

Université Louis Pasteur
Strasbourg
Ecole doctorale Vie & Santé

Thèse présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Louis Pasteur
Strasbourg I

Discipline: Sciences du vivant

Domaine: Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Par Arnaud GANDILLET

Evaluation de la cinétique de régénération hépatique et de l'efficacité de
transplantation d'hépatocytes dans différents modèles murins d'insuffisance
hépatique

Soutenue publiquement le 27 février 2004

Membres du jury

| | |
|------------------------|---|
| Directeur de thèse: | Pr. Lysiane RICHERT, PU, Besançon |
| Co-directeur de thèse: | Pr. Daniel JAECK, PU PH, Strasbourg |
| Rapporteur interne: | Pr. Jean SIBILIA, PU PH, Strasbourg |
| Rapporteur externe: | Dr. Hélène GILGENKRANTZ, CR, Paris |
| Rapporteur externe: | Pr. Jean-Marc CHALOPIN, PU PH, Besançon |
| Membre: | Pr. Georges MANTION, PU PH, Besançon |

Résumé français (1000 caractères espaces compris)

La régénération hépatique a été étudiée chez le rat Sprague-Dawley normal ou en insuffisance hépatique induite par des toxiques, tels le thioacétamide et la D-Galactosamine, ou après hépatectomie partielle. Selon le type d'atteinte la ploïdie hépatocytaire lors de la régénération varie considérablement, démontrant l'existence de mécanismes de régénération différents. L'induction, chez la souris Nude, de différents types d'insuffisance hépatique mimant la clinique nous a permis d'évaluer dans ces modèles l'efficacité de la greffe d'hépatocytes de rat enrichis ou non en hépatocytes diploïdes ou tétraploïdes. Les résultats indiquent que l'implantation cellulaire demeure faible en toutes circonstances, avec des variations selon l'insuffisance induite. Des investigations sont requises afin d'améliorer le taux de cellules implantées au sein du parenchyme hépatique receveur, dans l'optique de mettre à disposition un traitement alternatif fiable à la transplantation hépatique orthotopique.

Titre anglais

Evaluation of kinetics of hepatic regeneration and of hepatocyte transplantation efficacy in different murine models of hepatic injury

Résumé anglais (1000 caractères espaces compris)

Hepatic regeneration was studied in normal Sprague-Dawley rat after hepatic injury induced by toxics such as thioacetamide and D-Galactosamine or after partial hepatectomy. Hepatocyte ploidy in regenerating livers strongly depends on the injury, thus demonstrating the existence of different regeneration mechanisms. Induction in Nude mice of liver injury relevant to various clinical situations allowed us the study of hepatocyte transplantation efficacy in those models with cell suspensions enriched or not in diploid or tetraploid hepatocytes. Implantation of hepatocytes remained rather weak under any circumstances and varied according to the type of injury. Future investigations are required in order to improve the rate of hepatocyte implantation into the parenchyma leading to a secure alternative to orthotopic liver transplantation.

Mots-clés

hépatite, foie, toxiques, régénération, ploïdie, hépatectomie, apoptose, nécrose

Keywords

hepatitis, liver, toxics, regeneration, ploidy, hepatectomy, apoptosis, necrosis

Intitulé et adresse du laboratoire de thèse:

Laboratoire de Chirurgie Expérimentale

Fondation Transplantation

5, Avenue Molière

67200 STRASBOURG

France

A la mémoire du Dr. Charles Baud, Sr.

«La recherche procède par des moments distincts et durables, intuition, aveuglement, exaltation et fièvre. Elle aboutit un jour à cette joie, et connaît cette joie celui qui a vécu des moments singuliers»

Albert Einstein, *Comment je vois le monde.*

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse n'aurait pu être mené à son terme sans l'aide de nombreuses personnes, qui tout au long de ces trois années et demie ont œuvré pour que tout se déroule pour le mieux.

En premier lieu, j'aimerais remercier Madame le Professeur Lysiane RICHERT sans qui rien n'aurait été possible. Tu as fait énormément pour cette thèse, non seulement en tant que directeur de thèse mais également bien au-delà. Tu m'as toujours soutenu et nous avons toujours su travailler ensemble et avons réalisé du très bon travail. En un mot tu as été merveilleuse et j'espère que ces quelques mots sauront t'exprimer ma gratitude aussi bien sur le plan scientifique qu'humain.

Je souhaite également remercier Monsieur le Professeur Daniel JAECK, qui a accepté d'assumer, en plus de ses nombreuses activités professionnelles, la co-direction de cette thèse. Vous m'avez toujours répondu favorablement et rapidement à mes attentes lorsqu'il s'agissait de faire le point sur l'avancement des travaux, de me rassurer ou de résoudre divers problèmes.

Je tiens à remercier Madame le Docteur Hélène GILGENKRANTZ et Messieurs les Professeurs Jean SIBILIA, Jean-Marc CHALOPIN et Georges MANTION pour l'honneur qu'ils me font en ayant cordialement accepté d'être rapporteurs de ce travail et membres du jury.

Je suis reconnaissant à Monsieur le Professeur Philippe WOLF pour m'avoir permis d'effectuer mes travaux de recherche au sein de la Fondation Transplantation.

Je tenais bien évidemment à remercier Madame Eliane ALEXANDRE, qui m'a supporté (dans tous les sens du terme) avec tact au quotidien. Tes connaissances encyclopédiques,

ta bonne humeur, tes conseils et de façon générale ta façon de voir les choses m'ont beaucoup aidé dans la thèse et en dehors.

Je voudrais témoigner à Monsieur le Docteur Maxime AUDET toute mon affection pour son enthousiasme, sa disponibilité malgré un emploi du temps surchargé, son humour et sa sympathie.

Je désire remercier Madame le Professeur Marie-Pierre CHENARD-NEU pour son analyse experte de plusieurs dizaines de lames histologiques, pour sa curiosité scientifique et sa disponibilité. Il va sans dire que vous avez joué un rôle indispensable à ce travail de thèse. Je vous remercie également de m'avoir mis à disposition l'ensemble du plateau technique du service d'anatomo-pathologie; j'ai ainsi pu apprendre plusieurs techniques et effectuer librement de nombreuses expériences. Je voudrais souligner dans ces remerciements le gros travail réalisé avec passion et rapidité par les techniciennes Eliane et Martine.

J'aimerais dire à Monsieur le Docteur Luc MARCELLIN combien ses conseils en immunohistologie m'ont été utiles. Je vous remercie du temps que vous avez consacré à l'observation de nombreuses lames et à la réalisation de plusieurs diapositives.

A Monsieur le Professeur CINQUALBRE je souhaiterais exprimer mes remerciements pour ses conseils scientifiques, son franc-parler et son humour dévastateur. Je vous remercie également de m'avoir fait confiance pour l'écriture d'un sous-chapitre de votre nouvel ouvrage, j'ai vraiment été touché par ce geste.

Merci à Cathy ROYER pour ses magnifiques travaux de microscopie électronique et m'avoir fait découvrir l'élutriation centrifuge.

Merci également à Monsieur le Docteur Vincent HOLL pour m'avoir appris, au sein de l'équipe dirigée par Monsieur le Professeur Pierre BISCHOFF, les rudiments de l'analyse en cytométrie en flux et avoir permis ainsi le démarrage du projet.

Un grand merci à Monsieur Jochen BARTHS et Madame Claudine EBEL, du service commun de cytométrie en flux de l'IGBMC, pour les longues journées continues que nous avons passées ensemble à trier des hépatocytes. Vous avez été vraiment formidables.

