration rapportés sont généralement très faibles (<1% pour Agarwal et al (Agarwal et al., 2008), survie estimée à 0,05% pour Cai et al (Cai et al., 2007)) et la capacité de prolifération de ces cellules au sein du parenchyme hépatique reste inconnue. Deux équipes ont rapporté l'apparition de tératomes (Basma et al., 2009) ou de tumeurs (adénocarcinome du péritoine chez le rat (Basma et al., 2009), tumeurs myxoïdes (Payne et al., 2011)) dans les semaines suivant la transplantation des hES-Hep, conséquence de la pluripotentialité et l'état insuffisamment différencié des cellules. Il faut noter que les hES-Hep transplantées par Payne et al (Payne et al., 2011) ont subi un protocole de différenciation relativement court avant transplantation (10 jours), alors que Basma et al (Basma et al., 2009) ne retrouvent plus de tératomes si les hES-Hep transplantées sont triées par le marqueur membranaire ASPGR avant transplantation. L'amélioration des résultats après tri cellulaire et après une période de différenciation prolongée a été confirmée par Touboul et al (Touboul et al., 2010), qui rapportent une absence de tératomes après injection de hES-Hep différenciées pendant 21 jours et triées après transfection par un lentivirus exprimant GFP sous le contrôle du promoteur Apo-AII. Ces études démontrent la faisabilité de la transplantation cellulaire *in vivo* des hES-Hep, mais ces techniques sont limitées par le faible rendement et le risque d'apparition de tumeurs. L'étude de la fonctionnalité des hES-Hep transplantées étant assez limitée, il est difficile de savoir si l'environnement *in vivo* des cellules a participé à la poursuite de la maturation.

Au total, sous l'effet de facteurs de croissance, de facteurs solubles et d'un microenvironnement reproduisant certains éléments de la matrice extra-cellulaire, les hES sont capables de se différencier vers un phénotype hépatocytaire. Les études récentes ont permis de comparer le niveau d'expression de marqueurs hépatocytaires et la fonctionnalité des cellules obtenues avec les hépatocytes adultes de façon plus précise. Il en ressort que ces hES-Hep ne sont pas encore l'équivalent d'hépatocytes adultes, mais plutôt à un stade immature équivalent d'un hépatocyte fœtal. On note également une variabilité du phénotype obtenu en fin de maturation selon les auteurs, qui pourrait être liée aux conditions de culture mais également à la lignée hES utilisée, ce qui est suggéré par certaines études qui ont trouvé des différences d'expression de CYP450 (Ek et al., 2007) ou d'activité GST (Soderdahl et al., 2007) entre des hES-Hep issues de lignées différentes. Peu de données existent quant à la possibilité de maintenir des cultures de hES-Hep à long terme, mais il semblerait que ces cellules ont tendance à perdre leur phénotype hépatique si la durée de culture est prolongée, tout comme les HHCP (Hay et al., 2007). Les études à l'avenir doivent se tourner vers l'optimisation du rendement des protocoles de différenciation ainsi que l'amélioration des dernières étapes de la maturation.

Référence	Conditions de culture	Facteurs de croissance et autres	Isolément/tri	Durée de différenciation/culture	Marqueurs	Fonctionnalité	Tests in vivo	Remarques
Schuldiner 2000	CE J0-J5, puis monocouche à partir de J5, 20%KOSR	J5-15: NGF 100ng/ml, HGF 20ng/ml		15 jours de culture dont 10 jours de différenciation	RT-PCR : alb (NGF uniquement), AAT, AFP			
Rambhatla 2003	CE J0-4 20% sérum Matrigel	J0-15 : CE, Butyrate de Na 5 mM, DMSO 1% J15-19 : butyrate de Na, HGF 2,5 ng/ml		19 jours	alb, AAT, CK8, CK18	Stockage glycogène, activité CYP450 inducible		Utilisation de butyrate de sodium et DMSO, facteurs modifiant la chromatine.
Shirahashi 2004	CE sur collagène 1	J0-6 : CE J6-43 : HGF 20ng/ml, NGF 100ng/ml, EGF 100 ng/ml, FGF1 et FGF2 100ng/ml, acide rétinoïque, 1µM, OSM 10ng/ml, insuline, Dex 100nM		Jusqu'à 43 jours	qRT-PCR : alb, AAT IF : alb WB : alb	Production alb (niveau de l'ordre de 1% de celui des HHCP), urée		Différenciation de ES humaines et de souris.
Lavon 2004	CE J0-20 Milieu conditionné par hépatocytes adultes	J20-30: FGF1 100ng/ml, FGF2 5ng/ml, BMP4 50 ng/ml, HGF20 ng/ml	transfection eGFP (plasmide) fusionné avec séquence promoteur albumine	20 jours puis 2 semaines	RT-PCR : AFP, ApoA4, ApoB, ApoH, Fg			Seul FGF1 induit les cellules ALB-eGFP.
Schwartz 2005	CE J0-J7 puis collagène de type 1 de J7-J21 Sans sérum	J7-21 : FGF4, HGF, OSM		21 jours	RT-PCR : HNF3β, GATA4, HNF1, alb, AFP, CK18, ASPGR1, CYP1A1, 1A2, 2B6, 3A4 ICC : CK18, HNF1 WB : CK18, alb, ASPGR1	Production d'urée, alb, capture LDL, activité CYP450 inducible par phénobarbital		Meilleur différenciation avec collagène et matrigel par rapport à la fibronectine, la laminine ou absence de matrice extra-cellulaire, et avec HGF et FGF4 par rapport à FGF2 et butyrate de sodium.
Chen 2006	Matrigel	J0-5 :activine 50ng/ml J5-12 : dHGF (variant délété de HGF) 100 ou 500ng/ml		12 jours	qRT-PCR : SOX17, FOXA2, alb, AFP, CK18	Stockage glycogène , métabolisation lidocaïne, ammoniacque		Meilleurs résultats avec 500 ng/ml de dHGF qu'avec 100 ng/ml.
Baharvand 2006	CE ds culture collagène 3D et 2D	J9-12: FGF1 100ng/ml J12-20: HGF 20ng/ml J15-20: OSM 10ng/ml, ITS, Dex 100 nM			RT-PCR : Alb, CK18, CK9, CK19, CYP7A1, AFP, HNF3β, AAT, TTR, TDO, TAT, G6P	Stockage glycogène, production d'urée, d'alb, d'AFP, capture ICG		Meilleure différenciation en 3D par rapport à 2D.

Référence	Conditions de culture	Facteurs de croissance et autres	Isolément/ tri	Durée de différenciation/ culture	Marqueurs	Fonctionnalité	Tests in vivo	Remarques
Soto-Gutierrez 2006	CE J0-J5 Puis culture sur poly-amino-urethane (PAU) coated non woven PTFE (polytetrafluoroethylene) fabric	J0-3: FGF2 100ng/ml J3-11: dHGF 100ng/ml, DMSO 1% J11-14: Dex 100nM		14 jours	RT-PCR: alb	Stockage glycogène, production d'albumine, durée, métabolisation ammoniacque et lidocaïne		La membrane PTFE couvert de PAU permet une culture en 3D
Cai 2007	Sans sérum	J0-3 : activeine 100ng/ml J3-8 : FGF4 30ng/ml, BMP2 20ng/ml J13-18: OSM 10ng/ml, Dex 100nM		18 jours	RT-PCR: AFP, alb, CK8, CK18, G6P, HNF4α, PEPCK, TO, TAT, CYP7A1, CYP2B6, CYP3A4 qRT-PCR: alb IF: SOX17, FoxA2, AFP, Alb, CK8, CK18, AAT 70% des hES-Hep alb ⁺ à J8	Stockage glycogène, production albumine, capture ICG, LDL, hES-Hep permmissibles à l'infection par VIH, VHC , PROD assay avec phénobarbital montrant up-régulation CYP2B6	TC dans la rate de souris SCID traitées par CCl ₄ , détection de l'expression d'AAT 2 mois après TC	La nécessité d'associer BMP et FGF a été démontré. Le seul protocole démontrant une permmissivité des hES-Hep à l'infection par le VIH et le VHC.
Hay 2007	Culture des hES sans feeder	J0-3 : FGF2 J4-11 : DMSO J11-20 : HGF 2,5 ou 10ng/ml J20-24 : HGF 10ng/ml, OSM 10ng/ml		23-24 jours, puis une semaine de culture	RT-PCR: AFP, TTR, HNF4α, AAT, alb, TO, C/EBPα, IF: AFP, HNF4α, alb, Hepar1 WB: SOX17, SOX7, c-met, E-cadhérine	Stockage glycogène, capture ICG, production d'albumine et d'AFP, induction d'activité CYP3A4 (métabolisation testotérone) par rifampicine		De plus fortes concentrations d'HGF induisent une meilleure différenciation. On ne peut pas exclure la possibilité que CYP3A7 soit à l'origine de l'activité métabolique. Les cellules ont perdu leur phénotype 5 à 7 jours après la fin de la différenciation.
Söderdahl 2007	Culture sur feeder de fibroblastes de souris, milieu sans sérum	J0-J18 à 30 : FGF2 4ng/ml A partir de J18-22 : rajout rifampicine, desoxyphénobarbital , Dex, oméprazole, isoniazide		18 à 30 jours	ICC : AAT, alb, Foxa2, AFP, CK18, LFABP, GST WB : GSTA1-1, GSTM1-1, GSTP1-1	Activité glutathione transférase, de l'ordre de 50-100% de celle des HHCP		

Référence	Conditions de culture	Facteurs de croissance et autres	Isolément/tri	Durée de différenciation/culture	Marqueurs	Fonctionnalité	Tests in vivo	Remarques
Ek 2007	Culture sur feeder de fibroblastes de souris, milieu sans sérum	J0-J18 à 30 : FGF2 4ng/ml		18 à 30 jours	qRT-PCR : nombreux CYP450, UGTs , transporteurs, CAR, PXR, RXR, HNF1,3,4,6, C/EBPs, alb, G6P, ApoE, CYP7A1, ADH1A WB : CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2D6, 2E1, 3A4/7 Comparaison avec HHCP et HepG2	Pas de détection d'activité CYP1A ou CYP3A4		
Maguire 2007	Culture 3D par encapsulation des cellules dans des billes d'alginate			23 jours	Puce à ADN : nombreux CYP450, CYP7A1, CK18, Cadhérine 7, Connexines 26 et 32, E-cadhérine, E-sélectine	Stockage de glycogène, production d'albumine et d'urée		L'agrégation influence la différenciation des hES via l'E-Cadhérine.
Zhou 2007	CE, culture sur gélatine	Pendant 9 jours, culture avec des diverses associations de FGF1 10ng/ml, FGF2 10ng/ml, BMP4 10ng/ml, puis HGF 10 ng/ml, OSM 10 ng/ml, Dex 100nM et ITS		9 à 18 jours	RT-PCR : alb, AFP, HNF3β, G6P, TAT IF : alb	Stockage glycogène, capture ICG		Pas de différence entre FGF1 et FGF2 pour la différenciation, l'effet positif de BMP4 sur la différenciation est plus important que l'effet de FGF.
Duan 2007	CE, culture sur collagène	Dexaméthasone 100nM	Enrichissement en cellules transduites à J10-14 par un lentivirus exprimant GFP sous contrôle du promoteur AAT (11,2% des hES-Hep GFP ⁺)	28 jours de différenciation, jusqu'à 52 jours de culture	qRT-PCR : AAT (50,25% HHCP), alb (29,75% HHCP), transferrine, TAT RT-PCR : CYP2B6, 2E1, 3A4, 1A1, G6P, HNF3β, HNF4, CEBPα-β, BMP2 et 4, GATA4	Stockage glycogène, capture ICG, production d'albumine, induction de l'activité CYP1A2	TC chez souris NOD SCID à J14, production albumine humaine détectée dans sérum 1 à 3 semaines post TC, présence de hES-Hep dans le foie à 3 semaines	Première étude ayant transplanté les hES-Hep chez la souris.

Référence	Conditions de culture	Facteurs de croissance et autres	Isolement /tri	Durée de différenciation/ culture	Marqueurs	Fonctionnalité	Tests in vivo	Remarques
Baharvand 2008	Matrigel Milieu sans sérum	J0-5 : FGF2 40ng/ml, Noggin 100ng/ml J5 -12: FGF1 100ng/ml, FGF4 10ng/ml J12-19: HGF 20ng/ml, FGF4 J19-33: HGF, Dex 100nM, OSM 10ng/ml, ITS		28 jours	RT-PCR: HNF3β, HNF4β, CEBPα-β, CK19, CK8, CK18, TTR, AFP, ApoB, AAT, alb, TO, TAT, G6P, CYP7A1 IF: CK18 (45,7% des hES-Hep), alb (17,9%), HepPar1	Stockage glycogène, capture LDL, ICG, secretion d'alb, AFP, urée		
Hay 2008b	Matrigel Milieu sans serum	J0-3 à5: butyrate de sodium, activine 100ng/ml J5-12 : DMSO 1% J12-19 : HGF 10ng/ml, OSM 20ng/ml, insuline, hydrocortisone 10μM		19-20 jours, maintien en culture 5 jours après différenciation, puis perte progressive du phénotype	RT-PCR: OCT4, Brachyury, GSC, SOX17, FoxA2, CXCR4, HNF1α-1β-4α-6, AFP, Alb, TAT, TTR, TO, CAR, ApoF, CK7,18,19, CYP3A4, 3A7, 2C9, 2C19, PXR WB: OCT4, FoxA2, HNF4α, AFP, alb, AAT, c-met, E-cadherine, CYP3A, 2D6 ICC: alb (70% des hES-Hep), AFP, CK18, CK19, HepPar1, Brachyury, FoxA2, HNF4α Comparaison avec HHCP et FF	Stockage glycogène, production fibrinogène, fibronectine, α2macroglobuline, métabolisation midazolam (CYP3A4), tolbutamide (CYP2C9), bufuralol (CYP2D6)		Etude temps dependant des marqueurs de l'endoderme définitif et de la strie primitive.
Agarwal 2008	Collagène 1 à partir de J5	J0-5 : activine A 100ng/ml J5-11 : FGF4 10ng/ml, HGF 10ng/ml J11-20: FGF4, HGF, OSM 10ng/ml, Dex 100nM		20 jours	RT-PCR: AFP, Alb, AAT, CYP3A4, 7A1, Comparaison avec HepG2 IF: OCT4, SOX17, FoxA2, GATA4, SOX7, HNF4α, CD26, alb (67,4% des hES-Hep), AFP (82,7%), AAT (84,7%) WB: OCT4, SOX17, FoxA2, GATA4, AFP	Stockage glycogène, capture ICG, production d'albumine	TC chez des souris NOD-SCID traitées par CCI4, à 4 semaines post TC détection de hES-Hep dans le foie, taux d'intégration faible <1%	
Hay 2008a	Matrigel Milieu sans serum jusqu'à J10-12	J0-3 à5: butyrate de sodium ou Wnt3a 50ng/ml, activine 100ng/ml J5-12 : DMSO 1% J12-19 : HGF 10ng/ml, OSM 20ng/ml, insuline, hydrocortisone 10μM		18 jours	RT-PCR: alb, AFP, HNF4α, TAT, TO, ApoF, CYP3A4, 7A1, OCT4 qPCR : Brachyury, SOX17, HNF3β IF: alb (90% des hES-Hep à J17 avec Wnt3a), Brachyury	Production urée, AFP, alb, fibrinogène, fibronectine, préalb, haptoglobine, activité CYP1A2 (EROD assay), 24% de celle des HHCP	TC chez souris NOD SCID, injection intra-splénique, détection hES-Hep dans la rate 3 jours post TC, détection alb humaine dans le sérum des souris	Meilleur rendement et différenciation accélérée sous l'effet de Wnt (accélération passage de la strie primitive).

Référence	Conditions de culture	Facteurs de croissance et autres	Isolément/tri	Durée de différenciation/culture	Marqueurs	Fonctionnalité	Tests in vivo	Remarques
Ishii 2008	1 ^{er} méthode : CE puis culture sur gélatine 7 jours 2 ^e méthode : culture sur collagène, Matrigel ou laminine	Différentes combinaisons d'activine 100ng/ml, HGF 20ng/ml, BMP4 20ng/ml, FGF4 20ng/ml, acide rétinolique 10μM	Tranduction des hES par un vecteur exprimant GFP sous le contrôle du promoteur AFP, mais pas de culture après tri	14 jours	RT-PCR : OCT3-4, NANOG, AFP, TAT, TO, GSC, GATA4, alb, Brachyury IF : SOX17, AFP, E-cadhérine, alb Comparaison avec HHCP			Absence d'attachement cellulaire lors de culture sur laminine, meilleure culture sur Matrigel. L'acide rétinolique inhibe la différenciation. Meilleurs résultats avec activine pendant 4 jours puis HGF pendant 5 jours.
Shiraki 2008	Co-culture avec des cellules dérivées de mésonéphros de souris	J0-4 : activine A 20ng/ml, LY294002 10μM, FGF2 À partir de J10 : HGF 10ng/ml, Dex 1μM, OSM		60 jours	qRT-PCR : AFP, Shh, AFP, alb (niveau d'expression 10 ⁻⁶ celle des HHCP), CK7, CK9, CYP7A1, 2B10, 3A11, 3A13, ST2A1, UGT1A1, SLCO1A4, ABCB11 CF : CXCR4, E-cadhérine IF : AFP 80% des hES-Hep à J20, alb, CYP3A, 7A1 Comparaison avec HHCP et FF	Stockage glycogène, production albumine, activité CYP3A4 (P450-Glo CYP3A4 assay)		Culture des hES-Hep sur une longue durée.
Zhao 2009	A partir de J8, co-culture avec feeders stromaux d'embryons de souris	J0-3 : activine 100ng/ml, ITS J3-8 : FGF4 30ng/ml, BMP2 20ng/ml J13-18: OSM 10ng/ml, Dex 100nM	Tri par N-cadhérine à J8 (61% des cellules positives)	18 jours de différenciation, maintien en culture jusqu'à 100 jours	qRT-PCR : AFP, alb, HNF4α, C/EBPα, N-cadhérine RT-PCR : AFP, CK8, CK18, alb, AAT, TAT, CYP2B6, 3A7, PEPCCK, CK7, OCT3-4, NANOG IF : AFP, HNF4α, N-cadhérine, alb, FoxA2, AAT, CK7	Stockage glycogène, production albumine, capture LDL, ICG, activité CYP450 inductible (PROD assay)		A partir d'une population de progéniteurs à J8, différenciation également vers un phénotype biliaire.
Pei 2009	CE J0-2 Puis co-culture avec cellules stromales humaines fœtales transfectées pour sécréter FGF2	J0-2 : CE J2-5 : activine 100ng/ml J5-10 : co-culture J10-16 : HGF 20ng/ml, OSM 10ng/ml, Dex 100nM			RT-PCR : SOX17, AFP, FGF2, alb, CK18, CYP1B1 IF : SOX17, alb, AFP	Stockage glycogène, capture ICG, production alb		

Référence	Conditions de culture	Facteurs de croissance et autres	Isolement /tri	Durée de différenciation/culture	Marqueurs	Fonctionnalité	Tests in vivo	Remarques
Basma 2009	CE ou non Matrigel Milieu avec ou sans sérum	J0-3 : activine A 100 ng/ml, FGF2 100ng/ml J3-11 : DMSO 1%, HGF 100ng/ml J11-14: Dex 100nM	Tri par ASPGR (18-26% des hES-Hep ASPGR ⁺ après différenciation)	14 jours	qRT-PCR : OCT3-4, NANOG, AFP, ASPGR1, G6P, alb, TAT, cyclophiline RT-PCR : OCT3-4, NANOG, SOX17, alb (70% du niveau des HHCP), AFP, facteur VII, ASPGR IF : alb (exprimé par 55% des hES-Hep), AFP WB : facteur VII Comparaison avec HHCP	Stockage glycogène, production alb (75% du niveau des HHCP), facteur VII, AAT, urée, activité CYP1A inducible (EROD assay), CYP3A (métabolisation testostérone)	TC dans la rate de souris NOD SCID et uPA, et rat immunodéprimé FK506, hépatectomisés et rétrotrans, détection ASPGR ⁺ , pas de tumeurs chez la souris post TC mais adénocarcinome du péritoine chez le rat.	Si absence de tri par ASPGR, apparition de tératomes dans le foie, la rate et le péritoine. Après tri des hES-Hep ASPGR ⁺ , pas de tumeurs chez la souris post TC mais adénocarcinome du péritoine chez le rat.
Sasaki 2009	CE cultivés sur matériel synthétique (plaque MPC)	J0-3 : FGF1 25ng/ml, FGF2 25ng/ml J3-6 : HGF 20ng/ml, BMP4 20ng/ml J6-9 : OSM 20ng/ml, VEGF 20ng/ml		9 jours de différenciation puis 2 semaines de culture	RT-PCR : FoxA2, nestine, brachyury, également HEX, G6P, TAT, alb mais résultats non montrés	Capture ICG		
Moore 2009	Culture sur feeders de fibroblastes embryonnaires de souris	J0-4 : activine A 50ng/ml et/ou Wnt3a 100ng/ml J4-14 : HGF20ng/ml, OSM 10ng/ml, Dex, Wnt3a 100ng/ml		28 jours	qRT-PCR : FoxA2, AAT, TTR, HNF4, CK18, alb, AFP IF : AFP CF : alb (à J28, 72,8% hES-Hep alb ⁺), CK18	Capture ICG, production d'albumine, activité CYP1A (EROD assay)		Le prétraitement par activine de J0-J4 améliore la différenciation, pas d'effet si rajout de Wnt3a à ce stade.
Brolén 2010	Culture sur feeder de fibroblastes de souris, milieu sans sérum	J0-5 : activine A 100ng/ml, FGF2 4ng/ml ou Wnt3a 50ng/ml J6-17 : BMP2 50ng/ml ou BMP4 100ng/ml, FGF1/2/4 J18-45: Dex 100nM, OSM 10ng/ml, HGF 20ng/ml, EGF, ITS, hydrocortisone, acide ascorbique		18 à 45 jours	qRT-PCR : HNF3β, SOX17, CXCR4, AAT, AFP, alb (10 ⁻⁴ fois l'expression de HHCP), HNF4α, CYP1A2, CYP3A4, LFABP IF : SOX7, SOX17, EpCAM, CK19, CYP1A, CYP3A, MRP2, CK18 ICC : AAT, AFP, CK8-18-19, CD54, EpCAM, FABP1, HNF1α-4α-3β WB : alb, AFP, AAT, MRP2, OATP2, CYP3A Comparaison avec HHCP/HepG2	Stockage glycogène, capture ICG, production urée, alb, métabolisation phénacétine (CYP1A), diclophénac (CYP2C), midazolam (CYP3A)		

Référence	Conditions de culture	Facteurs de croissance et autres	Isolément/ tri	Durée de différenciation/ culture	Marqueurs	Fonctionnalité	Tests in vivo	Remarques
Touboul 2010	Sur plaques recouvertes de fibronectine ou sérum de veau foetal	J0-2 : activine 10ng/ml, FGF2 12ng/ml J2-5 : activine 100ng/ml, BMP4 10ng/ml, FGF2 20ng/ml, LY294002 1µM J5-8: FGF10 50ng/ml J8-10: FGF10 50ng/ml, acide rétinolique 0.1µM, SB431542 1µM J10-18 : FGF4 30ng/ml, HGF 50 ng/ml, EGF50 ng/ml	Transduction des hES indifférenciées avec un vecteur exprimant GFP sous le contrôle du promoteur ApoAII, expression GFP dès J13, pas de tri	21 jours	qRT-PCR : OCT4, NANOG, Brachyury, MIXL1, GSC, SOX2, SOX7, SOX17 RT-PCR : HNF4α-6, CEPBα, AFP, alb, AAT, TO, TAT, ApoAII, facteur IX, CYP3A7, 7A1, comparaison HHCP /FF IF : SOX17, FoxA2, GATA4, N-cadherine, CXCR4, OCT4, HNF4α, AFP, CK19, EpCAM CF : ASPGR, c-met, LDL, αGintégrine (35% des hES-Hep exprimant ces marqueurs)	Stockage glycogène, capture LDL, ICG, production albumine, activité CYP3A7	TC dans foie de souris uPA, détection d'alb et AAT dans sérum des souris pendant 8 semaines post TC, présence hES-Hep dans foie à 8 semaines post TC	Utilisation d'un inhibiteur de PI3kinase (LY294002) et d'un inhibiteur du récepteur activine/nodal (SB431542). La même technique de différenciation a été utilisée sur des iPS.
Duan 2010	Collagène 1	J0-2 : activine A 100ng/ml J2-5/8 : activine A, butyrate de sodium 0,5mM J8 : FGF4 20ng/ml, HGF 20ng/ml, BMP4 10ng/ml J9-19/23 : idem + DMSO 0,5%, OSM 50ng/ml, FGF4, HGF 20ng/ml, Dex 100nM		23 jours de différenciation, maintien en culture jusqu'à 36 jours	qRT-PCR : alb (expression 75% des HHCP), AFP RT-PCR : CYP1A1, 1B1, 2A6-7, 2B6, 2C8-19, 2E1, 7A1 CF : CXCR4, SOX17, FoxA2, alb (90% des hES-Hep alb ⁺), AFP, AAT, ASPGR (60% des hES-Hep ASPGR ⁺) IF : MRP1, OATP2, CAR, PXR, AhR, CPR, LXR WB : CYP1A2, 3A4, 2C9, 2D6, UGT1A1, 2B7, GSTP1-1, A1-1	Capture ICG, production alb, AFP Multiple reaction monitoring : métabolisation phénacétine (CYP1A),bufuranol (CYP2D), midazolam (CYP3A), diclophénac (CYP2C), réactions d'oxygénation, déshydrogénation (phase 1), glucuronidation, conjugaison (phase 2)		
Farzaneh 2010	Culture sur surface 3D nanofibrillaire mimant la matrice extra-cellulaire	J0-1 : activine A 100ng/ml J1-4: idem avec ITS J4-10: HGF 10 ng/ml, FGF4 10 ng/ml J10-19: HGF, FGF4, OSM 20ng/ml, Dex 100nM		19 jours	qRT-PCR : SOX17, AFP RT-PCR : AFP, alb, HNF4α, G6P, CYP7A1, TO, CEBPβ IF : FoxA2, SOX17, CXCR4, AFP, alb, CK18 CF : CXCR4, SOX17, AFP	Stockage glycogène, capture ICG, LDL, production AFP, alb, urée, activité CYP450 (PROD)		Meilleure différenciation sur surface 3D

Référence	Conditions de culture	Facteurs de croissance et autres	Isolement / tri	Durée de différenciation/ culture	Marqueurs	Fonctionnalité	Tests in vivo	Remarques
Roelandt 2010	Matrigel	J0-6: activine A 100ng/ml, Wnt3a 50ng/ml J6-10: FGF2 10ng/ml, BMP4 50ng/ml J10-14: FGF1 50ng/ml, FGF4 10ng/ml, FGF8b 25ng/ml J14-20: HGF 20ng/ml, follistatine-288 100ng/ml Dex 1µM et insuline 2,5mg/ml pendant toute la durée de culture		20 jours	qRT-PCR : alb, AAT, HNF4α, CK18-19, MRP2, PEPCK, TAT, CYP3A4-5-7, facteur V, OCT4, MIXL1, EOMES, GSC, AFP, TTR, facteur V, VII, connexine 34, GST, UGT1A1 IF : SOX17, OCT4, alb, PEPCK, CK18, MIXL1, SOX7 Comparaison avec HHCP et FF	Stockage glycogène, production urée, albumine (niveaux 2,6-57% ceux des HHCP), activité CYP450 inductible (P450 glo assay), glutathione S-transférase		A la fin du protocole, 10-20% des cellules ont atteint un phénotype hépatocyttaire fœtal. Même protocole réalisé avec des MAPCs de rat.
Si-Tayeb 2010	Matrigel, milieu sans sérum conditionné par fibroblastes murins embryonnaires	J0-5 : activine A 100ng/ml J5-10 : FGF2 10ng/ml, BMP4 20ng/ml J10-15 : HGF 20ng/ml J15-20 : OSM 20ng/ml		20 jours	qRT-PCR : CYP1A2, 2B6, 2C8-9, 2D6, 3A4-5-7, 7A1, UGTs, STs et autres Puce à ADN: panel de 40 gènes hépatos spécifiques IF : OCT4, GATA4, SOX17, FoxA2, HNF4α, AFP, alb CF : albumine	Stockage glycogène, lipides, capture ICG, LDL, production alb, urée	TC dans le foie de souris, à J7 post TC détection hES-Hep dans le foie de souris	Le même protocole a été réalisé avec des iPS.
Huang 2010	Co-culture avec cellules fibroblastiques dérivées de hES			21 semaines	qRT-PCR : OCT4, NANOG, Brachyury, MIXL1, SOX17, GATA4, CXCR4, AFP, CK8-18-19, alb, CYP7A1, TAT, TO, HNF4α, AAT, CYP3A4, HGF RT-PCR : AFP, CK8-18-19, alb, HNF4α, AAT, CYP3A4, 7A1, TAT, TO, HGF IF : OCT4, Brachyury, SOX1, SOX17, CK7, CK19, CK18, AFP, alb	Stockage glycogène, production alb		Même protocole réalisé avec de ES de singe. Après différenciation, les cellules étaient permissives à l'infection par le virus de l'hépatite B.
Zamule 2011	Collagène de de type 1 Milieu sans sérum	Dex 25nM ITS		10 à 20 jours	qRT-PCR : FoxA1, CEBPα, HNF1α, CAR, RXRα, PPAR, HNF4α, AFP, TTR, alb (expression 1000 fois moindre que HHCP), transferrine, AAT, PEPCK, HMGCS2, CYP3A4, 3A7, 3A5, 2E1, Comparaison HHCP IF : OCT4, SOX2, SSEA3, TRA-1-60, TRA-1-81	Stockage glycogène, capture ICG, production alb		Pas d'utilisation de facteurs de croissance. Pas d'activité CYP3A4 inductible.

Référence	Conditions de culture	Facteurs de croissance et autres	Isolement/ tri	Durée de différenciation/ culture	Marqueurs	Fonctionnalité	Tests in vivo	Remarques
Inamura 2011	Culture sur laminine puis collagène à partir de J9 Milieu sans sérum	J0-5 : activine A 50ng/ml, FGF2 10 ng/ml, insuline 10µg/m J6: transduction par un adénovirus exprimant HEX J6-9: BMP4 10ng/ml, FGF4 10ng/ml J9-18: FGF4, HGF 10ng/ml, OSM 10ng/ml, Dex 0.392ng/ml		18 jours	qRT-PCR: FoxA2, SOX17, NANOG, SOX7, AFP, alb, pour les cellules d'iPS, CYP3A4, 2D6, 7A1 IF: FoxA2, NANOG, AFP, alb, CK7, CK18, pour les cellules d'iPS CYP3A4, 7A1 Comparaison HHCP, FF	Pour les cellules dérivées des iPS, activité CYP3A4 (p450 glo assay) inductible par la rifampicine		Induction de la différenciation par expression forcée de HEX. Même protocole réalisé avec des iPS.
Payne 2011	Matrigel Milieu sans sérum	J0-3 à5: butyrate de sodium ou Wnt3a 50ng/ml, activine 100ng/ml J5-12 : DMSO 1% J12-19 : HGF 10ng/ml, OSM 20ng/ml, insuline, hydrocortisone 10µM (protocol de Hay 2008a)		18 jours de différenciation, poursuite culture 10 jours au-delà	qRT-PCR : NANOG, OCT4, alb, AFP RT-PCR: TAT, TO, TTR		TC dans rate de souris NOD traitées par CCl ₄ . Détection hES-Hep dans la rate 31 jours post TC, détection alb dans sérum de souris jusqu'à 3 mois post TC. Détection de l'expression de CYP450 humains dans la rate. A 3 mois post TC, présence de tumeurs dans le foie et la rate.	Les hES-Hep ayant migré dans le foie ont rapidement perdu leurs caractéristiques phénotypiques, contrairement à celles restées dans la rate.
Yu 2011	J0-5 : CE sur collagène A partir de J5, co-culture avec une lignée de fibroblastes murins (3T3J2)	J0-5 : activine A 100 ng/ml		30 jours	RT-PCR: OCT4, NANOG, FoxA2, SOX17 IF: OCT4, NANOG, FoxA2, SOX17, alb, AFP			

Référence	Conditions de culture	Facteurs de croissance et autres	Isolément/ tri	Durée de différenciation/ culture	Marqueurs	Fonctionnalité	Tests in vivo	Remarques
Miki 2011	Culture 3D sous perfusion dans un bioréacteur, Matrigel	J0-3 : activine 100ng/ml J3-8 : FGF4 30ng/ml, BMP2 20ng/ml J13-18: OSM 10ng/ml, Dex 100nM Protocole de Cai 2007		20 jours	qRT-PCR: SOX17, HNF4α, AAT, G6P, alb, CYP3A4, 3A7, CPS et autres gènes du cycle de l'urée CF: 30% des hES-Hep ASPGR ⁺ IF : alb, CK8, CK18, CK19, HNF4α, CYP3A4	Stockage glycogène, production alb, métabolisation ammoniacque, induction expression CYP3A par rifampicine		Meilleure différenciation en culture 3D sous l'action de facteurs de croissance dynamique par rapport à la culture 2D ou la différenciation spontanée en culture 3D. Apparition d'agglomérats de cellules alb ⁺ et de structures tubulaires primitives formées par des cellules CK19 ⁺ et CK7 ⁺ .

Table 3. Résumé des protocoles de différenciation de hES-Hep rapportés dans la littérature

ABCB11 : transporteur de sels biliaires, ADH1A : alcooldéshydrogénase 1, CPR : cytochrome P450 réductase, CE : corps embryoides, CF : cytométrie de flux, FF: foie foetal, GFP: green fluorescent protein, HMGCS2: 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A synthase 2, ICC : immunocytochimie, ICG : indocyanine green (vert d'indocyanine), ITS : insuline-transferrine-sélénium, LFABP: Liver Fatty Acid Binding Protein, LXR: liver X receptor, qRT-PCR : RT-PCR quantitative, RT-PCR : reverse transcriptase PCR, Shh: sonic hedgehog, SLC01A4: polypeptide transporteur d'anions organiques, ST2A1: hydroxystéroïde sulphotransférase, TC : transplantation cellulaire, WB : Western blot.

2. Génération d'hépatocytes humains à partir de cellules souches pluripotentes induites (iPS)

Les cellules souches pluripotentes induites (iPS) sont obtenues à partir de cellules somatiques reprogrammées par l'intégration de gènes gouvernant la pluripotence. L'équipe de Yamanaka a été la première à créer une lignée d'iPS en 2006 à partir de fibroblastes murins après transduction des gènes OCT4, SOX2, Klf4 (Krüppel-like factor 4) et c-myc en utilisant des vecteurs rétroviraux (Takahashi and Yamanaka, 2006). Les premières iPS humaines ont été générées l'année suivante (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007).

Les iPS ont un certain nombre de caractéristiques communes avec les hES, notamment la pluripotence et un fort potentiel prolifératif. Cependant, des différences notables existent entre les deux types cellulaires. Une étude concernant des iPS d'une lignée d'origine hémangioblastique a montré que les iPS présentent une senescence précoce et une prolifération limitée par rapport aux hES (Feng et al., 2010). D'autres travaux ont mis en évidence des différences significatives entre l'expression génique des hES et des iPS (Chin et al., 2009; Takahashi et al., 2007), avec dans les iPS 1267 gènes qui sont exprimés à des niveaux 5 fois supérieurs aux ES (Takahashi et al., 2007). Des différences au niveau de la méthylation de la chromatine (Doi et al., 2009; Kim et al., 2010; Polo et al., 2010) suggèrent que les iPS gardent un certain degré de mémoire épigénétique de leur tissu d'origine (Kim et al., 2010). Il est donc possible que cette mémoire puisse affecter les capacités de différenciation des iPS. Cependant, une étude récente chez la souris a démontré que la capacité des iPS à se différencier vers l'endoderme définitif était équivalente à celle des ES, malgré une répression anormale de certains gènes soumis à l'empreinte parentale impliqués dans le développement de l'endoderme définitif (Christodoulou et al., 2011).

La quasi-totalité des travaux sur la différenciation des iPS vers l'hépatocyte ont comparé leur différenciation à celle des hES, qui représentent le gold standard de la pluripotence, en utilisant des protocoles de différenciation établis à partir d'études antérieures sur les hES. Sullivan et al (Sullivan et al., 2010) ont été les premiers à différencier des iPS vers l'hépatocyte, à partir de 3 lignées différentes d'iPS obtenues de fibroblastes de patients de sexes et d'ethnies différents. Après 14 jours de différenciation, 70-90% des cellules exprimaient l'albumine et étaient capables de sécréter l'AFP, le fibrinogène, le TTR et la fibronectine, et présentaient une activité cytochrome P450. Les cellules différenciées n'ont pas été comparées aux HHCP, et les auteurs ont constaté qu'il existait des différences

significatives de niveau de sécrétion protéique entre les différentes lignées (variation de l'ordre d'un facteur 10). Les iPS différenciées avaient une fonctionnalité équivalente aux hES-Hep, avec un rendement de différenciation supérieur d'après les auteurs. Song et al (Song et al., 2009) a également constaté que les niveaux d'expression et la fonctionnalité des iPS d'origine fibroblastique en fin de différenciation étaient comparables à ceux des hES-Hep, mais des niveaux d'expression et une fonctionnalité des iPS différenciées nettement inférieure aux HHCP (sécrétion d'urée et d'albumine à 10%, activité des cytochromes P450 30 fois moindre). Si-Tayeb et al (Si-Tayeb et al., 2010b) ont détecté des différences subtiles entre les niveaux et la cinétique d'expression entre iPS et hES en cours de différenciation. Une analyse par puce à ADN a révélé que les iPS différenciées et les hES-Hep avaient en commun 57% de gènes up-régulés. Même si le rendement était élevé (80% des cellules exprimant l'albumine) l'expression des cytochromes P450 restait faible (<1% à 25% des HHCP). Pour la première fois, il a été démontré que les iPS différenciées étaient capables d'intégrer le foie de souris après transplantation cellulaire intra-parenchymateuse. Josefczuk et al (Josefczuk et al., 2011) ont eu une approche similaire, et ont trouvé l'expression commune de 411 gènes entre les iPS et hES différenciés, avec un pourcentage de gènes communs up-régulés plus faible que chez Si-Tayeb (18%). Deux protocoles de différenciation ont été comparés (Agarwal et al., 2008; Hay et al., 2008b) et les auteurs ont observé que le premier protocole induisait de préférence des gènes de la biosynthèse des stéroïdes (Hay et al., 2008b), alors que le deuxième induisait plutôt des gènes associés au pancréas et au cortex surrénalien (Agarwal et al., 2008). Le profil d'expression génique des deux types cellulaires après différenciation avait plus de similitudes avec les hépatocytes fœtaux que les progéniteurs hépatiques, avec une persistance de l'expression de l'AFP et un niveau d'expression des cytochromes P450 qui restait faible.

A la différence des études précédentes, Liu et al (Liu et al., 2010) ont étudié des iPS obtenues par reprogrammation d'hépatocytes adultes au lieu de fibroblastes. Après transduction rétrovirale d'OCT4, SOX2, Klf4 et c-myc, des iPS ont été obtenues au bout de 6 jours avec un rendement de 0,1 à 0,2%. La vitesse de cette reprogrammation était relativement élevée par rapport aux iPS obtenus à partir de fibroblastes, ce qui pourrait être expliqué par l'absence de transition mésenchymo-épithéliale, qui n'est pas nécessaire pour les hépatocytes. Une étude ultérieure (Liu et al., 2011) a comparé les iPS dérivées des hépatocytes aux iPS dérivées de tissus issus d'autres feuilletts embryonnaires (kératinocytes, cellules mésenchymateuses de la

moelle osseuse, kératinocytes). Des analyses épigénétiques ont retrouvé des différences de méthylation entre les iPS d'origine différente en faveur d'un mémoire épigénétique (conservation de certaines séquences communes avec les cellules parentales), mais globalement les états de méthylation étaient similaires entre les diverses iPS et les hES. Les iPS issues de feuillets embryonnaires différents avaient la même capacité à se différencier vers l'hépatocyte *in vitro*, équivalente à celle des hES. Le rendement au stade de l'endoderme hépatique était particulièrement élevé, avec 90 à 100% des cellules exprimant l'albumine au 10^e jour de différenciation. Avec un protocole de différenciation de 20 jours associant une exposition à l'activine A suivi de FGF4, HGF, OSM et Dex, les cellules en fin de différenciation avaient un haut niveau de fonctionnalité, avec sécrétion d'albumine et une activité cytochrome P450 (évalué par Glo Assay) à des niveaux comparables aux HHCP. Les cellules ont été injectées chez des souris NOD-SCID-IL2R atteintes d'une cirrhose induite par la dimethylnitrosamine. Le taux d'intégration des hES-Hep et des iPS différenciés quelque soit leur origine a été estimé à 11%, équivalent à celui des HHCP, et supérieur à ceux des hES et iPS indifférenciées. Le meilleur taux d'intégration était obtenu avec l'injection de cellules au stade d'endoderme définitif, peut être en raison d'une capacité proliférative accrue. L'injection de ces cellules a permis la survie de 89% des souris transplantées, avec une persistance des cellules transplantées jusqu'à 7 mois post-transplantation. La présence d'albumine, transferrine, AAT et fibrogène humains a été détecté dans le sérum des souris transplantés, mais à des taux plus faibles qu'attendu étant donnée le taux d'intégration des cellules.

Rashid et al (Rashid et al., 2010) et Ghodsizadeh et al (Ghodsizadeh et al., 2010) ont créé des lignées d'iPS à partir de fibroblastes de patients porteurs de maladies hépatiques métaboliques (hypercholestérolémie familiale, maladie de stockage de glycogène 1a (déficit en G6P), maladie de Crigler-Najjar, tyrosinémie héréditaire de type 1, et déficit en AAT pour Rashid et al). Même si les iPS différenciées ne présentaient pas un phénotype mature (persistance d'expression d'AFP), les cellules différenciées ont reproduit *in vitro* trois des maladies métaboliques : présence de polymères d'AAT mutée dans le cytoplasme des cellules ayant un déficit en AAT, absence de récepteurs LDL et absence de capture de LDL pour l'hypercholestérolémie familiale, et un excès de stockage en glycogène pour la maladie de stockage de glycogène.

Ces études sont une preuve de principe que les iPS peuvent être utilisées pour créer des modèles de maladies *in vitro* à partir de cellules somatiques prélevées de patients. La source cellulaire utilisée (fibroblastes) est accessible de façon peu invasive, et les iPS ne présentent pas les problèmes éthiques associés aux hES. Ces cellules ont une capacité équivalente aux hES à se différencier vers l'hépatocyte, avec un rendement qui est équivalent voire supérieur. La production d'iPS à partir de patients porteurs de maladies hépatiques et leur différenciation ultérieure en hépatocytes permettrait d'étudier *in vitro* la physiopathologie des maladies hépatiques et d'élaborer des stratégies thérapeutiques, notamment en évaluant l'hépatotoxicité d'éventuels médicaments, qui pourraient être adaptés au métabolisme hépatique de chaque individu. Cependant, ce modèle est difficilement applicable aux maladies hépatiques à début tardif et à celles dont la pathogénèse dépend de facteurs environnementaux. La génération des iPS est actuellement handicapée par les faibles rendements après introduction des facteurs de reprogrammation, de l'ordre de 0,01 à 0,1%, et la persistance de cellules reprogrammées de façon incomplète. Les facteurs de reprogrammation c-myc et Klf4 sont des oncogènes qui ont été impliqués dans la survenue de certaines tumeurs (Ben-David and Benvenisty, 2011), et donc leur utilisation comporte un risque tumorigène en cas d'expression ou de réactivation inappropriée. Ce risque, lié aux modifications génétiques, se surajoute au risque tumorigène lié au caractère pluripotent des cellules. Il a été suggéré que le potentiel tumorigène des iPS soit supérieur à celui des hES (Ben-David and Benvenisty, 2011). Certaines équipes ont remplacé ces oncogènes par des gènes ayant un potentiel oncogénique moindre (Lin28 et NANOG), mais avec un rendement qui est considérablement diminué. Les facteurs de reprogrammation étant des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et la pluripotence, leur transduction et leur expression pourraient diminuer la capacité des cellules à se différencier. Il a été démontré que l'excision des transgènes intégrés augmente les capacités de différenciation des iPS *in vitro* (Sommer et al., 2010). L'emploi de vecteurs rétroviraux et lentiviraux pose également des problèmes de sécurité d'utilisation dans un contexte de transplantation cellulaire, car il existe un risque de réplication virale et également d'oncogenèse. Par conséquent, plusieurs travaux ont été consacrés à diminuer les risques liés à l'utilisation de transgènes et de vecteurs viraux : limitation du nombre de transgènes (1 à 2) (Kim et al., 2009b; Li et al., 2009), ablation des gènes transduits (Kaji et al., 2009; Soldner et al., 2009; Woltjen et al., 2009), virus ou plasmides non intégrants (Okita et al., 2008; Si-Tayeb et al., 2010c; Stadtfeld et al., 2008; Yu et al., 2009), intégration des facteurs de programmation sans utilisation de vecteurs viraux par induction chimique (Conrad et al.,

2008; Kossack et al., 2009), transduction protéique (Kim et al., 2009a; Zhou et al., 2009) ou transfection par miARN avec (Anokye-Danso et al., 2011) ou sans (Miyoshi et al., 2011) utilisation de vecteurs viraux. D'autres équipes travaillent encore sur l'amélioration du rendement des iPS par l'utilisation de petites molécules inhibant la méthyl-transférase (Huangfu et al., 2008; Lyssiotis et al., 2009; Shi et al., 2008). Ainsi, avec l'amélioration des techniques de production et la maîtrise des risques liés à l'utilisation de transgènes, les iPS pourraient être une source prometteuse pour la production d'hépatocytes in vitro dans les années à venir.