Je souhaite remercier Madame le Docteur Jeanne STUTZMANN pour sa patience et ses conseils concernant mes travaux immuno-histologiques et m'avoir permis d'utiliser les outils analytiques disponibles à l'unité INSERM 381.

Merci enfin à la Région Alsace pour m'avoir attribué une bourse pour ces 3 années.

Je tenais à souligner l'importance qu'ont pris de nombreuses autres personnes dans la réalisation de ce travail. Que ces quelques mots sachent leur témoigner de ma reconnaissance.

Ainsi, j'aimerais remercier toutes celles et ceux que j'ai pu côtoyer ici à la Fondation Transplantation; je pense notamment à Pascale, Bernard, Cathy, Anne, Michèle, Solange et Gaston. Je ne saurais oublier les stagiaires, avec qui j'ai eu le plaisir de travailler dans une ambiance inoubliable: Isabelle, Senay et Michel (expert en CCC (Copier-coller Cinqualbre) mais encore loin du Maître !) je vous remercie du fond du cœur.

J'associe à ces remerciements l'équipe du laboratoire de biologie cellulaire de la Faculté de Médecine & Pharmacie à Besançon, Delphine, Catherine et Alexandre, pour leur accueil chaleureux et leur soutien à distance.

Enfin, je souhaiterais évoquer tous ceux qui m'ont soutenu et ont participé au bon déroulement de cette thèse. J'aimerais notamment évoquer dans un clin d'œil les 261

rats Sprague-Dawley, les 216 souris Nude et les 73 souris Balb/c qui ont contribué à mes travaux.

Je remercie aussi les docteurs Anne KASTNER, Alain PROPPER et Angélique DUCRAY qui m'ont fait confiance lorsque j'étais encore étudiant en maîtrise à Besançon.

Je remercie ma famille, mes amis ainsi que Sandrine pour son amour, sa compréhension et sa patience.

Il serait injuste de ne pas mentionner les quelques personnes qui m'ont fait avancer bien malgré eux et m'ont forgé tel que je suis maintenant. Ainsi, Natacha TURCK, pour toi et tes affabulations, ces quelques vers de Molière:

*« Ceux de qui la conduite offre le plus à rire,
Sont toujours sur autrui les premiers à médire ».*

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

PREMIÈRE PARTIE: Généralités sur le foie

| | |
|---|----|
| 1. Anatomie et histologie du foie | 17 |
| 2. Différents types cellulaires et fonctions hépatiques | 17 |
| 2.1. Les types cellulaires | 19 |
| 2.2. Les fonctions du foie | 21 |
| 3. Le rôle prépondérant des hépatocytes | 23 |
| 4. Régénération hépatique | 23 |

DEUXIEME PARTIE: Traitement des insuffisances hépatiques

| | |
|---|----|
| 1. Historique de la transplantation hépatique, essor et recherche d'alternatives | 25 |
| 2. L'alternative greffe d'hépatocytes | 28 |
| 2.1. Avantages théoriques | 28 |
| 2.2. Indications de la transplantation d'hépatocytes isolés | 29 |
| 3. Greffe hépatocytaire pour le traitement de l'insuffisance hépatique dans des modèles animaux | 31 |

TROISIEME PARTIE: Homéostasie hépatique

| | |
|---|----|
| 1. Foie normal | 34 |
| 2. Régénération post-hépatectomie partielle | 38 |
| 3. Régénération hépatique post-apoptose et/ou nécrose | 42 |
| 4. Objectifs du travail | 43 |

RESULTATS & PUBLICATIONS

PREMIÈRE PARTIE: Etude de la relation entre taille, localisation lobulaire, ploïdie et fonction hépatocytaire dans un foie de rat Sprague-Dawley

| | |
|-----------------|----|
| 1. Introduction | 46 |
|-----------------|----|

| | |
|--|----------|
| 2. Article «Hepatocyte ploidy in normal young rat» | 51 |
| 3. Etude de la relation entre localisation lobulaire et fonction hépatocytaire dans le foie de rat | 62 |
| 4. Etude de la ploïdie hépatocytaire dans un foie de rat Sprague-Dawley en régénération- Article «Hepatocyte ploidy in regenerating livers after partial hepatectomy, drug-induced necrosis, and cirrhosis» | 68 83 |
| 5. Discussion | |
| <i>DEUXIEME PARTIE: Mise au point de modèles de régénération hépatique chez la souris Nude</i> | 86 |
| 1. Introduction | 86 |
| 2. Développement de modèles expérimentaux d'insuffisance hépatique aiguë et chronique chez la souris Nude- Article «Experimental models of acute and chronic liver failure in Nude mice – Time course of liver regeneration» | 90 |
| 3. Discussion | 125 |
| <i>TROISIEME PARTIE: Transplantation d'hépatocytes de rat dans la souris Nude en insuffisance hépatique ou non</i> | 126 |
| 1. Introduction | 126 |
| 2. Matériel & Méthodes | 128 |
| 3. Résultats & Discussion | 132 |

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

| | |
|--|-----|
| 1. Recherche des conditions optimales d'implantation et de fonctionnalité des hépatocytes transplantés | 142 |
| 2. Démonstration de l'efficacité thérapeutique de la greffe d'hépatocytes dans des modèles animaux | 143 |
| 3. Recherche, dans une perspective clinique, d'alternatives aux hépatocytes | 144 |
| 3.1. Cellules souches hépatiques | 144 |
| 3.2. Cellules épithéliales biliaires | 146 |

| | |
|-------------------------------|-----|
| 3.3. Autres types cellulaires | 147 |
| BIBLIOGRAPHIE | 148 |
| ANNEXE | 169 |

ABBREVIATIONS

| | | | |
|---------------|--------------------------------------|------------|--|
| °C | degré Celsius | TA | thioacétamide |
| λ | longueur d'onde | TGF | transforming growth factor |
| μm | micromètre | THI | transplantation d'hépatocytes isolés |
| ADN | acide désoxyribonucléique | THO | transplantation hépatique orthotopique |
| AFP | α-fétoprotéine | TNF | tumor necrosis factor |
| CDK | kinase dépendante de cycline | U/L | unité par litre |
| CYP | monooxygénase cytochrome P450 | UI | unité internationale |
| CYP450 | Système CYP dépendant | uPA | urokinase plasminogen activator |
| CMH | complexe majeur d'histocompatibilité | | |
| DPPIV | dipeptyl peptidase IV | | |
| EGF | facteur de croissance épidermique | | |
| ELISA | enzyme linked immunosorbant assay | | |
| EROD | éthoxyrésorufine-O-déalkylation | | |
| FAH | fumaryl acéto-acétate | | |
| FITC | isothiocyanate de fluorescéine | | |
| g | gramme | | |
| h | heure | | |
| HGF | facteur de croissance hépatocytaire | | |
| Il6 | interleukine 6 | | |
| GalN | D-Galactosamine | | |
| GSH | glutathion réduit | | |
| GST | glutathion-S-transférase | | |
| kD | kilodalton | | |
| L | litre | | |
| M | mole par litre | | |
| mg | milligramme | | |
| min | minute | | |
| ml | millilitre | | |
| NAR | rat Nagase analbuminémique | | |
| nm | nanomètre | | |
| nmol | nanomole | | |
| PNP | paranitrophénol | | |
| PP | périportal | | |
| PROD | pentoxyrésorufine-O-déalkylation | | |
| PV | périveineux | | |

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE: Généralités sur le foie

1. Anatomie et histologie du foie

La connaissance de l'anatomie hépatique remonte à des temps anciens, puisque l'arrangement structural du foie en plusieurs lobes était apparent pour les personnes chargées de préparer des repas à partir d'animaux, ou dans le cadre de cérémonies ou encore lors de la momification d'humains ⁽⁶⁵⁾. On a pu retrouver des modèles de foie en argile, réalisés autour de l'an 2000 avant Jésus-Christ par les Babyloniens qui associaient déjà des noms aux différentes zones du foie; des concepts similaires ont été découverts par des civilisations ultérieures ⁽⁶⁵⁾. Les Babyloniens considéraient le foie comme le siège de l'âme, en raison d'observations de blessures de guerre et de sacrifices animaux au cours desquels des hémorragies massives survenaient à cet organe.

Le foie murin, à la différence du foie humain est anatomiquement plurilobé: celui d'un rat adulte pèse de 15 à 20g, contre environ 3 à 5g chez la souris (soit environ 4.5% de la masse corporelle chez le murin et 2,5% chez l'homme ⁽¹¹²⁾), et est constitué de 5 lobes (**Figure 1**): le lobe gauche, le lobe médian, le lobe droit et les deux lobes caudaux (ou de Spiegel). Contrairement à des espèces telles l'homme ou la souris, le rat ne possède pas de vésicule biliaire.

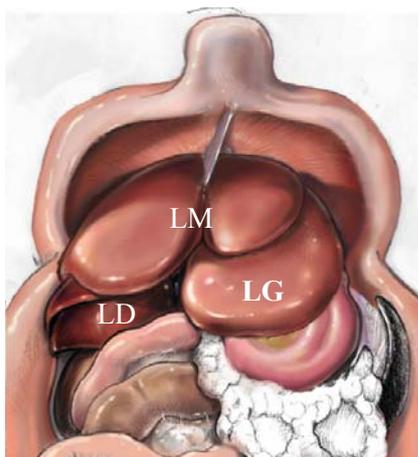


Figure 1: Vue supérieure d'un foie de rat *in situ*. LG: lobe gauche; LM: lobe médian; LD: lobe droit.
(Dessin courtoisement fourni et reproduction autorisée par les auteurs Marc Aprahamian et Yvan Freund).

La vascularisation de chacun des lobes hépatiques est majoritairement assurée par une branche de la veine porte et minoritairement par une branche de l'artère hépatique, apportant

du sang oxygéné (**Figure 2**). Le foie utilise 25-30% de l'oxygène consommé par un organisme.

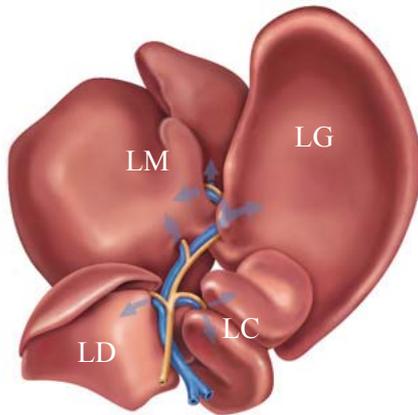


Figure 2: Représentation des différents lobes hépatiques et vascularisation chez le rat LG: lobe gauche; LM: lobe médian; LD: lobe droit; LC: lobes caudaux.

(Dessin courtoisement fourni et reproduction autorisée par les auteurs Marc Aprahamian et Yvan Freund).

Sur le plan histologique, le foie est constitué d'unités fonctionnelles appelées lobules ⁽¹²¹⁾. L'unité fonctionnelle d'un organe donné peut être définie comme étant la plus petite structure distincte se suffisant à elle-même et qui peut de façon indépendante réaliser toutes les fonctions connues de cet organe ⁽¹⁸⁷⁾.

Les lobules hépatiques sont organisés autour d'une veine centrale, et séparés entre eux par des espaces portes contenant des canaux biliaires, des petites branches de la veine porte et de l'artère hépatique. Les lobules ont une forme hexagonale et sont constitués de travées cellulaires de 20 à 25 hépatocytes, reliées entre elles en délimitant des lacunes hépatiques à l'intérieur desquelles cheminent les sinusoides hépatiques. Chaque lacune est ainsi divisée en un sinusoides et un espace péri-sinusoidal (ou de Disse): la surface basale des hépatocytes des hépatocytes est donc séparée des cellules endothéliales sinusoidales adjacentes par l'espace de Disse, lieu des échanges de substances entre le sérum et les hépatocytes (**Figure 3**).

Le flux sanguin se fait de façon unidirectionnelle, de la veine porte aux veines hépatiques. La lymphe est formée dans le foie par filtration du plasma vers les espaces de Disse lorsque le sang passe par les sinusoides.

L'innervation du foie se fait surtout par le système sympathique (*via* des fibres nerveuses adrénérergiques) mais le système parasympathique (*via* des fibres nerveuses cholinérergiques) entre également en jeu ⁽¹⁸⁷⁾.

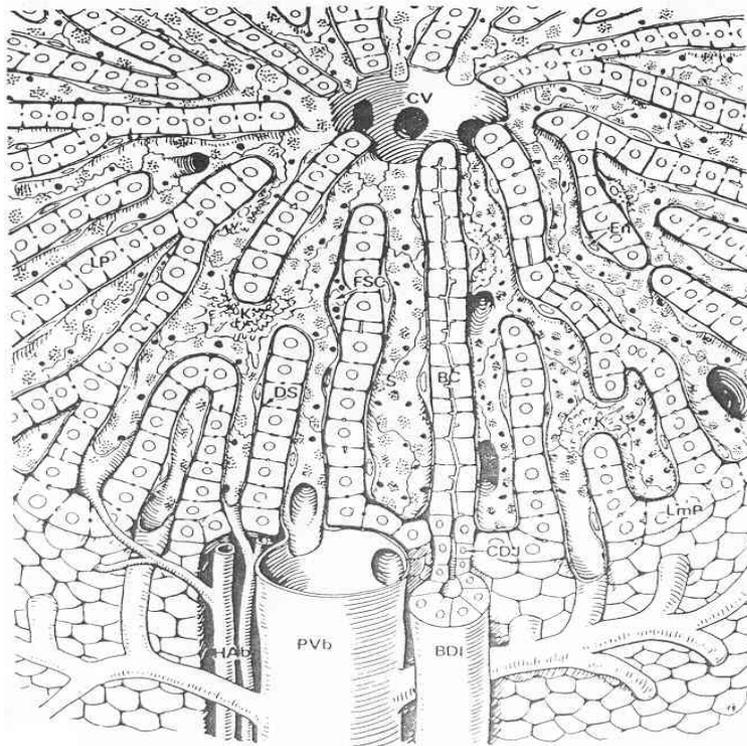


Figure 3: Schéma d'un lobule hépatique (d'après Sigal et al., 1992⁽¹⁹⁹⁾). CV: veine centrale; K: cellules de Kupffer; FSC: cellules de Ito; BC: canalicule biliaire; En: cellule endothéliale; S: sinusoïde avec fenestrations; DS: espace de Disse; HAb: branche de l'artère hépatique; PVb: branche de la veine porte; CDJ: canal de Hering; BDI: canal biliaire; LmP: travée circonscrivant le lobule; LP: travée hépatocyttaire.

2. Différents types cellulaires et fonctions hépatiques

Les différents types cellulaires présents dans le foie sont très organisés d'un point de vue architectural et coopèrent pour assurer les différentes fonctions^(94,110) métaboliques et excrétrices de cet organe.