3. Génération d'hépatocytes à partir de cellules extrahépatiques

La régénération hépatique est majoritairement un phénomène intra-hépatique, sous contrôle des hépatocytes et d'éventuels progéniteurs hépatiques. Cependant, il a été démontré qu'une atteinte hépatique peut dans certaines conditions mobiliser des cellules d'origine extra-hépatique, notamment de la moelle osseuse, qui migrent dans le foie et contribuent à sa régénération. Après les premières études chez les rongeurs (Petersen et al., 1999), ce phénomène a été mis en évidence chez les humains avec la mise en évidence dans le foie de patients ayant reçu une allogreffe de moelle des cellules en provenance du donneur (Alison et al., 2000; Theise et al., 2000). La mobilisation de cellules originaires de la moelle osseuse lors d'agressions hépatiques semble être un phénomène physiologique chez l'homme, en réponse à une hépatectomie (De Silvestro et al., 2004; Gehling et al., 2005) ou une transplantation hépatique (Lemoli et al., 2006), mais il faut noter que le nombre de cellules concernées est généralement très faible, et l'importance de leur rôle reste mal définie. Plusieurs mécanismes existent pour expliquer la contribution de la moelle osseuse à la régénération hépatique : fusion cellulaire (Terada et al., 2002; Vassilopoulos et al., 2003; Wang et al., 2003b), effets paracrines (Parekkadan et al., 2007; Sadat et al., 2007) et transdifférenciation (Jang et al., 2004; Lagasse et al., 2000). Ces phénomènes peuvent co-exister et leur importance relative semble être dépendante du modèle d'insuffisance hépatique et de l'environnement cellulaire. La nature exacte des cellules de la moelle osseuse capables de se différencier vers l'hépatocyte n'est pas précisément définie (Eckersley-Maslin et al., 2009). Il semblerait que la transdifférenciation vers l'hépatocyte se fasse principalement à partir de deux populations de

cellules souches présentes dans la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques et les cellules souches mésenchymateuses. Les cellules souches hématopoïétiques sont capables de se différencier en tous les types cellulaires sanguins, alors que les cellules souches mésenchymateuses se différencient en ostéocytes, adipocytes, chondrocytes, cellules musculaires lisses, et cellules stromales de la moelle osseuse. Ces cellules souches peuvent également être retrouvées dans d'autres types tissulaires (sang de cordon ombilical pour les cellules souches hématopoïétiques, tissu adipeux et cordon ombilical pour les cellules souches mésenchymateuses). D'autres équipes ont émis l'hypothèse que la moelle osseuse constitue une niche pour des cellules souches d'origine hépatique, qui pourraient être co-purifiées avec les cellules souches mésenchymateuses ou hématopoïétiques (Kucia et al., 2004; Ratajczak et al., 2004). Etant donné que de nombreux auteurs ont mis en évidence des phénomènes de régénération hépatique *in vivo* à partir de cellules de la moelle osseuse, plusieurs équipes ont décidé d'étudier la capacité de ces cellules à se transdifférencier vers un phénotype hépatique *in vitro*.

a) *Différenciation vers l'hépatocyte à partir de multipotent adult progenitor cells (MAPCs) isolés à partir de la moelle osseuse*

En 2002, Schwartz et al (Schwartz et al., 2002) ont isolé une population de cellules multipotentes à partir de la moelle osseuse, qui seraient une sous population de cellules souches mésenchymateuses. Ces cellules sont capables de se différencier à la fois vers des lignées cellulaires mésodermiques (ostéocytes, chondrocytes, adipocytes, myoblastes), neurectodermiques et endodermiques. Après culture sur Matrigel et exposition à l'HGF et le FGF4, les cellules exprimaient l'albumine, CK18, HNF4, HNF1 α ainsi que le CYP1B1 et 2B6 à des niveaux de 0,5 à 1% des HHCP. Ces cellules étaient capables de produire de l'urée, capter le LDL, stocker le glycogène et avaient une activité CYP450 inducible par le phénobarbital. Cependant, ces cellules sont difficiles à isoler et la reproductibilité de ces résultats est limitée à l'heure actuelle. Ainsi, la fonctionnalité des MAPC humains n'a pas encore été démontrée *in vivo*.

b) Différenciation vers l'hépatocyte à partir de cellules souches hématopoïétiques

En 2003, Fiegel et al (Fiegel et al., 2003) ont induit l'expression de marqueurs hépatiques (albumine, CK19) à partir de cellules souches hématopoïétiques isolées de moelle osseuse, sous l'action de HGF, EGF et dexaméthasone. Wang et al (Wang et al., 2003a) ont démontré que des cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ issus soit de moelle osseuse, soit de sang de cordon étaient capables d'intégrer des foies de souris NOD-SCID irradiées et exprimer des marqueurs hépatiques humains. Ces résultats *in vivo* ont également été retrouvés par Newsome et al (Newsome et al., 2003), sans évidence en faveur de fusion, mais en prenant la population mononucléé de sang de cordon non soumis à un tri par CD34. Par la suite, plusieurs études se sont penchées sur la différenciation *in vitro* de cellules du sang de cordon ombilical, source riche en cellules souches hématopoïétiques. Kakinuma et al (Kakinuma et al., 2003) ont isolé des cellules mononuclées de sang de cordon ombilical, dont 50% exprimaient l'albumine après 21 jours de différenciation sous l'action de divers facteurs de croissance dont HGF et des FGF. Après transplantation des cellules chez des souris SCID, la présence d'albumine humaine a été détectée dans le sérum de souris, et le pourcentage d'hépatocytes fonctionnels issus des cellules transplantées a été estimé à 0,1 à 1%. Nonome et al (Nonome et al., 2005) ont comparé la capacité de différenciation de cellules mononuclées de sang de cordon ombilical CD34⁺, CD34⁻ et non triées, et n'ont pas trouvé de différence significative puisque toutes les cellules étaient capable d'exprimer l'albumine et s'intégrer au sein de foie de souris NOD-SCID après transplantation. La nature précise des cellules au sein de sang de cordon ombilical capables de se transdifférencier reste donc mal connue.

c) Différenciation vers l'hépatocyte à partir de cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont capables de se différencier vers l'adipocyte, l'ostéocyte, le myocyte et le chondrocyte. Elles sont isolées en éliminant les populations cellulaires matures, puis purifiées à partir de marqueurs cellulaires ou de critères de fonctionnalité, qui peuvent varier selon les laboratoires et ainsi conduire à des résultats hétérogènes (Coulombel, 2004; Eckersley-Maslin et al., 2009). Elles ont l'avantage de posséder moins d'immunogénécité que les cellules souches hématopoïétiques, ce qui

favoriserait leur intégration dans un modèle de transplantation cellulaire. Une étude (Sato et al., 2005) a suggéré que les CSM de moelle osseuse auraient une meilleure capacité de différenciation *in vivo* que les cellules souches hématopoïétiques de moelle osseuse.

Concernant les CSM issues de la moelle osseuse, Lee et al (Lee et al., 2004b) ont obtenu des cellules pouvant capter les LDL, produire l'urée et métaboliser des substrats de CYP450 avec une induction au phénobarbital, après exposition séquentielle au HGF, FGF2 puis OSM, dexaméthasone et ITS. Snykers et al (Snykers et al., 2007) ont confirmé ces résultats avec un rendement élevé sous l'action de trichostatine A après initiation de la différenciation par FGF4 et HGF (au 8^e jour de différenciation, 87% des cellules exprimaient l'albumine). Ces cellules avaient une bonne fonctionnalité *in vitro*, car elles produisaient de l'urée et de l'albumine à des niveaux comparables aux HHCP, et possédaient une activité CYP2B6 et CYP1A inducible par le 3-méthylcholanthrene. Aurich et al (Aurich et al., 2007) ont démontré que des CSM transdifférenciées étaient capable d'intégrer le parenchyme hépatique de souris hépatectomisés dont la prolifération d'hépatocytes natifs a été inhibée (administration de propranolol), sans mise en évidence de fusion cellulaire, mais avec une repopulation estimée à moins de 1% de la masse hépatique totale. Cependant, ces cellules ont également le potentiel de générer des myofibroblastes au sein du foie après transplantation (di Bonzo et al., 2008) en cas de différenciation incomplète.

L'obtention de CSM à partir de moelle osseuse n'est pas dénuée de risques, car la procédure est invasive (biopsie/aspiration à travers la crête iliaque) et nécessite généralement une anesthésie générale. La qualité des CSM qui sont extraites peut varier et est dépendant de l'âge du donneur (D'Ippolito et al., 1999). Des équipes se sont donc tournées vers d'autres sources de CSM, dont le cordon ombilical et le tissu adipeux. Des CSM issues soit de sang de cordon ombilical (Hong et al., 2005; Lee et al., 2004b), soit de matrice (gelée de Wharton, tissu conjonctival) de cordon ombilical (Campard et al., 2008) sont capables d'exprimer des marqueurs hépatiques après différenciation *in vitro*. Campard et al (Campard et al., 2008) ont observé que des CSM issues de la matrice de cordon ombilical exprimaient à l'état basal (sans différenciation) un certain nombre de marqueurs hépatiques, dont l'albumine (pour 48,2% des cellules), l'AFP, le CK18, l'AAT, le G6P et le TO. Après différenciation *in vitro*, ces cellules étaient comparables aux HHCP quant à la production d'urée et l'activité CYP3A4 et pouvaient s'intégrer au sein du foie de souris NOD-SCID hépatectomisées, mais leur différenciation n'était que partielle, car elles ne produisaient pas d'albumine, n'exprimaient

pas certains marqueurs hépatiques (CYP2B6, HNF4, HepPar1 (Hepatocyte Paraffin 1)) et conservent l'expression de certains marqueurs mésenchymateux (actine, vimentine, fibronectine). Yan et al (Yan et al., 2009) ont transplanté des CSM de matrice de cordon ombilical sans différenciation préalable chez des souris nude traitées par CCl₄, et ont montré qu'en plus d'intégrer le parenchyme hépatique, les cellules induisaient une diminution du taux sérique de transaminases, favorisaient la prolifération hépatocytaire et diminuaient l'apoptose, peut être par des mécanismes paracrines.

Plus récemment, le tissu adipeux a été utilisé comme source de CSM. Ce tissu est plus facilement accessible que la moelle osseuse, et les CSM qui en sont issues auraient un meilleur potentiel prolifératif et une durée de culture plus longue que les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (Kern et al., 2006). Pour certains auteurs, ces cellules exprimeraient à l'état basal des marqueurs hépatiques comme le CK18 (Aurich et al., 2009; Saulnier et al., 2010; Seo et al., 2005), le CK19 (Aurich et al., 2009; Seo et al., 2005), l'albumine, le G6P et l'AAT (Zemel et al., 2009) ou l'AFP (Aurich et al., 2009). Seo et al (Seo et al., 2005) ont été les premiers à transplanter chez des souris NOD-SCID traitées par CCl₄ des cellules issues de CSM originaires de tissu adipeux, mais les résultats étaient équivalents entre cellules préalablement différenciées *in vitro* (DMSO, OSM, HGF) et cellules non différenciées. Au contraire, Aurich et al (Aurich et al., 2009) ont retrouvé des taux sériques d'albumine 15 fois plus élevés chez des souris hépatectomisées transplantées par des CSM de tissu adipeux différenciées (HGF, EGF) en comparaison à des cellules non différenciées. Les résultats étaient supérieurs pour les CSM issues de tissu adipeux sous-cutané par rapport au tissu adipeux péritonéal, avec un bon rendement (21% des hépatocytes de souris d'origine humaine pour les CSM de tissu adipeux sous-cutané) sans argument en faveur de fusion cellulaire. Stock et al (Stock et al., 2008) avaient comparé les capacités de différenciation des CSM issus de moelle osseuse et de tissu adipeux, et ont trouvé que les CSM de tissu adipeux se différenciaient aussi bien que les CSM de moelle osseuse. Contrairement à Aurich et al (Aurich et al., 2009), ils n'ont pas trouvé de différence significative entre les capacités de différenciation des CSM de tissu adipeux sous-cutané et de tissu adipeux péritonéal. Une analyse par puce à ADN a révélé que 1000 gènes sont up-régulés au cours de la différenciation, dont 60% ayant une expression à des niveaux équivalents aux HHCP. Certains de ces gènes up-régulés étaient caractéristiques d'hépatocytes périveineux (glutamine synthase, ribonucléase 4). Banas et al (Banas et al.,

2007) ont isolée des CSM de tissu adipeux sous-cutané CD105⁺, qui exprimaient au bout de 2 à 5 semaines de différenciation (HGF, FGF puis OSM et Dex) un certain nombre de marqueurs (albumine, CYP3A4, TTR, TO) avec un rendement de l'ordre de 60-85%. La capacité de métabolisation d'ammoniaque *in vitro* de ces cellules a également été démontrée *in vivo*, avec une diminution du taux d'ammoniaque sérique chez des souris transplantées. Les cellules ayant intégré le foie murin exprimaient l'albumine, mais avaient une morphologie atypique. Un travail ultérieur de la même équipe (Banas et al., 2008) a révélé que les CSM de tissu adipeux sécrétaient un certain nombre de cytokines (IL1RA, IL6, IL8, G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor), MCP1 (monocyte chemoattractant protein 1), NGF, HGF) à des taux plus importants que les CSM de moelle osseuse, et ces cytokines pourraient agir par un mécanisme paracrine sur la régénération hépatique. Plus récemment, des études de microarray (Saulnier et al., 2010; Yamamoto et al., 2008) ont démontré que les CSM de tissu adipeux subissaient une transition mésenchymo-épithéliale au cours de leur transdifférenciation vers l'hépatocyte.

d) Différenciation vers l'hépatocyte à partir de cellules adultes

La différenciation de cellules adultes pourrait éviter les problèmes liés à l'isolement des cellules souches (absence de marqueurs consensuels, techniques variables selon les laboratoires, populations hétérogènes). Ruhnke et al (Ruhnke et al., 2005) ont obtenu des résultats intéressants à partir de monocytes circulants périphériques, partiellement dédifférenciés sous l'action de G-CSF et IL3. Après exposition au FGF4, ces cellules pouvaient produire de l'albumine et de l'urée (à des niveaux 2 fois moindre que les HHCP), avaient une activité CYP1 et CYP2 inducible par le 3-méthylcholanthrene (activité de niveau comparable aux HHCP) ainsi qu'une activité de glucuronidation (Ruhnke et al., 2005). Après transplantation chez des souris NOD-SCID, des cellules exprimant l'albumine étaient retrouvées dans le foie de souris 21 jours post-transplantation, avec des résultats comparables à la transplantation de HHCP. Ces cellules étaient également capables de se différencier vers un phénotype pancréatique (Ruhnke et al., 2005).

Dravida et al (Dravida et al., 2005) ont extrait à partir de limbe (partie périphérique) de cornée des fibroblastes qui exprimaient des marqueurs de cellules souches embryonnaires (SSEA

(Stage-Specific Embryonic Antigen), OCT4, SOX2). Ces cellules étaient capables de se différencier vers de multiples lignées cellulaires (neurone, épithélium de cornée, cellules pancréatiques, cardiomyocytes, adipocytes) dont l'hépatocyte. Après culture en agrégats sous l'action de HGF, FGFs, EGF, OSM et dexaméthasone, les cellules étaient capables d'exprimer l'albumine et le HNF4 α . L'expression d'autres marqueurs hépatiques et la fonctionnalité des cellules n'ont pas été testés.

Lysy et al (Lysy et al., 2007) ont soumis des fibroblastes de peau à une culture sur collagène 1 avec HGF, FGF4 et ITS, puis OSM et ITS. Une analyse par cytométrie de flux a révélé qu'après différenciation 65,2% des cellules exprimaient l'albumine, ainsi que d'autres marqueurs comme AFP, AAT, G6P, TDO, GS et c-met (analyses PCR). Un certain pourcentage de ces cellules pouvait stocker le glycogène (21,7%) et produire de l'urée (à 30% du niveau des HHCP). La différenciation de ces cellules étaient cependant incomplète, car elles n'exprimaient pas CK8, CK18 et HepPar1, et n'étaient pas capable de sécréter l'albumine. Après transplantation chez des souris NOD-SCID hépatectomisées, des cellules exprimant l'albumine, l'AFP et le CK18 en association avec des marqueurs mésodermes étaient retrouvées dans les foies 21 jours post-transplantation, mais la présence d'albumine humaine dans le sérum des souris transplantées n'a pas été détectée. Les auteurs ont comparé la différenciation des fibroblastes à celle de CSM de moelle osseuse, et ont conclu que le degré de différenciation hépatique obtenu était équivalent entre les deux types cellulaires, mais une différenciation de fibroblastes cutanés au-delà du 3^e passage de culture n'était pas possible.

Au total, l'ensemble des études montre que la transdifférenciation *in vitro* d'autres types cellulaires, notamment des cellules souches mésenchymateuses ou hématopoïétiques, vers l'hépatocyte est possible. La génération d'hépatocytes à partir de tissus présents chez l'adulte évite les problèmes éthiques liés aux hES, et les risques liés à la manipulation génétique des iPS. Les cellules obtenues auraient un potentiel tumorigène moindre, car elles ne passent pas par un état de pluripotence, contrairement aux hES et aux iPS. Cependant, la fonctionnalité et le degré de différenciation des cellules obtenues ont été beaucoup moins étudiés que dans les cellules issues des hES ou d'iPS, puisque très peu d'études ont comparé directement les cellules différenciées aux HHCP. De plus, le rendement de ces protocoles de différenciation a été peu étudié. Les cellules souches issus de tissus extra-hépatiques semblent avoir une bonne capacité de différenciation, mais leur isolement et leur purification sont problématiques car les

marqueurs caractéristiques de ces populations sont mal définis, et les techniques et critères d'isolement peuvent varier d'un laboratoire à un autre, ce qui peut conduire à des résultats hétérogènes. La transdifférenciation à partir de populations de cellules matures bien définies et faciles d'accès paraît prometteur, mais à l'heure actuelle les études restent limitées chez l'homme.

4. Génération d'hépatocytes par reprogrammation directe de cellules adultes

Deux papiers récents travaillant avec des cellules de souris ont démontré qu'il est possible de générer des cellules à phénotype cellulaire à partir de cellules d'origine extra-hépatique non pas par transdifférenciation sous l'effet de facteurs solubles, mais par reprogrammation directe en transduisant les gènes ayant un rôle clé dans le développement hépatique, selon le modèle des iPS. Huang et al (Huang et al., 2011) ont transfecté des fibroblastes embryonnaires murins et des fibroblastes de queue de souris adultes par des lentivirus exprimant GATA4, FoxA3 et HNF1 α , avec en plus l'inactivation de p19^{Arf} pour les fibroblastes de queue. Sekiya et al (Sekiya and Suzuki, 2011) ont également transduit des fibroblastes embryonnaires murins et des fibroblastes dermiques de souris adultes avec des lentivirus, exprimant cette fois-ci deux gènes, HNF4 α et FoxA1, FoxA2 ou FoxA3. Les cellules ainsi générées (iHep) ont été cultivées pendant 15 (Huang et al., 2011) à 21 jours (Sekiya and Suzuki, 2011). Des analyses par puce à ADN ont démontré une répression des gènes fibroblastiques, et l'induction de certains gènes hépatiques, dont ceux impliqués dans le métabolisme du cholestérol et des glucides, ainsi que les cytochromes P450. L'expression des gènes transduits a diminué au cours du temps, démontrant que le processus de différenciation se faisait de façon indépendante. Au bout de 14 jours, 23% des iHep de Huang et al (Huang et al., 2011) exprimaient l'albumine, alors que ce chiffre était de 85% pour Sekiya et al (Sekiya and Suzuki, 2011). Ces cellules étaient capables de sécréter l'albumine (à des quantités 1,5 à 3 fois moindres que les HHCP), stocker le glycogène et capter les LDL et le vert d'indocyanine. Elles étaient également capables de métaboliser des substrats du CYP450 (diclofénac, phénacétine et testostérone pour Huang et al, et phénacétine, diclofénac, bufuranol et tolbutamide pour Sekiya et al), toujours à des niveaux moindres que les HHCP (d'un facteur 2 à 3 pour Huang et al, d'un facteur 10 à 85 pour Sekiya et al). Les iHep n'étaient pas capables de se différencier vers un phénotype biliaire, ce qui a conduit les auteurs à affirmer qu'elles

n'étaient pas représentatives d'une population de progéniteurs hépatiques, mais elles exprimaient l'AFP (Huang et al., 2011; Sekiya and Suzuki, 2011) et le CK19 (Huang et al., 2011). Les deux équipes ont démontré que ces cellules étaient capables de s'intégrer dans le foie de souris Fah^{-/-} après transplantation, et de restaurer partiellement la fonction hépatique des souris transplantées, sans mise en évidence de phénomènes de fusion cellulaire et sans apparition de tumeurs. Malgré une fonctionnalité inférieure aux HHCP, une expression incomplète de certains gènes du phénotype hépatique et la persistance de l'expression de l'AFP, ces travaux démontrent qu'il est possible de reprogrammer directement des cellules adultes vers un phénotype hépatique, sans passer par un état indifférencié, donc avec un risque de tumorigénicité moindre. Des travaux à venir détermineront si cette technique est possible chez l'homme.

	hES	iPS	Cellules souches de tissus adultes	Cellules adultes
Différenciation <i>in vitro</i>	Oui	Oui	Oui	Partielle
Différenciation <i>in vivo</i>	Oui	Oui	Oui	Oui
Potentiel de différenciation	Très fort	Très fort	Fort	Limité
Prolifération <i>in vitro</i>	Infinie	Infinie	Semi-infinie	Limitée
Transplantation autologue	Non	Non mais possible	Oui	Oui
Problèmes éthiques	Oui	Non ou très peu	Non	Non
Disponibilité pour la pratique médicale	Non	Oui	Oui	Oui potentiellement
Gouvernance par une législation	Oui	Non	Non	Non
Tumorigénicité	Oui	Oui	Non ou très peu	Non
Rejet	Oui	Non	Non	Non
Activité trophique <i>in vivo</i>	Non	Non	Oui	?

Tableau 4. Caractéristiques de cellules souches. Adapté de Ochiya et al (Ochiya et al., 2010).

VI. TRAVAUX EXPERIMENTAUX

Le 6 août 2004 a été passé le premier décret autorisant les travaux de recherche sur les hES dans des conditions très contrôlées. En juillet 2005, l'Institut de Recherche en Biothérapie de Montpellier a reçu l'autorisation d'effectuer des recherches sur hES. Notre laboratoire INSERM U632 a une longue expérience dans la culture et la caractérisation d'hépatocytes adultes humains in vitro. Nous avons voulu mettre à profit cette expérience afin de caractériser de façon optimale les hES-Hep au cours de leur différenciation.

Mes travaux sur la différenciation des hES vers l'hépatocyte ont commencé fin 2005, lors d'une année Master 2 Recherche. A cette époque, il y avait très peu d'études sur ce sujet, et ceux qui étaient publiés décrivaient la génération de hES-Hep au sein de corps embryoïdes (Lavon et al., 2004; Schwartz et al., 2005). Nous avons voulu élaborer un protocole de différenciation des hES en monocouche, afin d'assurer une meilleure homogénéité des cultures. Pour ce faire, nous avons testé plusieurs milieux, supports et facteurs de croissance. Nos résultats ont été confirmés par les publications d'autres équipes utilisant des protocoles similaires. Nous avons comparé les hES-Hep avec le modèle de référence, les HHCP, ainsi que des hépatocytes de foie fœtal afin de pouvoir situer leur état de différenciation. Des travaux antérieurs réalisés au sein de notre laboratoire ont permis d'isoler une population de progéniteurs, les cellules non-parenchymateuses épithéliales (NPE-Hep) (Duret et al., 2007). Nous avons comparé la différenciation des hES-Hep à la différenciation de ces cellules afin de voir s'il existait un parallélisme entre le développement des hES et la maturation des progéniteurs hépatiques. Enfin, nous avons essayé d'améliorer l'expression d'enzymes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques en évaluant les effets de l'expression forcée de CAR dans les hES-Hep.

1. Elaboration du protocole de différenciation

a) 1^e étape : Induction de l'endoderme définitif

Nous avons basé notre protocole de différenciation des hES en endoderme définitif sur les travaux de D'Amour et al (D'Amour et al., 2005), qui ont induit l'expression de marqueurs de l'endoderme définitif sous l'action d'activine A à 100 ng/ml et des faibles concentrations de sérum bovin fœtal (0,5%). L'activine A fait partie de la famille TGF β et se fixe sur les mêmes récepteurs que Nodal, qui est essentiel pour la spécification de l'endoderme définitif au cours de la gastrulation (un niveau élevé de Nodal spécifie l'endoderme définitif alors que des niveaux plus faibles spécifient le mésoderme (Lowe et al., 2001; Vincent et al., 2003)). Le sérum bovin fœtal contient des facteurs de croissance en forte quantité, avec un faible de taux de facteurs inhibiteurs (Mannello and Tonti, 2007). La réduction du taux de sérum bovin fœtal dans le milieu favoriserait ainsi la différenciation au dépens de la prolifération.

Par la suite, nous avons essayé d'optimiser ce protocole d'induction de l'endoderme définitif en jouant sur divers voies de signalisation ou en modifiant certains paramètres de culture.

- Wnt3a

La molécule Wnt est un activateur de la voie de signalisation β -caténine. La présence de Wnt inhibe la dégradation protéasomale de la β -caténine, qui se transloque au niveau du noyau. La β -caténine nucléaire forme un dimère avec les protéines nucléaires de la famille T cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF). Ce complexe peut avoir tantôt un rôle activateur de la transcription, tantôt un rôle inhibiteur.

L'activation de la voie Wnt/ β -caténine en synergie avec la voie TGF/Activine est nécessaire pour l'induction de la strie primitive (Gadue et al., 2006), qui va donner naissance au mésendoderme, à l'origine de l'endoderme définitif et du mésoderme. Ultérieurement, l'induction de l'endoderme définitif antérieur (précurseur de l'endoderme hépatique) va nécessiter une diminution de l'activité Wnt (McLin et al., 2007), car une forte activité Wnt favorise le développement de l'endoderme définitif postérieur, précurseur des intestins. Il existe donc un gradient de signalisation le long de l'axe antéro-postérieur qui est essentiel au développement des organes endodermaux.

Nous avons démontré que la présence de Wnt3a induit l'expression de marqueurs mésendodermaux et de l'endoderme définitif (cf figure 2 de l'article). Nous avons également comparé des durées d'exposition différentes, car l'effet de Wnt semble être influencé par la durée du signal (Hansson et al., 2009). Si l'exposition de Wnt est prolongée au-delà de 48 heures, l'expression des marqueurs de l'endoderme définitif diminue, et plus notamment celle des marqueurs de l'endoderme hépatique comme FOXA2 et HEX (cf figure 2 de l'article). Ceci confirme le rôle de la diminution de la signalisation Wnt/ β -caténine dans l'induction de l'endoderme définitif antérieur.

Nous avons également comparé l'effet de concentrations différentes de Wnt3a sur l'induction de l'endoderme définitif. La concentration de Wnt3a à 25 ng/ml induit une expression plus importante des marqueurs qu'à 5 ng/ml.

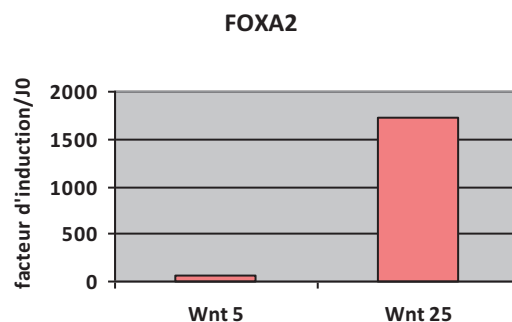


Figure 20. Effet de la concentration de Wnt3a sur l'expression de FOXA2 évaluée par qRT-PCR à J4.

- Inhibition de la voie PI3 Kinase

Les travaux de McLean et al (McLean et al., 2007) ont révélé que l'inhibition de la voie PI3 kinase favorise la différenciation des hES vers l'endoderme définitif, en utilisant des molécules agissant sur diverses étapes de la voie de signalisation PI3 kinase, dont LY294002 qui inhibe l'enzyme PI3 kinase elle-même. Lorsque les hES ont été exposés à l'activine A, la différenciation en endoderme définitif n'était possible que lorsque la voie PI3 kinase était inhibée, soit en rajoutant le LY294002, soit en abaissant la concentration de KOSR dans le milieu (2%). Le rajout d'insuline ou d'IGF, des activateurs connus de la voie PI3 kinase, dans le milieu de culture inhibe l'induction en endoderme définitif médiée par l'activine. Or, ces molécules sont présentes à des taux significatifs dans le KOSR et dans le sérum bovin fœtal.

L'IGF joue un rôle dans l'autorenouvellement dans les cultures de hES (Bendall et al., 2007) et antagonise la différenciation des hES en activant la voie PI3 kinase.

Nous avons donc utilisé le LY294002 dans le protocole de différenciation au stade de l'induction de l'endoderme définitif (J0-J5). Nous avons choisi la concentration de 30 µg/ml, car des concentrations de LY294002 supérieures entraînaient une mortalité importante des cellules.

- Variation du pourcentage de KOSR

Le KOSR (knock out serum replacement) est un produit de remplacement du sérum bovin à composition définie, utilisé pour la culture des hES. Nous avons testé des concentrations différentes de KOSR dans le milieu de différenciation des hES, afin de réduire la concentration au minimum, car comme le sérum bovin, le KOSR pourrait contenir des substances pouvant inhiber la différenciation. La réduction à une concentration de KOSR à 2% a conduit à une mortalité importante des cellules. Nous avons donc maintenu le KOSR à 10%.

- Diminution de la concentration du milieu en glucose

En pratique courante, les milieux utilisés pour la culture de hES contiennent des taux élevés de glucose, qui correspondent à des taux supra-physiologiques (25mM). Cependant, des études chez des embryons humains pré-implantatoires ont démontré que les embryons ne consomment que des quantités faibles de glucose aux stades précoces du développement (Gott et al., 1990). Le développement des embryons humains pré-implantatoires est inhibé par de fortes concentrations de glucose (Conaghan et al., 1993). Ceci est aussi vrai pour les hES, car la croissance des corps embryoides et la différenciation des hES est meilleure dans un milieu ayant une concentration physiologique en glucose (Khoo et al., 2005). De fortes concentrations de glucose augmentent l'activation de la voie PI3 kinase, et donc favorisent le maintien de l'état différencié comme vu précédemment, et majorent le stress oxydatif (Kim et al., 2006). Nous avons montré que l'utilisation d'un milieu à concentration physiologique en glucose (5mM) augmente l'expression des marqueurs de l'endoderme définitif (cf article figure 2).

- Pyruvate

Le pyruvate est un substrat préférentiel des embryons humains pré-implantatoires (Conaghan et al., 1993; Hardy et al., 1989). Conaghan et al ont démontré un effet négatif sur la survie d'embryons humains pré-implantatoires (mortalité avant le stade blastocyste). Nous avons cherché à savoir si l'adjonction de pyruvate dans le milieu de culture des hES favoriserait leur différenciation. Nous n'avons pas trouvé de différence significative concernant l'expression de marqueurs de l'endoderme définitif entre les hES cultivées en milieu avec et sans pyruvate. Puisqu'il n'y avait pas d'effet négatif sur la différenciation, nous avons choisi de continuer d'ajouter du pyruvate dans le milieu de culture.

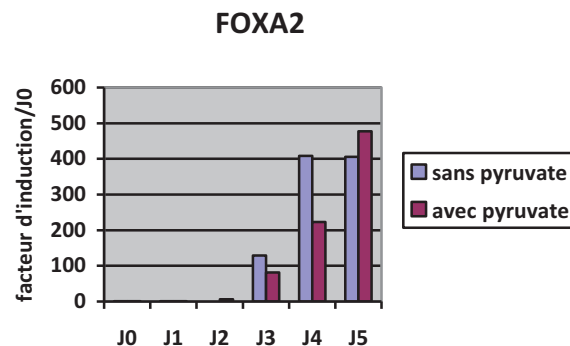


Figure 21. Comparaison par qRT-PCR de l'expression de FOXA2 par les hES en cours de différenciation en milieu avec et sans pyruvate

- Etude de l'expression de CXCR4 par cytométrie de flux

A J5, nous avons étudié l'expression du marqueur de surface de l'endoderme définitif CXCR4 dans les hES différenciées vers l'endoderme définitif. A J5, environ 90% des cellules exprimaient CXCR4.

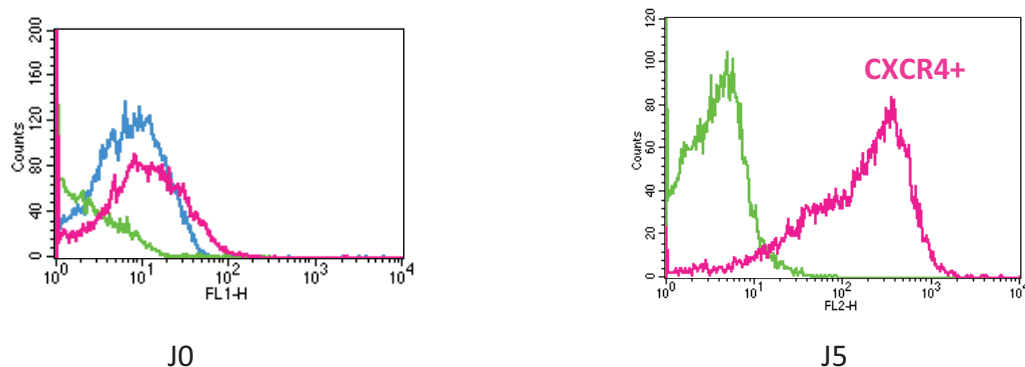


Figure 22. Résultats de l'étude par cytométrie de flux de l'expression du marqueur CXCR4 par les hES en cours de différenciation à J0 et à J5 de culture.

Malheureusement, nous n'avons pas réussi à mettre en culture les cellules triées, en raison d'une forte mortalité.

- Supports de culture

Nous avons testé le Matrigel et le collagène à la première étape de la différenciation. Une forte mortalité a été constatée avec le collagène, le Matrigel a donc été employé pour les étapes de l'induction de l'endoderme définitif et la spécification hépatique. Le Matrigel est une préparation soluble de membrane basale extrait de sarcome de souris. Il contient des composants de la matrice extra-cellulaire comme la laminine, du collagène IV, des protéoglycanes d'héparane sulfate et de l'entactine/nidogène, mais également des facteurs de croissance comme les FGF, l'EGF, le TGF- β , l'IGF et l'activateur tissulaire du plasminogène (BD Biosciences). L'effet du Matrigel sur la différenciation vers l'hépatocyte a été initialement démontré dans des systèmes de culture de progéniteurs murins (Strick-Marchand and Weiss, 2002; Tsuchiya et al., 2005).

b) 2^e étape : Spécification hépatique

L'expression des marqueurs de l'endoderme définitif étant maximale au bout de 5 jours de différenciation, nous avons débuté l'étape de la spécification hépatique à partir du 5^e jour de culture.

- Effet de différents FGF

La famille des facteurs de croissance FGF comprend 22 molécules différentes. Comme vu précédemment (cf chapitre II.2), les FGF sécrétés par le mésoderme cardiaque jouent un rôle clé dans la spécification hépatique (Jung et al., 1999). Au cours du développement, plusieurs FGF différents (FGF1, 2, 8, 10) sont exprimés par le mésoderme cardiaque (Zaret, 2002). Des études chez la souris ont démontré que ces facteurs sont vraisemblablement redondants entre eux (Miller et al., 2000). Nous avons testé divers FGF (1, 2, 4 et 8) et nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les différentes molécules concernant l'expression des marqueurs de la spécification hépatique (cf article Supplementary Figure 1A).

- Effet de BMP

Gouon-Evans et al (Gouon-Evans et al., 2006) ont étudié l'effet de BMP4 sur la spécification hépatique in vitro de ES de souris. Après traitement de corps embryoïdes par l'activine A pour induire l'endoderme définitif, une population de cellules exprimait fortement FOXA2, c-kit, et Brachyury. La présence de BMP4 à 50 ng/ml était essentielle pour l'induction de l'expression d'albumine et d'AFP, en conjonction avec le FGF2 et l'activine A.

Comme pour les FGF, nous avons testé différents types de BMP (2 et 4), et nous n'avons pas trouvé une différence significative (cf article Supplementary Figure 1A). Nous avons également fait varier la durée d'exposition des cellules au BMP, qui était rajouté dans le milieu à J5 à la concentration de 50 ng/ml. La prolongation de l'exposition au BMP au-delà de 5 jours a diminué l'expression de marqueurs de la spécification hépatique.

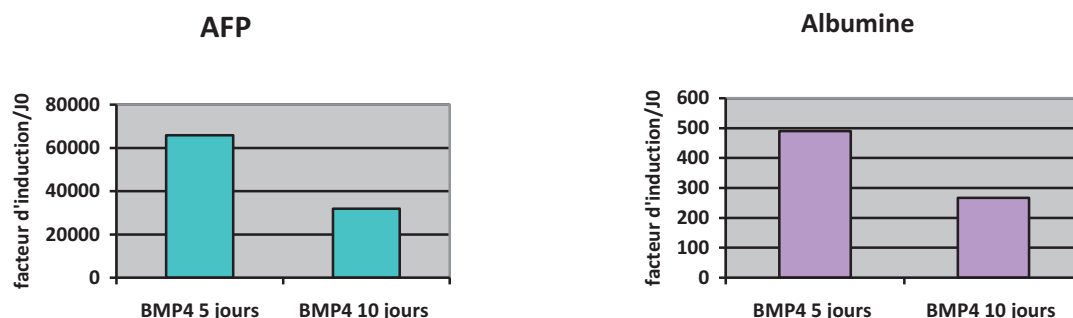


Figure 23. Expression d'AFP et d'albumine à J15 évaluée par qRT-PCR quantitative après une exposition au BMP4 pendant 5 jours (de J5 à J10) ou 10 jours (de J5 à J15).

Nous avons également essayé de rajouter le BMP4 et le FGF4 plus tôt dans le milieu de culture (à J3), mais ceci a entraîné une mortalité importante des cellules. Il était donc nécessaire de respecter un délai de 5 jours avant d'induire la spécification.

- Effet d'Activine A

Les travaux de Gouon-Evans et al (Gouon-Evans et al., 2006) ont démontré que le rendement de différenciation vers l'endoderme hépatique était optimal dans les cellules souches embryonnaires de souris en présence de l'association de BMP, FGF2 et activine A à 50 ng/ml après exposition initiale des cellules à l'activine A seule pour induire l'endoderme définitif. Nous avons étudié l'effet de la présence d'activine A à 50 ng/ml de J5 à J10. Une diminution de l'expression des marqueurs de l'endoderme hépatique a été constatée.

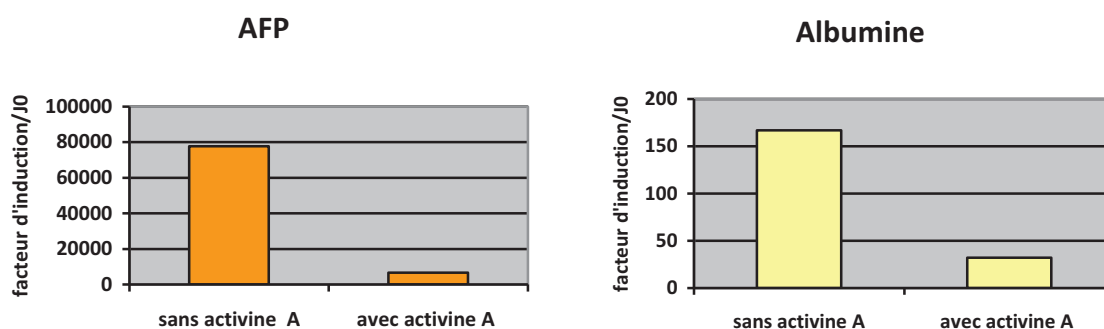


Figure 24. Expression d'AFP et d'albumine à J15 évaluée par qRT-PCR, en présence d'activine A à 50 ng/ml de J5 à J10 ou non.

- Effet de DMSO

Le diméthylsulphoxide (DMSO) est un modulateur épigénétique qui entre autres modifie l'acétylation des histones et augmente la méthylation de l'ADN. Nous avons constaté que l'ajout de DMSO à 1 % dans le milieu de culture à l'étape de spécification hépatique majorait l'expression des marqueurs de la différenciation (cf article supplementary figure 1B).

- Effet du pourcentage de KOSR

Pendant l'étape d'induction de l'endoderme définitif, le pourcentage optimal de KOSR dans le milieu de culture était de 10%. Nous avons constaté que l'expression des marqueurs de la différenciation est plus importante si la concentration en KOSR est diminuée à 2% pour l'étape de spécification (cf article supplementary figure 1C).

c) 3^e étape : La maturation hépatique

- Effet de HGF, OSM, ITS, Dexaméthasone

Après rajout de HGF à 20 ng/ml à J10, suivi de l'oncostatine M (10ng/ml), le dexaméthasone (5 uM) et l'insuline-transferrine-sélénium à J15, l'expression des marqueurs hépatiques a augmenté de façon temps dépendant de manière exponentielle. La prolongation de la durée d'exposition au HGF en le rajoutant plus précocement n'a pas entraîné une augmentation significative de l'expression des marqueurs.

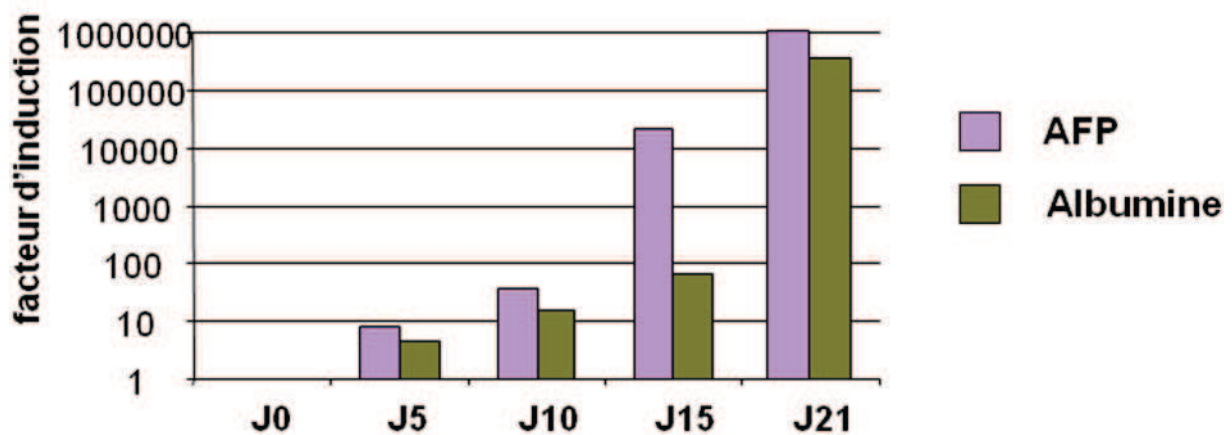


Figure 25. Expression d'AFP et d'albumine évaluée par qRT-PCR au cours du temps.

L'induction de l'expression de l'albumine était environ deux fois plus forte si OSM, ITS et Dex étaient rajoutés à J10 plutôt que J15.

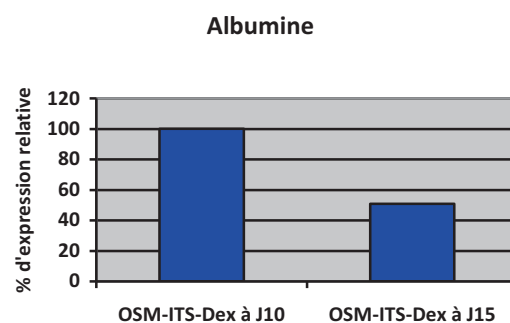


Figure 26. Evaluation de l'expression d'albumine par qRT-PCR à J22 de culture

- Effet d'autres facteurs de croissance

Afin d'essayer d'optimiser l'étape de maturation, d'autres facteurs de croissance ont été testés en conjonction avec l'OSM, le dexaméthasone et l'ITS. Ces molécules ont été choisies en raison de leur rôle éventuel dans le développement et/ou prolifération des hépatocytes et/ou des progéniteurs hépatiques :

- Wnt : rôle dans le développement hépatique et la zonation fonctionnelle via la voie β -caténine (Lade and Monga, 2011)
- Activine A : rôle dans l'apoptose et la régénération hépatique (Kreidl et al., 2009)
- Triiodothyronine (T3) : accélère la différenciation de progéniteurs hépatiques chez le rat (Laszlo et al., 2008)
- Liver growth factor (LGF) : complexe albumine-bilirubine qui agit comme un facteur de croissance chez le rat hépatectomisé (Abakumova et al., 1994)
- TWEAK (TNF-like weak inducer of apoptosis): induit la prolifération de cellules ovaies chez la souris (Jakubowski et al., 2005)
- Vitamine D3 : rôle dans la différenciation de divers types cellulaires (Samuel and Sitrin, 2008; Studzinski et al., 1993)
- VEGF (vascular endothelial growth factor) : joue un rôle essentiel dans le développement des sinusoides hépatiques, dont les cellules endothéliales peuvent moduler la prolifération hépatique (LeCouter et al., 2003)
- EGF (epithelial growth factor) : rôle dans la prolifération d'hépatocytes en culture primaire (Kim and Akaike, 2007).

Cependant, au terme de 27 jours de culture, il n'a pas été constaté de différence significative entre les hES-Hep cultivées en présence de ces facteurs de croissance (rajoutés à J10) et les hES-Hep cultivées avec le protocole standard (HGF, puis OSM, Dex et ITS).

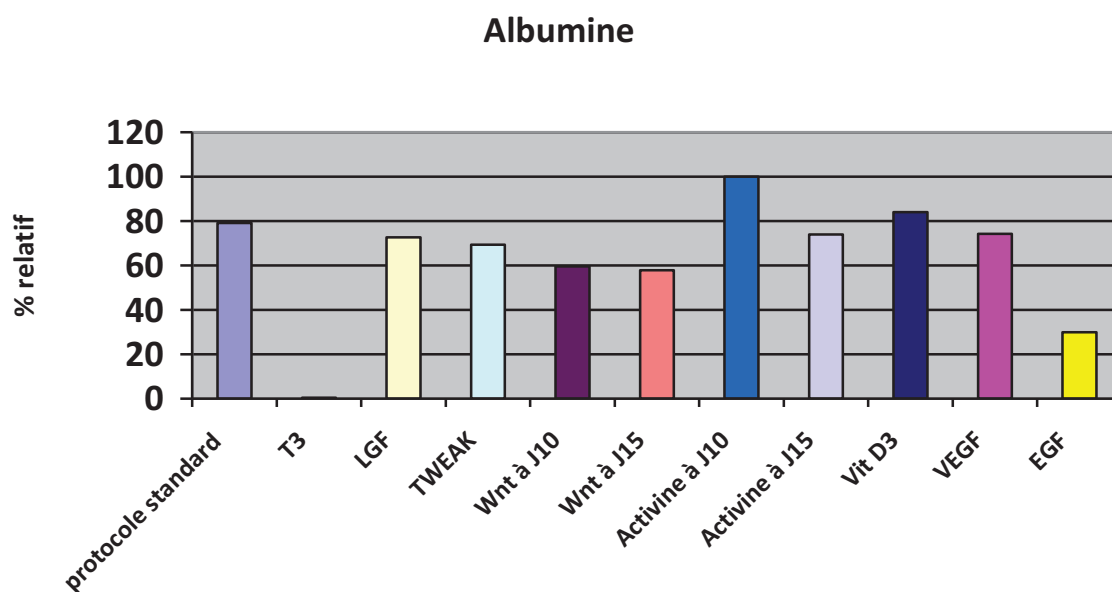


Figure 27. Comparaison de l'expression d'albumine par qRT-PCR chez les hES-Hep au bout de 27 jours de culture

- Effet de différents milieux de culture

A partir de J10, 5 milieux de culture ont été testés, leurs caractéristiques sont resumés dans le tableau ci-dessous.

Milieu	Composition	Remarques
ES	KO-DMEM 90% KO-SR 10% Glutamine 1% AANE 1% β -mercaptoéthanol 0,1% FGF2 10 ng/ml	Milieu de culture des hES, utilisé dès J0, pendant les étapes d'induction de l'endoderme définitif et spécification
Milieu A	IMDM 75% Ham F12 25% N2 0,5X B27 0,5X Penicilline/Streptomycine 1% Glutamine 2mM AAP 500X β -mercaptoéthanol Albumine de sérum bovin 0,05%	Version modifiée du milieu utilisé pour la différenciation d'ES par Gouon-Evans et al (Gouon-Evans et al., 2006)
Milieu B	William's E medium Acide linoléique 5.35 μ g/ml Pyruvate de sodium 550 mg/l AAP 0,2 mM Nicotinamide 10 mM Heparine 50 ng/ml ITS 100X Hydrocortisone 0,1 μ M	Version modifiée du milieu de culture pour hépatocytes foetaux utilisé par Lazaro et al (Lazaro et al., 2003)
Milieu de Verfaillie	DMEM low glucose 60% MCDB 201 1,441g/l 40% ITS+1 1X Hydrocortisone 1000X/Dex 5 μ M AAP 500X 10 ⁻⁴ M Pénicilline/Streptomycine 100X Glutamine 100X	Version modifiée du milieu de différenciation des MAPCs utilisé par Schwartz et al (Schwartz et al., 2002). Ce milieu était utilisé avec l'adjonction de Matrigel (Gross-Steinmeyer et al., 2005)
Milieu HCM	Milieu HCM™ AAP Albumine de sérum bovin Hydrocortisone Transferrine Insuline rhEGF Gentamycine-Amphotéricine	Milieu pour culture d'hépatocytes commercialisé par Lonza (www.lonza.com)

Milieu	Composition	Remarques
Milieu SAGM (small airway epithelial growth media)	Milieu SAGM™ BPE Insuline Hydrocortisone Gentamycine-Amphotéricine Acide rétinoïque	Milieu commercialisé pour la culture des cellules épithéliales des voies aériennes (www.lonza.com)
Milieu pour cellules endothéliales (MCE)	MCDB 131 (EMK-2) IGF1 20 ng/ml vEGF 0,5 ng/ml FGF2 10 ng/ml Hydrocortisone 1µM EGF 10 ng/ml Héparine 10 U/ml AAP Glutamine	Milieu basé sur le milieu de culture de HUVEC (human umbilical vein endothelial cells)
Milieu HepaRG	William's E medium L-glutamine Insuline 5µg/ml Hydrocortisone 50µM EGF 20 ng/ml	(Parent et al., 2004)

AANE : acides aminés non essentiels
 DMEM : Dulbecco's modified eagle medium
 IMDM : Iscove's modified Dulbecco's medium
 AAP : acide ascorbique-2-phosphate
 rhEGF : recombinant human EGF
 BPE : bovine pituitary extract

Tableau 5. Milieux de culture testés pour les hES-Hep

Les premiers milieux testés ont été les milieux ES, A et B. Les milieux A et B ont été utilisés à partir de J10. Par rapport aux milieux ES et B, le milieu A a induit l'expression d'albumine à J21 de façon nettement plus importante.

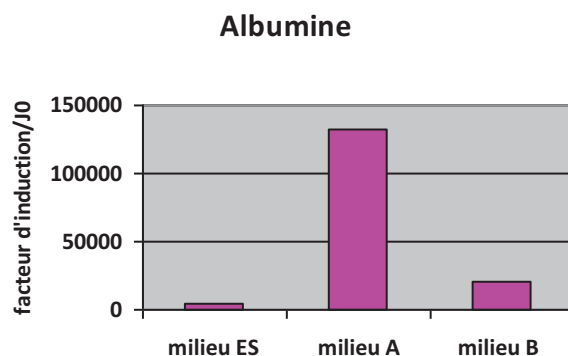


Figure 28. Comparaison de l'expression d'albumine à J21 par qRT-PCR

Les résultats PCR ont été confirmés en Western Blot (milieu en contact avec les hES-Hep de J18 à J21).

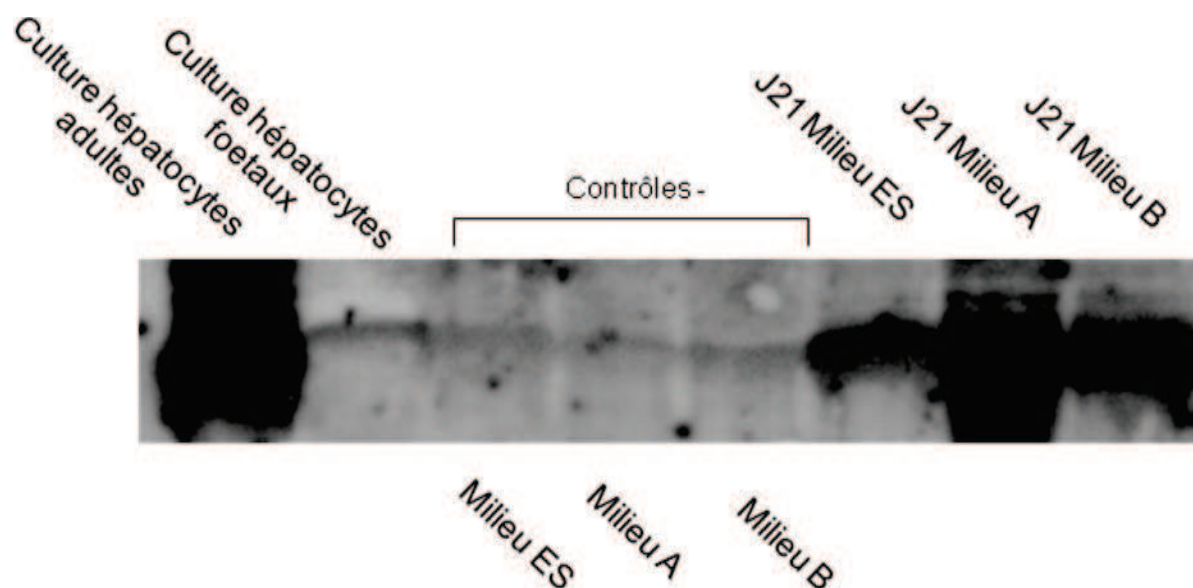


Figure 29. Western Blot évaluant la sécrétion d'albumine et comparant les différents milieux de culture à J21.

Par la suite, le milieu A a été comparé au milieu de Verfaillie (avec Matrigel) et à l'HCM. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le milieu de Verfaillie-Matrigel. Le rajout de

Matrigell dans le milieu de culture (Matrigel overlay) peut améliorer l'expression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques (Gross-Steinmeyer et al., 2005).

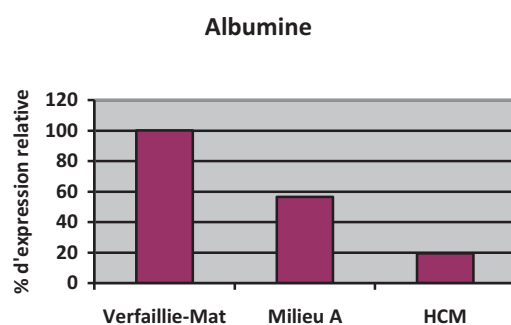


Figure 30. Comparaison de l'expression d'albumine par qRT-PCR à J22

L'ensemble des milieux a été comparé. Les résultats étaient variables selon le gène étudié. Globalement, le milieu de Verfaillie-Matrigel obtenait les meilleurs résultats. C'est ce milieu qui a été utilisé pour la suite des travaux. A partir de J10, les cellules ont été cultivées sur collagène, un support qui permet le maintien de HHCP en culture prolongée (Ferrini et al., 1997).

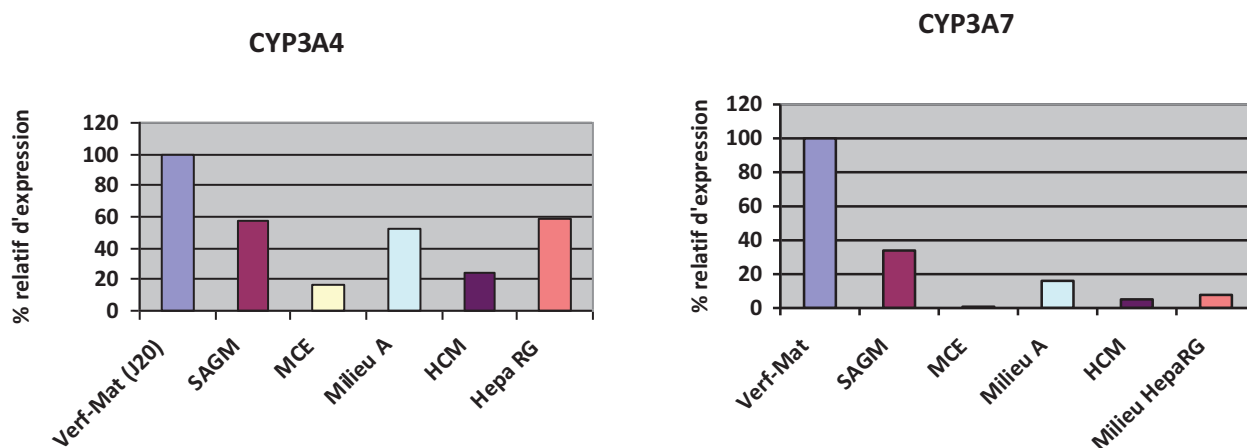


Figure 31. Comparaison de l'expression de CYP3A4 et CYP3A7 par qRT-PCR quantitative à J29

- Effet de molécules inductrices sur l'expression des CYP450

En rajoutant un mélange d'inducteurs (phénobarbital, rifampicine, 3-méthylcholanthrène) pendant les 24 dernières heures de culture, une augmentation de l'expression de CYP3A7 et 3A4 a été observée.

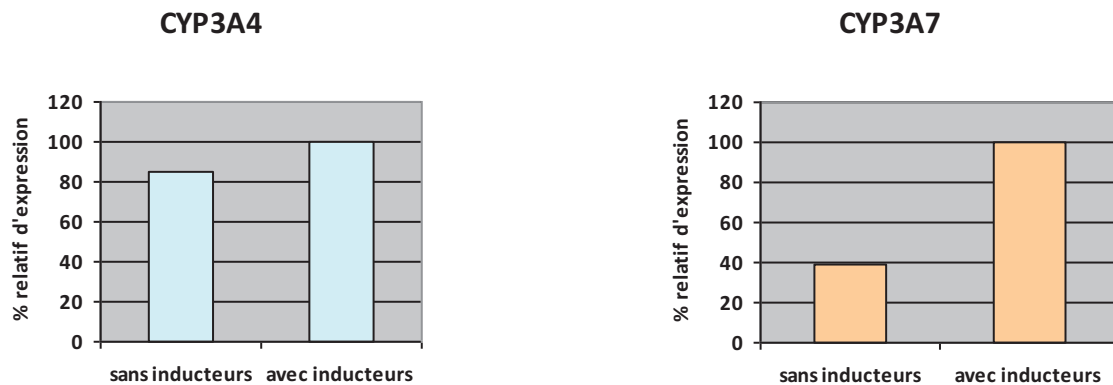


Figure 32. Etude par qRT-PCR de l'effet d'inducteurs sur l'expression de CYP3A4 et CYP3A7 à J27

- Prolongation de la durée de culture

Une durée de culture au-delà de 21 jours n'augmente pas l'expression des marqueurs hépatiques, avec même une tendance à la baisse de celle-ci.

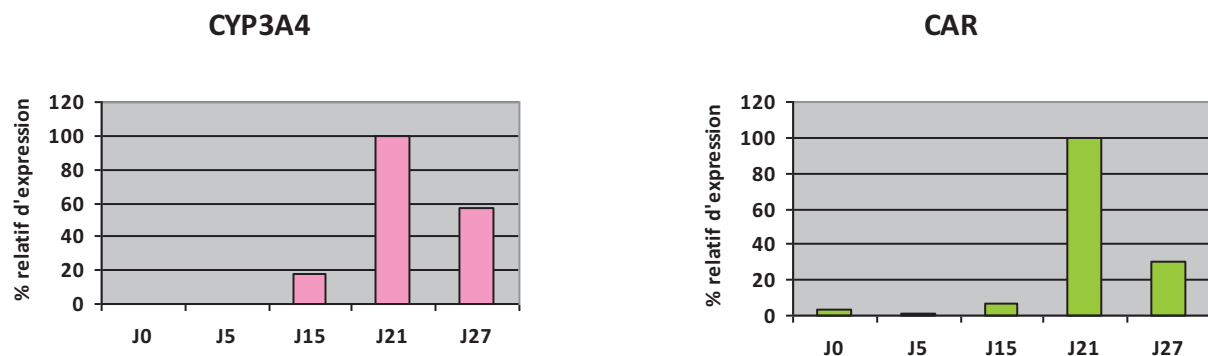


Figure 33. Evolution de l'expression de CYP3A4 et CAR dans le temps évaluée par qRT-PCR

2. Article

Differentiation of human embryonic stem cells to hepatocyte-like cells: CAR transduction activates a battery of detoxication genes.

N Funakoshi, C Duret, JM Pascussi, P Blanc, P Maurel, M Daujat-Chavanieu, S Gerbal-Chaloin.

Stem Cell Rev. 2011 Sep;7(3):518-31.

Comparison of Hepatic-like Cell Production from Human Embryonic Stem Cells and Adult Liver Progenitor Cells: CAR Transduction Activates a Battery of Detoxification Genes

Natalie Funakoshi · Cédric Duret ·
Jean-Marc Pascussi · Pierre Blanc · Patrick Maurel ·
Martine Daujat-Chavanieu · Sabine Gerbal-Chaloin

Published online: 6 January 2011

© The Author(s) 2011. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract In vitro production of human hepatocytes is of primary importance in basic research, pharmacotoxicology and biotherapy of liver diseases. We have developed a protocol of differentiation of human embryonic stem cells (ES) towards hepatocyte-like cells (ES-Hep). Using a set of human adult markers including CAAT/enhancer binding protein (C/EBP α), hepatocyte nuclear factor 4/7 ratio (HNF4 α 1/HNF4 α 7), cytochrome P450 7A1 (CYP7A1), CYP3A4 and constitutive androstane receptor (CAR), and fetal markers including α -fetoprotein, CYP3A7 and glutathione S-transferase P1, we analyzed the expression of a panel of 41

genes in ES-Hep comparatively with human adult primary hepatocytes, adult and fetal liver. The data revealed that after 21 days of differentiation, ES-Hep are representative of fetal hepatocytes at less than 20 weeks of gestation. The glucocorticoid receptor pathway was functional in ES-Hep. Extending protocols of differentiation to 4 weeks did not improve cell maturation. When compared with hepatocyte-like cells derived from adult liver non parenchymal epithelial (NPE) cells (NPE-Hep), ES-Hep expressed several adult and fetal liver makers at much greater levels (at least one order of magnitude), consistent with greater expression of liver-enriched transcription factors Forkhead box A2, C/EBP α , HNF4 α and HNF6. It therefore seems that ES-Hep reach a better level of differentiation than NPE-Hep and that these cells use different lineage pathways towards the hepatic phenotype. Finally we showed that lentivirus-mediated expression of xenoreceptor CAR in ES-Hep induced the expression of several detoxification genes including CYP2B6, CYP2C9, CYP3A4, UDP-glycosyltransferase 1A1, solute carriers 21A6, as well as biotransformation of midazolam, a CYP3A4-specific substrate.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12015-010-9225-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

N. Funakoshi · C. Duret · J.-M. Pascussi · P. Blanc · P. Maurel ·
M. Daujat-Chavanieu · S. Gerbal-Chaloin
INSERM,
U632, Montpellier, France

N. Funakoshi · C. Duret · J.-M. Pascussi · P. Blanc · P. Maurel ·
M. Daujat-Chavanieu · S. Gerbal-Chaloin (✉)
Institute of Research in Biotherapy,
CHU Montpellier, Hopital Saint Eloi,
80 Av Augustin Fliche,
34295, Montpellier cedex 5, France
e-mail: sabine.gerbal-chaloin@inserm.fr

N. Funakoshi · C. Duret · J.-M. Pascussi · P. Blanc · P. Maurel ·
M. Daujat-Chavanieu · S. Gerbal-Chaloin
Université MONTPELLIER1, UFR Médecine,
Montpellier, France

N. Funakoshi · P. Blanc
Service d'Hepato-Gastroenterologie B,
CHU Montpellier, Hopital Saint Eloi,
80 Av Augustin Fliche,
34295, Montpellier cedex 5, France

Keywords Human embryonic stem cells · Adult hepatic progenitors · Hepatic differentiation · Hepatocyte · Maturation · Lentivirus vector · Detoxification

Abbreviations

hES	Human embryonic stem cell
ES-Hep	Embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells
NPE-Hep	non parenchymal epithelial cell-derived hepatocyte-like cells
PCHH	primary cultures of human hepatocytes
TO	tryptophan 2,3-dioxygenase
TAT	tyrosine aminotransferase

GS	glutamine synthetase
G6P	glucose-6-phosphatase
PEPCK	phosphoenolpyruvate carboxykinase
SLC2A2	Glut2
CPS1	carbamoyl phosphate synthase
PKL	pyruvate kinase of liver
CYP7A1	cholesterol 7 α -hydroxylase
ALB	albumin
AAT	alpha-1 antitrypsin
AFP	alpha fetoprotein
TTR	transthyretin
FIB	Fibrinogen
ApoH	Apolipoprotein H
FII	blood coagulation factor II
FV	blood coagulation factor V
CYP	Cytochrome P450
POR	Cytochrome P450 reductase
UGT	UDP-glycosyltransferase
GST	Glutathione S-transferase
PXR,	pregnane X receptor
NR1I2	
CAR,	constitutive androstane receptor
NR1I3	
AhR	aryl hydrocarbon receptor
GR,	glucocorticoid receptor
NR3C1	
MRM	Multiple Reaction Monitoring

Introduction

Orthotopic liver transplantation is currently the only means to efficiently cure liver failure regardless of origin (drugs, alcohol or viral infection). However, liver donor scarcity strongly limits this approach. New strategies to produce human hepatocytes are therefore needed. These are based on the proliferative capacity of human embryonic stem (hES) cells and adequate protocols of *in vitro* differentiation towards mature hepatocytes. Moreover, due to the wide range of functions performed by the liver, hepatocytes derived from hES cells (ES-Hep) can be a useful tool for basic research and pharmacotoxicology.

One of the earliest commitment steps in embryogenesis is the formation of the primary germ layers ectoderm, mesoderm and endoderm, the founder populations of all somatic cell types in the body [1]. The liver develops from definitive endoderm (DE) that is generated from the anterior primitive streak (PS). Along the PS an inverted gradient of TGF β /Nodal/Activin and Wnt/ β catenin constitutes a signaling environment that is responsible for the induction of the hepatic lineage [2]. The cardiac mesoderm and septum transversum mesenchyme induce hepatic specification of the adjacent endodermal

epithelium through bone morphogenetic protein (BMP2-4) [3] and fibroblast growth factor (FGF1-2-8) signaling [4, 5]. At this stage, endothelial cells seem to have an organogenic role and provide a crucial growth stimulus for hepatic bud formation [6]; the cells are thereafter referred to as hepatoblasts. Although these cells already express some genes specific to fully differentiated hepatocytes, such as serum albumin, in the fetal liver hepatoblasts give rise to hepatocytes and bile duct cells (cholangiocytes). The hepatic versus bile duct phenotype specification process is not yet fully understood; nevertheless Notch [7] and TGF- β /activin pathways [8] seem to play crucial roles in this cell-fate decision.

During mid and late fetal life, the liver is the major hematopoietic organ. The secretion by hematopoietic cells of oncostatin M (OSM) coordinates the late stages of embryonic liver development and promotes the maturation of fetal hepatoblasts into hepatocytes [9]. This final maturation step also involves HGF (Hepatocyte Growth Factor), soluble compounds (glucocorticoid, insulin...), extracellular matrix components and cell-cell interaction and cooperation [10]. At birth, the function of the liver shifts from hematopoiesis to homeostasis and detoxification. Numerous adult functions are acquired and fetal ones are lost.

If liver development is well described in rodents, information is scarce concerning human development. Important differences exist between these species, as documented for many genes [11–18]. In addition, liver lobule architecture is established at birth in rodents, whereas it appears to be already specified at week 20–22 of gestation in humans, which may have a strong impact on the pattern of metabolic activities [19, 20]. It is therefore necessary to take these differences into account when considering hES differentiation towards hepatocytes. Recent studies from this [21] and other laboratories [22] have allowed to identify genes that are true markers of human liver maturation.

In the last five years, numerous papers have reported the generation of hepatocytes from human embryonic stem cells [23–29]. In most cases, these studies used HepG2 as a reference hepatic cell, or used the time-dependent increase of hepatic markers as a means to follow differentiation. The aim of this work was to investigate the differentiation of hES towards hepatocytes using several reference cell/tissue types including fetal and adult liver tissues, adult primary human hepatocytes and adult liver progenitors [30, 31].

Materials and Methods

Chemicals

Growth factors (Activin A, FGF, HGF, BMP, OSM) were obtained from Peprotech (Neuilly sur Seine, France). Mouse Wnt3a was from Chemicon (Hants, England).

Culture medium and supplements are from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Collagen I coated plates and Matrigel are from Becton-Dickinson (Le Pont de Claix, France). LY294002, DMSO, clotrimazole and midazolam are from Sigma.

Cell Culture and Differentiation

Human embryonic stem cells HUES-1 (obtained from Dr Douglas Melton, Harvard University) were cultured and amplified onto mouse embryonic fibroblasts (MEF), using DMEM medium supplemented with 10% KO-SR and 10 ng/ml FGF2. For differentiation, a single cell suspension of hES was transferred to a Matrigel™ coated plate (40 µg/cm²) and maintained in MEF conditioned medium (CM) for 24–48 h. When cells reached 50% confluence, medium was replaced by an endoderm priming medium for 5 days consisting of DMEM 5.5 mM glucose, 2 mM glutamine, 0.1 mM non essential amino-acid, 10% KO-SR supplemented with Activin A (100 ng/ml), FGF2 (10 ng/ml), Wnt3a (25 ng/ml) and LY294002 (30 µM). The medium was changed daily. For hepatic induction, KO-SR was reduced to 2% and supplemented with BMP4 (50 ng/ml), FGF4 (25 ng/ml) and 1% DMSO (Fig. 1a). For the differentiation process, cells were transferred to collagen I coated dishes in a medium consisting of 60% low glucose DMEM, 40% MCDB-201, supplemented with insulin-transferrin-selenium (ITS+1), 5 µM dexamethasone, 0.1 mM ascorbic acid 2-phosphate, 20 ng/ml HGF, 25 ng/ml FGF4, 10 ng/ml Oncostatin M (OSM). After 24 h, cold medium supplemented with 0.3 mg/ml Matrigel™ was added to the cells. Medium (without Matrigel addition) was then changed twice a week.

Other Liver Cells

HepG2-C3 hepatocellular carcinoma cell line was obtained from ATCC and cultured as recommended. Non parenchymal epithelial cells (NPE) were isolated, cultured and differentiated as described previously [31]. Human Fetal Liver (FL) samples (20 and 23 weeks) were obtained from CliniSciences (Montrouge, France). A mix of five human Adult Liver (AL) mRNA samples isolated from five lobectomies, and a mix of six mRNA samples isolated from Primary Cultures of Human Hepatocytes (PCHH) cultured for 3–4 days in ISOM medium [32] were used as references.

RNA Isolation and RT-PCR

After extraction with Trizol reagent (Invitrogen), 1 µg of total RNA was reverse-transcribed using random hexamer and the MMLV reverse transcriptase kit (Invitrogen).

Quantitative PCR was performed using Roche SYBER Green reagent and LightCycler 480 apparatus (Roche Diagnostic, Meylan, France). Amplification specificity was evaluated by determining the product melting curve. The expression of RPLP0 mRNA was used for relative quantification. Results are expressed as relative mRNA levels or as the percentage of mRNA expression in PCHH as indicated in figure legends. Sequences of primers are summarized in Table S1. The following program was used: one step at 95°C for 10 min, 50 cycles of denaturation at 95°C for 10 s, annealing at 65°C for 15 s, elongation at 72°C for 15 s. miR-122 was quantified by RT-PCR as described [33].

Western Blotting

The secretion of proteins in 4 day-aliquots of culture media was assayed by western blotting. Primary antibodies directed against human albumin, alpha-1 antitrypsin (AAT) (Dako Cytomation, Trappes, France) factor II (FII), factor V (FV) (USBiological), alpha-fetoprotein (AFP) (Thermo Fisher Scientific, Runcorn, UK) or fibrinogen (Sigma) were used at 1/1000 dilution. Anti-mouse, -goat or -rabbit horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were used at 1/10000, and chemiluminescent signal detection was performed with the ECL Western Blotting Detection kit (Amersham, England).

ELISA

Albumin and AAT proteins were quantified in 4 day-aliquots of culture media using AssayPro ELISA Kits (St Charles, MO) as recommended.

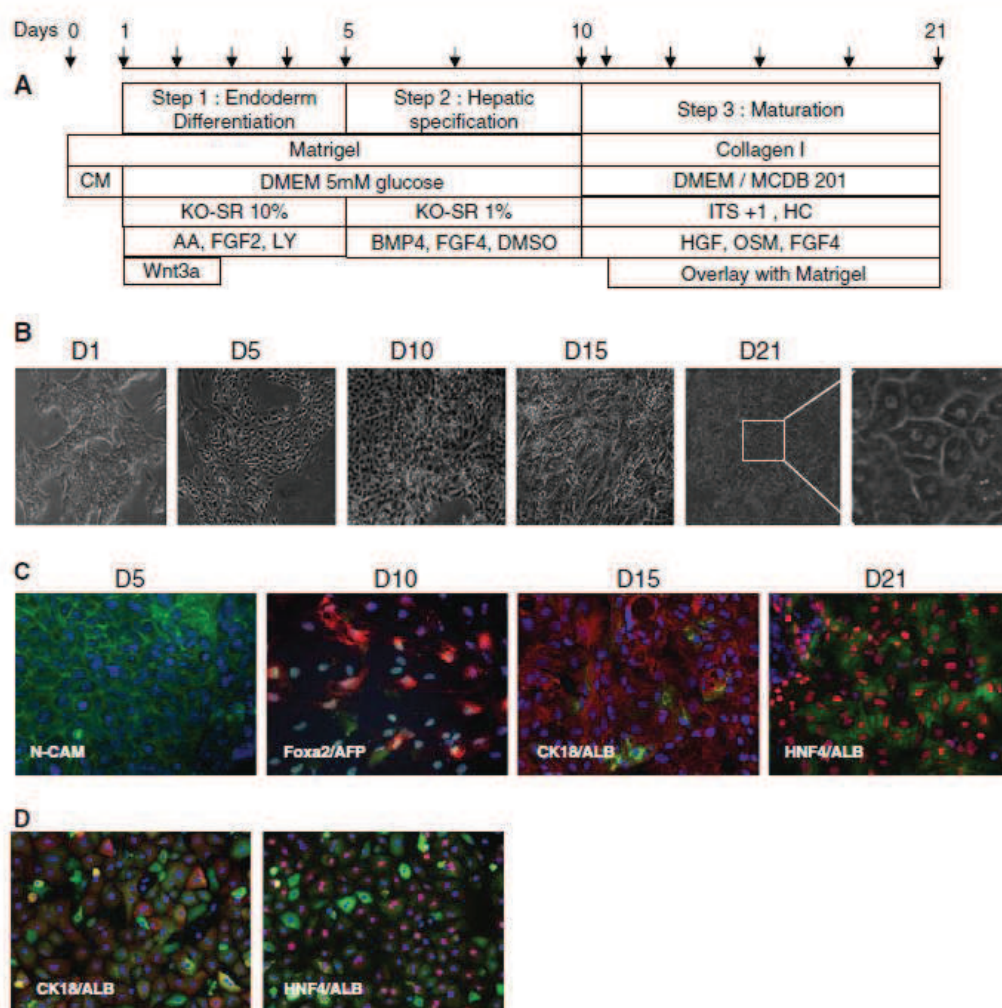
Urea Assay

The urea production in 4 day-aliquots of culture media was assayed by a colorimetric assay (Gentauro, Brussel, Belgium) as previously described [30].

Indirect Immunofluorescence

Fixed cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 in TBS for 5 min. Mouse antibodies directed against N-CAM (NeoMarkers) and cytokeratin 8/18 (NovoCastra), rabbit antibodies directed against HNF4 (Santa-Cruz) and AFP (Thermo Fisher Scientific), goat antibody directed against FOXA2 (R&D) and goat antibody-FITC directed against human albumin (Bethyl Laboratory) in PBS 3% FCS were applied to the cells for 1 h at room temperature. After washing, cells were incubated with anti-mouse Alexa-488, anti-rabbit or anti-goat Alexa-568 secondary antibodies (1/1000 dilution, Invitrogen) for 45 min at room temperature.

Fig. 1 Differentiation of hES cells. **A)** Protocol. Arrows indicate medium renewal. **B)** Photomicrographs of morphological changes during differentiation. **C)** and **D)** immunofluorescence analysis of N-CAM, FOXA2, AFP, HNF4, CK8-18 and Albumin in ES-Hep and PCHH. Only overlays (FOXA2-green/AFP-red; ALB-green/CK8-18 or HNF4-red) are shown here. See Supplementary Fig. 2 for further detail



Nuclei were labeled with Hoechst 33258. Immunofluorescent labeling was examined under a fluorescent microscope (Leica Microsystem, Rueil-Malmaison, France) and images were analyzed using Metamorph software (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA).

LDL Uptake

After 21 days of differentiation Hep-ES were incubated with 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Dil-LDL (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate, Molecular Probes, Eugene, OR) for 4 h in culture medium. Cells were washed with PBS and fixed in 3.2% formaldehyde. For nucleus staining, cells were incubated for 1 h with 3 μM Hoechst 33258 without permeabilization. Cells were examined as indicated above.

Glycogen Uptake

After 21 days of differentiation, the storage of glycogen in Hep-ES was evaluated using the Periodic Acid Schiff Assay staining as recommended by the manufacturer (Sigma).

Lentivirus

FG12-CMV and the FG12-hCAR were obtained after amplification of the CMV or the CMV-hCAR cassettes (pcDNA3-CMV Hpa-1 F: acGTTAAC CGTTGACATTGATTATTGAC; pcDNA3-Hpa-1 Rev: acGTTAACGatcagcgggttaaactc) from the pcDNA3 or the pcDNA3-hCAR (gifts from Masahiko Negishi, NIEHS, NC USA) plasmids and insertion into Hpa-1 linearized FG12 [34]. Lentivirus production and cell transduction were performed as previously described [35, 36]. HepG2-C3 and ES-Hep were transduced at D15 or D20, respectively, with 10 and 10, 20 and 50 μl of lentivirus solution and analyzed 3, 7 and 10 days later, after treatment with or without clotrimazole for the last 24 h.

Metabolic Activity

After 21 days of differentiation hES-Hep cells were incubated with 5 μM midazolam. At 24 h, 400 μL of acetonitrile/water (30/10, v/v) were added to each well and extracellular medium and cell homogenate were mixed and submitted to analysis for substrate and metabolites by LC/MS-MS, using MassLynx 4.0 Software (Waters-Micromass, Milford MA).

Results

In vitro Production of Definitive Endoderm (DE): Effect of Glucose and Wnt3a

The differentiation protocol used for HuES-1 cells is illustrated in Fig. 1a. This protocol is based on previous papers that emphasized the role of stimulatory factors such as Activin, LY294002, Wnt3a, DMSO, KO-SR [29, 37–41]. mRNA expression of mesendodermal and endodermal markers was analyzed from D1 to D5 (Fig. 2a). As expected, Brachyury (mesendodermal marker) mRNA reached a maximum at D2 and decreased thereafter. Note that the maximum level was greater and the decrease sharper in low glucose medium. No significant effect of glucose concentration was observed in the induction kinetics of endodermal marker transcripts Sox17, CXCR4, FOXA2, and HEX. However, while these transcript levels decreased between D4 and D5 in high glucose (25 mM) medium, they were maintained at their maximum up to D5 in low glucose (5.5 mM)

medium. Thus, DMEM culture medium containing 5.5 mM glucose was routinely used.

In the next series of experiments, HuES-1 cells were cultured as described above in the absence or presence of Wnt3a (25 ng/ml) for 48 (D1 to D3) or 96 h (D1 to D5) (Fig. 2b). The mRNA expression of mesendodermal (Brachyury) and primitive streak (MIXL1) markers increased with the duration of Wnt3a treatment. However, while mRNA levels of DE markers (Sox17, CER, GSC, HEX, FOXA2 and CXCR4) were strongly increased (4.8 to 33-fold) by Wnt3a exposure between D1 and D3, prolonged Wnt3a exposure (D1 to D5) led to a decrease in DE marker levels. In contrast, ZIC1 (ectodermal marker) mRNA level was strongly reduced by Wnt3a, while Sox7 (visceral endoderm marker) mRNA expression was not affected. Thus, transient exposition of cells to Wnt3a from D1 to D3 was routinely used to induce the DE. During this step, the cells became larger with dark cytoplasm and adopted a more mesenchymal aspect (Fig. 1b–D5), as confirmed by N-CAM expression (Fig. 1c–D5).

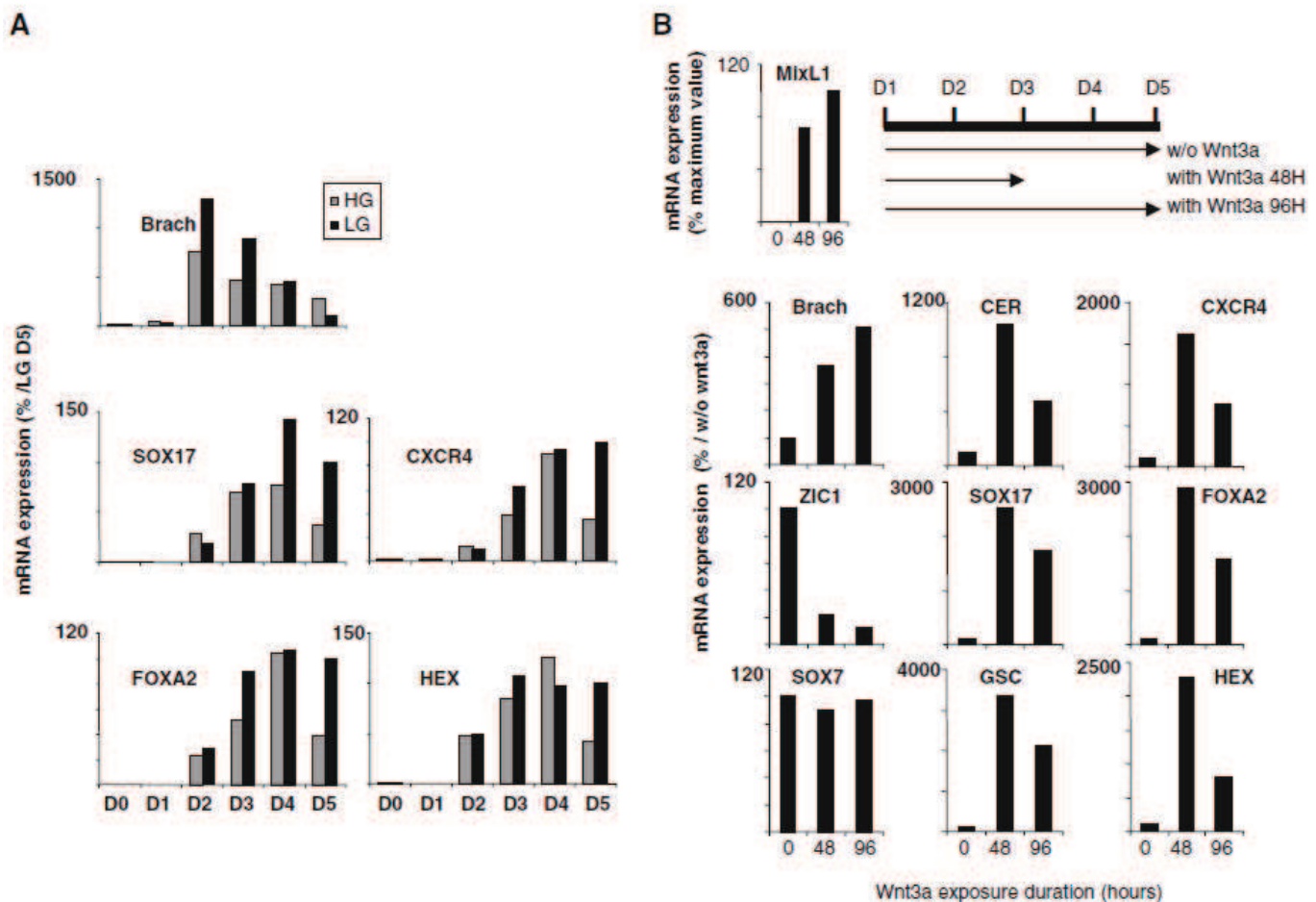


Fig. 2 Optimization of DE specification. **a** Effect of high (HG) and low (LG) glucose on mRNA expression of development markers (reference level 100 with LG at D5). **b** Effect of Wnt3a on mRNA

expression of development markers (reference level 100 without Wnt3a at D5)

Hepatic Specification

Hepatic specification was induced between D5 and D10 (Fig. 1a). In contrast to Jung et al. [42] and in agreement with Cai et al. [25], we observed that different combinations and doses (25–100 ng/ml) of BMPs and FGFs produced similar effects on the rate of this step (Supplementary Fig. 1A). Thus, for further experiments, we associated BMP4 and FGF4 at 50 and 25 ng/ml, respectively. We further observed that using 1% DMSO, previously reported as an epigenetic modulator [43], and decreasing KO-SR concentration to 2% increased the expression level of albumin, AFP, AAT, HNF4 α 7, HNF4 α 1 and FOXA2 mRNAs (Supplementary Fig. 1B–C). At D10, most of the cells expressed FOXA2/HNF3 β and AFP as shown in Fig. 1c and supplementary Fig. 2A.

Hepatic Maturation

Cell substratum has a strong impact on stem cell differentiation towards hepatocytes [44]. At D10, cells were trypsinized and replated on type-I collagen-coated plates, in a medium containing HGF, FGF4, insulin and glucocorticoids as used by others for MAPC differentiation towards hepatocytes [45]. This medium was complemented with OSM [46]. As first shown in mouse fetal hepatocytes [46] and parenchymal epithelial cells (NPE) [31], matrigel overlay had a stimulating effect on the maturation step. We therefore routinely used this additive at 0.3 mg/ml in this protocol at D11. Morphological changes during maturation are shown in Fig. 1b. Between D15 and D21, clusters of cells displayed a typical aspect of primary binucleated hepatocytes. Immunofluorescence analysis revealed time-dependent increased expression of ALB which colocalizes with CK8/18 (D15) and HNF4 (D21) (Fig. 1c and supplementary Fig. 2A). A similar pattern is observed in PCHH as shown in Fig. 1d and supplementary Fig. 2b. At D21, it can be seen that a significant proportion of cells do not express ALB and/or HNF4. We therefore evaluated the percentage of cells expressing ALB by immunofluorescence and FACS analysis. As shown in supplementary Fig. 3, this cell population represents 40% of the total number of cells in culture.