2.1. Les types cellulaires

Le **Tableau 1** montre l'abondance respective des différents types cellulaires présents dans le foie:

- Les cellules parenchymateuses ou hépatocytes

Ces cellules sont de loin le type cellulaire le plus abondant dans le foie (environ 60%) et sont le site majeur du métabolisme intermédiaire et du métabolisme des xénobiotiques, ainsi que de stockage (voir §3). De taille et de forme hétérogène, les hépatocytes présentent du point de vue ultra-structural d'une part une face vasculaire faisant face aux sinusoides et assurant ainsi les échanges avec la circulation sanguine, et d'autre part une face biliaire, apicale, qui contribue à la formation du canalicule biliaire, structure dépourvue de paroi propre puisque formée de l'accolement des membranes de plusieurs hépatocytes contigus⁽³⁹⁾.

De façon quelque peu arbitraire, les 6-8 hépatocytes de chaque travée situés à la périphérie du lobule hépatique sont dits périportaux tandis que ceux qui sont localisés à proximité de la veine centrale sont dits périveineux (ou péricentraux ou centrolobulaires) ⁽⁷⁴⁾.

- Les cellules endothéliales

Ces cellules impliquées dans la modulation de la prolifération hépatocytaire (par le Transforming Growth Factor β (TGF β), l'Hepatocyte Growth Factor (HGF) et l'interleukine 6 (Il6)) bordent les sinusoides et présentent la particularité d'être fenestrées et dépourvues de membrane basale, ce qui favorise les échanges entre les hépatocytes sous-jacents à la barrière endothéliale et les hépatocytes ⁽¹³⁴⁾.

- Les cellules de Kupffer

Localisées dans la lumière des sinusoides, ces cellules sont au contact, grâce à leurs prolongements, des cellules endothéliales et des hépatocytes. Ce sont des cellules littorales de type macrophage hépatique qui vont intervenir lors des réactions immunitaires ⁽¹²⁶⁾ et au cours des processus de sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance et d'inhibiteurs de la réplication notamment TGF β 1 ⁽¹³⁴⁾.

- Les cellules étoilées (ou de Ito)

Juxtaposées dans l'espace de Disse entre les hépatocytes et les sinusoides hépatiques, ces cellules stockent de nombreux globules lipidiques riches en vitamine A. Elles jouent un rôle majeur dans le développement de fibroses hépatiques et sont plus généralement impliquées dans la régulation de la croissance hépatique (remaniement de la matrice extra-cellulaire, synthèse de facteurs de croissance, production de cytokines) ⁽¹³⁴⁾.

- Les cellules «natural killer» (ou pit cells)

Ce sont des lymphocytes intrahépatiques donc résidents, visibles dans la lumière des capillaires sinusoidaux. Ils interviennent au cours de mécanismes de défense immunitaire.

- Les fibroblastes

Les fibroblastes ne sont pas des cellules spécialisées du foie; ils possèdent un rôle structural et architectural très important avec tous les composants de la matrice extra-cellulaire, intervenant également dans le remodelage et la plasticité du foie en tant qu'organe.

| Type cellulaire | Nombre (%) | Volume (%) |
|------------------------|------------|------------|
| Hépatocytes | 60-65 | 78 |
| Cellules endothéliales | 15-20 | 2,8 |
| Cellules de Kupffer | 8-12 | 2,1 |
| Cellules de Ito | 3-8 | 1,4 |
| «Pit cells» | <2 | - |

Tableau 1. Abondance des différents types cellulaires hépatiques (d'après Gebhardt R., 1992⁽⁷⁴⁾)

2.2. Les fonctions du foie

Le foie assure:

- des fonctions vasculaires,

le foie étant le principal réservoir sanguin de l'organisme. De plus, il permet la collecte de composants alimentaires, qui sont conduits au foie à partir du tractus digestif *via* la veine porte.

- des fonctions métaboliques,

le foie étant impliqué dans la biosynthèse, le stockage, la transformation et la dégradation de composés organiques⁽⁹⁴⁾. L'approvisionnement constant de l'organisme, en substrats énergétiques et précurseurs de biosynthèse est également assuré.

Il possède ainsi, grâce aux hépatocytes, un rôle dans la synthèse de l'urée, de l'albumine et intervient dans le métabolisme glucidique (stockage du glycogène, néoglucogenèse) et donc la glycémie, ainsi que dans les métabolismes lipidique (β -oxydation des acides gras, synthèse de cholestérol et de phospholipides, lipogenèse) et protéique (transformation des acides aminés, formation des protéines plasmatiques sauf les immunoglobulines, catabolisme de l'ammoniaque en urée)⁽¹¹³⁾. Il permet le stockage en particulier des vitamines A, D et B12 mais aussi du fer du fait de la présence d'apoferritine dans les cellules hépatiques.

Le foie possède également un rôle prépondérant, assuré par les hépatocytes, dans la détoxification de l'organisme, grâce au métabolisme des xénobiotiques et des substances endogènes. Par des cascades de réactions enzymatiques, les composés liposolubles sont absorbés en métabolites hydrosolubles éliminés ensuite dans l'urine, la bile et les fécès ainsi que représenté schématiquement (**Figure 4**).

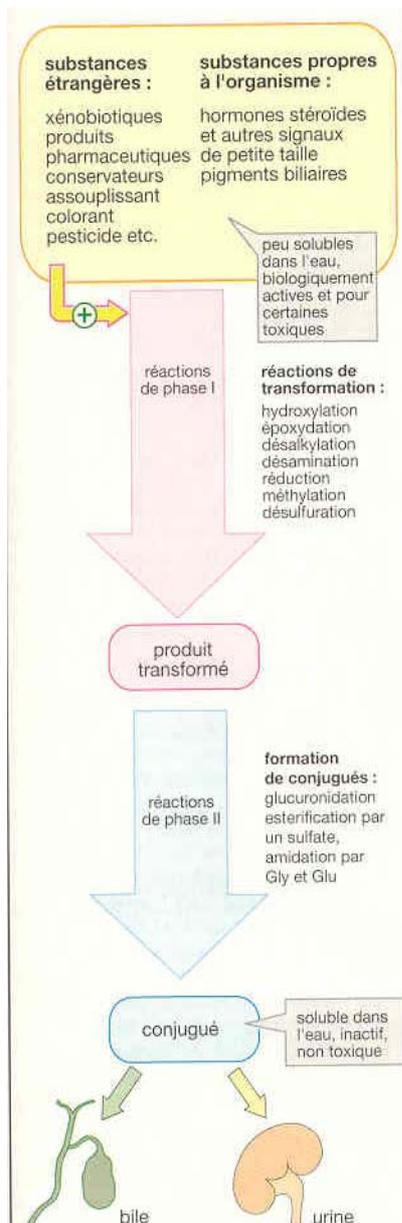


Figure 4. Etapes schématisques de la biotransformation et détoxification des xénobiotiques et substances endogènes (d'après Koolman J., Röhm K.H., 1994⁽¹¹³⁾).

Ces réactions enzymatiques comportent des biotransformations de type I (principalement des oxydations catalysées par le système multi-enzymatique cytochrome P450 dépendant (CYP450) qui introduisent un groupement polaire à la molécule à métaboliser et de type II (conjugaison à un ligand hydrosoluble de composés lipophiles ou de réactifs intermédiaires produits au cours des réactions de phase I) aboutissent à la formation de composés non toxiques. Le système CYP450 consiste en une flavoprotéine et une famille d'hémoprotéines localisées principalement sur le versant cytoplasmique de la membrane du réticulum endoplasmique. La spécificité de substrat des différents isoformes dépend de la réactivité avec le substrat et de la structure du site de liaison à ce substrat⁽¹²⁶⁾.