Differentiation of hES Cells to Hepatocyte-like Cells

In order to characterize the phenotype of hES-derived hepatocyte-like cells (ES-Hep), several markers were compared with those evaluated in NPE-derived hepatocyte-like cells (NPE-Hep) [30, 31], primary cultures of adult human hepatocytes (PCHH, $n=6$), adult liver tissue (AL, $n=5$), and fetal liver tissue (FL, mix of samples at 20–23 weeks gestational age). Hepatocellular carcinoma

HepG2-C3, considered as the most differentiated HepG2 clone was analyzed in parallel (Table 1). Note that, expression of markers was weighted by the percentage of cells expressing ALB at D21 (see column hES D21*).

Expression of Liver Enriched Transcription Factors

Hepatocyte-lineage genes are primarily regulated at the transcriptional level [47]. Analyzing transcription factor expression levels is therefore mandatory. C/EBP α and a HNF4 α 1/HNF4 α 7 ratio >1 [48] are generally considered as adult hepatocyte markers. FOXA2, HNF4 α 1, HNF4 α 7 and C/EBP α mRNA levels sharply reached maximum levels at D10 or D15 and decreased 2- to 5-fold at D21, except for HNF4 α 7 (Table 1A). In contrast, HNF1, HNF6, C/EBP β and XBP-1 mRNA expression increased slowly, reaching maximum levels at D21, close to levels in PCHH. At D21, the HNF4 α 1/HNF4 α 7 ratio was clearly <1 as in fetal liver.

Secreted Plasma Proteins

ALB, AAT, TTR, ApoH, FV and FII mRNAs were expressed at very low or non existent levels before D15 (Table 1B), and sharply increased at D15 or D21. AFP, a well known fetal marker, exhibited a tremendous increase between D10 and D15 to reach a level approximately ten times greater than that found in fetal liver. At D21, the expression of ALB, AAT and TTR was greater than in PCHH, while expression of ApoH, FII and FV was lower than that observed in PCHH. The expression of all transcripts was greater than that observed in HepG2-C3 cells, except for ApoH and FV. While AFP protein was not expressed in PCHH (Fig. 3a), expression levels of ALB, AAT, and FV proteins were similar to those observed in PCHH, consistent with transcript levels. Fibrinogen (FIB) was highly expressed in ES-Hep in comparison to PCHH, while the opposite was observed for FII (Fig. 3a). The findings concerning ALB and AAT were confirmed by ELISA (Fig. 3b).

Metabolism

Hepatocytes play crucial roles in amino acid metabolism (TO, TAT, GS), insulin-regulated glucose homeostasis [49] (G6P, PEPCK, SLC2A2), urea (CPS1), bile acid synthesis (CYP7A1) [50], and lipid homeostasis [51]. Apart from GS, none of these transcripts was significantly expressed at D1 and all exhibited a major increase between D15 and D21 (Table 1C), consistent with transcription factor expression before or at D15 (Table 1A). Indeed, G6P and PEPCK are HNF4- and C/EBP α -target genes, and Glut2 is a FOXA2- and HNF6-target gene [47]. At D21, TO, PEPCK, Glut2, CPS1 and PKL reached levels admittedly lower but close to those measured in PCHH.

Table 1 Quantitative RT-PCR analysis of mRNA expression of hepatic markers during hES differentiation (from D1 to D21) in comparison with NPE differentiation (D1 to D18), FL, AL and HepG2-C3. mRNA levels quoted in this table have been normalized with respect to corresponding levels in PCHH arbitrarily taken as 100

	hES D1	hES D5	hES D10	hES D15	hES D21	hES D21*	NPE D1	NPE D7	NPE D18	FL	HepG2- C3	AL	PCHH
A - Transcription Factors													
FOXA2	0.7	56	256	54	56	140	15	16	13	264	73	203	100
C/EBP α	0.03	0.08	0.2	13.5	5	12.5	0	0	0.2	0.3	0.2	1400	100
C/EBP β	2	2	3.5	10.5	22.5	56.2	51	62.5	61.5	189	116	219	100
HNF4 α 1	0.009	0.01	128	73	62	155	0.4	11	21	85	72	188	100
HNF4 α 7	0.7	1.8	123	75	159	397	1.2	33	17	135	85	53	100
Ratio α 1/ α 7	0.01	0.005	1	1	0.4	0.4	0.3	0.3	1.2	0.6	0.8	3.5	1
HNF1 α	0	0	4	21	35	87.5	0.4	15	11	252	72	132	100
HNF6	2.7	0.7	2.8	97	339	847.5	0.08	0.07	0.2	758	91	299	100
XPB1	12	5.2	20.6	51	80	200	24	50	69	306	126	354	100
B - Secreted plasma proteins													
AAT	0	0.1	1.3	138	472	1180	4.5	45	160	572	64	284	100
ALB	0	0.1	0.3	0.6	201	502.5	0.6	6.6	290	502	24	264	100
AFP	0	5	1443	1.10 ⁷	2.10 ⁷	5.10 ⁷	0	80	432	2.10 ⁶	7.10 ⁵	1056	100
TTR	0	0	35	1021	441	1102	nd	nd	1.2	160	18.7	619	100
ApoH	0	0	0	1.2	21.2	53	0	0.5	26	337	78	1315	100
FII	0	0	1.3	10.8	35.1	87.7	nd	nd	0.3	261	0.5	230	100
FV	0	0	0.075	14.4	75	187.5	0.5	7.1	21.2	504	111.3	430	100
C - Metabolism													
TO	0.7	0.01	0.05	10.2	10.2	25.5	0.1	8.8	13.3	65	0.03	2840	100
TAT	0	0	0	0.05	0.5	1.25	0.01	0.1	0.8	21	1.3	201	100
G6P	0	0	0	32	1150	2875	0.02	3.3	300	1072	18	4843	100
PEPCK	0.03	0.05	0.2	9.9	24.8	62	0.2	0.3	8.7	4431	11	9218	100
Glut2	0	0	0	3	63.3	158	2	5	7.9	1162	57.3	956	100
CYP7A1	0	0	0	0.12	14.7	36.75	0	0	0	0.06	0.6	1494	100
GS	34	41	220	76	183	457.5	119	214	327	651	193	398	100
CPS1	0.4	0.1	0.3	17.2	55.4	138.5	0.2	0.4	2.4	100	1.21	264	100
PKL	0.4	0.04	0.2	1.2	14	35	0.03	0.08	0.4	514	5.5	509	100
D - Detoxification													
CYP1A1	8	0.09	27	713	1865	4662	nd	nd	149	3.9	73	3902	100
CYP1A2	0.07	0	0.02	0.08	0.2	0.5	0	0	0.22	0	0.02	4275	100
CYP2B6	27.7	0.79	0	0.03	0.4	1	0	0.25	2.5	0.1	2.3	7436	100
CYP3A4	0	0	0.003	0.6	0.9	2.25	0.2	0.2	0.9	0.2	0.01	5429	100
CYP3A7	0	0	0	84	1.10 ⁵	2.510 ⁵	0	0	3.3	53630	5.4	264	100
POR	7	5.6	10.7	20.7	38.2	95.5	12.1	16.6	20.4	195	136	461	100
SLC21A6	0	0	0.003	0.2	0.3	0.75	0.05	0.7	0.3	491	0.005	1340	100
UGT1A1	0.03	0.01	0.01	0.2	1.6	4	25	1.5	0.6	0.08	0.08	234	100
GSTA3	0	0	31	2522	2470	6175	0	0	10.2	34	2.8	2919	100
GSTP1	4795	4189	4873	3722	2304	5760	1909	2603	2247	1643	3.1	383	100
E - Nuclear Receptors and Coactivators													
AhR	3	7.5	20	25	76	190	307	271	211	231	642	276	100
PXR	1	0.2	0.5	1.2	3	7.5	0.07	0.09	0.4	11	18	2900	100
CAR	0	0	0.3	27	9.5	23.7	0	0	0.5	0.3	0	1400	100
GR	9.7	7.7	16	63	124	310	136	202	190	524	289	217	100
SRC1	26	42	118	163	246	615	126.5	194.3	189.7	491	161	254	100
PGC1 α	10.4	9.8	25.5	30	136	340	94	265	218	856	581	1383	100
F - miRNA													
miRNA-122	0.008	0.08	0.2	1.4	17	42.5	nd	nd	nd	40	nd	nd	100

nd : not determined - 0 : not detected

0 - 25 %	26 - 50%	51 - 75%	76 - 100%	> 100
----------	----------	----------	-----------	-------

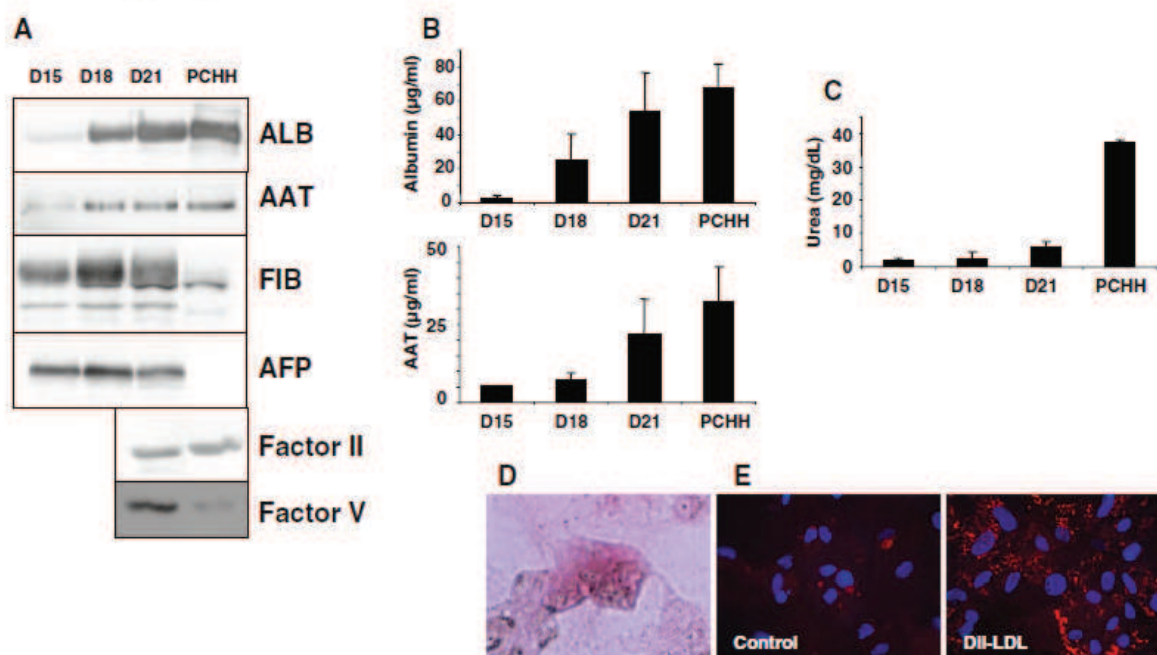


Fig. 3 Expression of plasma proteins in 4 days-aliquots of culture medium of ES-Hep after 15, 18 and 21 days of differentiation measured by Western-blot (a) and ELISA (b). Production of these

proteins by PCHH was analyzed in comparison. c Urea production. d Glycogen storage. e DiI-LDL uptake

TAT remained at a very low level with respect to PCHH while G6P exhibited level 10 times greater, as in FL. At D21, expression of CYP7A1 reached 15% of that observed in PCHH. As this gene is not expressed in FL (at week 24) it was considered as another marker of maturation, in agreement with previous observations in piglets [52]. Urea synthesis increased from D15 to D21 to reach 15% of the activity observed in PCHH (Fig. 3c). Finally, hES-Hep cells were able to store glycogen and uptake LDL as assessed by fluorescence labeling (Fig. 3d and e).

Detoxification

Xenobiotic biotransformation and excretion is dependent on the presence and distribution of phase I, phase II and transporter genes [53]. Cytochrome P450s (CYPs) are mixed function monooxygenases and are major phase I enzymes. In contrast to adult liver, fetal hepatocytes exhibit a modest detoxification function. CYP gene expression increases during liver ontogeny and is characterized by a strong expression of CYP3A7 in the human fetal liver [54]. In the perinatal period, expression of CYP3A7 decreases and that of CYP3A4 (its adult counterpart) increases [21]. As with CYP3A4, other CYPs including CYP2B6, CYP2C8/9 and CYP1A2 are major CYPs expressed in adult liver. In contrast to CYP1A2, CYP1A1 is also expressed in non hepatic tissues such as trachea and lung [54].

Except for CYP2B6, none of these genes was significantly expressed at D1, and all exhibited a major increase between D15 and D21 (Table 1D). CYP3A4 reached 1% of the level

detected in PCHH, while CYP3A7 expression was 100 times higher than in PCHH and close to that observed in FL. At D21, CYP1A1 was expressed at a high level in ES-Hep in contrast to CYP1A2. Surprisingly, CYP2B6 was expressed at a significant level in undifferentiated ES cells (corresponding to 25% of CYP2B6 mRNA in PCHH) and decreased rapidly thereafter. POR, the specific NADPH-dependent reductase involved in CYP enzyme function, was expressed at a significant level in undifferentiated cells (D1).

UGT1A1 is a glucuronidation enzyme exclusively expressed in adult liver [55] (Table 1D). Its mRNA expression increased during ES-Hep differentiation to reach 1.5% of PCHH mRNA levels. The mRNA expression of SLC21A6, a hepatospecific bilirubin transporter, was also induced during ES-Hep differentiation but only reached a very low level at D21 in comparison to PCHH. In contrast, SLC21A6 mRNA was expressed at a high level in FL as observed by others [56]. It is remarkable that GSTA3 and P1 levels were almost 20 times greater in ES-Hep as compared with PCHH. Moreover, GSTP1 was expressed at an even greater level in undifferentiated DE cells, in sharp contrast with GSTA3. Indeed, GSTP1 and GSTA3 are generally considered as fetal and adult markers, respectively.

Expression of Nuclear Receptor Implicated in Detoxification Function

In adult liver detoxification genes are transcriptionally regulated in part by xenoreceptors PXR (pregnane X receptor), CAR (constitutive androstane receptor) and

AhR (aryl-hydrocarbon receptor) [57–59]. CAR and PXR expression is regulated by HNF4 α 1 and GR [60]. PXR mRNA was detectable in undifferentiated HuES-1 cells, and its expression increased slightly from D10 to D21 to reach 3% of PCHH expression levels (Table 1E). CAR mRNA expression peaked at D15 (as observed with C/EBP α and TTR), representing 25% of PCHH expression level. This mRNA was barely detectable in FL and was considered as another marker of hepatocyte maturation. AhR was expressed at a significant level during the differentiation process, in accordance with the expression of its target gene, CYP1A1.

GR mRNA expression increased during differentiation to reach a level close to that of PCHH (Table 1E). Since GR is a central transcription factor for many cellular processes, we decided to evaluate its functionality. At D21, ES-Hep culture medium was depleted of dexamethasone for 16 h and then re-supplemented with 5 μ M dexamethasone for 24 h. The expression of a series of genes (supplementary Fig. 4) was analyzed before and after depletion, as well as 24 h after re-supplementation. The results provide clear evidence that this receptor is functional, as shown by the expected modulation of several target genes, TAT, CAR, PXR, CPS1, G6P and TTR. Interestingly, FOXA2 expression was not affected by dexamethasone, consistent with its expression reaching maximum levels at D10.

Expression of miRNA-122

miR-122 is liver specific and highly expressed at similar levels in human fetal liver (aged between 9 and 27 weeks) and adult liver [61]. In ES-Hep, its expression increased gradually during differentiation to reach a level close to 20% of that observed in PCHH (Table 1F).

Differentiation of NPE Cells to Hepatocyte-like Cells

We comparatively analyzed the expression of the same gene battery during adult NPE cell differentiation between D1 and D18 (Table 1). In contrast to hESC, these cells were not sensitive to OSM (not shown). Major differences between the differentiation processes of these two cell types were apparent. The transcription factors FOXA2, C/EBP α , HNF4 α and HNF6 were expressed at much lower levels in NPE-Hep compared to ES-Hep. Similarly, AFP, TTR (target genes of HNF6), FII, CYP7A1, CPS1, PKL, CYP3A7, UGT1A1, GSTA3, PXR and CAR exhibited lower levels of expression in NPE-Hep. In contrast, other markers such as C/EBP β , XBP1, albumin, AAT, ApoH, FV, TO, TAT, G6P, GS, CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP3A4, POR, SLC21A6, GSTP1, AhR, GR, SRC1 and PGC1 α were expressed at similar levels in both hES and NPE-derived hepatocyte-like cells.

Transduction of CAR in ES Cells

Previous investigations have shown that forced expression of transcription factor(s) can dramatically change cellular fates, inducing pluripotency, as in iPS cells [62, 63], promoting transdifferentiation in certain somatic cells [64, 65], or enhancing differentiation in carcinoma cells [66]. The xenosensor CAR regulates the expression of CYP2/3 and other xenobiotic conjugation and transporter genes after activation by exogenous compounds (such as phenobarbital or CITCO), or through its constitutive activity when transfected [59]. Since CAR is expressed at a low level in our ES-Hep, and as its expression is a marker of adult phenotype, we decided to study the impact of its lentivirus-mediated expression in ES-Hep, using HepG2-C3 cells for comparison. Transduction experiments carried out at D15 or D20 gave similar results. The mRNA levels of phase I (CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4), phase II (UGT1A1) and phase III (SLC21A6) genes as well as biotransformation of midazolam (CYP3A4 substrate) to 1-OH-midazolam in ES-Hep were induced in a dose-dependent manner, reaching 2–20% of levels observed in PCHH (Fig. 4a–b, and supplementary Fig. 5). Clotrimazole, a potent deactivator of CAR [67], significantly repressed both the expression of these genes and midazolam activity, as expected [68]. However, analysis of cells several days after the induction of lentivirus-mediated expression of CAR revealed that this xenosensor is down regulated from 100% (level after forced expression at D20) to 20% at D27–31. As expected, all CAR-target genes were down regulated in parallel (Fig. 4c). These results show that forced expression of transcription factors in ES-Hep cells may enhance, at least transiently, the differentiation status of these cells. Interestingly, CAR overexpression did not induce these mRNAs in HepG2-C3 cells (except for CYP2B6).

Discussion

In this work we have: i) optimized a protocol of differentiation of hES cells towards the hepatocyte phenotype, ii) characterized the differentiation level of hepatocyte-like cells derived from hES versus those derived from adult liver NPE by comparing them to PCHH, adult and fetal liver, and iii) evaluated the effect of forced expression of the xenoreceptor CAR in hES-derived hepatocyte-like cells on the expression of several markers of the hepatocyte detoxification function.

Numerous approaches have been developed to generate hepatocyte-like cells from hES cells [23–29]. Classical protocols used culture media with high glucose concentration (25 mM), arguing that highly proliferating cells need more energy. However, a more physiologic glucose

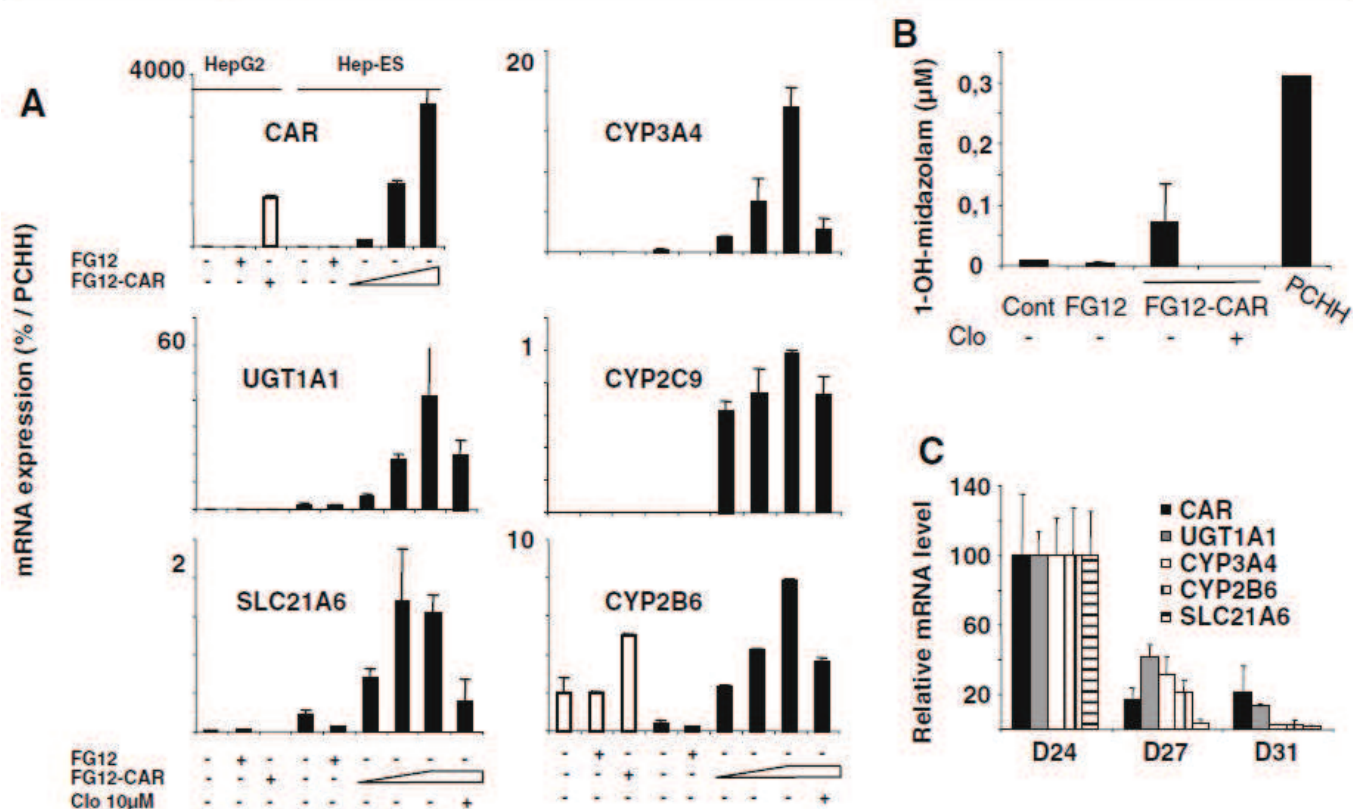


Fig. 4 Effect of CAR transduction. **a** Detoxication gene expression in HepG2-C3 and ES-Hep transduced with lentivirus harboring CAR (FG12-CAR) or control (FG12) plasmid at D15 and 48 h later treated

for 24 h with 1 μM clotrimazole. **b** 1-OH-midazolam production (see supplementary Fig. 5). **c** Gene down-regulation after CAR transduction at D20

concentration (5.5 mM) better promotes the *in vitro* development of mouse and human embryos [69, 70] and the formation of embryoid bodies [71]. Moreover, high glucose concentration enhances PI3-kinase activation and oxidative stress [72]. Our finding that DE markers reached higher levels in low glucose medium than in high glucose medium (Fig. 2) is consistent with these observations. Wnt3a signaling plays an important role in hESC self-renewal and differentiation [73]. Since duration of signaling is critical (along with magnitude) [74], we explored the possibility of adapting the duration of Wnt3a treatment. We showed that a short exposure of cells to Wnt3a (between D1 and D3) was optimal for DE marker expression (Fig. 2). The differentiation protocol was further improved by adopting conditions used to differentiate adult liver NPE cells [31]. These included the use of 1% DMSO and 2% KO-SR during hepatic specification (supplementary Fig. 1), and plating of cells on type-I collagen at D10, followed by overlay of matrigel starting at D11. This substratum is apparently optimal for PCHH both in our hands and as published [44]. Admittedly, ALB expression is not the ideal hepatocyte marker as supported by our observations that primary human hepatocytes are heterogeneous in this respect (see Fig. 1d and supplementary Fig. 2B). However, in the absence of an alternative consensual hepatocyte

marker, this parameter was used to monitor cell differentiation. In spite of our efforts to increase yield, ES-Hep only represent approximately 40% of cells at the end of the differentiation protocol and are likely to be heterogeneous in terms of the extent of their differentiation. This may account for the modest level of expression of hepatic markers as compared with PCHH (Table 1). It is remarkable that among the 41 genes tested here, 29 exhibited a more or less sharp increase between D15 and D21 of differentiation. Hence, it may be argued that longer period of differentiation would result in better maturation. However, this was not the case (not shown). Apparently, the cell phenotype was not maintained in ES-Hep beyond D21, in our conditions. Whether this is related to the finding that the master regulators of hepatospecific genes such as FOXA2, C/EBPα, and HFN4α1 (Table 1) [47] reached maximum levels between D10 and D15 and decreased thereafter is currently unknown and will require further investigation. The observation that CAR expression rapidly declines after lentivirus transduction of cells between D24 and 31 (Fig. 4c) may be a consequence of this process.

The main objective of hES cell differentiation is to generate mature hepatocytes for biotherapy, basic research, pharmacology and toxicology. It is therefore important to select the most appropriate cellular controls and markers to

evaluate the degree of differentiation of the generated cells. Some of the previous studies used controls that are not fully pertinent in this respect, including HepG2 cells which are certainly not “hepatocytes” [41], or undifferentiated ES cells [29]. In these cases, the high induction ratios of gene expression which were reported during differentiation should not be interpreted as a high level of differentiation, but merely reflect the low level of gene expression (if any) in the control cells (HepG2 or undifferentiated ES, Table 1). In addition, semi-quantitative PCR is frequently used with a high number of cycles (>35), rendering questionable the biological significance of detected signals [25, 75, 76]. Moreover, comparative analysis reveals important differences between rodent and human development [21, 22], raising the question of whether studies on rodents can be extrapolated to humans [77]. For instance, the human embryo catabolizes amino acids for energy production whereas the rodent embryo does not. Some authors referred to the expression of genes that are not *human adult* markers, but fetal markers instead (CYP3A7) [29]. It is therefore important not to rely exclusively on rodent markers, and a list of human-specific development and adult markers should be documented. Finally, demonstrating that some CYP substrates for instance are metabolized by ES-Hep does not mean these cells are *mature* hepatocytes [75]. In this study, we therefore made a quantitative RT-PCR analysis of genes in ES-Hep versus fetal liver, adult liver and PCHH to estimate the developmental “age” of hepatocyte-like cells. Human adult hepatocyte markers used included C/EBP α , CYP7A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP3A4, UGT1A1 and CAR (Table 1) for which there is a good agreement with rodent data [50, 54–56, 78, 79]. However, other genes appear to be adult markers in rodents but not in humans. TO is switched on in rat liver shortly after birth [11], and is therefore currently used as a maturation marker in mES differentiation [25]. Micro-array data [56] (fetal liver 15–24 weeks) and our results on a FL sample (20–23 weeks) (Table 1) show that TO is expressed in human FL at mid-gestation. TAT mRNA is expressed in rat liver after birth [12], but is again detected earlier (mid-gestation) in human liver [14] (Table 1). CPS1 activity is detected in rodents in the perinatal period and increases over 4 weeks post-partum to reach the level detected in adults [15], while in humans CPS1 can be detected as early as week 5 of gestation [16], with consistent enzymatic activity [17]. The rat ortholog SLC21A5 has been shown to increase gradually during postnatal development [18], while SLC21A6 mRNA is expressed in human fetal liver, and therefore cannot be considered as an adult marker. Human fetal hepatocyte markers used in this work included AFP, CYP3A7 and GSTP1. CYP3A7 is specifically expressed in the human fetal liver and is gradually replaced by CYP3A4 in the peri- and post-natal period. Interestingly, the couple GSTP1-

GSTA3 behaves similarly, GSTP1 being the fetal counterpart. According to the results presented in Table 1 concerning the relative levels of expression of these various adult and fetal markers, we conclude that ES-Hep obtained in this study are representative of fetal hepatocytes at less than 20 weeks of gestation [21].

We previously reported that hepatocyte-like cells can be derived from NPE cells which are likely to contain adult liver progenitors [30]. It was therefore interesting to compare the level of differentiation reached in ES-Hep versus NPE-Hep (Table 1). In ES-Hep at D21, the levels of 14 genes were greater by at least one order of magnitude than in NPE-Hep at D18, including notably adult markers such as C/EBP α , CYP7A1 and CAR. This would suggest that after a 3 week differentiation period, ES-Hep have reached a higher level of maturation than NPE-Hep. Indeed, when making a gene by gene comparison (excluding AFP), it appears that NPE-Hep at D18 exhibit a phenotype that is close to the phenotype displayed by ES-Hep between D5 and D10. However, this does not necessarily mean that ES- and NPE-derived hepatocyte-like cells pass through a common step during differentiation. On the other hand, levels of fetal markers AFP and CYP3A7 in NPE-Hep at D18 or before were much lower than in ES-Hep, suggesting that these cells are less “fetal”. Recently, it has been suggested [80] that two populations of stem cells are present in the adult liver, HpSCs (AFP-/CYP3A7-) and hepatoblasts (AFP+/CYP3A7+) and that hepatoblasts derive from HpSCs. It is therefore possible that our NPE cells are more closely related to HpSCs than hepatoblasts. However, during NPE differentiation AFP and CYP3A7 expression both increase moderately, remaining much lower (3–4 orders of magnitude) than levels observed in FL and ES-Hep. This suggests that NPE-Hep have not yet reached the hepatoblast stage, although it can be noted that several other liver markers are expressed in these cells at a level close to that of FL and ES-Hep. We can thus conclude that during differentiation stem cells of different origins are likely to follow and rely upon different pathways of gene regulation and expression. Interestingly, it clearly appears that despite being considered as a liver specific marker, albumin is certainly not a hepatocyte maturation marker as it reaches in ES-Hep, NPE-Hep and FL levels close to or greater than those observed in PCHH.

Detoxification is one of the major functions of adult hepatocytes. Generating hepatocyte-like cells from hES cells or other sources of stem cells represents therefore a major endeavor for investigating drug/xenobiotic metabolism, side effects and toxicity. Here we tested the impact of over-expressing the xenosensor CAR in ES-Hep. It is remarkable that several detoxification genes including CYP2B6, CYP2C9, CYP3A4, UGT1A1 and SLC21A6, as well as biotransformation of midazolam, a CYP3A4-specific substrate, were strongly induced in these conditions (Fig. 4 and supplementary

Fig. 5). Interestingly, the use of clotrimazole as a CAR deactivator, fully confirmed the role of this xenosensor in these observations. This approach opens the way to future explorations using other xenosensors (PXR) or transcription factors. However, despite greater levels of CAR in transduced ES Hep compared to PCHH, the levels of detoxification gene mRNAs reached only 2–20% of their levels in PCHH. This suggests that CAR is necessary but not sufficient in this respect. Indeed, Jover et al. [66] reported on a cooperation between CAR and C/EBP α on CYP gene expression. Co-transfection of xenosensors and other liver enriched transcription factors should be tested in future studies to optimize xenobiotic metabolism in stem cell-derived hepatocytes. Interestingly, similar transduction of HepG2-C3 cells by CAR had almost no impact on detoxification gene expression. Indeed, except for CYP2B6, not a single gene among CYP2C9, CYP3A4, SLC21A6 and UGT1A1 was induced significantly in HepG2-C3 cells, underscoring the importance of the cellular context in this respect, i.e. transcription factor cooperativity and epigenetic events.

Conclusion

In conclusion, we have adapted a robust protocol of differentiation of hES cells to hepatocyte-like cells. Our analysis of the expression of a panel of 41 genes and comparison with human fetal and adult liver, and primary hepatocytes suggests that our ES-Hep are representative of fetal hepatocytes of less than 20 weeks of gestation. ES-Hep apparently reach a better level of maturation as compared with adult NPE-Hep. Transduction of ES-Hep with CAR produced a massive increase of expression of genes involved in the detoxification function.

Acknowledgements HUES-1 cells were obtained from Dr Douglas Melton, Harvard University. This work was supported in part by grants from: Fondation de l'Avenir (ES and NPE cells), the European Community (Predictomics) and Sanofi-Aventis (NPE cells).

Disclosure of potential conflicts of interest To the best of our knowledge, there is no conflict of interest for any of the authors.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

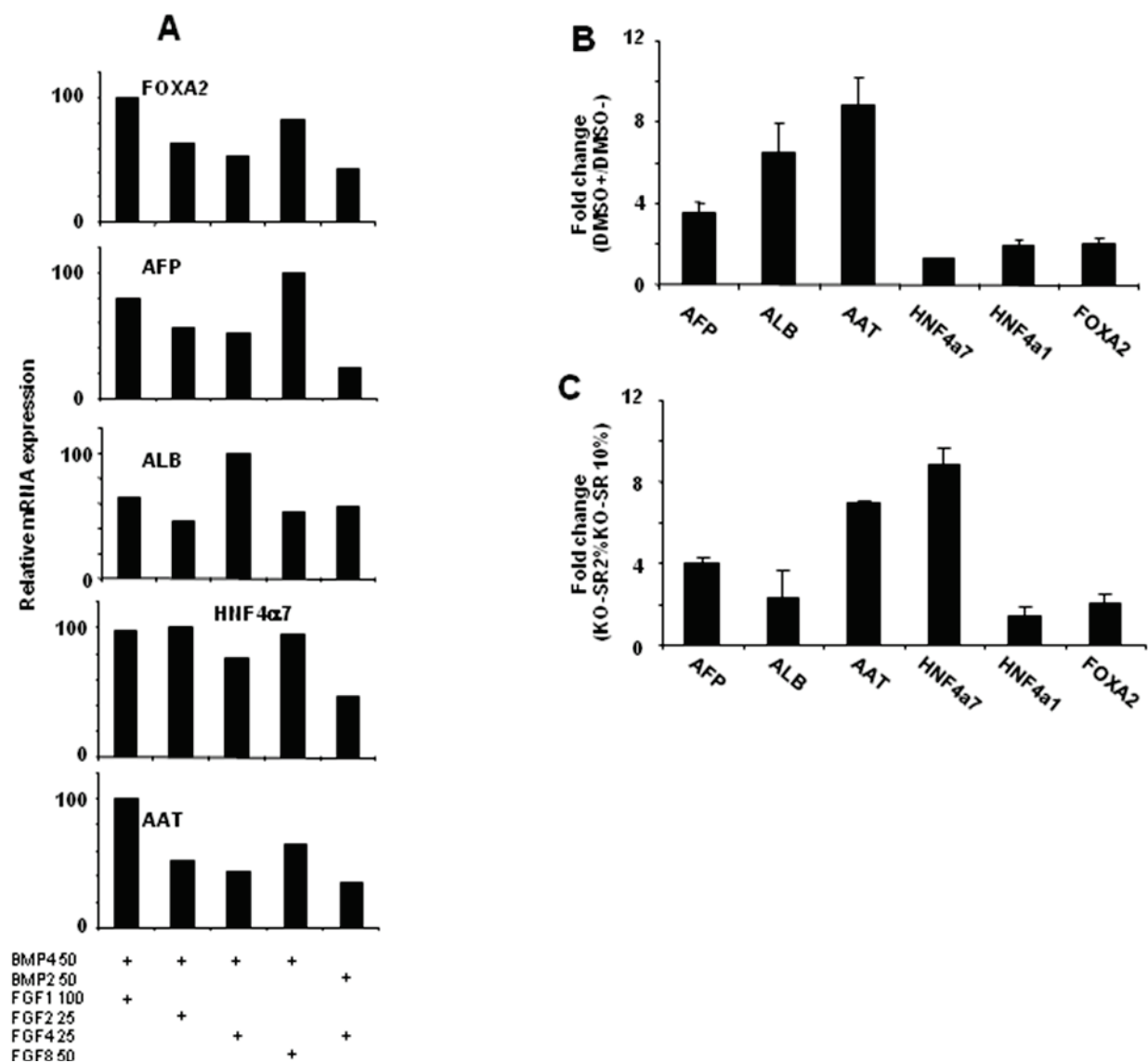
References

- Zaret, K. S. (2002). Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. *Nature Reviews Genetics*, 3(7), 499–512.
- Zorn, A. M., & Wells, J. M. (2007). Molecular basis of vertebrate endoderm development. *International Review of Cytology*, 259, 49–111.
- Gouon-Evans, V., Boussemart, L., Gadue, P., et al. (2006). BMP-4 is required for hepatic specification of mouse embryonic stem cell-derived definitive endoderm. *Nature Biotechnology*, 24(11), 1402–1411.
- Calmont, A., Wandzioch, E., Tremblay, K. D., et al. (2006). An FGF response pathway that mediates hepatic gene induction in embryonic endoderm cells. *Developmental Cell*, 11(3), 339–348.
- Zaret, K. S. (2001). Hepatocyte differentiation: from the endoderm and beyond. *Current Opinion in Genetics & Development*, 11(5), 568–574.
- Matsumoto, K., Yoshitomi, H., Rossant, J., & Zaret, K. S. (2001). Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science*, 294(5542), 559–563.
- Zong, Y., Panikkar, A., Xu, J., et al. (2009). Notch signaling controls liver development by regulating biliary differentiation. *Development*, 136(10), 1727–1739.
- Clotman, F., & Lemaigre, F. P. (2006). Control of hepatic differentiation by activin/TGF β signaling. *Cell Cycle*, 5(2), 168–171.
- Kamiya, A., Kinoshita, T., & Miyajima, A. (2001). Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS Letters*, 492(1–2), 90–94.
- Lazaro, C. A., Croager, E. J., Mitchell, C., et al. (2003). Establishment, characterization, and long-term maintenance of cultures of human fetal hepatocytes. *Hepatology*, 38(5), 1095–1106.
- Kaltschmidt, C., Muller, M., Brem, G., & Renkawitz, R. (1994). DNase I hypersensitive sites far upstream of the rat tryptophan oxygenase gene direct developmentally regulated transcription in livers of transgenic mice. *Mechanisms of Development*, 45(3), 203–210.
- Greengard, O. (1969). Enzymic differentiation in mammalian liver injection of fetal rats with hormones causes the premature formation of liver enzymes. *Science*, 163(870), 891–895.
- Greengard, O. (1977). Enzymic differentiation of human liver: comparison with the rat model. *Pediatric Research*, 11(5), 669–676.
- Andersson, S. M., Raiha, N. C., & Ohisalo, J. J. (1980). Tyrosine aminotransferase activity in human fetal liver. *Journal of Developmental Physiology*, 2(1–2), 17–27.
- Lamers, W. H., & Mooren, P. G. (1980). Role of glucocorticosteroid hormones on the levels of rat liver carbamoylphosphate synthase (ammonia) and arginase activity during ontogenesis. *Biology of the Neonate*, 37(3–4), 113–137.
- Moorman, A. F., Vermeulen, J. L., Charles, R., & Lamers, W. H. (1989). Localization of ammonia-metabolizing enzymes in human liver: ontogenesis of heterogeneity. *Hepatology*, 9(3), 367–372.
- Mukarram Ali Baig, M., Habibullah, C. M., Swamy, M., et al. (1992). Studies on urea cycle enzyme levels in the human fetal liver at different gestational ages. *Pediatric Research*, 31(2), 143–145.
- Guo, G. L., Johnson, D. R., & Klaassen, C. D. (2002). Postnatal expression and induction by pregnenolone-16 α -carbonitrile of the organic anion-transporting polypeptide 2 in rat liver. *Drug Metabolism and Disposition*, 30(3), 283–288.
- Collardeau-Frachon, S., & Scoazec, J. Y. (2008). Vascular development and differentiation during human liver organogenesis. *Anatomical Record (Hoboken)*, 291(6), 614–627.
- Yu, Y., Zhang, C., Zhou, G., et al. (2001). Gene expression profiling in human fetal liver and identification of tissue- and developmental-stage-specific genes through compiled expression profiles and efficient cloning of full-length cDNAs. *Genome Research*, 11(8), 1392–1403.

21. Brizard, J. P., Ramos, J., Robert, A., et al. (2009). Identification of proteomic changes during human liver development by 2D-DIGE and mass spectrometry. *Journal of Hepatology*, 51(1), 114–126.
22. Nagata, T., Takahashi, Y., Ishii, Y., et al. (2003). Profiling of genes differentially expressed between fetal liver and postnatal liver using high-density oligonucleotide DNA array. *International Journal of Molecular Medicine*, 11(6), 713–721.
23. Carpenter, M. K., Rosler, E., & Rao, M. S. (2003). Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. *Cloning and Stem Cells*, 5(1), 79–88.
24. Lavon, N., Yanuka, O., & Benvenisty, N. (2004). Differentiation and isolation of hepatic-like cells from human embryonic stem cells. *Differentiation*, 72(5), 230–238.
25. Cai, J., Zhao, Y., Liu, Y., et al. (2007). Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology*, 45(5), 1229–1239.
26. Basma, H., Soto-Gutierrez, A., Yannam, G. R., et al. (2009). Differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived hepatocytes. *Gastroenterology*, 136(3), 990–999.
27. Brolen G., Sivertsson L., Bjorquist P., et al., (2009). Hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells specifically via definitive endoderm and a progenitor stage. *Journal of Biotechnology*.
28. Si-Tayeb, K., Noto, F. K., Nagaoka, M., et al. (2010). Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology*, 51(1), 297–305.
29. Touboul, T., Hannan, N. R., Corbinau, S., et al. (2010). Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions that recapitulate liver development. *Hepatology*, 51(5), 1754–1765.
30. Duret, C., Gerbal-Chaloin, S., Ramos, J., et al. (2007). Isolation, characterization, and differentiation to hepatocyte-like cells of nonparenchymal epithelial cells from adult human liver. *Stem Cells*, 25(7), 1779–1790.
31. Gerbal-Chaloin, S., Duret, C., Raulet, E., et al. (2010). Isolation and culture of adult human liver progenitor cells: in vitro differentiation to hepatocyte-like cells. *Methods in Molecular Biology*, 640, 247–260.
32. Isom, H. C., Secott, T., Georgoff, L., Woodworth, C., & Mummaw, J. (1985). Maintenance of differentiated rat hepatocytes in primary culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(10), 3252–3256.
33. Raymond, C. K., Roberts, B. S., Garrett-Engle, P., Lim, L. P., & Johnson, J. M. (2005). Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs. *RNA*, 11(11), 1737–1744.
34. Qin, X. F., An, D. S., Chen, I. S., & Baltimore, D. (2003). Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(1), 183–188.
35. Moreau, A., Vilarem, M. J., Maurel, P., & Pascussi, J. M. (2008). Xenoreceptors CAR and PXR activation and consequences on lipid metabolism, glucose homeostasis, and inflammatory response. *Molecular Pharmacology*, 5(1), 35–41.
36. Pascussi J. M., Robert A., Moreau A., et al., (2007). Differential regulation of Constitutive Androstane Receptor expression by Hepatocyte Nuclear Factor4alpha isoforms. *Hepatology*. (in press).
37. D'Amour, K. A., Agulnick, A. D., Eliazar, S., Kelly, O. G., Kroon, E., & Baetge, E. E. (2005). Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nature Biotechnology*, 23(12), 1534–1541.
38. McLean, A. B., D'Amour, K. A., Jones, K. L., et al. (2007). Activin efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signaling is suppressed. *Stem Cells*, 25(1), 29–38.
39. Gadue, P., Huber, T. L., Paddison, P. J., & Keller, G. M. (2006). Wnt and TGF-beta signaling are required for the induction of an in vitro model of primitive streak formation using embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(45), 16806–16811.
40. Sullivan, G. J., Hay, D. C., Park, I. H., et al. (2010). Generation of functional human hepatic endoderm from human induced pluripotent stem cells. *Hepatology*, 51(1), 329–335.
41. Hay, D. C., Zhao, D., Fletcher, J., et al. (2008). Efficient differentiation of hepatocytes from human embryonic stem cells exhibiting markers recapitulating liver development in vivo. *Stem Cells*, 26(4), 894–902.
42. Jung, J., Zheng, M., Goldfarb, M., & Zaret, K. S. (1999). Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science*, 284(5422), 1998–2003.
43. Iwatani, M., Ikegami, K., Kremenska, Y., et al. (2006). Dimethyl sulfoxide has an impact on epigenetic profile in mouse embryonic body. *Stem Cells*, 24(11), 2549–2556.
44. McClelland, R., Wauthier, E., Uronis, J., & Reid, L. (2008). Gradients in the liver's extracellular matrix chemistry from periportal to pericentral zones: influence on human hepatic progenitors. *Tissue Engineering Part A*, 14(1), 59–70.
45. Schwartz, R. E., Reyes, M., Koodie, L., et al. (2007). Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *Journal of Clinical Investigation*, 117(10), 1291–1302.
46. Kamiya, A., Kojima, N., Kinoshita, T., Sakai, Y., & Miyajima, A. (2002). Maturation of fetal hepatocytes in vitro by extracellular matrices and oncostatin M: induction of tryptophan oxygenase. *Hepatology*, 35(6), 1351–1359.
47. Costa, R. H., Kalinichenko, V. V., Holterman, A. X., & Wang, X. (2003). Transcription factors in liver development, differentiation and regeneration. *Hepatology*, 38(6), 1331–1347.
48. Briancon, N., Bailly, A., Clotman, F., Jacquemin, P., Lemaigre, F. P., & Weiss, M. C. (2004). Expression of the alpha7 isoform of hepatocyte nuclear factor (HNF) 4 is activated by HNF6/OC-2 and HNF1 and repressed by HNF4alpha1 in the liver. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(32), 33398–33408.
49. Klover, P. J., & Mooney, R. A. (2004). Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(5), 753–758.
50. Massimi, M., Lear, S. R., Huling, S. L., Jones, A. L., & Erickson, S. K. (1998). Cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7A): patterns of messenger RNA expression during rat liver development. *Hepatology*, 28(4), 1064–1072.
51. Postic, C., Dentin, R., & Girard, J. (2004). Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes Metab.*, 30(5), 398–408.
52. Lewis, D. S., Oren, S., Wang, X., et al. (2000). Developmental changes in cholesterol 7alpha- and 27-hydroxylases in the piglet. *Journal of Animal Science*, 78(4), 943–951.
53. Gonzalez, F. J. (1992). Human cytochromes P450: problems and prospects. *Trends in Pharmacological Sciences*, 13(9), 346–352.
54. Bieche, I., Narjoz, C., Asselah, T., et al. (2007). Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome (CYP)1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues. *Pharmacogenetics and Genomics*, 17(9), 731–742.
55. Strassburg, C. P., Strassburg, A., Kneip, S., et al. (2002). Developmental aspects of human hepatic drug glucuronidation in young children and adults. *Gut*, 50(2), 259–265.
56. Le Camour, T., Assou, S., Tondeur, S., et al. (2010). Amazonia!: An online resource to google and visualize public human whole genome expression data. *The Open Bioinformatics Journal*, 4, 5–10.
57. Hankinson, O. (1995). The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 35, 307–340.