Des différences inter-individuelles sont observées, liées non seulement à un polymorphisme génétique mais aussi à l'âge, au sexe, à l'éventuelle pathologie hépatique et aux facteurs environnementaux.

- des fonctions d'excrétion,

notamment de composés dans la bile mais aussi la formation et la dégradation de nombreux composants du plasma sanguin (dont des facteurs de coagulation sanguine). Indispensable à la digestion des lipides, la bile est sécrétée en continu par les cellules hépatiques, déversée dans les canalicules biliaires puis dans les canaux biliaires avant de rejoindre soit la vésicule biliaire soit le duodénum⁽¹¹³⁾.

3. Le rôle prépondérant des hépatocytes

- Les hépatocytes, qui constituent environ 60% de la masse hépatique ⁽⁷⁴⁾, sont responsables de la majorité des fonctions hépatiques. Ils sont donc directement impliqués dans la survie de l'individu de par le nombre et l'importance des fonctions qu'ils assurent, ainsi que détaillé au §2.2 ci-dessus. Les hépatocytes jouent en particulier un rôle majeur dans:

- les mécanismes de détoxification de l'organisme: des réactions enzymatiques vont permettre la formation de métabolites non toxiques qui seront éliminés par l'organisme.
- le métabolisme des lipides, glucides et protides.
- les fonctions d'excrétion assurées par le foie.

- Une particularité intéressante est que ces cellules peuvent posséder un contenu en acide désoxyribonucléique (ADN) correspondant soit à 2 copies du génome ou davantage. Au cours de la vie fœtale et néonatale les hépatocytes sont principalement diploïdes; ensuite progressivement une polyploïdisation se met en place et résulte de façon évolutive dans l'apparition de cellules de contenu ADN plus grand ⁽¹¹⁵⁾.

- Une autre caractéristique des hépatocytes est que l'expression génique est fonction de leur distribution spatiale au sein du lobule hépatique: on parle d'hétérogénéité métabolique ⁽⁷⁴⁾. Ceci reflète donc une spécialisation fonctionnelle liée au compartimentage spatial.

4. Régénération hépatique

On entend par régénération la possibilité de restauration de la masse tissulaire et de la fonction après insuffisance hépatique ou après résection partielle. La plupart des organes en sont dépourvus mais le foie possède cette capacité fascinante. Il est à noter qu'il ne s'agit pas d'une régénération au sens propre du terme (comme ce serait le cas chez certains vers, insectes, amphibiens et reptiles, comme par exemple la régénération *ad integrum* de la queue d'un lézard): la partie disparue (par résection) ne repousse pas mais que les parties résiduelles s'hypertrophient ^(35,154). L'anatomie du foie n'étant pas récupérée, il serait plus approprié de parler d'hyperplasie, ou de croissance, compensatoire ^(58, 112). Un couplage entre croissance

cellulaire et réplication cellulaire pourrait s'opérer dans le foie en régénération, de façon similaire à ce qui a été décrit chez la levure, la drosophile ou même le mammifère ⁽⁵⁸⁾.

La connaissance de la capacité du foie à régénérer, donc à réajuster son volume optimal avec la taille de l'individu, n'est pas récente, puisque dès l'Antiquité elle était mentionnée par Eschyle dans la mythologie grecque à travers la punition infligée au Titan Prométhée par Zeus, notamment pour avoir dérobé le feu et l'avoir transmis à l'humanité ainsi que nous avoir enseigné la civilisation et les arts. Ainsi, Prométhée fut enchaîné par Héphestos à un rocher au sommet du Mont Caucase, exposé aux rayons brûlants du soleil et où un aigle (ou un vautour, selon les sources) lui dévorait le foie avant de s'envoler repu à la tombée de la nuit (**Figure 5**).

Selon le mythe, le foie régénérait en une nuit seulement, renouvelant ainsi de jour en jour le calvaire du supplicié ⁽¹⁸²⁾, jusqu'à ce qu'Hercule le délivre de nombreuses années plus tard.

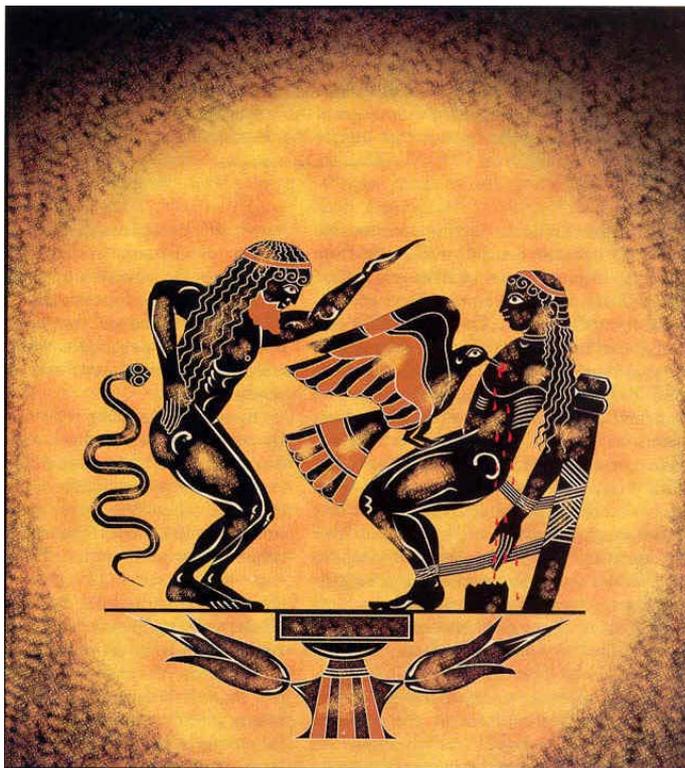


Figure 5. Illustration retrouvée sur un vase ancien et représentant le mythe de Prométhée

En fait, dans des circonstances normales, le foie humain initie sa régénération en 3 jours et récupère une taille normale en 3 mois. Dans la plupart des cas les fonctions hépatiques sont normalisées en 2 à 3 semaines après hépatectomie partielle ou dans les cas de guérison spontanée suite à une hépatite fulminante ⁽³⁵⁾.

1. Historique de la transplantation hépatique, essor et recherche d'alternatives

Le foie, de par ses fonctions, est un organe indispensable à la vie. Une insuffisance hépatique sévère (aiguë ou chronique) représente un fort danger pour la survie de l'individu puisque le taux de survie dans ces conditions n'est actuellement que d'environ 20% ⁽²⁰⁶⁾. La transplantation hépatique orthotopique (THO), c'est-à-dire le remplacement dans la même situation anatomique du foie malade par un foie donneur, permet d'améliorer le pronostic vital de ces pathologies, avec une survie à un an des patients actuellement de l'ordre de 80%. La taille de l'organe transplanté n'est que d'importance modérée, sauf dans des cas extrêmes (enfants, personnes de petite taille etc.), puisqu'un greffon transplanté régénérera rapidement s'il est petit tandis qu'il s'atrophiera grâce à des phénomènes d'apoptose s'il est trop grand pour le receveur ^(35,112).