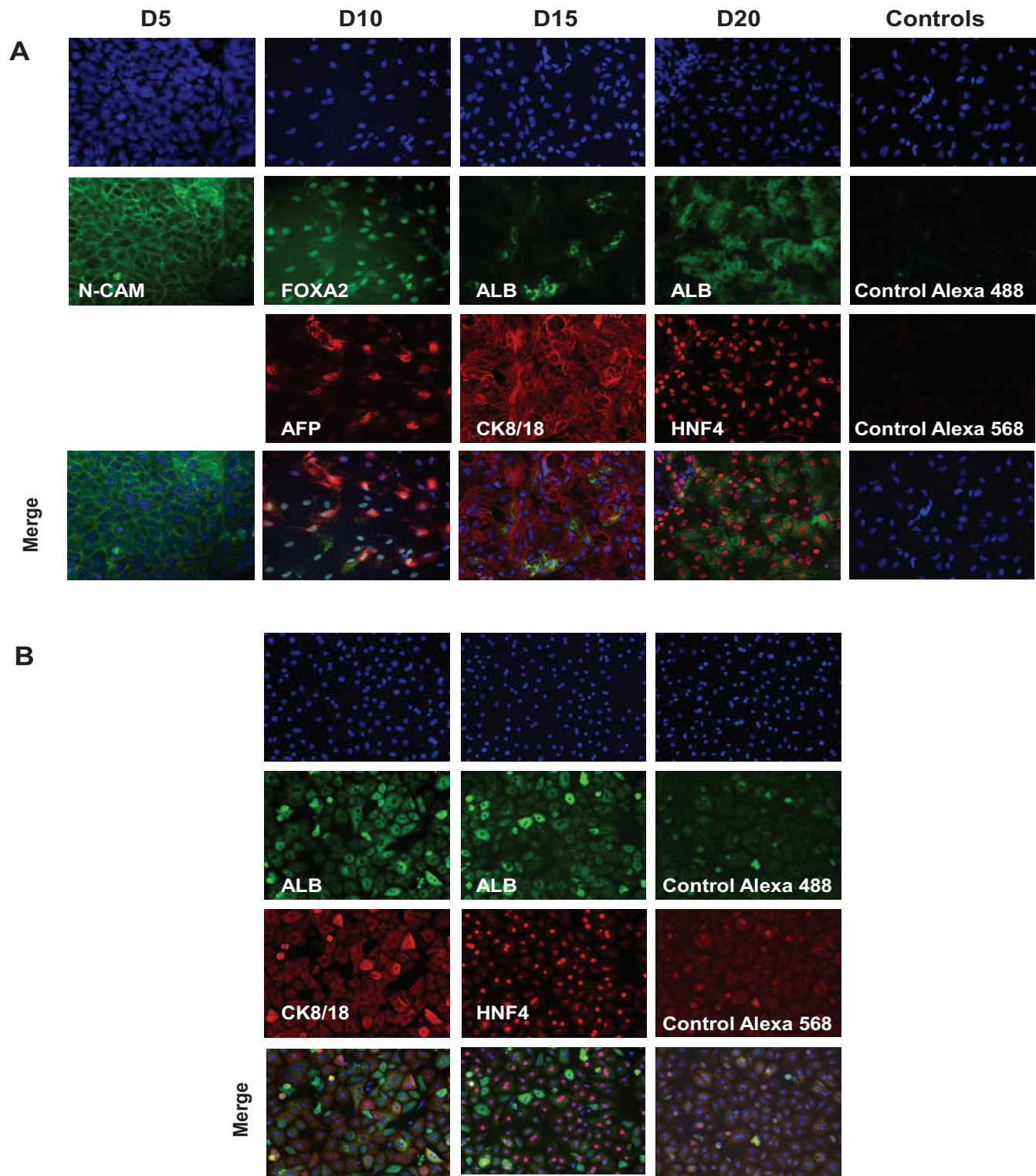
58. Kliewer, S. A., Moore, J. T., Wade, L., et al. (1998). An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell*, 92(1), 73–82.
59. Honkakoski, P., Zelko, L., Sueyoshi, T., & Negishi, M. (1998). The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene. *Molecular and Cellular Biology*, 18(10), 5652–5658.
60. Pascussi, J. M., Gerbal-Chaloin, S., Duret, C., Daujat-Chavanieu, M., Vilarem, M. J., & Maurel, P. (2008). The tangle of nuclear receptors that controls xenobiotic metabolism and transport: crosstalk and consequences. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 48, 1–32.
61. Tzur, G., Israel, A., Levy, A., et al. (2009). Comprehensive gene and microRNA expression profiling reveals a role for microRNAs in human liver development. *PLoS ONE*, 4(10), e7511.
62. Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nature Protocols*, 2(12), 3081–3089.
63. Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318(5858), 1917–1920.
64. Ieda, M., Fu, J. D., Delgado-Olguin, P., et al. (2010). Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*, 142(3), 375–386.
65. Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z. P., Kokubu, Y., Sudhof, T. C., & Wernig, M. (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*, 463(7284), 1035–1041.
66. Pascual, M., Gomez-Lechon, M. J., Castell, J. V., & Jover, R. (2008). ATF5 is a highly abundant liver-enriched transcription factor that cooperates with constitutive androstane receptor in the transactivation of CYP2B6: implications in hepatic stress responses. *Drug Metabolism and Disposition*, 36(6), 1063–1072.
67. Moore, L. B., Parks, D. J., Jones, S. A., et al. (2000). Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(20), 15122–15127.
68. Zhang, W., Ramamoorthy, Y., Kilicarslan, T., Nolte, H., Tyndale, R. F., & Sellers, E. M. (2002). Inhibition of cytochromes P450 by antifungal imidazole derivatives. *Drug Metabolism and Disposition*, 30(3), 314–318.
69. Conaghan, J., Handyside, A. H., Winston, R. M., & Leese, H. J. (1993). Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 99(1), 87–95.
70. Quinn, P., Moinipanah, R., Steinberg, J. M., & Weathersbee, P. S. (1995). Successful human in vitro fertilization using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate ions. *Fertility and Sterility*, 63(4), 922–924.
71. Khoo, M. L., McQuade, L. R., Smith, M. S., Lees, J. G., Sidhu, K. S., & Tuch, B. E. (2005). Growth and differentiation of embryoid bodies derived from human embryonic stem cells: effect of glucose and basic fibroblast growth factor. *Biology of Reproduction*, 73(6), 1147–1156.
72. Kim, Y. H., Heo, J. S., & Han, H. J. (2006). High glucose increase cell cycle regulatory proteins level of mouse embryonic stem cells via PI3-K/Akt and MAPKs signal pathways. *Journal of Cellular Physiology*, 209(1), 94–102.
73. Angers, S., & Moon, R. T. (2009). Proximal events in Wnt signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(7), 468–477.
74. Hansson, M., Olesen, D. R., Peterslund, J. M., et al. (2009). A late requirement for Wnt and FGF signaling during activin-induced formation of foregut endoderm from mouse embryonic stem cells. *Developmental Biology*, 330(2), 286–304.
75. Duan, Y., Ma, X., Zou, W., et al. (2010). Differentiation and characterization of metabolically functioning hepatocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 28(4), 674–686.
76. Zhao, D., Chen, S., Cai, J., et al. (2009). Derivation and characterization of hepatic progenitor cells from human embryonic stem cells. *PLoS ONE*, 4(7), e6468.
77. Dingemans, M. A., & Lamers, W. H. (1994). Expression patterns of ammonia-metabolizing enzymes in the liver, mesonephros, and gut of human embryos and their possible implications. *The Anatomical Record*, 238(4), 480–490.
78. Croniger, C., Leahy, P., Reshef, L., & Hanson, R. W. (1998). C/EBP and the control of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription in the liver. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(48), 31629–31632.
79. Timchenko, N. A., Harris, T. E., Wilde, M., et al. (1997). CCAAT/enhancer binding protein alpha regulates p21 protein and hepatocyte proliferation in newborn mice. *Molecular and Cellular Biology*, 17(12), 7353–7361.
80. Zhang, L., Theise, N., Chua, M., & Reid, L. M. (2008). The stem cell niche of human livers: symmetry between development and regeneration. *Hepatology*, 48(5), 1598–1607.

Supplementary Figure 1



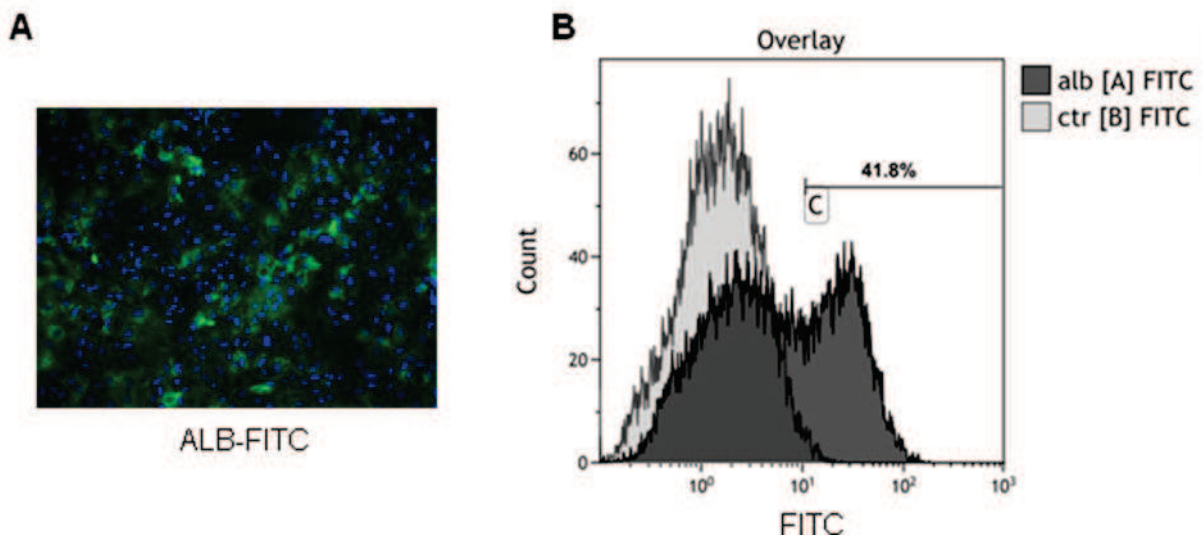
Supplementary Figure 1. Optimization of hepatic specification: Hepatic specification was induced in the presence of different combinations of BMPs and FGFs (ng/ml) (A), presence or absence of 1% DMSO (B) or 2% versus 10% KO-SR (C). mRNA expression of early hepatic genes is expressed as fold change (with DMSO/ without DMSO - 2%/10% KO-SR).

Supplementary Figure 2



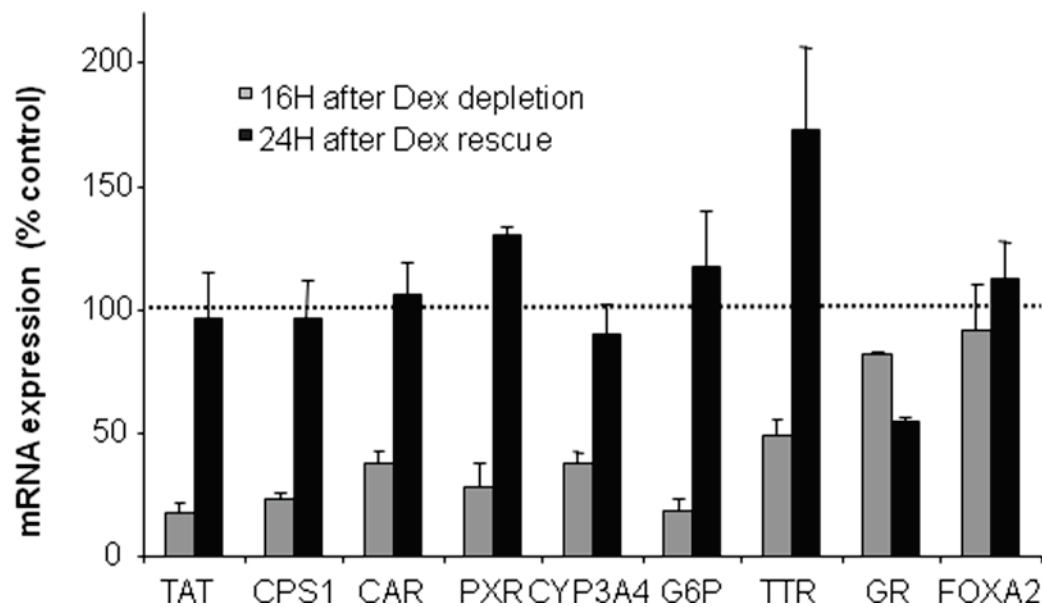
Supplementary Figure 2. Immunofluorescence analysis over time (D5 to D21) of N-CAM, FOXA2, AFP, HNF4, CK8-18 and Albumin in ES-Hep (A) and PCHH (D2)(B).

Supplementary Figure 3



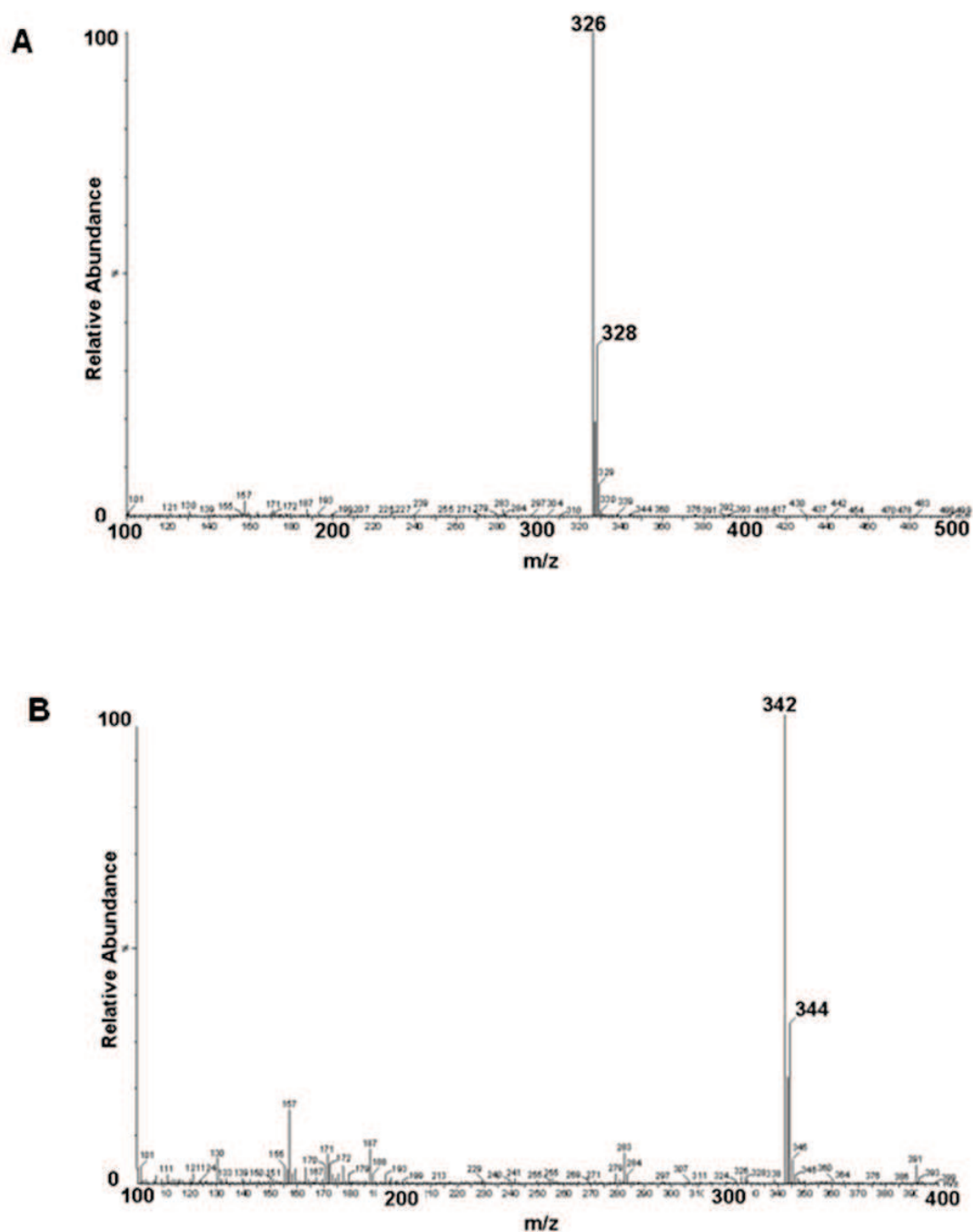
Supplementary Figure 3. Expression of ALB in ES-Hep cells at D21. (A) Immunofluorescence analysis of ALB accumulation. (B) FACS analysis in the absence (control) or presence of ALB antibodies.

Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 4. Functionality of glucocorticoid receptor. At D21 ES-Hep culture medium was depleted of dexamethasone for 16 hours and then re-supplemented with 5 μ M dexamethasone for 24 h. mRNA expression of a panel of genes was then analyzed. Results are expressed as the percentage of expression at D21, before dexamethasone depletion.

Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 5. Biotransformation of midazolam to 1-hydroxy-midazolam in ES-Hep cells. At day 21 of differentiation, ES cells were incubated for 24H with 5 μ M midazolam. Representative mass spectra of midazolam (A) and 1'-hydroxymidazolam (B). Representative LC-MS profiles of midazolam (C) and 1'-hydroxymidazolam (D) after a 24- hour incubation period with Hep-ES.

Table S1: Sequence of the primers used for qPCR

AAT	TGCTGGGGCCATGTTTTTAG	GGGACCAGCTCAACCCTTCT
AhR	GTCGTCTAAGGTGTCTGCTGGA	CGCAAACAAAGCCAACTGAGGTG
AFP	CATAGCGAGCAGCCCAAAGAAGAA	TGCAGCCAAAGTGAAGAGGGAAGA
ALB	TGCCTGCCTGTTGCCAAAGC	TTGGCAAGGTCCGCCCTGTC
ApoH	GCACTGAGGAAGGAAAATGG	GGCCATCCAGAGAATATCCA
CAR	CCGTGTGGGGTTCCAGGTAG	CAGCCAGCAGGCCTAGCAAC
C/EBP α	AGGGACTTGGGGCTTGGAAC	GACCCCCATCGCAGTGAGTT
C/EBP β	GCCCTCGCAGGTCAAGAGCA	TTGAACAAGTTCCGCAGGGTG
CPS1	TGTCCATTGGTCAGGCTGGA	GCCACCCATGCCCAGAATTA
CXCR4	CACCGCATCTGGAGAACCA	GCCCATTTCCTCGGTGTAGTT
CYP1A1	TCCGGGACATCACAGACAGC	ACCCTGGGGTTCATCACCAA
CYP1A2	CATCCCCACAGCACAACAA	TCCCCTTGGCCAGGACTTC
CYP2B6	ATGGGGCACTGAAAAAGACTGA	AGAGGCGGGGACACTGAATGAC
CYP2C9	TCCTATCATTGATTACTTCCCG	AACTGCAGTGTTTTCCAAGC
CYP3A4	GCCTGGTGCTCCTCTATCTA	GGCTGTTGACCATCATAAAAG
CYP3A7	AAGTCTGGGGTATTTATGACT	CGCTGGYGAATGTTGGAGAC
CYP7A1	AGGACGGTTCCTACAACATC	CGATCCAAAGGGCATGTAGT
FOXA2	GTATGCTGGGAGCGGTGAAG	CCACGTACGACGACATGTTCA
FII	TCACAGCCTTCACCCCATGA	CAACGTTGGTAAGGGGCAGC
FV	GTGCCCATGACCACATCAGC	CCTCTTCATGTGCCGCCTCT
Glut2	GGTGGCTTGGGGACACACTT	GTGACGATGGCCAGCTGATG
GSTA3	CGGGCTGACATTAGCCTGGT	TTCTTCACCGTGGGCAGGTT
GSTP1	CCCTGCTGTCCCAGAACCAG	ACTCAGGGGAGGCCAGGAAG

GR	GGACGGTCTGAAGAGCCAA	TCGGGGAATTCAATACTCATGG
G6P	CGTGATCGCAGACCTCAGGA	GGCTCCCTGGTCCAGTCTCA
HEX	TACTCTGGAGCCCCTTCTTG	TTCAAGGTCTTCCTGGGAGG
HNF1 α	CCAGCATCCCAGCAGATCCT	GTGTCCATGGCCAGCTTGTG
HNF4 α 1	GCCTACACCACCTGGAAT	GCAGATGGCACACAGGGCGC
HNF4 α 7	GTCAGCGTGAACGCGCCCC	GCAGATGGCACACAGGGCGC
HNF6	GCATCCCACAGGCCATCTTC	GGGCTTTTTGGGTGTGTTGC
PEPCK	CGGCATCGAGCTGACGGATT	CGCCGTACCCACTGCCAAAG
PGC1 α	CGCACCGAAATTCTCCCTTG	CTCCCTTTGCTTGGCCCTCT
PKL	ACCGGCAGCTGTTTGAGGAG	CAGAGCGGGTGACAGCAATG
POR	ACTCTGCTCTCGTCAACCAGCT	TGGGTGCTTCTTGTTGGACTCC
PXR	GGACCAGCTGCAGGAGCAAT	CATGAGGGGCGTAGCAAAGG
SLC21A6	CAATGGGAACCAGTCTGTGGA	TGTGAGGTGCCTCCAAGTGC
SRC1	GCTCGTTCATCCACATTGCC	ACTACTTGTCATGCCAACGG
SOX7	AGAGGAAACGGCTGGCAGTG	CGCGGCCGGTACTTGTAGTT
SOX17	GGCGCAGCAGAATCCAGA	CCACGACTTGCCCAGCAT
TAT	AGGCCAGGTGGTCTGTGAGG	AGGGGTGCCTCAGGACAGTG
TO	CCCGTAGAAGGCAGCGAAGA	TCGGTGCATCCGAGAAACAA
TTR	CAGAGCTGCATGGGCTCACA	GATTGGTGACGACAGCCGTG
UGT1A1	GGTGACTGTCCAGGACCTAT	TAGTGGATTTTGGTGAAGGCAGTT
XBP1	GCAGCTCAGACTGCCAGAGA	CCCCAAGCGCTGTCTTAACT
ZIC1	GCTGCGCAAACACATGAAGG	TGGAAGAGAGCGCACTGTGG

Marqueur	Nom complet	Fonction
<i>Facteurs de transcription</i>		
FOXA2	Forkhead box A2	Active quasiment tous les gènes hépatospécifiques, rôle dans l'initiation du développement hépatique
C/EBPα	CCAAT/enhancer binding protein α	Régule la différenciation et la prolifération hépatocytaire, les gènes de la néoglucogenèse et du métabolisme lipidique, fortement exprimé dans les hépatoblastes. Reprime la différenciation biliaire.
C/EBPβ	CCAAT/enhancer binding protein β	Régule les gènes de la néoglucogenèse, stimule le PEPCCK.
HNF4α1	Hepatocyte Nuclear Factor 4α1	Le HNF4α a un rôle essentiel dans la différenciation hépatocytaire, la morphogenèse et la zonation. Le HNF4α1 est l'isoforme adulte, exprimé de façon prédominant dans le foie adulte.
HNF4α7	Hepatocyte Nuclear Factor 4α7	Isoforme fœtal du HNF4α.
HNF1α	Hepatocyte Nuclear Factor 1α	Stimule la différenciation hépatocytaire, régule le métabolisme du glucose et des lipides.
HNF6	Hepatocyte Nuclear Factor 6	Stimule la migration des hépatoblastes, contrôle la différenciation biliaire et hépatocytaire.
XPB1	X-box Binding Protein 1	Stimule la production de réticulum endoplasmique, protège le réticulum endoplasmique contre des facteurs de stress.
<i>Protéines plasmatiques sécrétées</i>		
AAT	α 1 antitrypsine	Inhibiteur de protéase de la famille des serpin, protège les tissus des enzymes des cellules inflammatoires.
Alb	Albumine	Protéine principale du plasma, régule la pression oncotique, transporte diverses substances.
AFP	α foetoprotéine	Protéine sécrétée par le foie et le sac amniotique au cours de la vie fœtale, équivalent fœtal de l'albumine. Chez l'adulte, pas de fonction physiopathologique, utilisé comme marqueur tumoral (carcinome hépatocellulaire).
TTR	Transthyréline, également appelée pré-albumine	Transporte l'hormone thyroïdienne T4 et le rétinol.
ApoH	Apolipoprotéine H, également appelée β2 glyco-protéine 1	Rôle dans le métabolisme lipidique et la coagulation.
FII	Facteur de coagulation II, également appelé prothrombine	Proenzyme vitamine K dépendant faisant partie de la cascade de la coagulation.
FV	Facteur de coagulation V, également appelé pro-accéléline	Protéine de la cascade de la coagulation agissant comme cofacteur.

Marqueur	Nom complet	Fonction
Protéines du métabolisme		
TO	Tryptophane 2,3 dioxygénase	Enzyme (oxydoréductase) du métabolisme du tryptophane.
TAT	Tyrosine aminotransférase	Enzyme du métabolisme de la tyrosine.
G6P	Glucose 6 phosphatase	Enzyme de la glycogénolyse, libère le glucose qui est sécrété dans la circulation sanguine.
PEPCK	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	Enzyme de la néoglucogenèse.
Glut2	Glucose transporter 2	Transporteur du glucose, assure la sécrétion du glucose hépatique dans le sang.
CYP7A1	Cytochrome P450 7A1, également appelé cholestérol 7 α hydroxylase	Enzyme impliqué dans la synthèse des acides biliaires, oxyde le cholestérol.
GS	Glutamine synthétase	Rôle dans le métabolisme de la glutamine et dans la détoxification de l'ammoniaque.
CPS1	Carbamoyl phosphate synthase	Enzyme du cycle de l'urée.
PKL	Pyruvate kinase of the liver	Enzyme de la glycolyse.
Détoxification		
CYP1A1	Cytochrome P450, family 1, member A1	Enzyme de phase 1, activée par les hydrocarbures aromatiques polycycliques.
CYP1A2	Cytochrome P450, family 1, member A2	Enzyme de phase 1, activée par les hydrocarbures aromatiques polycycliques.
CYP2B6	Cytochrome P450, family 2, member B6	Enzyme de la phase 1, induite par le phénobarbital.
CYP3A4	Cytochrome P450, family 3, member A4	Enzyme de la phase 1 la plus abondante dans le foie, ayant le nombre de substrats le plus élevé, induite entre autre par les corticoïdes.
CYP3A7	Cytochrome P450, family 3, member A7	Isoforme foetal du CYP3A7.
POR	Cytochrome P450 réductase	Enzyme nécessaire pour le transfert d'électrons de NADPH vers les cytochromes P450.
SLC21A6	Solute Carrier Organic Anion Transporter Family 21 member A6, également appelé OATP2 ou OATPC	Transporteur permettant la capture de la bilirubine et des sels biliaires par les hépatocytes.
UGT1A1	UDP glycosyltransférase 1 polypeptide A1	Enzyme de phase II responsable de la glucuronoconjugaison.

Marqueur	Nom complet	Fonction
Détoxification (suite)		
GSTA3	Glutathione S transférase A3	Enzyme de la phase II retrouvée chez l'adulte.
GSTP1	Glutathione S transférase P1	Enzyme de la phase II, prédominant dans le fœtus.
Récepteurs Nucléaires et Co-activateurs		
AhR	Aryl hydrocarbon receptor	Facteur de transcription activé par la dioxine et la 3-méthylcholanthrène, régule l'expression de CYP1A1 et 1B1, rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaire.
PXR	Pregnane X receptor	Récepteur nucléaire ayant un rôle de « xénosenseur » : en présence de xénobiotiques il active les CYP450 dont CYP3A4.
CAR	Constitutive androstane receptor	Récepteur nucléaire ayant un rôle de « xénosenseur » : en présence de xénobiotiques (comme le phénobarbital) il active les CYP450 dont les CYP2B6.
GR	Glucocorticoid receptor	Active l'expression de CAR et de PXR.
SRC1	Steroid receptor coactivator 1	Coactivateur des récepteurs nucléaires, joue un rôle dans l'activation de CYP450 par PXR.
PGC1 α	Peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 α	Coactivateur transcriptionnel jouant un rôle dans la régulation des métabolismes glucidique et lipidique, interagit avec HNF4 α .
miRNA		
miRNA 122	Micro RNA 122	miRNA spécifique au foie, régule le métabolisme des acides gras.

Tableau 6. Marqueurs utilisés pour évaluer l'état de différenciation des hES-Hep

VII. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Depuis 2005, date de début de ce travail, de nombreuses publications sont parues documentant la différenciation des hES vers l'hépatocyte. La plupart de ces travaux utilisent un protocole basé sur les étapes de la différenciation hépatique *in vivo*, avec le rajout successif de facteurs de croissance mimant chaque stade du développement (activine A, FGF, BMP, HGF, OSM, Dex, etc.), aboutissant à des protocoles dont les grandes lignes sont consensuelles. Notre travail se démarque des autres études par la comparaison systématique de la différenciation des hES-Hep à celle des NPE-Hep, une population de progéniteurs issus du foie adulte humain, et l'activation de l'expression de gènes du métabolisme des xénobiotiques en forçant l'expression du xénorécepteur CAR, ce qui à notre connaissance n'a jamais été rapporté dans la littérature. La mise en évidence des effets de la surexpression de CAR et de l'activation du GR indique que les voies de signalisation gouvernant l'expression des gènes du métabolisme des xénobiotiques sont mises en place (au moins partiellement) dans nos hES-Hep, ce qui ouvre des perspectives pour l'utilisation de ces cellules dans les études de pharmacotoxicité.

1. Amélioration des cultures de hES-Hep

Les cellules que nous avons obtenues en fin de différenciation ont clairement un phénotype immature, tout comme celles des autres protocoles publiés dans la littérature. Il sera donc nécessaire dans l'avenir de développer des techniques afin d'améliorer les étapes ultimes de la différenciation. Nous avons démontré que l'expression forcée d'un gène pouvait améliorer l'état de différenciation des hES-Hep, au moins temporairement. L'optimisation de la différenciation pourrait être améliorée par l'induction simultanée de plusieurs gènes ayant des effets coopératifs, ou par une induction séquentielle afin de maintenir l'état de différenciation au cours du temps. Cette technique a été utilisée avec des progéniteurs hépatiques de souris (Iacob et al., 2011), où l'expression forcée de *Foxa2*, *HNF4 α* et *C/EBP α* induisait la maturation, avec une augmentation de la sécrétion d'albumine proportionnelle au nombre de gènes transduits. Takayama et al (Takayama et al., 2011) ont généré des hES-Hep à partir de hES et d'iPS avec des adénovirus exprimant *SOX17* à J3 de culture, puis *HEX* 3 jours plus

tard. La plupart des équipes forçant l'expression d'un gène au cours de la différenciation ont transfecté les hES à un stade précoce (Inamura et al., 2011; Seguin et al., 2008; Takayama et al., 2011). Notre travail a démontré que les hES-Hep pouvaient être transduites à un stade plus avancé (J15 ou J20). Il reste à déterminer quels sont les gènes les plus appropriés à induire, à quel moment leur expression est la plus favorable, et si l'expression forcée de certains gènes à un stade de développement plus avancé peut améliorer la maturation terminale.

Afin d'améliorer et de maintenir l'expression du phénotype hépatique, les conditions de culture doivent mimer le microenvironnement cellulaire *in vivo* de manière aussi fidèle que possible. Il est bien établi que la culture en 3 dimensions améliore l'expression des gènes du métabolisme des xénobiotiques dans les HHCP (Meng, 2010), et il existe de nombreux systèmes de culture en 3D : hydrogels, Matrigel, échafaudage de collagène, culture sphéroïde au sein de billes d'alginate, culture au sein de fibres creuses, culture en sandwich, culture sur membranes semi-poreuses, culture sur polymères synthétiques, etc. Il a été suggéré que la culture en 3D permet des interactions inter-cellulaires plus physiologiques, et induit une polarisation des hépatocytes (Haouzi et al., 2005). Plusieurs auteurs ont effectivement démontré que les hES se différenciaient mieux vers l'hépatocyte en culture 3D qu'en culture 2D (Baharvand et al., 2006; Farzaneh et al., 2010; Maguire et al., 2007). L'importance des propriétés mécaniques du microenvironnement sur le phénotype cellulaire a récemment été souligné par Lozoya et al (Lozoya et al., 2011), qui ont démontré que le phénotype de progéniteurs hépatiques pouvait être modulé par le degré d'élasticité au sein d'une culture en hydrogel. *In vivo*, les hépatocytes sont soumis à des forces de cisaillement lors de l'écoulement du sang au sein du lobule hépatique. Le développement de bioréacteurs avec une culture dynamique assurant l'écoulement du milieu de culture sur les hépatocytes a permis de mimer ces phénomènes de flux. Ainsi, la fonctionnalité et le maintien du phénotype d'hépatocytes adultes sont améliorés par la culture sous perfusion en condition 3D (Vinci et al., 2011), qui optimise également la différenciation et la survie d'hépatocytes fœtaux (Ring et al., 2010; Schmelzer et al., 2010), et de hES différenciées vers l'hépatocyte (Miki et al., 2011). La maturation des hépatocytes pourrait être stimulée via des signaux mécaniques transduits par des récepteurs sensoriels (ex. cils) sur la membrane des hépatocytes polarisés (Decaens et al., 2008). *In vivo*, le foie est également soumis de façon passive aux mouvements du diaphragme, ce qui pourrait avoir un rôle dans la maturation hépatique post-natal (Miki, 2011).

Une autre piste pour améliorer les conditions de culture des hES en voie de différenciation est le développement de systèmes de co-culture avec d'autres types cellulaires, afin de permettre les interactions inter-cellulaires présentes dans le microenvironnement *in vivo*. Tuleuova et al (Tuleuova et al., 2010) ont démontré que la différenciation d'ES de souris sous l'effet de facteurs de croissance était accélérée par la co-culture avec des cellules stellaires, induisant une expression plus importante des marqueurs hépatiques. Saito et al (Saito et al., 2006) ont démontré que des facteurs sécrétés par des cellules de foie fœtal de souris étaient suffisants pour différencier des ES de singe vers l'hépatocyte, et que cette différenciation était plus rapide qu'avec un protocole utilisant des facteurs de croissance. Soto-Gutierrez et al (Soto-Gutierrez et al., 2007) ont cultivé des ES de souris avec des lignées de cholangiocytes, cellules endothéliales et cellules stellaires humaines, et ont constaté que la différenciation était meilleure en présence de cellules endothéliales, mais elle était encore supérieure quand les trois lignées étaient associées aux ES en voie de différenciation. Certains auteurs (Shiraki et al., 2008; Yu et al., 2011; Zhao et al., 2009) ont montré que les co-cultures de hES-Hep avec d'autres lignées cellulaires pouvait allonger la durée de culture des hES-Hep. Kim et al (Kim and Rajagopalan, 2010) ont développé un système combinant la culture en 3D d'hépatocytes de rat avec une co-culture avec des cellules endothéliales, les hépatocytes étant séparés des cellules endothéliales par une membrane mimant l'espace de Disse. Dans ces conditions, la fonctionnalité des hépatocytes a été améliorée et le phénotype des deux types cellulaires a été maintenu plus longtemps. Le développement de co-cultures nécessite des populations cellulaires accompagnatrices de bonne qualité, ainsi que la mise en œuvre de techniques de tri des cellules hépatocytaires afin d'éviter des problèmes de contamination, ou des systèmes de cultures où les différents types cellulaires sont séparés.

Comme nous l'avons vu au chapitre I.4, les hépatocytes sont soumis à la zonation fonctionnelle au sein du lobule hépatique. La production d'hépatocytes de la zone péricentrale est intéressante pour les études de pharmacologie et de toxicologie, car ce sont ces hépatocytes qui expriment les enzymes du métabolisme des xénobiotiques de façon la plus importante. Or, d'après l'hypothèse du gradient de maturation au sein du lobule hépatique (Turner et al., 2011), ces hépatocytes péricentraux seraient les plus « matures ». En ce qui concerne notre protocole, nous ne pouvons pas définir nos hES-Hep comme hépatocytes périportaux ou péricentraux, car elles expriment fortement à la fois des enzymes de la zone périportale (G6P, CPS1) et péricentrale (GST, GS, CYP1A1) (cf tableau 1 de l'article). Le phénomène de zonation se met en place lors de la période péri-natale, et fait donc partie des

étapes terminales de la maturation hépatocytaire. Une meilleure compréhension des mécanismes qui sous tendent cette zonation permettra d'améliorer la maturation hépatocytaire *in vitro*. Par exemple, il serait intéressant d'étudier l'effet de la voie Wnt/ β -caténine sur des hES-Hep en fin de différenciation, puisqu'elle joue un rôle essentiel dans la régulation de la zonation *in vivo* (Torre et al., 2011).

En plus du développement de systèmes de culture imitant le plus fidèlement possible le microenvironnement hépatocytaire *in vivo*, l'amélioration de la différenciation hépatocytaire nécessitera l'élucidation des mécanismes gouvernant la maturation dans les périodes péri et post-natales, pour lesquels peu de données sont disponibles actuellement. Afin d'améliorer l'homogénéité des populations cellulaires obtenues, il est probable que de nouvelles techniques de tri doivent être mise en œuvre, de préférence sans manipulation génétique, en utilisant des marqueurs cellulaires de surface, ou d'autres propriétés cellulaires, comme la capacité de capter le vert d'indocyanine (Yoshie et al., 2011).

2. Perspectives pour les hES-Hep

a) Etudes pharmacologiques

Le développement de nouveaux médicaments nécessite de réaliser au préalable des tests rigoureux *in vivo* et *in vitro* avant les essais cliniques chez l'homme. Malgré cela, 90% des médicaments potentiels ne passent pas le stade d'essais cliniques en raison d'une efficacité ou d'une sécurité insuffisante. Parmi les médicaments qui sont retenus pour la commercialisation, les effets secondaires indésirables sont un problème important, puisque entre 1995 et 2005 34 médicaments ont été retirés du marché (Need et al., 2005), et le nombre d'effets secondaires médicamenteux rapportés n'a cessé de croître ces dernières années (Moore et al., 2007). Ces effets secondaires sont la majorité du temps la conséquence d'une hépatotoxicité, ce qui démontre que les modèles précliniques d'évaluation pharmacologique sont encore à améliorer. L'hépatotoxicité médicamenteuse est attribuée à des effets au niveau cellulaire qui précèdent les manifestations cliniques ou biologiques (inhibition des fonctions mitochondriales, perturbation de l'homéostasie intracellulaire, activation de l'apoptose, stress oxydatif, inhibition d'enzymes ou de transporteurs, formation de métabolites toxiques ou

immunogènes) (Mandenius et al., 2011). Le développement de modèles cellulaires appropriés permettra de détecter *in vitro* l'hépatotoxicité médicamenteuse de façon plus prédictive.

L'utilisation de cellules dérivées des hES dans cette optique nécessite plusieurs conditions (Mandenius et al., 2011) :

- L'obtention de hES-Hep en grande quantité et de bonne qualité.
- Un protocole de différenciation efficace permettant d'obtenir une population homogène de cellules.
- L'expression par les hES-Hep d'un phénotype stable sur plusieurs semaines de culture, proche de celui des HHCP, avec notamment l'expression d'enzymes des phases 1 et 2 du métabolisme des xénobiotiques (CYP450, UGTs, GSTs, STs, etc.), mais également l'expression de transporteurs enzymatiques qui permettent l'excrétion des métabolites en dehors de l'hépatocytes (MDR, OATP, ABC, BCRP, etc.). Pour cela, il est nécessaire que les cellules possèdent une polarité, car ces transporteurs sont situés au niveau de la membrane plasmique des hépatocytes, soit au niveau de la face sinusoïdale, soit au niveau de la face canaliculaire. Idéalement, les cellules hépatocytaires devraient être cultivées dans au sein d'un bioréacteur, en culture 3D dynamique, reflétant le microenvironnement *in vivo*. Notre travail a démontré que l'expression forcée de CAR pouvait améliorer l'expression des gènes du métabolisme des xénobiotiques, ce qui est intéressant dans le cadre d'études pharmacologiques.
- La création de lignées de hES-Hep reflétant les variations génétiques des enzymes du métabolisme des xénobiotiques dans la population générale. Les cellules dérivées des iPS pourraient également être concernées par cette approche.

Actuellement, la société Cellartis en Suède commercialise des hES-Hep fraîches vendues dans des plaques multipuits (culture 2D), d'une homogénéité supérieure à 80%, pouvant être expédiées partout dans le monde (Cellartis; Mandenius et al., 2011). Ces cellules ont été utilisées pour l'étude du risque de carcinogenèse de certains produits chimiques (Yildirimman et al., 2011), et dans une étude d'infection virale (Mantel, 2010). Dans le cadre du projet européen Vitrocellomics, les hES-Hep ont été utilisés dans des essais de dépistage d'hépatotoxicité. D'après les auteurs, les résultats auraient été prometteurs, mais non concluants (Mandenius et al., 2011). Parallèlement, il a été estimé que 64% des 20 premières

compagnies pharmaceutiques mondiales travaillent actuellement avec des hES (Jensen et al., 2009). Parmi les applications possibles des hES-Hep, leur utilisation dans la recherche pharmacologique semble celle qui sera la plus rapidement mise en œuvre. Des études futures devront valider l'utilité des hES-Hep dans ce contexte.

b) Applications thérapeutiques

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la prévalence des maladies hépatiques et la pénurie d'organes pour la transplantation hépatique a conduit au développement de thérapies alternatives, pour lesquelles les hES représentent une source potentielle de cellules hépatocytaires. Ces thérapies cellulaires peuvent être mises en œuvre dans trois contextes : l'insuffisance hépatique aiguë, l'insuffisance hépatique chronique, et des maladies métaboliques d'origine hépatique. L'insuffisance hépatique aiguë, ou hépatite fulminante, survient chez un sujet sans pathologie hépatique sous-jacente. Son évolution est difficile à prédire : chez certains patients, le traitement médical peut suffire, et le foie peut régénérer spontanément et récupérer ses fonctions antérieures. Chez d'autres patients, l'insuffisance hépatique aiguë peut rapidement conduire à la défaillance multi-viscérale et au décès. Elle est le plus souvent secondaire à une atteinte toxique (paracétamol notamment) ou virale. La mortalité de l'insuffisance hépatique aiguë varie de 30 à 100%, et motive 5 à 6% des transplantations hépatiques (Bernal et al., 2010). Dans ce contexte de pathologie aiguë et de traitement d'urgence, il est nécessaire que les hépatocytes employés dans la thérapie cellulaire soient fonctionnels immédiatement et facilement disponibles. L'insuffisance hépatique chronique est la conséquence d'une cirrhose, qui modifie l'architecture hépatique et les fonctions hépatocytaires. Dans cette situation, la thérapie cellulaire serait une solution d'attente en attendant qu'un organe soit disponible pour une transplantation hépatique (ceci est également applicable pour l'insuffisance hépatique aiguë). Les maladies hépatiques métaboliques concernent une population pédiatrique, et sont la conséquence d'un déficit d'une fonction métabolique du foie : conjugaison de la bilirubine (maladie de Crigler-Najjar), synthèse et dégradation du glycogène (maladies de stockage du glycogène), anomalies du cycle de l'urée, déficit de synthèse du facteur VII. Pour ces patients, la transplantation d'hépatocytes de fonctionnalité normale pourrait pallier au déficit enzymatique du foie natif.