D'un point de vue historique, des cas de résection hépatique dans des cas de blessures avec protrusion du foie à l'extérieur de l'individu suite à un traumatisme abdominal ont été rapportés dès 1716. Des hépatectomies concernant des portions lacérées de foie suite à des blessures de guerre étaient également décrites ⁽⁶⁵⁾. Cependant les «vraies» opérations hépatobiliaires n'ont pu prendre leur essor que dans les 25 dernières années du XIX^e siècle, après la découverte des conditions d'anesthésie et d'asepsie nécessaires à ces actes chirurgicaux tels la résection de parenchyme hépatique tumoral, les résections hépatiques étant encore à l'heure actuelle le plus souvent pratiquées chez des patients atteints de tumeurs primitives ou secondaires.

Des avancées rapides ont été obtenues au cours du XX^e siècle et particulièrement à partir de 1970 avec l'amélioration des méthodes diagnostiques (ultra-sonographie, imagerie à résonance magnétique, cholangiographie, laparoscopie...). La quantification de fonctions hépatiques a elle aussi considérablement amélioré les indications à la transplantation hépatique, c'est-à-dire la sélection des patients en vue d'interventions chirurgicales.

Un bond spectaculaire a eu lieu en 1963 par la 1^{ère} THO (avec hépatectomie totale préalable) par l'équipe de Starzl à Denver aux Etats-Unis d'Amérique, suivie quelques mois après d'un succès de Calne et Wilhelm en Angleterre. L'utilisation d'un immunosuppresseur, la

ciclosporine A, dès 1979 a permis de révolutionner la tolérance du greffon et d'améliorer les taux de survie à un an après chirurgie ⁽⁶⁵⁾, passant soudainement de 30% à 70%.

Actuellement, le traitement de référence de l'insuffisance hépatique est la THO puisque étant le dernier et seul recours thérapeutique d'un grand nombre d'hépatopathies. Si cette technique est devenue de mieux en mieux maîtrisée, que les indications pour en bénéficier sont nombreuses (**Tableau 2**) et que le pronostic vital post-transplantation a profité des améliorations de la réanimation per- et post- opératoire, plusieurs problèmes demeurent néanmoins actuellement malgré les progrès thérapeutiques au fil des décennies ⁽⁶⁵⁾: la THO exige une disponibilité immédiate en greffons humains et nécessite une technique chirurgicale longue (bien que réduite à environ 7 heures contre 18 heures à ses débuts), onéreuse et délicate.

| <i>Hépatopathies chroniques irréversibles</i> | <i>Tumeurs hépatiques</i> | <i>Hépatites fulminantes</i> | <i>Maladies métaboliques</i> |
|---|----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Cirrhoses | Carcinome hépatocellulaire | Hépatites toxiques | Syndrome de Crigler-Najjar |
| Cholangite sclérosante | Cholangiocarcinome | Hépatites virales | Maladie de Wilson |
| | | | Tyrosinémie héréditaire |

Tableau 2: Indications à la transplantation hépatique

La recherche de traitements alternatifs à la THO permettant de diminuer le nombre de décès de patients atteints d'insuffisance hépatique en élargissant la palette de thérapeutiques possibles, est actuellement à l'étude par de nombreuses équipes de cliniciens et de chercheurs de par le monde.

La connaissance de la segmentation lobulaire et structurelle du foie et de ses capacités de réserve ainsi que le succès à enrayer les hémorragies massives ont rendu possible des transplantations hépatiques avec donneur vivant ⁽¹⁷⁾ pour lesquelles les résultats de survie à 5 ans, 90%, sont très encourageants de même que ceux obtenus après partage du greffon. Cependant, cette technique oblige à une immunosuppression définitive des patients afin d'éviter le rejet du greffon, phénomène qui n'est pas bien maîtrisé ⁽¹²⁶⁾. Un facteur pré-opératoire prédictif du rejet de greffe pourrait être la production de Tumor Necrosis Factor α

(TNF α)⁽¹⁵⁾. De plus, et dans tous les cas, pour diverses raisons (groupe sanguin, taille du greffon, âge, médication, histoire du malade) le nombre de donneurs compatibles n'est pas élevé et des alternatives demeurent à élaborer.

La greffe auxiliaire représente également une alternative séduisante: il s'agit d'une transplantation hépatique après bipartition du greffon dans laquelle le foie malade reste en place. En cas de normalisation des fonctions hépatiques, le traitement immunosuppresseur pourra être arrêté, le greffon s'atrophiera et sera ôté.

Concernant la xéno greffe, technique qui apparaissait comme très prometteuse il y a déjà quelques dizaines d'années, deux problèmes majeurs n'ont pu être résolus à l'heure actuelle: le premier est qu'on ne peut s'assurer de la non-transmission au patient de virus pathogènes, et le second concerne la tolérance et les fonctions du greffon. En effet un greffon de porc n'est pas toléré par l'organisme tandis qu'un greffon de babouin pourrait être mieux toléré en présence d'immunosuppresseurs mais de nombreuses synthèses hépatiques ne seraient pas effectuées aux taux métaboliquement adéquats d'un être humain⁽¹⁰⁷⁾. Une des approches proposée consisterait en l'obtention de cochons transgéniques porteurs du système du complément humain ou déficients en gènes pouvant limiter l'action délétère des réponses immunes⁽¹⁶⁹⁾. De ce fait, pour des raisons sanitaires, la xéno greffe est actuellement interdite en pratique clinique en France.

Une technique de perfusion de foie *ex vivo* a été rapportée dès la fin des années 1960, basée sur la circulation du sang du patient dans un foie entier extracorporel. Cette méthode, optimisée pour un usage clinique, fut abandonnée au profit de la THO dans les années 1970 mais suscite de nouveau l'intérêt des chercheurs et des cliniciens depuis quelques années⁽²⁰⁶⁾.

Un concept voisin, le foie bioartificiel, a été développé afin de suppléer un foie déficient: le plasma du patient circule dans un bio-réacteur contenant des hépatocytes primaires allogéniques ou xénogéniques^(75,157,208). L'un des inconvénients de cette technique est que les matériaux biocompatibles peuvent potentiellement entraîner par eux-mêmes des risques supplémentaires notamment infectieux pour le patient, en plus de perturbations métaboliques et hémodynamiques⁽²⁰⁶⁾. Les résultats sont néanmoins prometteurs même si le système reste à parfaire^(197,235).

Les résultats encourageants suite à des approches de détoxification par des hépatocytes en culture ont conduit les chercheurs à continuer dans cette optique. Très récemment, une patiente souffrant de non-fonction du greffon après THO a été traitée par un tel système extra-corporel utilisant des hépatocytes humains primaires et une dialyse *via* l'albumine ⁽¹⁸⁶⁾.

Des approches reposant sur l'utilisation, dans un bio-réacteur, de cellules souches ^(6,197) ou d'hépatocytes encapsulés ⁽²¹⁰⁾ sont à l'étude. Un nouveau système, appelé MARS (pour «molecular adsorbents recirculating system»), a été développé au cours de la dernière décennie repose sur la dialyse du sang du patient à travers une membrane de polysulfone imprégnée d'albumine: les toxines liées à l'albumine du patient vont se fixer sur les sites de cette membrane artificielle ⁽¹⁹⁷⁾. La plupart des toxines possèdent une forte affinité de liaison avec l'albumine, leur taux augmente au cours d'une atteinte hépatique et saturent les molécules d'albumine avec pour conséquence une capacité réduite à détoxifier le foie ⁽²⁰⁶⁾. De plus, ces toxines libres causent par elles-mêmes des dommages au foie ce qui contribue à détériorer le foie et donc l'état de santé du patient ⁽⁹⁹⁾.

2. L'alternative greffe d'hépatocytes

2.1. Avantages théoriques

Greffer des cellules isolées présente de nombreux avantages potentiels par rapport à la transplantation d'un organe entier: diminution de la morbidité, coût moins élevé, perspective de pallier la pénurie d'organes et réinterventions chirurgicales facilitées. Ainsi, l'intervention (injection intra-portale de ces cellules *via* un cathéter vasculaire voire injection intra-splénique) serait moins lourde qu'une THO dans le sens où la transplantation d'hépatocytes ne nécessite pas de retirer les hépatocytes du receveur. Une véritable guérison de l'insuffisance hépatique pourrait parfois être obtenue si le foie propre régénère, éliminant ainsi le besoin de recourir à la THO ⁽¹³¹⁾; dans ce dernier cas le traitement immunosuppresseur, obligatoire en raison des réponses immunitaires suscitées chez l'hôte par les hépatocytes allogéniques greffés, pourrait alors être arrêté.

Un autre avantage est que, contrairement à la THO, plusieurs receveurs pourraient bénéficier de cellules à partir d'un seul foie donneur puisqu'un faible nombre de cellules suffirait à repeupler le parenchyme atteint. La création d'une banque de cellules cryoconservées

permettrait de s'affranchir des délais d'attente pré-greffe en assurant leur disponibilité à tout moment. Cependant, celle-ci n'est pas à l'ordre du jour puisque la nature des cellules à cryoconserver dans un type thérapeutique n'a pas encore été déterminée.

Une source possible d'hépatocytes consiste à disposer de foies rejetés pour le transplantaion notamment stéatosiques, en vue d'isoler des hépatocytes humains pour une application en greffe cellulaire ⁽¹¹⁾. En effet, de nombreuses équipes, dont la nôtre ont montré que la qualité des hépatocytes isolés à partir de foies stéatosiques était tout à fait acceptable pour envisager leur transplantaion ^(1,11).

2.2. Indications de la transplantaion d'hépatocytes isolés

La transplantaion d'hépatocytes isolés (THI) pourrait être effective comme alternative à la THO pour de nombreuses applications cliniques ⁽¹⁷⁷⁾.

Tout d'abord, la thérapie génique cellulaire par greffe d'hépatocytes autologues (transfectés et porteurs du gène déficient jusqu'alors chez le receveur) a été envisagée pour des pathologies dues à des désordres métaboliques congénitaux (c'est-à-dire essentiellement des déficits enzymatiques). Les exemples les plus étudiés sont les possibilités de traitement:

- d'une part du syndrome de Crigler-Najjar: un déficit en bilirubine UDP glucuronosyltransférase, UGT1A1, provoque une accumulation à des taux toxiques de bilirubine non-conjuguée dans le plasma et une perte de l'excrétion biliaire de bilirubine ^(43,86).
- d'autre part la maladie de Wilson (due à la perturbation du métabolisme du cuivre liée à des mutations dans le gène ATP7b, ce qui mène à une toxicité hépatique) ⁽¹³²⁾.

Des résultats mitigés ont été obtenus en clinique après greffe de cellules hépatiques ^(18,33,63,93,98,118,131,203). En conséquence, des études plus approfondies sont nécessaires si l'on veut appliquer avec davantage de succès cette technique et la banaliser pour davantage d'indications (**Tableau 3**).

Une autre application de la THI concerne son potentiel thérapeutique dans le domaine du traitement définitif (en cas de guérison) ou transitoire (en pont à une THO) de l'insuffisance hépatique aiguë ou chronique ⁽⁹³⁾ (**Tableau 3**).

La transplantation de cellules peut également être envisagée dans un cadre de suppléance à l'insuffisance hépatique transitoire suite à des résections chirurgicales larges dans le cadre de tumeurs.

En effet, le foie régénère après une exérèse partielle par un mécanisme d'hypertrophie compensatoire associé à une hyperplasie des cellules. De ce fait l'hépatectomie partielle demeure le traitement de choix dans le cadre de cancers primitifs. Toutefois, l'ampleur de certaines hépatectomies partielles (dans le cadre de résection de tumeurs, notamment sur un foie cirrhotique) sont limitées, faute de moyen de suppléance en attendant la régénération hépatique, par l'insuffisance hépatique qu'elles entraîneraient du fait du peu de réserve fonctionnelle du foie. La possibilité de greffer des hépatocytes capables d'assurer les fonctions métaboliques hépatiques durant ce laps de temps permettrait de réaliser des exérèses chirurgicales plus larges et donc plus efficaces (**Tableau 3**).

La détermination pré-opératoire du taux de résection maximal pour des cancers primaires hépatiques ou faisant suite à des métastases a été délicate, avec 20 à 30% d'erreurs ⁽¹⁰⁹⁾ jusqu'aux avancées technologiques des années 1970. L'incapacité à restaurer la masse hépatique fonctionnelle se soldant par la mort du patient, on considère actuellement que la résection de 90% de la masse parenchymateuse hépatique (soit environ 1 à 2% de la masse du patient) est un maximum.

De plus, l'état de santé de patient est limitant pour réaliser une hépatectomie partielle puisque la mortalité per-opératoire (ainsi que le taux de complications) augmente fortement chez des patients présentant une stéatose hépatique ou une malnutrition ⁽¹¹²⁾.

| Atteinte du foie | Atteinte d'organes extra-hépatiques |
|--|---|
| <i>Désordres génétiques</i> | <i>Déficiences métaboliques</i> |
| Maladie de Wilson Déficit en α 1 antitrypsine Protoporphyrurie érythroïdétique Lipidoses (maladie de Gaucher) Tyrosinémie de type I | Syndrome de Crigler-Najjar Hypercholestérolémie familiale Syndromes d'hyperammonémie Défauts dans le métabolisme glucidique Oxalose |
| <i>Désordres acquis</i> | <i>Défauts de coagulation et désordres immuns</i> |
| Insuffisance hépatique aiguë Hépatite virale chronique Insuffisance hépatique chronique Tumeurs et métastases hépatiques | Hémophilie de type A Déficience en facteur IX Angioedème héréditaire |

Tableau 3. Cas pour lesquels un traitement par thérapie cellulaire hépatique peut être envisagé (*adapté de Gupta & Chowdhury, 2002* ⁽⁹³⁾).

3. Greffe hépatocytaire pour le traitement de l'insuffisance hépatique dans des modèles animaux: état de la question

Des expériences réalisées chez le rat en insuffisance hépatique aiguë avaient montré que la survie post-greffe d'hépatocytes isolés (syngéniques, allogéniques ou xénogéniques ⁽¹²⁸⁻¹²⁹⁾) était améliorée de façon plus ou moins spectaculaire par rapport à celle d'animaux témoins non transplantés. Ainsi, la greffe de cellules chez un rat présentant une hépatite fulminante causée par la diméthylnitrosamine a permis d'augmenter le taux de survie, passant d'environ 10% pré-greffe à 65% post-greffe ⁽²¹²⁾. Des travaux avaient également été conduits chez des rats en insuffisance hépatique après injection de D-Galactosamine (GalN) ^(16,204,212) avec des conclusions encourageantes.

Par ailleurs, des augmentations de survie de quelques heures, voire d'un mois, avaient été rapportées chez des animaux après hépatectomie large ^(8,44,51,181) associée à un shunt porto-cave ^(45,145).