- Le foie bioartificiel

Le premier foie bioartificiel a été créé il y a 25 ans (Matsumura et al., 1987), et consiste en un bioréacteur contenant des hépatocytes au sein duquel passe le plasma du patient, séparé des cellules ou non par une membrane semi-perméable. Les hépatocytes dans le bioréacteur remplacent les fonctions du foie défaillant, comme la détoxification, la biotransformation, l'excrétion et la synthèse protéique. Les foies bioartificiels contiennent également la plupart du temps une colonne de charbon végétal activé, et une résine échangeuse d'ions qui aident à éliminer les toxines dans le plasma par adsorption ou par effet de gradient physico-chimique. Par rapport aux systèmes de suppléance artificielle de type MARS (Molecular Adsorbent Recirculating System), le foie bioartificiel permet non seulement de détoxifier le plasma, mais également d'assurer les fonctions hépatiques de synthèse et de régulation. A l'heure actuelle, deux systèmes de foie bioartificiel ont fait l'objet d'études cliniques randomisées, l'HepatAssist (Demetriou et al., 2004), qui utilise des hépatocytes porcins cryopréservés, et l'Extracorporeal Liver Assist Device (ELAT) (Sussman et al., 1994), qui utilise des cellules dérivées d'un hépatoblastome humain. Les essais concernaient des patients souffrant d'insuffisance hépatique aiguë, et l'utilisation de ces systèmes a été accompagnée d'une amélioration de certains paramètres cliniques (neurologiques) et biologiques (diminution de la bilirubine et des transaminases). Cependant, il n'y avait pas de différence significative de survie entre les patients traités et le groupe contrôle. Ces foies bioartificiels ont été utilisés comme traitement de suppléance en attendant une transplantation hépatique, et une quinzaine de patients ont ainsi pu être amenés à la transplantation. D'autres systèmes ont également fait l'objet d'essais cliniques, utilisant des hépatocytes porcins (Flendrig et al., 1997) ou des hépatocytes humains (Sauer et al., 2003), (Wang et al., 2000). Malgré l'ancienneté du concept de foie bioartificiel, l'utilisation de ces systèmes reste très restreinte, et les premiers résultats doivent être confirmés par des études randomisées contrôlées incluant un plus grand nombre de patients. Un des freins principaux au développement de foies bioartificiels est l'absence d'une source de cellules fonctionnelles, qui doivent être disponibles dans un contexte d'urgence en grande quantité. Les hES-Hep pourraient répondre aux besoins du foie bioartificiel, à condition qu'elles aient acquis une fonctionnalité suffisamment mature qui pourra être maintenu à long terme, ou au moins pendant la durée du traitement. L'utilisation de hES-Hep dans ce contexte évite les problèmes liés à la tumorigénicité et à

l'immunogénéicité des cellules dérivées de hES (cf. plus loin), car le plasma n'est pas en contact direct avec les cellules du bioréacteur.

- La transplantation hépatocytaire

Par rapport à la transplantation hépatique, la transplantation hépatocytaire est une technique beaucoup moins invasive qui pourrait être mise en œuvre avec relativement peu de risques chez des patients dont l'état de santé est grave. Le foie natif est laissé en place, ce qui lui laisse le temps de régénérer et de récupérer ses fonctions en cas d'insuffisance hépatique aiguë. En cas d'échec du greffon cellulaire, la fonction hépatique retourne à son état antérieur, alors qu'une défaillance d'un greffon hépatique peut entraîner un risque vital. A l'heure actuelle, les résultats les plus encourageants de la transplantation hépatocytaire ont été obtenus avec des patients atteints de maladies métaboliques, avec une amélioration partielle des déficits enzymatiques (Dhawan et al., 2006; Dhawan et al., 2010). Par rapport à l'insuffisance hépatique, le nombre d'hépatocytes requis serait moindre, puisqu'il n'y a qu'un seul déficit enzymatique à corriger. Il faut noter cependant que ce traitement n'a pas évité la transplantation hépatique chez la majorité des patients. Dans l'insuffisance hépatique aiguë, la transplantation hépatocytaire a amélioré certains paramètres cliniques (encéphalopathie hépatique) et biologiques (ammonémie), et a permis à certains patients d'attendre une transplantation hépatique (Dhawan et al., 2010; Fisher and Strom, 2006). Cependant, il n'y avait pas de différence significative de survie chez les patients transplantés, et il est difficile de déterminer si les améliorations constatées étaient secondaires à la transplantation, ou à la récupération spontanée du foie natif. Les résultats de la transplantation hépatocytaire chez des patients en insuffisance hépatique chronique sont moins convaincants, avec uniquement une amélioration anecdotique de certains paramètres biologiques (Fisher and Strom, 2006; Soltys et al., 2010). La transplantation hépatocytaire dans cette population présente des difficultés en raison de l'architecture anormale du foie, avec notamment la présence de fibrose dans l'espace de Disse, ce qui ne facilite pas l'intégration et la survie des hépatocytes transplantés.

Afin que la transplantation hépatocytaire puisse être développée à grande échelle, il existe plusieurs problèmes à résoudre :

- L'absence d'un modèle animal approprié pouvant imiter l'insuffisance hépatique chez l'homme. Les études préliminaires ont été réalisées chez les rongeurs, mais l'expérience clinique a montré que les résultats sont difficilement transposables chez l'homme. L'utilisation d'animaux de plus grande taille est souhaitable (chiens, cochons, moutons).
- Déterminer le site approprié d'injection hépatocytaire en fonction du contexte. L'injection dans la veine porte peut être difficile chez des patients ayant des troubles de la coagulation dans le contexte d'insuffisance hépatique aiguë. L'intégration d'hépatocytes au sein du foie peut être compromise chez des patients cirrhotiques à l'architecture hépatique anormale. De plus, l'injection d'hépatocytes dans la veine porte risque de majorer l'hypertension portale. L'injection dans l'artère splénique, en intrapéritonéal, ou une injection directement dans le foie ou la rate représentent des alternatives.
- Déterminer le nombre de cellules à transplanter afin de corriger l'insuffisance hépatique. Habituellement, jusqu'à 100×10^6 cellules/kg peuvent être injectées par la veine porte (Dhawan et al., 2010). L'injection dans la veine porte d'une masse de cellules supérieure à 1% de la masse hépatique peut entraîner des effets indésirables, comme l'hypertension portale ou l'embolisation pulmonaire.
- Améliorer l'intégration, la prolifération et la survie des cellules transplantées dans le foie natif. A l'heure actuelle, les bénéfices de la transplantation hépatocytaire ne sont que temporaires, et la répétition des injections est souvent nécessaire. Chez la souris, de bons résultats ont été obtenus quand les cellules transplantées présentaient un avantage sélectif de survie par rapport aux hépatocytes natifs. Chez l'homme, l'irradiation hépatique pré-transplantation ou l'embolisation portale partielle sont des techniques potentielles pour améliorer la survie des hépatocytes transplantés (Soltys et al., 2010).
- Améliorer les techniques de suivi des cellules transplantées après transplantation, pour mieux comprendre le devenir des cellules après injection dans l'organisme.
- Trouver une source de cellules hépatocytaires en grande quantité. Les cellules dérivées des hES et des iPS pourraient être potentiellement employées dans ce contexte. En particulier, l'utilisation d'iPS provenant du patient lui-même ou d'un donneur

compatible pourrait éviter les problèmes d'immunogénécité. Cependant, l'utilisation de ces cellules pour la thérapie cellulaire humaine présente un certain nombre de problèmes à résoudre.

- Obstacles à l'utilisation de cellules dérivées des hES et d'iPS en thérapie cellulaire

Un des obstacles majeurs à l'utilisation de cellules dérivées des hES et d'iPS est le potentiel tumorigène de ces cellules. Les hES ont plusieurs caractéristiques phénotypiques voisines des cellules cancéreuses : une vitesse de prolifération élevée, une absence d'inhibition de contact, une tendance à l'instabilité génomique, une forte activité télomérase, une forte expression d'oncogènes comme Myc et Klf4, et des similitudes dans leur expression génétique et leur état épigénétique (Ben-David and Benvenisty, 2011). Quand les hES sont injectées chez des souris immunodéficientes, elles forment des tératomes (Thomson et al., 1998). Les iPS seraient encore plus tumorigènes que les hES, pour plusieurs raisons. La reprogrammation nécessite des manipulations génétiques par vecteurs rétroviraux, qui présentent un risque d'oncogenèse insertionnelle, et un risque de réactivation. Plusieurs stratégies ont été développées afin de réduire ce risque (cf chapitre V.2). La reprogrammation entraîne des modifications épigénétiques pouvant augmenter l'instabilité génétique des cellules. De plus, les iPS dérivent de cellules somatiques adultes qui se sont déjà multipliées de nombreuses fois, et ont pu acquérir des mutations (Ben-David and Benvenisty, 2011). Les iPS formeraient des tératomes plus rapidement que les hES (Gutierrez-Aranda et al., 2010), et pourraient être à l'origine de tumeurs somatiques carcinomateuses, ce qui n'est pas habituellement observé avec les hES, qui sont à l'origine de tératomes bénins (Ben-David and Benvenisty, 2011). De plus, les deux types cellulaires sont soumis à une pression sélective lors de leur dérivation et leur culture : les cellules conservées pour la culture à long terme seront celles qui prolifèrent le plus et maintiennent leur état indifférencié. Ces cellules ne sont probablement pas celles qui sont les plus adaptées à la différenciation, et il est possible qu'elles aient un potentiel tumorigène accru (Knoepfler, 2009).

La transplantation des hES-Hep dans des modèles murins a conduit à l'apparition de tératomes, voire d'adénocarcinomes, et ce malgré un tri cellulaire préalable (Basma et al., 2009). Il sera nécessaire de développer des stratégies pour diminuer le risque tumorigène lié

aux cellules dérivées des hES et des iPS. Une différenciation la plus complète possible des cellules serait souhaitable, mais il est possible que des cellules ayant des phénotypes immatures soient utiles pour la thérapie cellulaire, car elles auraient un potentiel prolifératif plus important une fois dans l'hôte, et pourraient se différencier *in vivo*. La population cellulaire utilisée pour une thérapie cellulaire ne devra pas contenir des cellules indifférenciées. Des techniques de tri efficace doivent être développées, comme l'utilisation d'anticorps cytotoxiques contre les cellules pluripotentes (Choo et al., 2008; Tan et al., 2009), ou le cytométrie de flux utilisant des marqueurs de surface de cellules pluripotentes, comme le SSEA-4 et le TRA-1-60 (Fong et al., 2009), ou le SSEA-5 (Tang et al., 2011). Cette dernière étude a également identifié 5 marqueurs (CD9, CD30, CD50, CD90 et CD200) caractéristiques de cellules pluripotentes. Le tri avec l'anticorps anti-SSEA-5 en association avec deux des marqueurs CD a permis d'abolir la formation de tératomes à partir de cultures de hES incomplètement différenciées. Au vu des difficultés à générer une population homogène de cellules différenciées, une autre stratégie serait d'interférer avec des gènes nécessaires pour la formation de tératomes, mais dispensables pour les cellules matures. Par exemple, l'ablation (par voie génétique ou pharmacologique) de l'expression de survivine, un oncogène fœtal avec une activité anti-apoptique a stimulé l'apoptose dans les cultures de hES et leurs tératomes (Blum et al., 2009). Une autre équipe a introduit un gène suicide, la thymidine kinase, dans des hES, qui les rend sensible au ganciclovir, un traitement antiviral (Schuldiner et al., 2003). Avec cette technique, l'administration de ganciclovir pouvait éliminer des tératomes secondaires aux hES exprimant le gène suicide. Une meilleure compréhension des mécanismes de la tumorigénèse permettrait de cibler des gènes appropriés.

Un autre problème soulevé par l'utilisation de cellules dérivées de hES ou d'iPS est l'utilisation actuelle de cellules ou de produits d'origine animale dans les systèmes de culture. Les hES sont le plus souvent cultivées sur des feeders (couche de cellules nourricières) d'origine murine. Le sérum de veau fœtal est souvent employé dans les milieux de culture. L'utilisation de produits d'origine animale présente un risque d'infection des cellules en culture par des prions, des virus, ou d'autres pathogènes non encore identifiés (Mannello and Tonti, 2007). De plus, les cellules en culture peuvent incorporer des protéines d'origine animale qui pourraient engendrer une réaction immunogène si elles sont ultérieurement utilisées en thérapie cellulaire. Il a été démontré que des hES cultivées sur feeder de fibroblastes murins pouvaient être contaminées par un acide sialique non humain et

immunogène (Martin et al., 2005), alors que des patients ayant reçu des lymphocytes cultivés avec du sérum de veau fœtal ont développé une réaction d'hypersensibilité de type III (dépôts de complexes immuns) (Selvaggi et al., 1997). Le sérum de veau fœtal est un produit biologique dont la composition peut varier selon le lot de fabrication. La variabilité de ce produit peut gêner la reproductibilité des résultats de culture. Il sera donc nécessaire de développer et de généraliser l'utilisation de sérums de remplacement (dont la composition chimique est définie) et de feeders d'origine humaine. Dans le cadre d'applications en thérapie cellulaire, il est également souhaitable de minimiser les risques liés aux hES eux-mêmes, en s'assurant de l'absence de maladie infectieuse transmissible ou d'anomalie génétique héréditaire (Halme and Kessler, 2006). Ceci implique la réalisation des tests sur les lignées de hES, et d'avoir à disposition les dossiers médicaux des donneurs de gamètes à l'origine de l'embryon d'où la lignée a été dérivée. Cependant, une longue période peut s'écouler entre le moment de la donation de gamètes et l'utilisation de cellules dérivées des hES, et il n'est pas certain que les lignées de hES utilisées actuellement remplissent ces critères. Il sera également nécessaire d'étudier le profil immunologique des lignées de hES avant toute utilisation en thérapie cellulaire, car elles expriment des antigènes (HLA classe I et II, antigènes de groupe sanguin ABO) qui peuvent entraîner un phénomène de rejet chez le receveur (Bradley et al., 2002; Lee et al., 2010; Molne et al., 2008). Comme avec la transplantation d'organes à l'heure actuelle, les cellules dérivées des hES devront être compatibles avec le receveur pour le système ABO, et il est probable qu'une immunosuppression au long cours sera nécessaire. Une alternative serait de créer des banques de hES présentant les combinaisons HLA/ABO les plus fréquentes, afin d'être compatibles avec une majorité de la population.

Cependant, la dérivation d'un grand nombre de lignées de hES et le développement d'une telle banque est freiné par les problèmes éthiques posés par les hES, car leur obtention passe nécessairement par la destruction de l'embryon dont elles sont issues. Les iPS contournent ce problème éthique puisqu'elles sont issues de tissus adultes. Les iPS ouvrent des perspectives de médecine « personnalisée », avec la création de lignées à partir des cellules d'un patient pouvant être utilisées dans une thérapie cellulaire chez ce même patient, par exemple dans un contexte d'insuffisance hépatique chronique, ou pour la correction d'une maladie métabolique après modification génétique des cellules *in vitro*. Une étape a récemment été franchie dans cette direction : le gène défectueux responsable du déficit en α 1-antitrypsine a été excisé dans une lignée d'iPS humains d'un patient atteint de cette maladie, puis remplacé par un gène

fonctionnel. Les iPS ont été différenciées vers l'hépatocyte et étaient capables de sécréter de l' α 1-antitrypsine humaine après transplantation chez la souris (Yusa et al., 2011). L'utilisation des cellules du patient lui-même éviterait les problèmes d'immunogénicité et de rejet d'une transplantation cellulaire. Ces lignées « personnelles » pourraient être utilisées dans des études pharmacologiques afin de déterminer le traitement le plus efficace chez un patient donné. Cependant, la mise en œuvre d'applications cliniques des iPS est confrontée aux problèmes de tumorigénicité de ces cellules (cf. précédemment), mais également aux rendements faibles de reprogrammation, ce qui prolonge la durée nécessaire pour obtenir des cellules différenciées. Ces cellules ne semblent pas encore adaptées à des applications cliniques nécessitant une disponibilité immédiate des cellules (insuffisance hépatique aiguë, par exemple). Plus récemment, il a été démontré que des cellules adultes différenciées pouvaient être directement reprogrammées vers un autre type cellulaire, avec notamment la conversion de fibroblastes en hépatocytes (Huang et al., 2011; Sekiya and Suzuki, 2011) ou en cellules neuronales (Kim et al., 2011). Parallèlement, des hépatocytes ont pu être transdifférenciés vers des cellules neuronales (Marro et al., 2011), démontrant que des cellules d'une couche germinale peuvent être reprogrammées vers des cellules d'une couche germinale différente. Ceci démontre l'importance du phénomène de plasticité cellulaire, et ouvre la voie à la génération d'hépatocytes directement à partir d'autres tissus, ce qui contournerait les problèmes liés à la tumorigénicité des hES et des iPS.

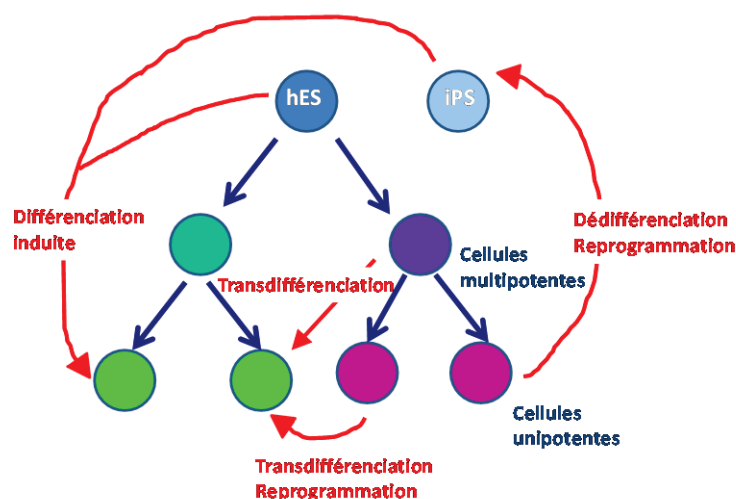


Figure 34. Nouveaux concepts dans la plasticité cellulaire

Les avancées des dernières décennies dans l'isolement et la culture de populations cellulaires a permis le développement de la thérapie cellulaire, dont le premier exemple a été la greffe de moëlle osseuse dans les maladies hématologiques, qui est devenue un traitement utilisé en pratique courante. Les progrès récents dans le domaine des cellules souches s'est traduit par une augmentation considérable du nombre d'essais cliniques utilisant des cellules souches en thérapie cellulaire depuis 2 à 3 ans (Trounson et al., 2011). Ces essais concernent principalement des cellules souches isolées de tissus adultes ou de cordons ombilicaux, autologues ou allogènes, concernant une grande variété de pathologies : infarctus du myocarde (cellules souches mésenchymateuses et cardiaques), paraplégies, ataxies, sclérose latérale amyotrophique, maladie de Parkinson, accidents vasculaires cérébraux (cellules souches mésenchymateuses, neurales, et de cellules souches de sang de cordon ombilical), maladies auto-immunes comme la sclérose en plaques (cellules souches hématopoïétiques), la drépanocytose, la β -thalassémie (cellules souches hématopoïétiques), les maladies de la cornée (cellules souches limbales) et les dystrophies musculaires (myoblastes) (Trounson et al., 2011). A l'heure actuelle, trois essais cliniques utilisant des cellules dérivées de hES sont en cours (Trounson et al., 2011). Le premier essai, mené par la société Geron et approuvé en 2009, évalue l'effet de la transplantation de cellules progéniteurs oligodendrocytaires issues de hES dans des patients souffrant de lésions traumatiques de la moëlle osseuse thoracique. Deux autres essais utilisent des cellules rétinienne pigmentaires différenciées de hES dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge ou juvénile (maladie de Stargardt). De futurs essais de cellules issues de hES pourront concerner l'utilisation de cellules progéniteurs de motoneurones dans l'atrophie musculaire spinale (application en cours) (Trounson et al., 2011), de cellules β d'ilôts de Langerhans au sein d'une chambre implantée chez les diabétiques (California Institute of Regenerative Medicine), ou de cellules progéniteurs cardiaques dans l'infarctus du myocarde (Blin et al., 2010).

Même si le chemin menant aux applications cliniques des hES est long et difficile, le fait que les premiers essais cliniques ont pu voir le jour est encourageant. Les résultats de ces essais détermineront l'avenir des hES dans la thérapie cellulaire. Quoiqu'il en soit, les travaux réalisés sur les hES ont permis de mieux comprendre les mécanismes de la différenciation vers l'hépatocyte, et serviront comme point de départ pour les recherches à venir.

BIBLIOGRAPHIE

- Abakumova, O., Fedorova, L.M., Popov, A.A., Li, V.S., Arkhangelskaya, S.L., and Bachmanova, G.I. (1994). Effects of albumin-bilirubin complexes with syngeneic or allogeneic albumin on DNA and protein synthesis in liver and spleen of partially hepatectomized rats. *J Hepatol* 21, 947-952.
- Agarwal, S., Holton, K.L., and Lanza, R. (2008). Efficient differentiation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 26, 1117-1127.
- Agellon, L.B., Zhang, P., Jiang, X.C., Mendelsohn, L., and Tall, A.R. (1992). The CCAAT/enhancer-binding protein trans-activates the human cholesteryl ester transfer protein gene promoter. *J Biol Chem* 267, 22336-22339.
- Alison, M.R., Poulson, R., Jeffery, R., Dhillon, A.P., Quaglia, A., Jacob, J., Novelli, M., Prentice, G., Williamson, J., and Wright, N.A. (2000). Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 406, 257.
- Alison, M.R., Vig, P., Russo, F., Bigger, B.W., Amofah, E., Themis, M., and Forbes, S. (2004). Hepatic stem cells: from inside and outside the liver? *Cell Prolif* 37, 1-21.
- Andersson, S.M., Raiha, N.C., and Ohisalo, J.J. (1980). Tyrosine aminotransferase activity in human fetal liver. *J Dev Physiol* 2, 17-27.
- Aninat, C., Piton, A., Glaise, D., Le Charpentier, T., Langouet, S., Morel, F., Guguen-Guillouzo, C., and Guillouzo, A. (2006). Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos* 34, 75-83.
- Anokye-Danso, F., Trivedi, C.M., Juhr, D., Gupta, M., Cui, Z., Tian, Y., Zhang, Y., Yang, W., Gruber, P.J., Epstein, J.A., *et al.* (2011). Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 8, 376-388.
- Antoniou, A., Raynaud, P., Cordi, S., Zong, Y., Tronche, F., Stanger, B.Z., Jacquemin, P., Pierreux, C.E., Clotman, F., and Lemaigre, F.P. (2009). Intrahepatic bile ducts develop according to a new mode of tubulogenesis regulated by the transcription factor SOX9. *Gastroenterology* 136, 2325-2333.
- Arney, K.L., and Fisher, A.G. (2004). Epigenetic aspects of differentiation. *J Cell Sci* 117, 4355-4363.
- Asgari, S., Pournasr, B., Salekdeh, G.H., Ghodsizadeh, A., Ott, M., and Baharvand, H. (2010). Induced pluripotent stem cells: a new era for hepatology. *J Hepatol* 53, 738-751.
- Aurich, H., Sgodda, M., Kaltwasser, P., Vetter, M., Weise, A., Liehr, T., Brulport, M., Hengstler, J.G., Dollinger, M.M., Fleig, W.E., *et al.* (2009). Hepatocyte differentiation

- of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut* 58, 570-581.
- Aurich, I., Mueller, L.P., Aurich, H., Luetzkendorf, J., Tisljar, K., Dollinger, M.M., Schormann, W., Walldorf, J., Hengstler, J.G., Fleig, W.E., *et al.* (2007). Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut* 56, 405-415.
- Baharvand, H., Hashemi, S.M., Kazemi Ashtiani, S., and Farrokhi, A. (2006). Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro. *Int J Dev Biol* 50, 645-652.
- Baharvand, H., Hashemi, S.M., and Shahsavani, M. (2008). Differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatocyte-like cells in a serum-free adherent culture condition. *Differentiation* 76, 465-477.
- Banas, A., Teratani, T., Yamamoto, Y., Tokuhara, M., Takeshita, F., Osaki, M., Kawamata, M., Kato, T., Okochi, H., and Ochiya, T. (2008). IFATS collection: in vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury. *Stem Cells* 26, 2705-2712.
- Banas, A., Teratani, T., Yamamoto, Y., Tokuhara, M., Takeshita, F., Quinn, G., Okochi, H., and Ochiya, T. (2007). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology* 46, 219-228.
- Barbera-Guillem, E., Arrue, J.M., Ballesteros, J., and Vidal-Vanaclocha, F. (1986). Structural changes in endothelial cells of developing rat liver in the transition from fetal to postnatal life. *J Ultrastruct Mol Struct Res* 97, 197-206.
- Barroso-delJesus, A., Romero-Lopez, C., Lucena-Aguilar, G., Melen, G.J., Sanchez, L., Ligerio, G., Berzal-Herranz, A., and Menendez, P. (2008). Embryonic stem cell-specific miR302-367 cluster: human gene structure and functional characterization of its core promoter. *Mol Cell Biol* 28, 6609-6619.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215-233.
- Basma, H., Soto-Gutierrez, A., Yannam, G.R., Liu, L., Ito, R., Yamamoto, T., Ellis, E., Carson, S.D., Sato, S., Chen, Y., *et al.* (2009). Differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived hepatocytes. *Gastroenterology* 136, 990-999.
- BD Biosciences www.bdbiosciences.com. [En ligne].
- Beath, S.V. (2003). Hepatic function and physiology in the newborn. *Semin Neonatol* 8, 337-346.
- Beattie, G.M., Lopez, A.D., Bucay, N., Hinton, A., Firpo, M.T., King, C.C., and Hayek, A. (2005). Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Stem Cells* 23, 489-495.

- Beaudry, J.B., Pierreux, C.E., Hayhurst, G.P., Plumb-Rudewiez, N., Weiss, M.C., Rousseau, G.G., and Lemaigre, F.P. (2006). Threshold levels of hepatocyte nuclear factor 6 (HNF-6) acting in synergy with HNF-4 and PGC-1alpha are required for time-specific gene expression during liver development. *Mol Cell Biol* 26, 6037-6046.
- Becker, K.A., Ghule, P.N., Therrien, J.A., Lian, J.B., Stein, J.L., van Wijnen, A.J., and Stein, G.S. (2006). Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase. *J Cell Physiol* 209, 883-893.
- Becker, K.A., Stein, J.L., Lian, J.B., van Wijnen, A.J., and Stein, G.S. (2007). Establishment of histone gene regulation and cell cycle checkpoint control in human embryonic stem cells. *J Cell Physiol* 210, 517-526.
- Bedossa, P., and Paradis, V. (2003). Liver extracellular matrix in health and disease. *J Pathol* 200, 504-515.
- Begum, S., Joshi, M., Ek, M., Holgersson, J., Kleman, M.I., and Sumitran-Holgersson, S. (2010). Characterization and engraftment of long-term serum-free human fetal liver cell cultures. *Cytotherapy* 12, 201-211.
- Ben-David, U., and Benvenisty, N. (2011). The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cancer* 11, 268-277.
- Bendall, S.C., Stewart, M.H., Menendez, P., George, D., Vijayaragavan, K., Werbowetski-Ogilvie, T., Ramos-Mejia, V., Rouleau, A., Yang, J., Bosse, M., *et al.* (2007). IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in vitro. *Nature* 448, 1015-1021.
- Benhamouche, S., Decaens, T., Godard, C., Chambrey, R., Rickman, D.S., Moinard, C., Vasseur-Cognet, M., Kuo, C.J., Kahn, A., Perret, C., *et al.* (2006). Apc tumor suppressor gene is the "zonation-keeper" of mouse liver. *Dev Cell* 10, 759-770.
- Bernal, W., Auzinger, G., Dhawan, A., and Wendon, J. (2010). Acute liver failure. *Lancet* 376, 190-201.
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., *et al.* (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125, 315-326.
- Bieche, I., Narjoz, C., Asselah, T., Vacher, S., Marcellin, P., Lidereau, R., Beaune, P., and de Waziers, I. (2007). Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome (CYP)1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues. *Pharmacogenet Genomics* 17, 731-742.
- Blackham, A., and Spencer, P.S. (1969). The effects of oestrogens and progestins on the response of mice to barbiturates. *Br J Pharmacol* 37, 129-139.
- Blin, G., Nury, D., Stefanovic, S., Neri, T., Guillevic, O., Brinon, B., Bellamy, V., Rucker-Martin, C., Barbry, P., Bel, A., *et al.* (2010). A purified population of multipotent

- cardiovascular progenitors derived from primate pluripotent stem cells engrafts in postmyocardial infarcted nonhuman primates. *J Clin Invest* 120, 1125-1139.
- Blum, B., Bar-Nur, O., Golan-Lev, T., and Benvenisty, N. (2009). The anti-apoptotic gene survivin contributes to teratoma formation by human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 27, 281-287.
- Boheler, K.R. (2009). Stem cell pluripotency: a cellular trait that depends on transcription factors, chromatin state and a checkpoint deficient cell cycle. *J Cell Physiol* 221, 10-17.
- Bort, R., Signore, M., Tremblay, K., Martinez Barbera, J.P., and Zaret, K.S. (2006). Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development. *Dev Biol* 290, 44-56.
- Bossard, P., and Zaret, K.S. (1998). GATA transcription factors as potentiators of gut endoderm differentiation. *Development* 125, 4909-4917.
- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., *et al.* (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122, 947-956.
- Boyer, L.A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L.A., Lee, T.I., Levine, S.S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M.K., *et al.* (2006). Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 441, 349-353.
- Bradley, J.A., Bolton, E.M., and Pedersen, R.A. (2002). Stem cell medicine encounters the immune system. *Nat Rev Immunol* 2, 859-871.
- Braeuning, A., Ittrich, C., Kohle, C., Buchmann, A., and Schwarz, M. (2007). Zonal gene expression in mouse liver resembles expression patterns of Ha-ras and beta-catenin mutated hepatomas. *Drug Metab Dispos* 35, 503-507.
- Bralet, M.P., Branchereau, S., Brechot, C., and Ferry, N. (1994). Cell lineage study in the liver using retroviral mediated gene transfer. Evidence against the streaming of hepatocytes in normal liver. *Am J Pathol* 144, 896-905.
- Brizard, J.P., Ramos, J., Robert, A., Lafitte, D., Bigi, N., Sarda, P., Laoudj-Chenivesse, D., Navarro, F., Blanc, P., Assenat, E., *et al.* (2009). Identification of proteomic changes during human liver development by 2D-DIGE and mass spectrometry. *J Hepatol* 51, 114-126.
- Brolen, G., Sivertsson, L., Bjorquist, P., Eriksson, G., Ek, M., Semb, H., Johansson, I., Andersson, T.B., Ingelman-Sundberg, M., and Heins, N. (2010). Hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells specifically via definitive endoderm and a progenitor stage. *J Biotechnol* 145, 284-294.
- Cadoret, A., Ovejero, C., Terris, B., Souil, E., Levy, L., Lamers, W.H., Kitajewski, J., Kahn, A., and Perret, C. (2002). New targets of beta-catenin signaling in the liver are involved in the glutamine metabolism. *Oncogene* 21, 8293-8301.

- Cai, J., Zhao, Y., Liu, Y., Ye, F., Song, Z., Qin, H., Meng, S., Chen, Y., Zhou, R., Song, X., *et al.* (2007). Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology* 45, 1229-1239.
- Calegari, F., Haubensak, W., Haffner, C., and Huttner, W.B. (2005). Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development. *J Neurosci* 25, 6533-6538.
- Calegari, F., and Huttner, W.B. (2003). An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. *J Cell Sci* 116, 4947-4955.
- California Institute of Regenerative Medicine. <http://www.cirm.ca.gov/content/cell-therapy-diabetes>. Cell Therapy for Diabetes. [En ligne].
- Calmont, A., Wandzioch, E., Tremblay, K.D., Minowada, G., Kaestner, K.H., Martin, G.R., and Zaret, K.S. (2006). An FGF response pathway that mediates hepatic gene induction in embryonic endoderm cells. *Dev Cell* 11, 339-348.
- Campard, D., Lysy, P.A., Najimi, M., and Sokal, E.M. (2008). Native umbilical cord matrix stem cells express hepatic markers and differentiate into hepatocyte-like cells. *Gastroenterology* 134, 833-848.
- Carpenter, B., Lin, Y., Stoll, S., Raffai, R.L., McCuskey, R., and Wang, R. (2005). VEGF is crucial for the hepatic vascular development required for lipoprotein uptake. *Development* 132, 3293-3303.
- Carpentier, R., Suner, R.E., Van Hul, N., Kopp, J.L., Beaudry, J.B., Cordi, S., Antoniou, A., Raynaud, P., Lepreux, S., Jacquemin, P., *et al.* (2011). Embryonic Ductal Plate Cells Give Rise to Cholangiocytes, Periportal Hepatocytes, and Adult Liver Progenitor Cells. *Gastroenterology*.
- Cashore, W. (2011). Neonatal Bilirubin Metabolism. In *Fetal and Neonatal Physiology*, R. Polin, ed. (Saunders).
- Cassiman, D., Libbrecht, L., Sinelli, N., Desmet, V., Deneef, C., and Roskams, T. (2002). The vagal nerve stimulates activation of the hepatic progenitor cell compartment via muscarinic acetylcholine receptor type 3. *Am J Pathol* 161, 521-530.
- Castell, J.V., Jover, R., Martinez-Jimenez, C.P., and Gomez-Lechon, M.J. (2006). Hepatocyte cell lines: their use, scope and limitations in drug metabolism studies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2, 183-212.
- Cellartis. www.cellartis.com. [En ligne].
- Centre Hepato-biliaire Paul Brousse. <http://www.centre-hepato-biliaire.org/comprendre/etreopere/transplantation/histoire/index.phtml>. La transplantation hépatique: quelques repères. Centre Hépatobiliaire Hôpital Paul Brousse Villejuif [En ligne].

- Cerec, V., Glaise, D., Garnier, D., Morosan, S., Turlin, B., Drenou, B., Gripon, P., Kremsdorf, D., Gugen-Guillouzo, C., and Corlu, A. (2007). Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology* 45, 957-967.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113, 643-655.
- Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L., and Smith, A. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* 450, 1230-1234.
- Chen, X., and Zeng, F. (2011). Directed hepatic differentiation from embryonic stem cells. *Protein Cell* 2, 180-188.
- Chen, Y., Soto-Gutierrez, A., Navarro-Alvarez, N., Rivas-Carrillo, J.D., Yamatsuji, T., Shirakawa, Y., Tanaka, N., Basma, H., Fox, I.J., and Kobayashi, N. (2006). Instant hepatic differentiation of human embryonic stem cells using activin A and a deleted variant of HGF. *Cell Transplant* 15, 865-871.
- Chin, M.H., Mason, M.J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsumyan, G., Aimiwu, O., Richter, L., Zhang, J., *et al.* (2009). Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell* 5, 111-123.
- Choo, A.B., Tan, H.L., Ang, S.N., Fong, W.J., Chin, A., Lo, J., Zheng, L., Hentze, H., Philp, R.J., Oh, S.K., *et al.* (2008). Selection against undifferentiated human embryonic stem cells by a cytotoxic antibody recognizing podocalyxin-like protein-1. *Stem Cells* 26, 1454-1463.
- Christodoulou, C., Longmire, T.A., Shen, S.S., Bourdon, A., Sommer, C.A., Gadue, P., Spira, A., Gouon-Evans, V., Murphy, G.J., Mostoslavsky, G., *et al.* (2011). Mouse ES and iPS cells can form similar definitive endoderm despite differences in imprinted genes. *J Clin Invest* 121, 2313-2325.
- Christoffels, V.M., Sassi, H., Ruijter, J.M., Moorman, A.F., Grange, T., and Lamers, W.H. (1999). A mechanistic model for the development and maintenance of portocentral gradients in gene expression in the liver. *Hepatology* 29, 1180-1192.
- Clotman, F., Jacquemin, P., Plumb-Rudewiez, N., Pierreux, C.E., Van der Smissen, P., Dietz, H.C., Courtoy, P.J., Rousseau, G.G., and Lemaigre, F.P. (2005). Control of liver cell fate decision by a gradient of TGF beta signaling modulated by Onecut transcription factors. *Genes Dev* 19, 1849-1854.
- Clotman, F., Lannoy, V.J., Reber, M., Cereghini, S., Cassiman, D., Jacquemin, P., Roskams, T., Rousseau, G.G., and Lemaigre, F.P. (2002). The onecut transcription factor HNF6 is required for normal development of the biliary tract. *Development* 129, 1819-1828.

- Coffinier, C., Gresh, L., Fiette, L., Tronche, F., Schutz, G., Babinet, C., Pontoglio, M., Yaniv, M., and Barra, J. (2002). Bile system morphogenesis defects and liver dysfunction upon targeted deletion of HNF1beta. *Development* 129, 1829-1838.
- Collardeau-Frachon, S., and Scoazec, J.Y. (2008). Vascular development and differentiation during human liver organogenesis. *Anat Rec (Hoboken)* 291, 614-627.
- Colletti, M., Cicchini, C., Conigliaro, A., Santangelo, L., Alonzi, T., Pasquini, E., Tripodi, M., and Amicone, L. (2009). Convergence of Wnt signaling on the HNF4alpha-driven transcription in controlling liver zonation. *Gastroenterology* 137, 660-672.
- Conaghan, J., Handyside, A.H., Winston, R.M., and Leese, H.J. (1993). Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos in vitro. *J Reprod Fertil* 99, 87-95.
- Conrad, S., Renninger, M., Hennenlotter, J., Wiesner, T., Just, L., Bonin, M., Aicher, W., Buhring, H.J., Mattheus, U., Mack, A., *et al.* (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* 456, 344-349.
- Coulombel, L. (2004). Identification of hematopoietic stem/progenitor cells: strength and drawbacks of functional assays. *Oncogene* 23, 7210-7222.
- Couvelard, A., Scoazec, J.Y., Dauge, M.C., Bringuier, A.F., Potet, F., and Feldmann, G. (1996). Structural and functional differentiation of sinusoidal endothelial cells during liver organogenesis in humans. *Blood* 87, 4568-4580.
- Crosby, H.A., Hubscher, S., Fabris, L., Joplin, R., Sell, S., Kelly, D., and Strain, A.J. (1998). Immunolocalization of putative human liver progenitor cells in livers from patients with end-stage primary biliary cirrhosis and sclerosing cholangitis using the monoclonal antibody OV-6. *Am J Pathol* 152, 771-779.
- Crosby, H.A., Kelly, D.A., and Strain, A.J. (2001). Human hepatic stem-like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium. *Gastroenterology* 120, 534-544.
- D'Amour, K.A., Agulnick, A.D., Eliazer, S., Kelly, O.G., Kroon, E., and Baetge, E.E. (2005). Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol* 23, 1534-1541.
- D'Ippolito, G., Schiller, P.C., Ricordi, C., Roos, B.A., and Howard, G.A. (1999). Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res* 14, 1115-1122.
- Dan, Y.Y., Riehle, K.J., Lazaro, C., Teoh, N., Haque, J., Campbell, J.S., and Fausto, N. (2006). Isolation of multipotent progenitor cells from human fetal liver capable of differentiating into liver and mesenchymal lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9912-9917.
- De Alwis, N., Hudson, G., Burt, A.D., Day, C.P., and Chinnery, P.F. (2009). Human liver stem cells originate from the canals of Hering. *Hepatology* 50, 992-993.

- De Silvestro, G., Vicarioto, M., Donadel, C., Menegazzo, M., Marson, P., and Corsini, A. (2004). Mobilization of peripheral blood hematopoietic stem cells following liver resection surgery. *Hepatogastroenterology* 51, 805-810.
- Decaens, C., Durand, M., Grosse, B., and Cassio, D. (2008). Which in vitro models could be best used to study hepatocyte polarity? *Biol Cell* 100, 387-398.
- DeLaForest, A., Nagaoka, M., Si-Tayeb, K., Noto, F.K., Konopka, G., Battle, M.A., and Duncan, S.A. (2011). HNF4A is essential for specification of hepatic progenitors from human pluripotent stem cells. *Development* 138, 4143-4153.
- Demetriou, A.A., Brown, R.S., Jr., Busuttil, R.W., Fair, J., McGuire, B.M., Rosenthal, P., Am Esch, J.S., 2nd, Lerut, J., Nyberg, S.L., Salizzoni, M., *et al.* (2004). Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure. *Ann Surg* 239, 660-667; discussion 667-670.
- Deutsch, G., Jung, J., Zheng, M., Lora, J., and Zaret, K.S. (2001). A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development* 128, 871-881.
- Dhawan, A., Mitry, R.R., and Hughes, R.D. (2006). Hepatocyte transplantation for liver-based metabolic disorders. *J Inherit Metab Dis* 29, 431-435.
- Dhawan, A., Puppi, J., Hughes, R.D., and Mitry, R.R. (2010). Human hepatocyte transplantation: current experience and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7, 288-298.
- di Bonzo, L.V., Ferrero, I., Cravanzola, C., Mareschi, K., Rustichell, D., Novo, E., Sanavio, F., Cannito, S., Zamara, E., Bertero, M., *et al.* (2008). Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential. *Gut* 57, 223-231.
- Doi, A., Park, I.H., Wen, B., Murakami, P., Aryee, M.J., Irizarry, R., Herb, B., Ladd-Acosta, C., Rho, J., Loewer, S., *et al.* (2009). Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet* 41, 1350-1353.
- Dolle, L., Best, J., Empsen, C., Mei, J., Van Rossen, E., Roelandt, P., Snykers, S., Najimi, M., Battah, F.A., Theise, N.D., *et al.* (2011). Successful isolation of liver progenitor cells by aldehyde dehydrogenase activity from naive mice. *Hepatology*.
- Dravida, S., Pal, R., Khanna, A., Tipnis, S.P., Ravindran, G., and Khan, F. (2005). The transdifferentiation potential of limbal fibroblast-like cells. *Brain Res Dev Brain Res* 160, 239-251.
- Duan, Y., Catana, A., Meng, Y., Yamamoto, N., He, S., Gupta, S., Gambhir, S.S., and Zern, M.A. (2007). Differentiation and enrichment of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells in vitro and in vivo. *Stem Cells* 25, 3058-3068.

- Duan, Y., Ma, X., Zou, W., Wang, C., Bahbahan, I.S., Ahuja, T.P., Tolstikov, V., and Zern, M.A. (2010). Differentiation and characterization of metabolically functioning hepatocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 28, 674-686.
- Duret, C., Gerbal-Chaloin, S., Ramos, J., Fabre, J.M., Jacquet, E., Navarro, F., Blanc, P., Sa-Cunha, A., Maurel, P., and Daujat-Chavanieu, M. (2007). Isolation, characterization, and differentiation to hepatocyte-like cells of nonparenchymal epithelial cells from adult human liver. *Stem Cells* 25, 1779-1790.
- EASL. www.easl.eu/assets/application/files/19d80b59a26a03c_file.pdf. Facts and Figures. European Association for the Study of the Liver [*En ligne*].
- Eckersley-Maslin, M.A., Warner, F.J., Grzelak, C.A., McCaughan, G.W., and Shackel, N.A. (2009). Bone marrow stem cells and the liver: are they relevant? *J Gastroenterol Hepatol* 24, 1608-1616.
- Efroni, S., Duttagupta, R., Cheng, J., Dehghani, H., Hoeppner, D.J., Dash, C., Bazett-Jones, D.P., Le Grice, S., McKay, R.D., Buetow, K.H., *et al.* (2008). Global transcription in pluripotent embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2, 437-447.
- Ek, M., Soderdahl, T., Kuppers-Munther, B., Edsbacke, J., Andersson, T.B., Bjorquist, P., Cotgreave, I., Jernstrom, B., Ingelman-Sundberg, M., and Johansson, I. (2007). Expression of drug metabolizing enzymes in hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells. *Biochem Pharmacol* 74, 496-503.
- Ellis, A.J., Hughes, R.D., Nicholl, D., Langley, P.G., Wendon, J.A., O'Grady, J.G., and Williams, R. (1999). Temporary extracorporeal liver support for severe acute alcoholic hepatitis using the BioLogic-DT. *Int J Artif Organs* 22, 27-34.
- Enomoto, H., Yoshida, K., Kishima, Y., Kinoshita, T., Yamamoto, M., Everett, A.D., Miyajima, A., and Nakamura, H. (2002). Hepatoma-derived growth factor is highly expressed in developing liver and promotes fetal hepatocyte proliferation. *Hepatology* 36, 1519-1527.
- Erickson, S.K., Bruscalupi, G., Conti Devirgiliis, L., Leoni, S., Mangiantini, M.T., Spagnuolo, S., and Trentalance, A. (1988). Changes in parameters of lipoprotein metabolism during rat hepatic development. *Biochim Biophys Acta* 963, 525-533.
- Erker, L., and Grompe, M. (2007). Signaling networks in hepatic oval cell activation. *Stem Cell Res* 1, 90-102.
- Evarts, R.P., Nagy, P., Marsden, E., and Thorgeirsson, S.S. (1987). A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. *Carcinogenesis* 8, 1737-1740.
- Evarts, R.P., Nagy, P., Nakatsukasa, H., Marsden, E., and Thorgeirsson, S.S. (1989). In vivo differentiation of rat liver oval cells into hepatocytes. *Cancer Res* 49, 1541-1547.

- Fan, J., Shen, H., Dai, Q., Minuk, G.Y., Burzynski, F.J., and Gong, Y. (2009). Bone morphogenetic protein-4 induced rat hepatic progenitor cell (WB-F344 cell) differentiation toward hepatocyte lineage. *J Cell Physiol* 220, 72-81.
- Farzaneh, Z., Pournasr, B., Ebrahimi, M., Aghdami, N., and Baharvand, H. (2010). Enhanced functions of human embryonic stem cell-derived hepatocyte-like cells on three-dimensional nanofibrillar surfaces. *Stem Cell Rev* 6, 601-610.
- Fausto, N., and Campbell, J.S. (2003). The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev* 120, 117-130.
- Fayard, E., Auwerx, J., and Schoonjans, K. (2004). LRH-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis. *Trends Cell Biol* 14, 250-260.
- Fellous, T.G., Islam, S., Tadrous, P.J., Elia, G., Kocher, H.M., Bhattacharya, S., Mears, L., Turnbull, D.M., Taylor, R.W., Greaves, L.C., *et al.* (2009). Locating the stem cell niche and tracing hepatocyte lineages in human liver. *Hepatology* 49, 1655-1663.
- Feng, Q., Lu, S.J., Klimanskaya, I., Gomes, I., Kim, D., Chung, Y., Honig, G.R., Kim, K.S., and Lanza, R. (2010). Hemangioblastic derivatives from human induced pluripotent stem cells exhibit limited expansion and early senescence. *Stem Cells* 28, 704-712.
- Ferrini, J.B., Pichard, L., Domergue, J., and Maurel, P. (1997). Long-term primary cultures of adult human hepatocytes. *Chem Biol Interact* 107, 31-45.
- Fiegel, H.C., Lioznov, M.V., Cortes-Dericks, L., Lange, C., Kluth, D., Fehse, B., and Zander, A.R. (2003). Liver-specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 21, 98-104.
- Fisher, R.A., and Strom, S.C. (2006). Human hepatocyte transplantation: worldwide results. *Transplantation* 82, 441-449.
- Flendrig, L.M., la Soe, J.W., Jorning, G.G., Steenbeek, A., Karlsen, O.T., Bovee, W.M., Ladiges, N.C., te Velde, A.A., and Chamuleau, R.A. (1997). In vitro evaluation of a novel bioreactor based on an integral oxygenator and a spirally wound nonwoven polyester matrix for hepatocyte culture as small aggregates. *J Hepatol* 26, 1379-1392.
- Fluckiger, A.C., Dehay, C., and Savatier, P. (2003). [Embryonic stem cells and cell replacement therapies in the nervous system]. *Med Sci (Paris)* 19, 699-708.
- Fluckiger, A.C., Marcy, G., Marchand, M., Negre, D., Cosset, F.L., Mitalipov, S., Wolf, D., Savatier, P., and Dehay, C. (2006). Cell cycle features of primate embryonic stem cells. *Stem Cells* 24, 547-556.
- Fong, C.Y., Peh, G.S., Gauthaman, K., and Bongso, A. (2009). Separation of SSEA-4 and TRA-1-60 labelled undifferentiated human embryonic stem cells from a heterogeneous cell population using magnetic-activated cell sorting (MACS) and fluorescence-activated cell sorting (FACS). *Stem Cell Rev* 5, 72-80.

- Francastel, C., Schubeler, D., Martin, D.I., and Groudine, M. (2000). Nuclear compartmentalization and gene activity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 137-143.
- Friedman, J.R., and Kaestner, K.H. (2006). The Foxa family of transcription factors in development and metabolism. *Cell Mol Life Sci* 63, 2317-2328.
- Gadue, P., Huber, T.L., Paddison, P.J., and Keller, G.M. (2006). Wnt and TGF-beta signaling are required for the induction of an in vitro model of primitive streak formation using embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 16806-16811.
- Gallitendoerfer, R., Abouzied, M.M., Hartmann, D., Dobrowolski, R., Gieselmann, V., and Franken, S. (2008). Hepatoma-derived growth factor (HDGF) is dispensable for normal mouse development. *Dev Dyn* 237, 1875-1885.
- Gangaraju, V.K., and Lin, H. (2009). MicroRNAs: key regulators of stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 116-125.
- Gasser, S.M. (2002). Visualizing chromatin dynamics in interphase nuclei. *Science* 296, 1412-1416.
- Gebhardt, R. (1992). Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacol Ther* 53, 275-354.
- Gehling, U.M., Willems, M., Dandri, M., Petersen, J., Berna, M., Thill, M., Wulf, T., Muller, L., Pollok, J.M., Schlagner, K., *et al.* (2005). Partial hepatectomy induces mobilization of a unique population of haematopoietic progenitor cells in human healthy liver donors. *J Hepatol* 43, 845-853.
- Gerber, M.A., Thung, S.N., Shen, S., Stromeyer, F.W., and Ishak, K.G. (1983). Phenotypic characterization of hepatic proliferation. Antigenic expression by proliferating epithelial cells in fetal liver, massive hepatic necrosis, and nodular transformation of the liver. *Am J Pathol* 110, 70-74.
- Ghodsizadeh, A., Taei, A., Totonchi, M., Seifinejad, A., Gourabi, H., Pournasr, B., Aghdami, N., Malekzadeh, R., Almadani, N., Salekdeh, G.H., *et al.* (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.
- Glycolysis and Gluconeogenesis Concept Map
<http://www.cfkeep.org/html/snapshot.php?id=64251362312819>. [En ligne].
- Gomez-Lechon, M.J., Donato, M.T., Castell, J.V., and Jover, R. (2003). Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. *Curr Drug Metab* 4, 292-312.
- Gordon, G.J., Coleman, W.B., and Grisham, J.W. (2000). Temporal analysis of hepatocyte differentiation by small hepatocyte-like progenitor cells during liver regeneration in retrorsine-exposed rats. *Am J Pathol* 157, 771-786.

- Gott, A.L., Hardy, K., Winston, R.M., and Leese, H.J. (1990). Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 5, 104-108.
- Gouon-Evans, V., Boussemart, L., Gadue, P., Nierhoff, D., Koehler, C.I., Kubo, A., Shafritz, D.A., and Keller, G. (2006). BMP-4 is required for hepatic specification of mouse embryonic stem cell-derived definitive endoderm. *Nat Biotechnol* 24, 1402-1411.
- Gouysse, G., Couvelard, A., Frachon, S., Bouvier, R., Nejari, M., Dauge, M.C., Feldmann, G., Henin, D., and Scoazec, J.Y. (2002). Relationship between vascular development and vascular differentiation during liver organogenesis in humans. *J Hepatol* 37, 730-740.
- Greber, B., Lehrach, H., and Adjaye, J. (2007). Fibroblast growth factor 2 modulates transforming growth factor beta signaling in mouse embryonic fibroblasts and human ESCs (hESCs) to support hESC self-renewal. *Stem Cells* 25, 455-464.
- Greengard, O. (1969). Enzymic differentiation in mammalian liver injection of fetal rats with hormones causes the premature formation of liver enzymes. *Science* 163, 891-895.
- Gross-Steinmeyer, K., Stapleton, P.L., Tracy, J.H., Bammler, T.K., Lehman, T., Strom, S.C., and Eaton, D.L. (2005). Influence of Matrigel-overlay on constitutive and inducible expression of nine genes encoding drug-metabolizing enzymes in primary human hepatocytes. *Xenobiotica* 35, 419-438.
- Gualdi, R., Bossard, P., Zheng, M., Hamada, Y., Coleman, J.R., and Zaret, K.S. (1996). Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control. *Genes Dev* 10, 1670-1682.
- Guengerich, F.P. (1999). Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39, 1-17.
- Guguen-Guillouzo, C. (2002). Isolation and culture of human and animal hepatocytes. In *Culture of epithelial cells* (New York, Wiley-Liss).
- Guguen-Guillouzo, C., Corlu, A., and Guillouzo, A. (2010). Stem cell-derived hepatocytes and their use in toxicology. *Toxicology* 270, 3-9.
- Guguen-Guillouzo, C., and Guillouzo, A. (2010). General review on in vitro hepatocyte models and their applications. *Methods Mol Biol* 640, 1-40.
- Gulbis, B., Jauniaux, E., Cotton, F., and Stordeur, P. (1998). Protein and enzyme patterns in the fluid cavities of the first trimester gestational sac: relevance to the absorptive role of secondary yolk sac. *Mol Hum Reprod* 4, 857-862.
- Guo, G.L., Johnson, D.R., and Klaassen, C.D. (2002). Postnatal expression and induction by pregnenolone-16alpha-carbonitrile of the organic anion-transporting polypeptide 2 in rat liver. *Drug Metab Dispos* 30, 283-288.

- Gutierrez-Aranda, I., Ramos-Mejia, V., Bueno, C., Munoz-Lopez, M., Real, P.J., Macia, A., Sanchez, L., Ligerio, G., Garcia-Perez, J.L., and Menendez, P. (2010). Human induced pluripotent stem cells develop teratoma more efficiently and faster than human embryonic stem cells regardless the site of injection. *Stem Cells* 28, 1568-1570.
- Hailfinger, S., Jaworski, M., Braeuning, A., Buchmann, A., and Schwarz, M. (2006). Zonal gene expression in murine liver: lessons from tumors. *Hepatology* 43, 407-414.
- Halme, D.G., and Kessler, D.A. (2006). FDA regulation of stem-cell-based therapies. *N Engl J Med* 355, 1730-1735.
- Han, S., Dziedzic, N., Gadue, P., Keller, G.M., and Gouon-Evans, V. (2011). An endothelial cell niche induces hepatic specification through dual repression of Wnt and Notch signaling. *Stem Cells* 29, 217-228.
- Hansson, M., Olesen, D.R., Peterslund, J.M., Engberg, N., Kahn, M., Winzi, M., Klein, T., Maddox-Hyttel, P., and Serup, P. (2009). A late requirement for Wnt and FGF signaling during activin-induced formation of foregut endoderm from mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 330, 286-304.
- Haouzi, D., Baghdiguian, S., Granier, G., Travo, P., Mangeat, P., and Hibner, U. (2005). Three-dimensional polarization sensitizes hepatocytes to Fas/CD95 apoptotic signalling. *J Cell Sci* 118, 2763-2773.
- Hardy, K., Hooper, M.A., Handyside, A.H., Rutherford, A.J., Winston, R.M., and Leese, H.J. (1989). Non-invasive measurement of glucose and pyruvate uptake by individual human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod* 4, 188-191.
- Hay, D.C., Fletcher, J., Payne, C., Terrace, J.D., Gallagher, R.C., Snoeys, J., Black, J.R., Wojtacha, D., Samuel, K., Hannoun, Z., *et al.* (2008a). Highly efficient differentiation of hESCs to functional hepatic endoderm requires ActivinA and Wnt3a signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 12301-12306.
- Hay, D.C., Zhao, D., Fletcher, J., Hewitt, Z.A., McLean, D., Urruticoechea-Uriquen, A., Black, J.R., Elcombe, C., Ross, J.A., Wolf, R., *et al.* (2008b). Efficient differentiation of hepatocytes from human embryonic stem cells exhibiting markers recapitulating liver development in vivo. *Stem Cells* 26, 894-902.
- Hay, D.C., Zhao, D., Ross, A., Mandalam, R., Lebkowski, J., and Cui, W. (2007). Direct differentiation of human embryonic stem cells to hepatocyte-like cells exhibiting functional activities. *Cloning Stem Cells* 9, 51-62.
- He, Z.P., Tan, W.Q., Tang, Y.F., and Feng, M.F. (2003). Differentiation of putative hepatic stem cells derived from adult rats into mature hepatocytes in the presence of epidermal growth factor and hepatocyte growth factor. *Differentiation* 71, 281-290.
- Heng, B.C., Yu, H., Yin, Y., Lim, S.G., and Cao, T. (2005). Factors influencing stem cell differentiation into the hepatic lineage in vitro. *J Gastroenterol Hepatol* 20, 975-987.

- Hengstler, J.G., Brulport, M., Schormann, W., Bauer, A., Hermes, M., Nussler, A.K., Fandrich, F., Ruhnke, M., Ungefroren, H., Griffin, L., *et al.* (2005). Generation of human hepatocytes by stem cell technology: definition of the hepatocyte. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 1, 61-74.
- Hentsch, B., Lyons, I., Li, R., Hartley, L., Lints, T.J., Adams, J.M., and Harvey, R.P. (1996). Hlx homeo box gene is essential for an inductive tissue interaction that drives expansion of embryonic liver and gut. *Genes Dev* 10, 70-79.
- Herrera, M.B., Bruno, S., Buttiglieri, S., Tetta, C., Gatti, S., Deregibus, M.C., Bussolati, B., and Camussi, G. (2006). Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. *Stem Cells* 24, 2840-2850.
- hgh.org. <http://www.hgh.org/Endocrine-System/An-Overview-of-Endocrine-Hormones-Secreted-by-the-Liver.html>. An Overview of Endocrine Hormones Secreted by the Liver [*En ligne*].
- Hong, S.H., Gang, E.J., Jeong, J.A., Ahn, C., Hwang, S.H., Yang, I.H., Park, H.K., Han, H., and Kim, H. (2005). In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 330, 1153-1161.
- Houbaviy, H.B., Murray, M.F., and Sharp, P.A. (2003). Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell* 5, 351-358.
- Huang, H.P., Yu, C.Y., Chen, H.F., Chen, P.H., Chuang, C.Y., Lin, S.J., Huang, S.T., Chan, W.H., Ueng, T.H., Ho, H.N., *et al.* (2010). Factors from human embryonic stem cell-derived fibroblast-like cells promote topology-dependent hepatic differentiation in primate embryonic and induced pluripotent stem cells. *J Biol Chem* 285, 33510-33519.
- Huang, P., He, Z., Ji, S., Sun, H., Xiang, D., Liu, C., Hu, Y., Wang, X., and Hui, L. (2011). Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature* 475, 386-389.
- Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A.E., and Melton, D.A. (2008). Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol* 26, 795-797.
- Hussain, S.Z., Sneddon, T., Tan, X., Micsenyi, A., Michalopoulos, G.K., and Monga, S.P. (2004). Wnt impacts growth and differentiation in ex vivo liver development. *Exp Cell Res* 292, 157-169.
- Iacob, R., Rudrich, U., Rothe, M., Kirsch, S., Maasoumy, B., Narain, N., Verfaillie, C.M., Sancho-Bru, P., Iken, M., Popescu, I., *et al.* (2011). Induction of a mature hepatocyte phenotype in adult liver derived progenitor cells by ectopic expression of transcription factors. *Stem Cell Res* 6, 251-261.
- Iacovacci, S., Manzin, A., Barca, S., Sargiacomo, M., Serafino, A., Valli, M.B., Macioce, G., Hassan, H.J., Ponzetto, A., Clementi, M., *et al.* (1997). Molecular characterization and

dynamics of hepatitis C virus replication in human fetal hepatocytes infected in vitro. *Hepatology* 26, 1328-1337.

- Ijpenberg, A., Perez-Pomares, J.M., Guadix, J.A., Carmona, R., Portillo-Sanchez, V., Macias, D., Hohenstein, P., Miles, C.M., Hastie, N.D., and Munoz-Chapuli, R. (2007). Wt1 and retinoic acid signaling are essential for stellate cell development and liver morphogenesis. *Dev Biol* 312, 157-170.
- Inamura, M., Kawabata, K., Takayama, K., Tashiro, K., Sakurai, F., Katayama, K., Toyoda, M., Akutsu, H., Miyagawa, Y., Okita, H., *et al.* (2011). Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Mol Ther* 19, 400-407.
- Ishii, T., Fukumitsu, K., Yasuchika, K., Adachi, K., Kawase, E., Suemori, H., Nakatsuji, N., Ikai, I., and Uemoto, S. (2008). Effects of extracellular matrixes and growth factors on the hepatic differentiation of human embryonic stem cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295, G313-321.
- Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, M., Soreq, H., and Benvenisty, N. (2000). Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med* 6, 88-95.
- Iwatani, M., Ikegami, K., Kremenska, Y., Hattori, N., Tanaka, S., Yagi, S., and Shiota, K. (2006). Dimethyl sulfoxide has an impact on epigenetic profile in mouse embryoid body. *Stem Cells* 24, 2549-2556.
- Jakubowski, A., Ambrose, C., Parr, M., Lincecum, J.M., Wang, M.Z., Zheng, T.S., Browning, B., Michaelson, J.S., Baetscher, M., Wang, B., *et al.* (2005). TWEAK induces liver progenitor cell proliferation. *J Clin Invest* 115, 2330-2340.
- James, D., Levine, A.J., Besser, D., and Hemmati-Brivanlou, A. (2005). TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development* 132, 1273-1282.
- Jang, Y.Y., Collector, M.I., Baylin, S.B., Diehl, A.M., and Sharkis, S.J. (2004). Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol* 6, 532-539.
- Jensen, J., Hyllner, J., and Bjorquist, P. (2009). Human embryonic stem cell technologies and drug discovery. *J Cell Physiol* 219, 513-519.
- Jones, A. (1996). Anatomy of the normal liver In *Hepatology: a textbook of liver disease* (Philadelphia), pp. 3-32.
- Jones, D.L., and Wagers, A.J. (2008). No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 11-21.
- Jozefczuk, J., Prigione, A., Chavez, L., and Adjaye, J. (2011). Comparative analysis of human embryonic stem cell and induced pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells

- reveals current drawbacks and possible strategies for improved differentiation. *Stem Cells Dev* 20, 1259-1275.
- Jung, J., Zheng, M., Goldfarb, M., and Zaret, K.S. (1999). Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* 284, 1998-2003.
- Jungermann, K. (1992). Zonal liver cell heterogeneity. *Enzyme* 46, 5-7.
- Jungermann, K., and Kietzmann, T. (1996). Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu Rev Nutr* 16, 179-203.
- Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., and Woltjen, K. (2009). Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458, 771-775.
- Kakinuma, S., Tanaka, Y., Chinzei, R., Watanabe, M., Shimizu-Saito, K., Hara, Y., Teramoto, K., Arii, S., Sato, C., Takase, K., *et al.* (2003). Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. *Stem Cells* 21, 217-227.
- Kalhan, S., Parimi, PS. (2011). Metabolism of Glucose and Methods of Investigation in the Fetus and Newborn. In *Fetal and Neonatal Physiology*, R. Polin, ed. (Saunders).
- Kaltschmidt, C., Muller, M., Brem, G., and Renkawitz, R. (1994). DNase I hypersensitive sites far upstream of the rat tryptophan oxygenase gene direct developmentally regulated transcription in livers of transgenic mice. *Mech Dev* 45, 203-210.
- Kamiya, A., Kinoshita, T., Ito, Y., Matsui, T., Morikawa, Y., Senba, E., Nakashima, K., Taga, T., Yoshida, K., Kishimoto, T., *et al.* (1999). Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *EMBO J* 18, 2127-2136.
- Kanebratt, K.P., and Andersson, T.B. (2008). HepaRG cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction in humans. *Drug Metab Dispos* 36, 137-145.
- Kashyap, V., Rezende, N.C., Scotland, K.B., Shaffer, S.M., Persson, J.L., Gudas, L.J., and Mongan, N.P. (2009). Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs. *Stem Cells Dev* 18, 1093-1108.
- Kennedy, M. (2008). Hormonal regulation of hepatic drug-metabolizing enzyme activity during adolescence. *Clin Pharmacol Ther* 84, 662-673.
- Kennedy, S., Rettinger, S., Flye, M.W., and Ponder, K.P. (1995). Experiments in transgenic mice show that hepatocytes are the source for postnatal liver growth and do not stream. *Hepatology* 22, 160-168.
- Keohane, A.M., O'Neill L, P., Belyaev, N.D., Lavender, J.S., and Turner, B.M. (1996). X-Inactivation and histone H4 acetylation in embryonic stem cells. *Dev Biol* 180, 618-630.

- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Kluter, H., and Bieback, K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24, 1294-1301.
- Khoo, M.L., McQuade, L.R., Smith, M.S., Lees, J.G., Sidhu, K.S., and Tuch, B.E. (2005). Growth and differentiation of embryoid bodies derived from human embryonic stem cells: effect of glucose and basic fibroblast growth factor. *Biol Reprod* 73, 1147-1156.
- Khuu, D.N., Scheers, I., Ehnert, S., Jazouli, N., Nyabi, O., Buc-Calderon, P., Meulemans, A., Nussler, A., Sokal, E., and Najimi, M. (2011). In vitro differentiated adult human liver progenitor cells display mature hepatic metabolic functions: a potential tool for in vitro pharmacotoxicological testing. *Cell Transplant* 20, 287-302.
- Kim, D., Kim, C.H., Moon, J.I., Chung, Y.G., Chang, M.Y., Han, B.S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R., *et al.* (2009a). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4, 472-476.
- Kim, J., Chu, J., Shen, X., Wang, J., and Orkin, S.H. (2008). An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell* 132, 1049-1061.
- Kim, J., Efe, J.A., Zhu, S., Talantova, M., Yuan, X., Wang, S., Lipton, S.A., Zhang, K., and Ding, S. (2011). Direct reprogramming of mouse fibroblasts to neural progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 7838-7843.
- Kim, J.B., Greber, B., Arauzo-Bravo, M.J., Meyer, J., Park, K.I., Zaehres, H., and Scholer, H.R. (2009b). Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 461, 649-643.
- Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M.J., Ji, H., Ehrlich, L.I., *et al.* (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467, 285-290.
- Kim, S.H., and Akaike, T. (2007). Epidermal growth factor signaling for matrix-dependent cell proliferation and differentiation in primary cultured hepatocytes. *Tissue Eng* 13, 601-609.
- Kim, Y., and Rajagopalan, P. (2010). 3D hepatic cultures simultaneously maintain primary hepatocyte and liver sinusoidal endothelial cell phenotypes. *PLoS One* 5, e15456.
- Kim, Y.H., Heo, J.S., and Han, H.J. (2006). High glucose increase cell cycle regulatory proteins level of mouse embryonic stem cells via PI3-K/Akt and MAPKs signal pathways. *J Cell Physiol* 209, 94-102.
- Kinoshita, T., and Miyajima, A. (2002). Cytokine regulation of liver development. *Biochim Biophys Acta* 1592, 303-312.
- Klaassen, C.D., and Slitt, A.L. (2005). Regulation of hepatic transporters by xenobiotic receptors. *Curr Drug Metab* 6, 309-328.

- Klein, D., Demory, A., Peyre, F., Kroll, J., Augustin, H.G., Helfrich, W., Kzhyshkowska, J., Schledzewski, K., Arnold, B., and Goerdts, S. (2008). Wnt2 acts as a cell type-specific, autocrine growth factor in rat hepatic sinusoidal endothelial cells cross-stimulating the VEGF pathway. *Hepatology* 47, 1018-1031.
- Knoepfler, P.S. (2009). Deconstructing stem cell tumorigenicity: a roadmap to safe regenerative medicine. *Stem Cells* 27, 1050-1056.
- Kojima, N., Kinoshita, T., Kamiya, A., Nakamura, K., Nakashima, K., Taga, T., and Miyajima, A. (2000). Cell density-dependent regulation of hepatic development by a gp130-independent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 277, 152-158.
- Kossack, N., Meneses, J., Shefi, S., Nguyen, H.N., Chavez, S., Nicholas, C., Gromoll, J., Turek, P.J., and Reijo-Pera, R.A. (2009). Isolation and characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells. *Stem Cells* 27, 138-149.
- Kreidl, E., Ozturk, D., Metzner, T., Berger, W., and Grusch, M. (2009). Activins and follistatins: Emerging roles in liver physiology and cancer. *World J Hepatol* 1, 17-27.
- Kucia, M., Ratajczak, J., Reca, R., Janowska-Wieczorek, A., and Ratajczak, M.Z. (2004). Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury. *Blood Cells Mol Dis* 32, 52-57.
- Kung, J.W., Currie, I.S., Forbes, S.J., and Ross, J.A. (2010). Liver development, regeneration, and carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol* 2010, 984248.
- Kuntz, E.K., HD. (2008a). Biochemistry and functions of the liver In *Hepatology Textbook and Atlas 3rd Edition* (Heidelberg, Springer), pp. 36-76.
- Kuntz, E.K., HD. (2008b). Morphology of the Liver. In *Hepatology Textbook and Atlas*, 3rd edition (Heidelberg, Springer), pp. 16-33.
- Kuo, F.C., and Darnell, J.E., Jr. (1991). Evidence that interaction of hepatocytes with the collecting (hepatic) veins triggers position-specific transcription of the glutamine synthetase and ornithine aminotransferase genes in the mouse liver. *Mol Cell Biol* 11, 6050-6058.
- Kyrmizi, I., Hatzis, P., Katrakili, N., Tronche, F., Gonzalez, F.J., and Talianidis, I. (2006). Plasticity and expanding complexity of the hepatic transcription factor network during liver development. *Genes Dev* 20, 2293-2305.
- Lade, A.G., and Monga, S.P. (2011). Beta-catenin signaling in hepatic development and progenitors: which way does the WNT blow? *Dev Dyn* 240, 486-500.
- Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I.L., and Grompe, M. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 6, 1229-1234.

- Lahuna, O., Fernandez, L., Karlsson, H., Maiter, D., Lemaigre, F.P., Rousseau, G.G., Gustafsson, J., and Mode, A. (1997). Expression of hepatocyte nuclear factor 6 in rat liver is sex-dependent and regulated by growth hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12309-12313.
- Laine, K., Tybring, G., and Bertilsson, L. (2000). No sex-related differences but significant inhibition by oral contraceptives of CYP2C19 activity as measured by the probe drugs mephenytoin and omeprazole in healthy Swedish white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 68, 151-159.
- Lamers, W.H., and Mooren, P.G. (1980). Role of glucocorticosteroid hormones on the levels of rat liver carbamoylphosphate synthase (ammonia) and arginase activity during ontogenesis. *Biol Neonate* 37, 113-137.
- Lannoy, V.J., Decaux, J.F., Pierreux, C.E., Lemaigre, F.P., and Rousseau, G.G. (2002). Liver glucokinase gene expression is controlled by the onecut transcription factor hepatocyte nuclear factor-6. *Diabetologia* 45, 1136-1141.
- Laszlo, V., Dezso, K., Baghy, K., Papp, V., Kovalszky, I., Safrany, G., Thorgeirsson, S.S., Nagy, P., and Paku, S. (2008). Triiodothyronine accelerates differentiation of rat liver progenitor cells into hepatocytes. *Histochem Cell Biol* 130, 1005-1014.
- Lavon, N., and Benvenisty, N. (2005). Study of hepatocyte differentiation using embryonic stem cells. *J Cell Biochem* 96, 1193-1202.
- Lavon, N., Yanuka, O., and Benvenisty, N. (2004). Differentiation and isolation of hepatic-like cells from human embryonic stem cells. *Differentiation* 72, 230-238.
- Lazaro, C.A., Croager, E.J., Mitchell, C., Campbell, J.S., Yu, C., Foraker, J., Rhim, J.A., Yeoh, G.C., and Fausto, N. (2003). Establishment, characterization, and long-term maintenance of cultures of human fetal hepatocytes. *Hepatology* 38, 1095-1106.
- Le Carrou, T.A., S.; Tondeur, S.; Lhermitte, L.; Lamb, N.; Rème, T.; Pantesco, V.; Hamamah, S.; Klein, B.; De Vos, J. (2010). Amazonia!: An Online Resource to Google and Visualize Public Human whole Genome Expression Data. *Open Bioinforma J* 4, 5-10.
- LeCouter, J., Moritz, D.R., Li, B., Phillips, G.L., Liang, X.H., Gerber, H.P., Hillan, K.J., and Ferrara, N. (2003). Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* 299, 890-893.
- Lee, J.E., Kang, M.S., Park, M.H., Shim, S.H., Yoon, T.K., Chung, H.M., and Lee, D.R. (2010). Evaluation of 28 human embryonic stem cell lines for use as unrelated donors in stem cell therapy: implications of HLA and ABO genotypes. *Cell Transplant* 19, 1383-1395.
- Lee, J.H., Hart, S.R., and Skalnik, D.G. (2004a). Histone deacetylase activity is required for embryonic stem cell differentiation. *Genesis* 38, 32-38.

- Lee, K.D., Kuo, T.K., Whang-Peng, J., Chung, Y.F., Lin, C.T., Chou, S.H., Chen, J.R., Chen, Y.P., and Lee, O.K. (2004b). In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 40, 1275-1284.
- Lee, T.I., Jenner, R.G., Boyer, L.A., Guenther, M.G., Levine, S.S., Kumar, R.M., Chevalier, B., Johnstone, S.E., Cole, M.F., Isono, K., *et al.* (2006). Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* 125, 301-313.
- Lee, Y.K., and Moore, D.D. (2008). Liver receptor homolog-1, an emerging metabolic modulator. *Front Biosci* 13, 5950-5958.
- Leite, A.R., Correa-Giannella, M.L., Dagli, M.L., Fortes, M.A., Vegas, V.M., and Giannella-Neto, D. (2007). Fibronectin and laminin induce expression of islet cell markers in hepatic oval cells in culture. *Cell Tissue Res* 327, 529-537.
- Lemaigre, F.P. (2009). Mechanisms of liver development: concepts for understanding liver disorders and design of novel therapies. *Gastroenterology* 137, 62-79.
- Lemoli, R.M., Catani, L., Talarico, S., Loggi, E., Gramenzi, A., Baccarani, U., Fogli, M., Grazi, G.L., Aluigi, M., Marzocchi, G., *et al.* (2006). Mobilization of bone marrow-derived hematopoietic and endothelial stem cells after orthotopic liver transplantation and liver resection. *Stem Cells* 24, 2817-2825.
- Li, A.P., Kaminski, D.L., and Rasmussen, A. (1995). Substrates of human hepatic cytochrome P450 3A4. *Toxicology* 104, 1-8.
- Li, W., Zhou, H., Abujarour, R., Zhu, S., Young Joo, J., Lin, T., Hao, E., Scholer, H.R., Hayek, A., and Ding, S. (2009). Generation of human-induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2. *Stem Cells* 27, 2992-3000.
- Libbrecht, L., Desmet, V., Van Damme, B., and Roskams, T. (2000). Deep intralobular extension of human hepatic 'progenitor cells' correlates with parenchymal inflammation in chronic viral hepatitis: can 'progenitor cells' migrate? *J Pathol* 192, 373-378.
- Lindros, K.O., Oinonen, T., Issakainen, J., Nagy, P., and Thorgeirsson, S.S. (1997). Zonal distribution of transcripts of four hepatic transcription factors in the mature rat liver. *Cell Biol Toxicol* 13, 257-262.
- Liu, H., Kim, Y., Sharkis, S., Marchionni, L., and Jang, Y.Y. (2011). In vivo liver regeneration potential of human induced pluripotent stem cells from diverse origins. *Sci Transl Med* 3, 82ra39.
- Liu, H., Ye, Z., Kim, Y., Sharkis, S., and Jang, Y.Y. (2010). Generation of endoderm-derived human induced pluripotent stem cells from primary hepatocytes. *Hepatology* 51, 1810-1819.
- Lokmane, L., Haumaitre, C., Garcia-Villalba, P., Anselme, I., Schneider-Maunoury, S., and Cereghini, S. (2008). Crucial role of vHNF1 in vertebrate hepatic specification. *Development* 135, 2777-2786.

- Loo, C.K., and Wu, X.J. (2008). Origin of stellate cells from submesothelial cells in a developing human liver. *Liver Int* 28, 1437-1445.
- Lowe, L.A., Yamada, S., and Kuehn, M.R. (2001). Genetic dissection of nodal function in patterning the mouse embryo. *Development* 128, 1831-1843.
- Lowes, K.N., Brennan, B.A., Yeoh, G.C., and Olynyk, J.K. (1999). Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. *Am J Pathol* 154, 537-541.
- Lozoya, O.A., Wauthier, E., Turner, R.A., Barbier, C., Prestwich, G.D., Guilak, F., Superfine, R., Lubkin, S.R., and Reid, L.M. (2011). Regulation of hepatic stem/progenitor phenotype by microenvironment stiffness in hydrogel models of the human liver stem cell niche. *Biomaterials* 32, 7389-7402.
- Lyssiotis, C.A., Foreman, R.K., Staerk, J., Garcia, M., Mathur, D., Markoulaki, S., Hanna, J., Lairson, L.L., Charette, B.D., Bouchez, L.C., *et al.* (2009). Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8912-8917.
- Lysy, P.A., Smets, F., Sibille, C., Najimi, M., and Sokal, E.M. (2007). Human skin fibroblasts: From mesodermal to hepatocyte-like differentiation. *Hepatology* 46, 1574-1585.
- Mackinnon, M., Sutherland, E., and Simon, F.R. (1977). Effects of ethinyl estradiol on hepatic microsomal proteins and the turnover of cytochrome P-450. *J Lab Clin Med* 90, 1096-1106.
- Maguire, T., Davidovich, A.E., Wallenstein, E.J., Novik, E., Sharma, N., Pedersen, H., Androulakis, I.P., Schloss, R., and Yarmush, M. (2007). Control of hepatic differentiation via cellular aggregation in an alginate microenvironment. *Biotechnol Bioeng* 98, 631-644.
- Mahieu-Caputo, D., Allain, J.E., Branger, J., Coulomb, A., Delgado, J.P., Andreoletti, M., Mainot, S., Frydman, R., Leboulch, P., Di Santo, J.P., *et al.* (2004). Repopulation of athymic mouse liver by cryopreserved early human fetal hepatoblasts. *Hum Gene Ther* 15, 1219-1228.
- Malhi, H., Irani, A.N., Gagandeep, S., and Gupta, S. (2002). Isolation of human progenitor liver epithelial cells with extensive replication capacity and differentiation into mature hepatocytes. *J Cell Sci* 115, 2679-2688.
- Mandenius, C.F., Andersson, T.B., Alves, P.M., Batzl-Hartmann, C., Bjorquist, P., Carrondo, M.J., Chesne, C., Coecke, S., Edsbagge, J., Fredriksson, J.M., *et al.* (2011). Toward preclinical predictive drug testing for metabolism and hepatotoxicity by using in vitro models derived from human embryonic stem cells and human cell lines - a report on the Vitrocellomics EU-project. *Altern Lab Anim* 39, 147-171.

- Mannello, F., and Tonti, G.A. (2007). Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! *Stem Cells* 25, 1603-1609.
- Mantel, N.e.a. (2010). Potential markers of attenuation of YF virus after infection of stem-cell derived human hepatocytes with wild-type Asibi or live-attenuated YF 17D virus. . *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 83 abstract 12.
- Margagliotti, S., Clotman, F., Pierreux, C.E., Lemoine, P., Rousseau, G.G., Henriët, P., and Lemaigre, F.P. (2008). Role of metalloproteinases at the onset of liver development. *Dev Growth Differ* 50, 331-338.
- Marion, M.J., Hantz, O., and Durantel, D. (2010). The HepaRG cell line: biological properties and relevance as a tool for cell biology, drug metabolism, and virology studies. *Methods Mol Biol* 640, 261-272.
- Marro, S., Pang, Z.P., Yang, N., Tsai, M.C., Qu, K., Chang, H.Y., Sudhof, T.C., and Wernig, M. (2011). Direct lineage conversion of terminally differentiated hepatocytes to functional neurons. *Cell Stem Cell* 9, 374-382.
- Marson, A., Levine, S.S., Cole, M.F., Frampton, G.M., Brambrink, T., Johnstone, S., Guenther, M.G., Johnston, W.K., Wernig, M., Newman, J., *et al.* (2008). Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell* 134, 521-533.
- Martin, M.J., Muotri, A., Gage, F., and Varki, A. (2005). Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med* 11, 228-232.
- Martinez Barbera, J.P., Clements, M., Thomas, P., Rodriguez, T., Meloy, D., Kioussis, D., and Beddington, R.S. (2000). The homeobox gene Hex is required in definitive endodermal tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation. *Development* 127, 2433-2445.
- Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A.A., *et al.* (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 9, 625-635.
- Matsumoto, K., Miki, R., Nakayama, M., Tatsumi, N., and Yokouchi, Y. (2008). Wnt9a secreted from the walls of hepatic sinusoids is essential for morphogenesis, proliferation, and glycogen accumulation of chick hepatic epithelium. *Dev Biol* 319, 234-247.
- Matsumoto, K., Yoshitomi, H., Rossant, J., and Zaret, K.S. (2001). Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science* 294, 559-563.

- Matsumura, K.N., Guevara, G.R., Huston, H., Hamilton, W.L., Rikimaru, M., Yamasaki, G., and Matsumura, M.S. (1987). Hybrid bioartificial liver in hepatic failure: preliminary clinical report. *Surgery* 101, 99-103.
- McClelland, R., Wauthier, E., Uronis, J., and Reid, L. (2008). Gradients in the liver's extracellular matrix chemistry from periportal to pericentral zones: influence on human hepatic progenitors. *Tissue Eng Part A* 14, 59-70.
- McGinnity, D.F., Zhang, G., Kenny, J.R., Hamilton, G.A., Otmani, S., Stams, K.R., Haney, S., Brassil, P., Stresser, D.M., and Riley, R.J. (2009). Evaluation of multiple in vitro systems for assessment of CYP3A4 induction in drug discovery: human hepatocytes, pregnane X receptor reporter gene, and Fa2N-4 and HepaRG cells. *Drug Metab Dispos* 37, 1259-1268.
- McLean, A.B., D'Amour, K.A., Jones, K.L., Krishnamoorthy, M., Kulik, M.J., Reynolds, D.M., Sheppard, A.M., Liu, H., Xu, Y., Baetge, E.E., *et al.* (2007). Activin efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signaling is suppressed. *Stem Cells* 25, 29-38.
- McLin, V.A., Rankin, S.A., and Zorn, A.M. (2007). Repression of Wnt/beta-catenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development. *Development* 134, 2207-2217.
- Meijer, C., Wiezer, M.J., Diehl, A.M., Schouten, H.J., Meijer, S., van Rooijen, N., van Lambalgen, A.A., Dijkstra, C.D., and van Leeuwen, P.A. (2000). Kupffer cell depletion by CI2MDP-liposomes alters hepatic cytokine expression and delays liver regeneration after partial hepatectomy. *Liver* 20, 66-77.
- Meng, Q. (2010). Three-dimensional culture of hepatocytes for prediction of drug-induced hepatotoxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 6, 733-746.
- Meshorer, E., and Misteli, T. (2006). Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 540-546.
- Meshorer, E., Yellajoshula, D., George, E., Scambler, P.J., Brown, D.T., and Misteli, T. (2006). Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells. *Dev Cell* 10, 105-116.
- Michalopoulos, G.K. (2007). Liver regeneration. *J Cell Physiol* 213, 286-300.
- Michalopoulos, G.K., Bowen, W.C., Mule, K., and Luo, J. (2003). HGF-, EGF-, and dexamethasone-induced gene expression patterns during formation of tissue in hepatic organoid cultures. *Gene Expr* 11, 55-75.
- Miki, T. (2011). Hepatic Differentiation of Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells for Regenerative Medicine. In *Embryonic Stem Cells - Differentiation and Pluripotent Alternatives*, M.S. Kallos, ed. (InTech), pp. 303-320.

- Miki, T., Ring, A., and Gerlach, J. (2011). Hepatic differentiation of human embryonic stem cells is promoted by three-dimensional dynamic perfusion culture conditions. *Tissue Eng Part C Methods* 17, 557-568.
- Miller, D.L., Ortega, S., Bashayan, O., Basch, R., and Basilico, C. (2000). Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice. *Mol Cell Biol* 20, 2260-2268.
- Misteli, T. (2001). Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. *Science* 291, 843-847.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113, 631-642.
- Miyoshi, N., Ishii, H., Nagano, H., Haraguchi, N., Dewi, D.L., Kano, Y., Nishikawa, S., Tanemura, M., Mimori, K., Tanaka, F., *et al.* (2011). Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell* 8, 633-638.
- Molne, J., Bjorquist, P., Andersson, K., Diswall, M., Jeppsson, A., Strokan, V., Rydberg, L., and Breimer, M.E. (2008). Blood group ABO antigen expression in human embryonic stem cells and in differentiated hepatocyte- and cardiomyocyte-like cells. *Transplantation* 86, 1407-1413.
- Monga, S.P., Monga, H.K., Tan, X., Mule, K., Pediaditakis, P., and Michalopoulos, G.K. (2003). Beta-catenin antisense studies in embryonic liver cultures: role in proliferation, apoptosis, and lineage specification. *Gastroenterology* 124, 202-216.
- Moore, R.N., and Moghe, P.V. (2009). Expedited growth factor-mediated specification of human embryonic stem cells toward the hepatic lineage. *Stem Cell Res.*
- Moore, T.J., Cohen, M.R., and Furberg, C.D. (2007). Serious adverse drug events reported to the Food and Drug Administration, 1998-2005. *Arch Intern Med* 167, 1752-1759.
- Moorman, A.F., Vermeulen, J.L., Charles, R., and Lamers, W.H. (1989). Localization of ammonia-metabolizing enzymes in human liver: ontogenesis of heterogeneity. *Hepatology* 9, 367-372.
- Mukarram Ali Baig, M.H., CM.; Swamy, M.; Hassan, I.; Taher-uz-Zaman; Ayesha, Q.; Devi, BG. (1992). Studies on urea cycle enzyme levels in the human fetal liver at different gestational ages *Pediatr Res* 31, 143-145.
- Naito, M., Hasegawa, G., Ebe, Y., and Yamamoto, T. (2004). Differentiation and function of Kupffer cells. *Med Electron Microsc* 37, 16-28.
- Najimi, M., Khuu, D.N., Lysy, P.A., Jazouli, N., Abarca, J., Sempoux, C., and Sokal, E.M. (2007). Adult-derived human liver mesenchymal-like cells as a potential progenitor reservoir of hepatocytes? *Cell Transplant* 16, 717-728.

- Nakamura, H., Nakasa, H., Ishii, I., Ariyoshi, N., Igarashi, T., Ohmori, S., and Kitada, M. (2002). Effects of endogenous steroids on CYP3A4-mediated drug metabolism by human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 30, 534-540.
- Nayak, V.K., Kshirsagar, N.A., Desai, N.K., and Satoskar, R.S. (1988). Influence of menstrual cycle on antipyrine pharmacokinetics in healthy Indian female volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 26, 604-606.
- Need, A.C., Motulsky, A.G., and Goldstein, D.B. (2005). Priorities and standards in pharmacogenetic research. *Nat Genet* 37, 671-681.
- Newsome, P.N., Hussain, M.A., and Theise, N.D. (2004). Hepatic oval cells: helping redefine a paradigm in stem cell biology. *Curr Top Dev Biol* 61, 1-28.
- Newsome, P.N., Johannessen, I., Boyle, S., Dalakas, E., McAulay, K.A., Samuel, K., Rae, F., Forrester, L., Turner, M.L., Hayes, P.C., *et al.* (2003). Human cord blood-derived cells can differentiate into hepatocytes in the mouse liver with no evidence of cellular fusion. *Gastroenterology* 124, 1891-1900.
- Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24, 372-376.
- Noda, C., Nakamura, T., and Ichihara, A. (1983). alpha-Adrenergic regulation of enzymes of amino acid metabolism in primary cultures of adult rat hepatocytes. *J Biol Chem* 258, 1520-1525.
- Nonome, K., Li, X.K., Takahara, T., Kitazawa, Y., Funeshima, N., Yata, Y., Xue, F., Kanayama, M., Shinno, E., Kuwae, C., *et al.* (2005). Human umbilical cord blood-derived cells differentiate into hepatocyte-like cells in the Fas-mediated liver injury model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289, G1091-1099.
- Nowak, G., Ericzon, B.G., Nava, S., Jaksch, M., Westgren, M., and Sumitran-Holgersson, S. (2005). Identification of expandable human hepatic progenitors which differentiate into mature hepatic cells in vivo. *Gut* 54, 972-979.
- Ochiya, T., Yamamoto, Y., and Banas, A. (2010). Commitment of stem cells into functional hepatocytes. *Differentiation* 79, 65-73.
- Oinonen, T., and Lindros, K.O. (1998). Zonation of hepatic cytochrome P-450 expression and regulation. *Biochem J* 329 (*Pt 1*), 17-35.
- Okaya, A., Kitanaka, J., Kitanaka, N., Satake, M., Kim, Y., Terada, K., Sugiyama, T., Takemura, M., Fujimoto, J., Terada, N., *et al.* (2005). Oncostatin M inhibits proliferation of rat oval cells, OC15-5, inducing differentiation into hepatocytes. *Am J Pathol* 166, 709-719.
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322, 949-953.

- Padgham, C.R., Boyle, C.C., Wang, X.J., Raleigh, S.M., Wright, M.C., and Paine, A.J. (1993). Alteration of transcription factor mRNAs during the isolation and culture of rat hepatocytes suggests the activation of a proliferative mode underlies their de-differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 197, 599-605.
- Palovaara, S., Tybring, G., and Laine, K. (2003). The effect of ethinyloestradiol and levonorgestrel on the CYP2C19-mediated metabolism of omeprazole in healthy female subjects. *Br J Clin Pharmacol* 56, 232-237.
- Parekkadan, B., van Poll, D., Suganuma, K., Carter, E.A., Berthiaume, F., Tilles, A.W., and Yarmush, M.L. (2007). Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One* 2, e941.
- Parent, R., Marion, M.J., Furio, L., Trepo, C., and Petit, M.A. (2004). Origin and characterization of a human bipotent liver progenitor cell line. *Gastroenterology* 126, 1147-1156.
- Pascussi, J.M., Drocourt, L., Fabre, J.M., Maurel, P., and Vilarem, M.J. (2000a). Dexamethasone induces pregnane X receptor and retinoid X receptor-alpha expression in human hepatocytes: synergistic increase of CYP3A4 induction by pregnane X receptor activators. *Mol Pharmacol* 58, 361-372.
- Pascussi, J.M., Drocourt, L., Gerbal-Chaloin, S., Fabre, J.M., Maurel, P., and Vilarem, M.J. (2001). Dual effect of dexamethasone on CYP3A4 gene expression in human hepatocytes. Sequential role of glucocorticoid receptor and pregnane X receptor. *Eur J Biochem* 268, 6346-6358.
- Pascussi, J.M., Gerbal-Chaloin, S., Duret, C., Daujat-Chavanieu, M., Vilarem, M.J., and Maurel, P. (2008). The tangle of nuclear receptors that controls xenobiotic metabolism and transport: crosstalk and consequences. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48, 1-32.
- Pascussi, J.M., Gerbal-Chaloin, S., Fabre, J.M., Maurel, P., and Vilarem, M.J. (2000b). Dexamethasone enhances constitutive androstane receptor expression in human hepatocytes: consequences on cytochrome P450 gene regulation. *Mol Pharmacol* 58, 1441-1450.
- Payne, C.M., Samuel, K., Pryde, A., King, J., Brownstein, D., Schrader, J., Medine, C.N., Forbes, S.J., Iredale, J.P., Newsome, P.N., *et al.* (2011). Persistence of functional hepatocyte-like cells in immune-compromised mice. *Liver Int* 31, 254-262.
- Pei, H.Y., Y.; Xi, J.; Bai, Z.; Yue, W.; Nan, X.; Bai, C.; Wang, Y.; Pei, X. (2009). Lineage Restriction and Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Hepatic Progenitors and Zone 1 Hepatocytes. *Tissue Eng Part C* 15, 95-104.
- Perez-Pomares, J.M., Carmona, R., Gonzalez-Iriarte, M., Macias, D., Guadix, J.A., and Munoz-Chapuli, R. (2004). Contribution of mesothelium-derived cells to liver sinusoids in avian embryos. *Dev Dyn* 229, 465-474.

Perinatal Physiology.

http://www.merckmanuals.com/professional/print/pediatrics/perinatal_physiology/perinatal_physiology.html. The Merck Manual for Health Care Professionals [*En ligne*].

Perincheri, S., Dingle, R.W., Peterson, M.L., and Spear, B.T. (2005). Hereditary persistence of alpha-fetoprotein and H19 expression in liver of BALB/cJ mice is due to a retrovirus insertion in the *Zhx2* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 396-401.

Petersen, B.E., Bowen, W.C., Patrene, K.D., Mars, W.M., Sullivan, A.K., Murase, N., Boggs, S.S., Greenberger, J.S., and Goff, J.P. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284, 1168-1170.

Pichard-Garcia, L., Gerbal-Chaloin, S., Ferrini, J.B., Fabre, J.M., and Maurel, P. (2002). Use of long-term cultures of human hepatocytes to study cytochrome P450 gene expression. *Methods Enzymol* 357, 311-321.

Pierreux, C.E., Stafford, J., Demonte, D., Scott, D.K., Vandenhoute, J., O'Brien, R.M., Granner, D.K., Rousseau, G.G., and Lemaigre, F.P. (1999). Antiglucocorticoid activity of hepatocyte nuclear factor-6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8961-8966.

Pineiro-Carrero, V.M., and Pineiro, E.O. (2004). Liver. *Pediatrics* 113, 1097-1106.

Piscaglia, A.C., Campanale, M., Gasbarrini, A., and Gasbarrini, G. (2010). Stem cell-based therapies for liver diseases: state of the art and new perspectives. *Stem Cells Int* 2010, 259461.

Polo, J.M., Liu, S., Figueroa, M.E., Kulalert, W., Eminli, S., Tan, K.Y., Apostolou, E., Stadtfeld, M., Li, Y., Shioda, T., *et al.* (2010). Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 28, 848-855.

Polycopies Santé Université Lyon 1. <http://spiral.univ-lyon1.fr/polycops/histologiefonctionnelleorganes/frameaccueil.html>. [*En ligne*].

Quinlan, J.M., Colley, B.J., Farrant, M., and Tosh, D. (2007). Epithelial metaplasia and the development of cancer. *Biochim Biophys Acta* 1776, 10-21.

Rambhatla, L., Chiu, C.P., Kundu, P., Peng, Y., and Carpenter, M.K. (2003). Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplant* 12, 1-11.

Ramji, D.P., Vitelli, A., Tronche, F., Cortese, R., and Ciliberto, G. (1993). The two C/EBP isoforms, IL-6DBP/NF-IL6 and C/EBP delta/NF-IL6 beta, are induced by IL-6 to promote acute phase gene transcription via different mechanisms. *Nucleic Acids Res* 21, 289-294.

Rashid, S.T., Corbineau, S., Hannan, N., Marciniak, S.J., Miranda, E., Alexander, G., Huang-Doran, I., Griffin, J., Ahrlund-Richter, L., Skepper, J., *et al.* (2010). Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. *J Clin Invest* 120, 3127-3136.

- Ratajczak, M.Z., Kucia, M., Reca, R., Majka, M., Janowska-Wieczorek, A., and Ratajczak, J. (2004). Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow. *Leukemia* 18, 29-40.
- Rattenbury, J.M., Jeacock, M.K., and Shepherd, D.A. (1980). Urea synthesis in the liver and kidney of developing sheep. *Biochim Biophys Acta* 630, 210-219.
- Reid, L.M., Fiorino, A.S., Sigal, S.H., Brill, S., and Holst, P.A. (1992). Extracellular matrix gradients in the space of Disse: relevance to liver biology. *Hepatology* 15, 1198-1203.
- Ring, A., Gerlach, J., Peters, G., Pazin, B.J., Minervini, C.F., Turner, M.E., Thompson, R.L., Triolo, F., Gridelli, B., and Miki, T. (2010). Hepatic maturation of human fetal hepatocytes in four-compartment three-dimensional perfusion culture. *Tissue Eng Part C Methods* 16, 835-845.
- Roberts, D.J. (2000). Molecular mechanisms of development of the gastrointestinal tract. *Dev Dyn* 219, 109-120.
- Roelandt, P., Pauwelyn, K.A., Sancho-Bru, P., Subramanian, K., Ordovas, L., Vanuytsel, K., Geraerts, M., Firpo, M., De Vos, R., Fevery, J., *et al.* (2010). Human embryonic and rat adult stem cells with primitive endoderm-like phenotype can be fated to definitive endoderm, and finally hepatocyte-like cells. *PLoS One* 5, e12101.
- Roskams, T., and Desmet, V. (1998). Ductular reaction and its diagnostic significance. *Semin Diagn Pathol* 15, 259-269.
- Roskams, T.A., Libbrecht, L., and Desmet, V.J. (2003). Progenitor cells in diseased human liver. *Semin Liver Dis* 23, 385-396.
- Roskams, T.A., Theise, N.D., Balabaud, C., Bhagat, G., Bhathal, P.S., Bioulac-Sage, P., Brunt, E.M., Crawford, J.M., Crosby, H.A., Desmet, V., *et al.* (2004). Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology* 39, 1739-1745.
- Rossi, J.M., Dunn, N.R., Hogan, B.L., and Zaret, K.S. (2001). Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev* 15, 1998-2009.
- Ruhnke, M., Ungefroren, H., Nussler, A., Martin, F., Brulport, M., Schormann, W., Hengstler, J.G., Klapper, W., Ulrichs, K., Hutchinson, J.A., *et al.* (2005). Differentiation of in vitro-modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells. *Gastroenterology* 128, 1774-1786.
- Russo, F.P., and Parola, M. (2011). Stem and progenitor cells in liver regeneration and repair. *Cytotherapy* 13, 135-144.
- Sadat, S., Gehmert, S., Song, Y.H., Yen, Y., Bai, X., Gaiser, S., Klein, H., and Alt, E. (2007). The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF. *Biochem Biophys Res Commun* 363, 674-679.

- Saito, K., Yoshikawa, M., Ouji, Y., Moriya, K., Nishiofuku, M., Ueda, S., Hayashi, N., Ishizaka, S., and Fukui, H. (2006). Promoted differentiation of cynomolgus monkey ES cells into hepatocyte-like cells by co-culture with mouse fetal liver-derived cells. *World J Gastroenterol* 12, 6818-6827.
- Sakata, R., Ueno, T., Nakamura, T., Ueno, H., and Sata, M. (2004). Mechanical stretch induces TGF-beta synthesis in hepatic stellate cells. *Eur J Clin Invest* 34, 129-136.
- Samuel, D., Ichai, P., Feray, C., Saliba, F., Azoulay, D., Arulnaden, J.L., Debat, P., Gigou, M., Adam, R., Bismuth, A., *et al.* (2002). Neurological improvement during bioartificial liver sessions in patients with acute liver failure awaiting transplantation. *Transplantation* 73, 257-264.
- Samuel, S., and Sitrin, M.D. (2008). Vitamin D's role in cell proliferation and differentiation. *Nutr Rev* 66, S116-124.
- Sancho-Bru, P., Najimi, M., Caruso, M., Pauwelyn, K., Cantz, T., Forbes, S., Roskams, T., Ott, M., Gehling, U., Sokal, E., *et al.* (2009). Stem and progenitor cells for liver repopulation: can we standardise the process from bench to bedside? *Gut* 58, 594-603.
- Sangan, C.B., and Tosh, D. (2010). Hepatic progenitor cells. *Cell Tissue Res* 342, 131-137.
- Sasaki, K., Ichikawa, H., Takei, S., No, H.S., Tomotsune, D., Kano, Y., Yokoyama, T., Sirasawa, S., Mogi, A., Yoshie, S., *et al.* (2009). Hepatocyte differentiation from human ES cells using the simple embryoid body formation method and the staged-additional cocktail. *ScientificWorldJournal* 9, 884-890.
- Sasse, D. (1996). Regulation of Hepatic Metabolism: intra and intercellular compartmentation. In, R.K. Thurman, FC.; Jungermann, K., ed. (New York and London, Plenum Press), pp. 3-53.
- Sato, Y., Araki, H., Kato, J., Nakamura, K., Kawano, Y., Kobune, M., Sato, T., Miyanishi, K., Takayama, T., Takahashi, M., *et al.* (2005). Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* 106, 756-763.
- Sauer, I.M., Kardassis, D., Zeillinger, K., Pascher, A., Gruenwald, A., Pless, G., Irgang, M., Kraemer, M., Puhl, G., Frank, J., *et al.* (2003). Clinical extracorporeal hybrid liver support--phase I study with primary porcine liver cells. *Xenotransplantation* 10, 460-469.
- Saulnier, N., Piscaglia, A.C., Puglisi, M.A., Barba, M., Arena, V., Pani, G., Alfieri, S., and Gasbarrini, A. (2010). Molecular mechanisms underlying human adipose tissue-derived stromal cells differentiation into a hepatocyte-like phenotype. *Dig Liver Dis* 42, 895-901.
- Scadden, D.T. (2006). The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 441, 1075-1079.

Schéma de l'uréogénèse.

<http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/CNbioch/POLY.Chp.2.3.html>. Faculté de Médecine Pierre & Marie Curie [En ligne].

Schmelzer, E., Triolo, F., Turner, M.E., Thompson, R.L., Zeilinger, K., Reid, L.M., Gridelli, B., and Gerlach, J.C. (2010). Three-dimensional perfusion bioreactor culture supports differentiation of human fetal liver cells. *Tissue Eng Part A* 16, 2007-2016.

Schmelzer, E., Wauthier, E., and Reid, L.M. (2006). The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors. *Stem Cells* 24, 1852-1858.

Schmelzer, E., Zhang, L., Bruce, A., Wauthier, E., Ludlow, J., Yao, H.L., Moss, N., Melhem, A., McClelland, R., Turner, W., *et al.* (2007). Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med* 204, 1973-1987.

Schuldiner, M., Itskovitz-Eldor, J., and Benvenisty, N. (2003). Selective ablation of human embryonic stem cells expressing a "suicide" gene. *Stem Cells* 21, 257-265.

Schuldiner, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D.A., and Benvenisty, N. (2000). Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11307-11312.

Schwartz, R.E., Linehan, J.L., Painschab, M.S., Hu, W.S., Verfaillie, C.M., and Kaufman, D.S. (2005). Defined conditions for development of functional hepatic cells from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 14, 643-655.

Schwartz, R.E., Reyes, M., Koodie, L., Jiang, Y., Blackstad, M., Lund, T., Lenvik, T., Johnson, S., Hu, W.S., and Verfaillie, C.M. (2002). Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 109, 1291-1302.

Schwartz, R.E., and Verfaillie, C. (2010). Hepatic stem cells. *Methods Mol Biol* 640, 167-179.

Seglen, P.O. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 13, 29-83.

Seguin, C.A., Draper, J.S., Nagy, A., and Rossant, J. (2008). Establishment of endoderm progenitors by SOX transcription factor expression in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 182-195.

Sekine, S., Lan, B.Y., Bedolli, M., Feng, S., and Hebrok, M. (2006). Liver-specific loss of beta-catenin blocks glutamine synthesis pathway activity and cytochrome p450 expression in mice. *Hepatology* 43, 817-825.

Sekiya, S., and Suzuki, A. (2011). Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature* 475, 390-393.

Selden, C., Chalmers, S.A., Jones, C., Standish, R., Quaglia, A., Rolando, N., Burroughs, A.K., Rolles, K., Dhillon, A., and Hodgson, H.J. (2003). Epithelial colonies cultured

- from human explanted liver in subacute hepatic failure exhibit hepatocyte, biliary epithelial, and stem cell phenotypic markers. *Stem Cells* 21, 624-631.
- Sell, S. (1994). Liver stem cells. *Mod Pathol* 7, 105-112.
- Sell, S. (1997). Electron microscopic identification of putative liver stem cells and intermediate hepatocytes following periportal necrosis induced in rats by allyl alcohol. *Stem Cells* 15, 378-385.
- Sell, S. (1998). Comparison of liver progenitor cells in human atypical ductular reactions with those seen in experimental models of liver injury. *Hepatology* 27, 317-331.
- Sell, S. (2001). Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology* 33, 738-750.
- Sell, S., and Leffert, H.L. (1982). An evaluation of cellular lineages in the pathogenesis of experimental hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2, 77-86.
- Selvaggi, T.A., Walker, R.E., and Fleisher, T.A. (1997). Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. *Blood* 89, 776-779.
- Seo, M.J., Suh, S.Y., Bae, Y.C., and Jung, J.S. (2005). Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 328, 258-264.
- Serls, A.E., Doherty, S., Parvatiyar, P., Wells, J.M., and Deutsch, G.H. (2005). Different thresholds of fibroblast growth factors pattern the ventral foregut into liver and lung. *Development* 132, 35-47.
- Shen, M.M. (2007). Nodal signaling: developmental roles and regulation. *Development* 134, 1023-1034.
- Shi, Y., Desponts, C., Do, J.T., Hahm, H.S., Scholer, H.R., and Ding, S. (2008). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell* 3, 568-574.
- Shin, D., Shin, C.H., Tucker, J., Ober, E.A., Rentzsch, F., Poss, K.D., Hammerschmidt, M., Mullins, M.C., and Stainier, D.Y. (2007). Bmp and Fgf signaling are essential for liver specification in zebrafish. *Development* 134, 2041-2050.
- Shiojiri, N., Sano, M., Inujima, S., Nitou, M., Kanazawa, M., and Mori, M. (2000). Quantitative analysis of cell allocation during liver development, using the spf(ash)-heterozygous female mouse. *Am J Pathol* 156, 65-75.
- Shiojiri, N., and Sugiyama, Y. (2004). Immunolocalization of extracellular matrix components and integrins during mouse liver development. *Hepatology* 40, 346-355.

- Shirahashi, H., Wu, J., Yamamoto, N., Catana, A., Wege, H., Wager, B., Okita, K., and Zern, M.A. (2004). Differentiation of human and mouse embryonic stem cells along a hepatocyte lineage. *Cell Transplant* *13*, 197-211.
- Shiraki, N., Umeda, K., Sakashita, N., Takeya, M., Kume, K., and Kume, S. (2008). Differentiation of mouse and human embryonic stem cells into hepatic lineages. *Genes Cells* *13*, 731-746.
- Shook, D., and Keller, R. (2003). Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mech Dev* *120*, 1351-1383.
- Si-Tayeb, K., Lemaigre, F.P., and Duncan, S.A. (2010a). Organogenesis and development of the liver. *Dev Cell* *18*, 175-189.
- Si-Tayeb, K., Noto, F.K., Nagaoka, M., Li, J., Battle, M.A., Duris, C., North, P.E., Dalton, S., and Duncan, S.A. (2010b). Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology* *51*, 297-305.
- Si-Tayeb, K., Noto, F.K., Sepac, A., Sedlic, F., Bosnjak, Z.J., Lough, J.W., and Duncan, S.A. (2010c). Generation of human induced pluripotent stem cells by simple transient transfection of plasmid DNA encoding reprogramming factors. *BMC Dev Biol* *10*, 81.
- Sigal, S.H., Brill, S., Fiorino, A.S., and Reid, L.M. (1992). The liver as a stem cell and lineage system. *Am J Physiol* *263*, G139-148.
- Sigal, S.H., Rajvanshi, P., Gorla, G.R., Sokhi, R.P., Saxena, R., Gebhard, D.R., Jr., Reid, L.M., and Gupta, S. (1999). Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. *Am J Physiol* *276*, G1260-1272.
- Slack, J.M., and Tosh, D. (2001). Transdifferentiation and metaplasia--switching cell types. *Curr Opin Genet Dev* *11*, 581-586.
- Snykers, S., De Kock, J., Rogiers, V., and Vanhaecke, T. (2009). In vitro differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art. *Stem Cells* *27*, 577-605.
- Snykers, S., Vanhaecke, T., De Becker, A., Papeleu, P., Vinken, M., Van Riet, I., and Rogiers, V. (2007). Chromatin remodeling agent trichostatin A: a key-factor in the hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells derived of adult bone marrow. *BMC Dev Biol* *7*, 24.
- Soderdahl, T., Kuppers-Munther, B., Heins, N., Edsbacke, J., Bjorquist, P., Cotgreave, I., and Jernstrom, B. (2007). Glutathione transferases in hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells. *Toxicol In Vitro* *21*, 929-937.
- Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G.W., Cook, E.G., Hargus, G., Blak, A., Cooper, O., Mitalipova, M., *et al.* (2009). Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* *136*, 964-977.

- Soltys, K.A., Soto-Gutierrez, A., Nagaya, M., Baskin, K.M., Deutsch, M., Ito, R., Shneider, B.L., Squires, R., Vockley, J., Guha, C., *et al.* (2010). Barriers to the successful treatment of liver disease by hepatocyte transplantation. *J Hepatol* 53, 769-774.
- Sommer, C.A., Sommer, A.G., Longmire, T.A., Christodoulou, C., Thomas, D.D., Gostissa, M., Alt, F.W., Murphy, G.J., Kotton, D.N., and Mostoslavsky, G. (2010). Excision of reprogramming transgenes improves the differentiation potential of iPS cells generated with a single excisable vector. *Stem Cells* 28, 64-74.
- Song, Z., Cai, J., Liu, Y., Zhao, D., Yong, J., Duo, S., Song, X., Guo, Y., Zhao, Y., Qin, H., *et al.* (2009). Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. *Cell Res* 19, 1233-1242.
- Sosa-Pineda, B., Wigle, J.T., and Oliver, G. (2000). Hepatocyte migration during liver development requires Prox1. *Nat Genet* 25, 254-255.
- Soto-Gutierrez, A., Navarro-Alvarez, N., Rivas-Carrillo, J.D., Chen, Y., Yamatsuji, T., Tanaka, N., and Kobayashi, N. (2006). Differentiation of human embryonic stem cells to hepatocytes using deleted variant of HGF and poly-amino-urethane-coated nonwoven polytetrafluoroethylene fabric. *Cell Transplant* 15, 335-341.
- Soto-Gutierrez, A., Navarro-Alvarez, N., Zhao, D., Rivas-Carrillo, J.D., Lebkowski, J., Tanaka, N., Fox, I.J., and Kobayashi, N. (2007). Differentiation of mouse embryonic stem cells to hepatocyte-like cells by co-culture with human liver nonparenchymal cell lines. *Nat Protoc* 2, 347-356.
- Spagnoli, D., Dobrosielski-Vergona, K., and Widnell, C.C. (1983). Effects of hormones on the activity of glucose-6-phosphatase in primary cultures of rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 226, 182-189.
- Spear, B.T., Jin, L., Ramasamy, S., and Dobierzewska, A. (2006). Transcriptional control in the mammalian liver: liver development, perinatal repression, and zonal gene regulation. *Cell Mol Life Sci* 63, 2922-2938.
- Spee, B., Carpino, G., Schotanus, B.A., Katoonizadeh, A., Vander Borcht, S., Gaudio, E., and Roskams, T. (2010). Characterisation of the liver progenitor cell niche in liver diseases: potential involvement of Wnt and Notch signalling. *Gut* 59, 247-257.
- Spence, J.R., Lange, A.W., Lin, S.C., Kaestner, K.H., Lowy, A.M., Kim, I., Whitsett, J.A., and Wells, J.M. (2009). Sox17 regulates organ lineage segregation of ventral foregut progenitor cells. *Dev Cell* 17, 62-74.
- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322, 945-949.
- Stem Cells for dummies. <http://stem-cells-for-dummies.kargen.org/i-3.php>. [En ligne].
- Stock, P., Staeger, M.S., Muller, L.P., Sgodda, M., Volker, A., Volkmer, I., Lutzkendorf, J., and Christ, B. (2008). Hepatocytes derived from adult stem cells. *Transplant Proc* 40, 620-623.

- Strick-Marchand, H., and Weiss, M.C. (2002). Inducible differentiation and morphogenesis of bipotential liver cell lines from wild-type mouse embryos. *Hepatology* 36, 794-804.
- Strom, S., Inzunza, J., Grinnemo, K.H., Holmberg, K., Matilainen, E., Stromberg, A.M., Blennow, E., and Hovatta, O. (2007). Mechanical isolation of the inner cell mass is effective in derivation of new human embryonic stem cell lines. *Hum Reprod* 22, 3051-3058.
- Strom, S.C., Chowdhury, J.R., and Fox, I.J. (1999). Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease. *Semin Liver Dis* 19, 39-48.
- Studzinski, G.P., McLane, J.A., and Uskokovic, M.R. (1993). Signaling pathways for vitamin D-induced differentiation: implications for therapy of proliferative and neoplastic diseases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 3, 279-312.
- Sullivan, G.J., Hay, D.C., Park, I.H., Fletcher, J., Hannoun, Z., Payne, C.M., Dalgetty, D., Black, J.R., Ross, J.A., Samuel, K., *et al.* (2010). Generation of functional human hepatic endoderm from human induced pluripotent stem cells. *Hepatology* 51, 329-335.
- Sussman, N.L., Gislason, G.T., Conlin, C.A., and Kelly, J.H. (1994). The Hepatix extracorporeal liver assist device: initial clinical experience. *Artif Organs* 18, 390-396.
- Suzuki, A., Iwama, A., Miyashita, H., Nakauchi, H., and Taniguchi, H. (2003). Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. *Development* 130, 2513-2524.
- Suzuki, A., Sekiya, S., Onishi, M., Oshima, N., Kiyonari, H., Nakauchi, H., and Taniguchi, H. (2008). Flow cytometric isolation and clonal identification of self-renewing bipotent hepatic progenitor cells in adult mouse liver. *Hepatology* 48, 1964-1978.
- 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.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Takayama, K., Inamura, M., Kawabata, K., Tashiro, K., Katayama, K., Sakurai, F., Hayakawa, T., Furue, M.K., and Mizuguchi, H. (2011). Efficient and directive generation of two distinct endoderm lineages from human ESCs and iPSCs by differentiation stage-specific SOX17 transduction. *PLoS One* 6, e21780.
- Tan, H.L., Fong, W.J., Lee, E.H., Yap, M., and Choo, A. (2009). mAb 84, a cytotoxic antibody that kills undifferentiated human embryonic stem cells via oncosis. *Stem Cells* 27, 1792-1801.
- Tan, X., Yuan, Y., Zeng, G., Apte, U., Thompson, M.D., Cieply, B., Stolz, D.B., Michalopoulos, G.K., Kaestner, K.H., and Monga, S.P. (2008). Beta-catenin deletion

- in hepatoblasts disrupts hepatic morphogenesis and survival during mouse development. *Hepatology* 47, 1667-1679.
- Tan, Y., Yoshida, Y., Hughes, D.E., and Costa, R.H. (2006). Increased expression of hepatocyte nuclear factor 6 stimulates hepatocyte proliferation during mouse liver regeneration. *Gastroenterology* 130, 1283-1300.
- Tang, C., Lee, A.S., Volkmer, J.P., Sahoo, D., Nag, D., Mosley, A.R., Inlay, M.A., Ardehali, R., Chavez, S.L., Pera, R.R., *et al.* (2011). An antibody against SSEA-5 glycan on human pluripotent stem cells enables removal of teratoma-forming cells. *Nat Biotechnol* 29, 829-834.
- Tanimizu, N., and Miyajima, A. (2004). Notch signaling controls hepatoblast differentiation by altering the expression of liver-enriched transcription factors. *J Cell Sci* 117, 3165-3174.
- Tatematsu, M., Kaku, T., Medline, A., and Farber, E. (1985). Intestinal metaplasia as a common option of oval cells in relation to cholangiofibrosis in liver of rats exposed to 2-acetylaminofluorene. *Lab Invest* 52, 354-362.
- Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D.M., Nakano, Y., Meyer, E.M., Morel, L., Petersen, B.E., and Scott, E.W. (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416, 542-545.
- Terada, T., and Nakanuma, Y. (1995). Detection of apoptosis and expression of apoptosis-related proteins during human intrahepatic bile duct development. *Am J Pathol* 146, 67-74.
- Theise, N.D., Nimmakayalu, M., Gardner, R., Illei, P.B., Morgan, G., Teperman, L., Henegariu, O., and Krause, D.S. (2000). Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 32, 11-16.
- Theise, N.D., Saxena, R., Portmann, B.C., Thung, S.N., Yee, H., Chiriboga, L., Kumar, A., and Crawford, J.M. (1999). The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* 30, 1425-1433.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
- Thorgeirsson, S.S., and Grisham, J.W. (2003). Overview of recent experimental studies on liver stem cells. *Semin Liver Dis* 23, 303-312.
- Thung, S.N. (1990). The development of proliferating ductular structures in liver disease. An immunohistochemical study. *Arch Pathol Lab Med* 114, 407-411.
- Tolson, A.H., and Wang, H. (2010). Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR. *Adv Drug Deliv Rev* 62, 1238-1249.

- Torre, C., Perret, C., and Colnot, S. (2011). Transcription dynamics in a physiological process: beta-catenin signaling directs liver metabolic zonation. *Int J Biochem Cell Biol* 43, 271-278.
- Touboul, T., Hannan, N.R., Corbineau, S., Martinez, A., Martinet, C., Branchereau, S., Mainot, S., Strick-Marchand, H., Pedersen, R., Di Santo, J., *et al.* (2010). Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions that recapitulate liver development. *Hepatology* 51, 1754-1765.
- Trounson, A., Thakar, R.G., Lomax, G., and Gibbons, D. (2011). Clinical trials for stem cell therapies. *BMC Med* 9, 52.
- Tsuchiya, A., Heike, T., Fujino, H., Shiota, M., Umeda, K., Yoshimoto, M., Matsuda, Y., Ichida, T., Aoyagi, Y., and Nakahata, T. (2005). Long-term extensive expansion of mouse hepatic stem/progenitor cells in a novel serum-free culture system. *Gastroenterology* 128, 2089-2104.
- Tuleuova, N., Lee, J.Y., Lee, J., Ramanculov, E., Zern, M.A., and Revzin, A. (2010). Using growth factor arrays and micropatterned co-cultures to induce hepatic differentiation of embryonic stem cells. *Biomaterials* 31, 9221-9231.
- Turner, R., Lozoya, O., Wang, Y., Cardinale, V., Gaudio, E., Alpini, G., Mendel, G., Wauthier, E., Barbier, C., Alvaro, D., *et al.* (2011). Human hepatic stem cell and maturational liver lineage biology. *Hepatology* 53, 1035-1045.
- Vallier, L., Alexander, M., and Pedersen, R.A. (2005). Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 118, 4495-4509.
- Van Aerde, J., Wilke, MS., Feldman, M., Clandinin, MT. (2011). Accretion of Lipid in the Fetus and Newborn. In *Fetal and Neonatal Physiology*, R. Polin, ed. (Saunders).
- Vassilopoulos, G., Wang, P.R., and Russell, D.W. (2003). Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 422, 901-904.
- Vincent, S.D., Dunn, N.R., Hayashi, S., Norris, D.P., and Robertson, E.J. (2003). Cell fate decisions within the mouse organizer are governed by graded Nodal signals. *Genes Dev* 17, 1646-1662.
- Vinci, B., Duret, C., Klieber, S., Gerbal-Chaloin, S., Sa-Cunha, A., Laporte, S., Suc, B., Maurel, P., Ahluwalia, A., and Daujat-Chavanieu, M. (2011). Modular bioreactor for primary human hepatocyte culture: medium flow stimulates expression and activity of detoxification genes. *Biotechnol J* 6, 554-564.
- Wang, J., Rao, S., Chu, J., Shen, X., Levasseur, D.N., Theunissen, T.W., and Orkin, S.H. (2006). A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* 444, 364-368.

- Wang, M., Tan, Y., Costa, R.H., and Holterman, A.X. (2004). In vivo regulation of murine CYP7A1 by HNF-6: a novel mechanism for diminished CYP7A1 expression in biliary obstruction. *Hepatology* 40, 600-608.
- Wang, X., Ge, S., McNamara, G., Hao, Q.L., Crooks, G.M., and Nolta, J.A. (2003a). Albumin-expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-deficient mice that received transplants of highly purified human hematopoietic stem cells. *Blood* 101, 4201-4208.
- Wang, X., Willenbring, H., Akkari, Y., Torimaru, Y., Foster, M., Al-Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M., Olson, S., and Grompe, M. (2003b). Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 422, 897-901.
- Wang, Y., Baskerville, S., Shenoy, A., Babiarz, J.E., Baehner, L., and Blelloch, R. (2008). Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nat Genet* 40, 1478-1483.
- Wang, Y.J., Li, M.D., Wang, Y.M., Chen, G.Z., Lu, G.D., and Tan, Z.X. (2000). Effect of extracorporeal bioartificial liver support system on fulminant hepatic failure rabbits. *World J Gastroenterol* 6, 252-254.
- Waring, J.F., Ciurlionis, R., Jolly, R.A., Heindel, M., Gagne, G., Fagerland, J.A., and Ulrich, R.G. (2003). Isolated human hepatocytes in culture display markedly different gene expression patterns depending on attachment status. *Toxicol In Vitro* 17, 693-701.
- Watt, A.J., and Forrester, L.M. (2006). Deriving and identifying hepatocytes from embryonic stem cells. *Stem Cell Rev* 2, 19-22.
- Weinstein, M., Monga, S.P., Liu, Y., Brodie, S.G., Tang, Y., Li, C., Mishra, L., and Deng, C.X. (2001). Smad proteins and hepatocyte growth factor control parallel regulatory pathways that converge on beta1-integrin to promote normal liver development. *Mol Cell Biol* 21, 5122-5131.
- Wisse, E., Luo, D., Vermijlen, D., Kanellopoulou, C., De Zanger, R., and Braet, F. (1997). On the function of pit cells, the liver-specific natural killer cells. *Semin Liver Dis* 17, 265-286.
- Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hamalainen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., *et al.* (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458, 766-770.
- Woo, K., Dutta, A.K., Patel, V., Kresge, C., and Feranchak, A.P. (2008). Fluid flow induces mechanosensitive ATP release, calcium signalling and Cl⁻ transport in biliary epithelial cells through a PKCzeta-dependent pathway. *J Physiol* 586, 2779-2798.
- Xiao, L., Yuan, X., and Sharkis, S.J. (2006). Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 24, 1476-1486.

- Xu, R.H., Peck, R.M., Li, D.S., Feng, X., Ludwig, T., and Thomson, J.A. (2005). Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods* 2, 185-190.
- Yamamoto, Y., Banas, A., Murata, S., Ishikawa, M., Lim, C.R., Teratani, T., Hatada, I., Matsubara, K., Kato, T., and Ochiya, T. (2008). A comparative analysis of the transcriptome and signal pathways in hepatic differentiation of human adipose mesenchymal stem cells. *FEBS J* 275, 1260-1273.
- Yan, Y., Xu, W., Qian, H., Si, Y., Zhu, W., Cao, H., Zhou, H., and Mao, F. (2009). Mesenchymal stem cells from human umbilical cords ameliorate mouse hepatic injury in vivo. *Liver Int* 29, 356-365.
- Yang, L., Li, S., Hatch, H., Ahrens, K., Cornelius, J.G., Petersen, B.E., and Peck, A.B. (2002). In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8078-8083.
- Yavorkovsky, L., Lai, E., Ilic, Z., and Sell, S. (1995). Participation of small intraportal stem cells in the restitutive response of the liver to periportal necrosis induced by allyl alcohol. *Hepatology* 21, 1702-1712.
- Yildirimman, R., Brolen, G., Vilardell, M., Eriksson, G., Synnergren, J., Gmuender, H., Kamburov, A., Ingelman-Sundberg, M., Castell, J., Lahoz, A., *et al.* (2011). Human embryonic stem cell derived hepatocyte-like cells as a tool for in vitro hazard assessment of chemical carcinogenicity. *Toxicol Sci*.
- Yokomori, H., Oda, M., Yoshimura, K., Nagai, T., Ogi, M., Nomura, M., and Ishii, H. (2003). Vascular endothelial growth factor increases fenestral permeability in hepatic sinusoidal endothelial cells. *Liver Int* 23, 467-475.
- Yoshie, S., Ito, J., Shirasawa, S., Yokoyama, T., Fujimura, Y., Takeda, K., Mizuguchi, M., Matsumoto, K., Tomotsune, D., and Sasaki, K. (2011). Establishment of Novel Detection System for Embryonic Stem Cell-Derived Hepatocyte-Like Cells Based on Nongenetic Manipulation with Indocyanine Green. *Tissue Eng Part C Methods*.
- Yoshimura, A., Ichihara, M., Kinjyo, I., Moriyama, M., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Hara, T., and Miyajima, A. (1996). Mouse oncostatin M: an immediate early gene induced by multiple cytokines through the JAK-STAT5 pathway. *EMBO J* 15, 1055-1063.
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, II, and Thomson, J.A. (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324, 797-801.
- Yu, J., and Thomson, J.A. (2008). Pluripotent stem cell lines. *Genes Dev* 22, 1987-1997.
- 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., *et al.* (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920.

- Yu, Y., Zhang, C., Zhou, G., Wu, S., Qu, X., Wei, H., Xing, G., Dong, C., Zhai, Y., Wan, J., *et al.* (2001). Gene expression profiling in human fetal liver and identification of tissue- and developmental-stage-specific genes through compiled expression profiles and efficient cloning of full-length cDNAs. *Genome Res* 11, 1392-1403.
- Yu, Y.D., Kim, K.H., Lee, S.G., Choi, S.Y., Kim, Y.C., Byun, K.S., Cha, I.H., Park, K.Y., Cho, C.H., and Choi, D.H. (2011). Hepatic differentiation from human embryonic stem cells using stromal cells. *J Surg Res* 170, e253-261.
- Yusa, K., Rashid, S.T., Strick-Marchand, H., Varela, I., Liu, P.Q., Paschon, D.E., Miranda, E., Ordonez, A., Hannan, N.R., Rouhani, F.J., *et al.* (2011). Targeted gene correction of alpha1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature* 478, 391-394.
- Zajicek, G., Oren, R., and Weinreb, M., Jr. (1985). The streaming liver. *Liver* 5, 293-300.
- Zamek-Gliszczynski, M.J., Hoffmaster, K.A., Nezasa, K., Tallman, M.N., and Brouwer, K.L. (2006). Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites. *Eur J Pharm Sci* 27, 447-486.
- Zamule, S.M., Coslo, D.M., Chen, F., and Omiecinski, C.J. (2011). Differentiation of human embryonic stem cells along a hepatic lineage. *Chem Biol Interact* 190, 62-72.
- Zaret, K.S. (2002). Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. *Nat Rev Genet* 3, 499-512.
- Zemel, R., Bachmetov, L., Ad-El, D., Abraham, A., and Tur-Kaspa, R. (2009). Expression of liver-specific markers in naive adipose-derived mesenchymal stem cells. *Liver Int* 29, 1326-1337.
- Zeng, G., Awan, F., Otruba, W., Muller, P., Apte, U., Tan, X., Gandhi, C., Demetris, A.J., and Monga, S.P. (2007). Wnt'er in liver: expression of Wnt and frizzled genes in mouse. *Hepatology* 45, 195-204.
- Zhang, L., Theise, N., Chua, M., and Reid, L.M. (2008). The stem cell niche of human livers: symmetry between development and regeneration. *Hepatology* 48, 1598-1607.
- Zhang, Y., Kim, M.J., Bertino, J.S., Jr., Nafziger, A.N., and Sellers, E.M. (2006). Use of omeprazole as a CYP3A probe drug: effect of sex and menstrual cycle phase on CYP3A activity in healthy Caucasian adults. *J Clin Pharmacol* 46, 345-352.
- 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.
- Zhao, R., and Duncan, S.A. (2005). Embryonic development of the liver. *Hepatology* 41, 956-967.

- Zhao, R., Watt, A.J., Li, J., Luebke-Wheeler, J., Morrissey, E.E., and Duncan, S.A. (2005). GATA6 is essential for embryonic development of the liver but dispensable for early heart formation. *Mol Cell Biol* 25, 2622-2631.
- Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., *et al.* (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4, 381-384.
- Zhou, Q.J., Huang, Y.D., Xiang, L.X., Shao, J.Z., Zhou, G.S., Yao, H., Dai, L.C., and Lu, Y.L. (2007). In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes induced by fibroblast growth factors and bone morphological protein-4. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 1714-1721.
- Zong, Y., Panikkar, A., Xu, J., Antoniou, A., Raynaud, P., Lemaigre, F., and Stanger, B.Z. (2009). Notch signaling controls liver development by regulating biliary differentiation. *Development* 136, 1727-1739.

RESUME en français

Les hépatocytes humains adultes en culture primaire (HHCP) ont de nombreuses applications en physiopathologie hépatique, en pharmacologie et en biothérapie, mais sont limitées par leur faible disponibilité. Les cellules souches embryonnaires humaines (hES) sont une source prometteuse pour l'obtention d'hépatocytes en grande quantité. Nous avons développé un modèle *in vitro* de différenciation de hES en hépatocytes en reproduisant toutes les étapes de l'ontogenèse hépatique. Au cours de la différenciation, l'expression de 41 gènes marqueurs du foie a été étudiée et comparée aux HHCP, au foie fœtal et aux progéniteurs hépatiques issus du foie adulte. Les résultats démontrent qu'au bout de 21 jours de différenciation, les cellules souches embryonnaires différenciées en hépatocytes (hES-Hep) ont atteint un état de maturation équivalent aux hépatocytes fœtaux aux alentours de 20 semaines de gestation. L'expression forcée du xénorécepteur CAR dans les hES-Hep a induit l'expression de gènes de la détoxification et la biotransformation de midazolam, un substrat de CYP3A4. Ces résultats pourront contribuer au développement de cultures de hES-Hep comme alternative aux HHCP pour les études du métabolisme des xénobiotiques et pour la thérapie cellulaire.

TITRE en anglais

Production of hepatocytes from human embryonic stem cells

RESUME en anglais

Primary cultures of human adult hepatocytes (PCHH) have widespread potential applications in liver physiopathology, pharmacology, and cell-based therapies, but are currently limited by poor availability. Human embryonic stem cells (hES) are a promising source for the generation of hepatocytes in large quantities. In this study, we differentiated hES into hepatocytes by mimicking *in vitro* the various stages of hepatic ontogenesis. We analyzed the expression of a panel of 41 liver marker genes in hepatocyte-like cells derived from hES (hES-Hep) in comparison with PCHH, fetal liver and progenitors obtained from adult liver. The data revealed that after 21 days of differentiation ES-Hep are representative of fetal hepatocytes at around 20 weeks of gestation. The forced expression of the xenoreceptor CAR in hES-Hep induced the expression of detoxification genes as well as the biotransformation of midazolam, a substrate of CYP3A4. These results may contribute to the development of hES-Hep cultures as an alternative to PCHH for studies of xenobiotic metabolism and for cell-based therapies.

MOTS CLES

Cellules souches embryonnaires, hépatocyte, foie, différenciation

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE

INSERM U1040, Groupe Différenciation hépatique des cellules souches et biothérapie des maladies du foie, Institut de Recherche en Biothérapie, Hôpital St Eloi, CHU Montpellier, 80 rue Augustin Fliche, 34295 Montpellier, France

MOTS CLES EN ANGLAIS

Human embryonic stem cells, hepatocyte, liver, differentiation