Au cours de travaux réalisés au laboratoire, dans le cadre d'une thèse d'Université, des essais de greffe d'hépatocytes syngéniques furent réalisés, avec pour receveur le rat Nagase

analbuminémique (NAR) de souche Sprague-Dawley mutante dont la singularité est de présenter des taux sériques d'albumine très bas en raison d'une déficience dans l'expression du gène de l'albumine ^(39,162). L'évaluation de l'efficacité de la THI a été réalisée *in vivo* dans une combinaison syngénique par la transplantation intrasplénique d'hépatocytes isolés de rat Sprague-Dawley normal chez des rats NAR et a été déterminée par le suivi et l'implantation des cellules greffées présentant un marquage albumine positif. Les résultats ont montré qu'après implantation, la fonctionnalité des hépatocytes était transitoire.

Par ailleurs, des essais de transplantation d'hépatocytes après cryoconservation avaient été réalisés. En effet, un des objectifs du laboratoire consiste à la création d'une banque d'hépatocytes humains utilisables pour leur transplantation ⁽²⁾. Malgré des résultats de viabilité, fonctionnalité en culture post-décongélation tout à fait satisfaisants, l'implantation d'hépatocytes après décongélation dans le modèle animal choisi, le rat NAR, était deux fois moins importante comparée à celle de cellules fraîchement isolées. De plus, il y avait absence de fonctionnalité de ces cellules chez le rat receveur, reflétant la fragilité et les altérations membranaires au cours de la cryoconservation ⁽³⁹⁾.

En présence d'un signal de régénération hépatique tel que l'hépatectomie partielle à 70%, l'implantation était doublée mais la fonctionnalité des hépatocytes était perdue dans le sens où il n'y a pas eu excrétion d'albumine. Ceci pouvait être dû à l'apparition d'une sénescence rapide ou à un état peu différencié des cellules ⁽³⁹⁾.

Afin d'évaluer l'efficacité de transplantation d'hépatocytes chez des receveurs en insuffisance hépatique chez lesquels les hépatocytes transplantés dans le parenchyme hépatique étaient visualisables, les rats NAR ont été soumis à des traitements induisant des hépatites fulminantes ou chroniques chez le rat Sprague-Dawley.

Le rat NAR a répondu selon un mode «tout ou rien» à l'induction d'hépatite fulminante par la GalN: pour de faibles doses l'atteinte est faible et tous les animaux survivaient tandis qu'avec une dose plus élevée l'atteinte hépatique était marquée et la mortalité de 100% ⁽³⁹⁾.

De plus, le rat NAR, contrairement au rat non muté Sprague-Dawley, s'est montré résistant à l'induction de cirrhose par des injections répétées de thioacétamide ⁽⁴¹⁾. Une coadministration de thioacétamide et d'albumine ne permettait pas non plus de développer de cirrhose chez ces animaux. Ainsi, l'efficacité de la THI n'a pu être évaluée au cours de ces travaux ⁽³⁹⁾.

En conséquence, il apparaît clairement nécessaire d'étudier les moyens d'améliorer l'efficacité de transplantation, et pour cela:

1) Développer des insuffisances hépatiques mimant la clinique dans un autre animal que le rat analbuminémique et faire un suivi des hépatocytes transplantés,

2) Améliorer les protocoles de cryoconservation, en particulier en bloquant le stress oxydant récemment mis en évidence au cours de ceux-ci ⁽¹⁹⁾, ou encore en favorisant une récupération de l'intégrité membranaire par une incubation post-isolement en présence de précurseurs adaptés. Ceci permettrait de greffer davantage de cellules viables et fonctionnelles et donc ne pas dépendre d'un approvisionnement en hépatocytes fraîchement isolés,

3) Améliorer le taux d'implantation des hépatocytes greffés. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer le faible taux d'implantation des cellules dans un parenchyme receveur: des mécanismes physiques ou une régulation du nombre et/ou de la qualité des cellules greffées faisant que toutes les cellules ne s'intègrent pas.

Certaines données de la littérature sont contradictoires: par exemple la persistance plus ou moins longue post-greffe d'une sécrétion d'albumine normalisée après greffe chez le rat NAR ^(40,162), ou encore le fait que ce soient les hépatocytes transplantés qui soient responsables des augmentations des taux de survie. En effet, il n'est pas élucidé si d'une part l'activité métabolique des cellules greffées seule permet de contribuer de façon transitoire ou non à la repopulation du foie receveur et à la normalisation des taux sériques métaboliques et d'autre part dans quelle mesure des facteurs solubles peuvent influencer les hépatocytes transplantés et/ou les hépatocytes hôtes.

Ceci suggère l'existence de mécanismes complexes encore mal connus intervenant lors de la régénération hépatique, rendant nécessaire une connaissance plus précise de ces phénomènes.

TROISIEME PARTIE: Homéostasie hépatique

1. Foie normal

Dans un organisme multi-cellulaire adulte, la régulation génétique équilibre la balance entre division/prolifération cellulaire et mort cellulaire programmée (ou apoptose). La mitose, phase de division proprement dite, assure le renouvellement cellulaire et tissulaire.

En absence d'anomalie, la mitose aboutit à la division en deux cellules filles possédant chacune la même quantité ADN que la cellule mère. Il est à noter qu'en conditions normales, c'est-à-dire sans stimulus de régénération on estime à moins de 0,1% la proportion d'hépatocytes en division ^(58,112). La majorité des hépatocytes sont donc dans une phase de quiescence du cycle cellulaire (G_0) c'est-à-dire qu'à l'état normal ne poursuivent pas un cycle mitotique. Les autres cellules parcourent un cycle de division, habituellement divisé en 4 phases successives: G_1 , S (phase de synthèse d'ADN), G_2 et M (phase de division). Par opposition à la phase M, Les autres phases du cycle cellulaire constituent l'interphase.

Il est à noter que les cellules en phase G_0 peuvent retourner en phase G_1 sous l'influence de signaux déclenchant la mitose (facteurs des croissances, virus tumorigènes) et entrer en phase S en passant le point de restriction situé en fin de phase G_1 .

Le cycle cellulaire est finement régulé principalement par des cyclines et des kinases dépendantes de cyclines (CDK) qui peuvent se combiner de différentes façons pour contrôler non seulement l'entrée en phase en M ainsi que la sortie de la phase G_1 mais également la transition au-delà du point de restriction en phase G_1 et le début de la réplication du matériel génétique en phase S ⁽¹¹³⁾.

L'étape de réplication est contrôlée notamment par la transition cycline D/CDK4 et cycline E/CDK2 qui constitue un point de restriction du cycle cellulaire ^(57,155). Cette transition représente une étape clé et est modulable par divers agents qui vont ralentir la progression du cycle cellulaire. Parmi ceux-ci on peut citer BCl2 et Skp2 dont la protéine est impliquée dans la dégradation de p27, un inhibiteur de CDK ^(30,108).

Les voies de signalisation orientées vers la croissance cellulaire se divisent en 4 groupes, selon la nature des récepteurs impliqués: récepteurs couplés aux protéines G, récepteurs possédant une activité intrinsèque tyrosine kinase, récepteurs qui recrutent des kinases cytoplasmiques et récepteurs nucléaires aux hormones (**Figures 6 A, B, C, D**). Lorsqu'ils sont activés ces récepteurs vont permettre l'expression de gènes du complexe AP-1, de *myc*, *fos* et

jun ainsi que de cyclines essentielles pour la prolifération cellulaire. L'arrêt de la croissance est médiée par l'activation de récepteurs sérine-thréonine kinase de la superfamille TGFβ⁽¹¹²⁾.

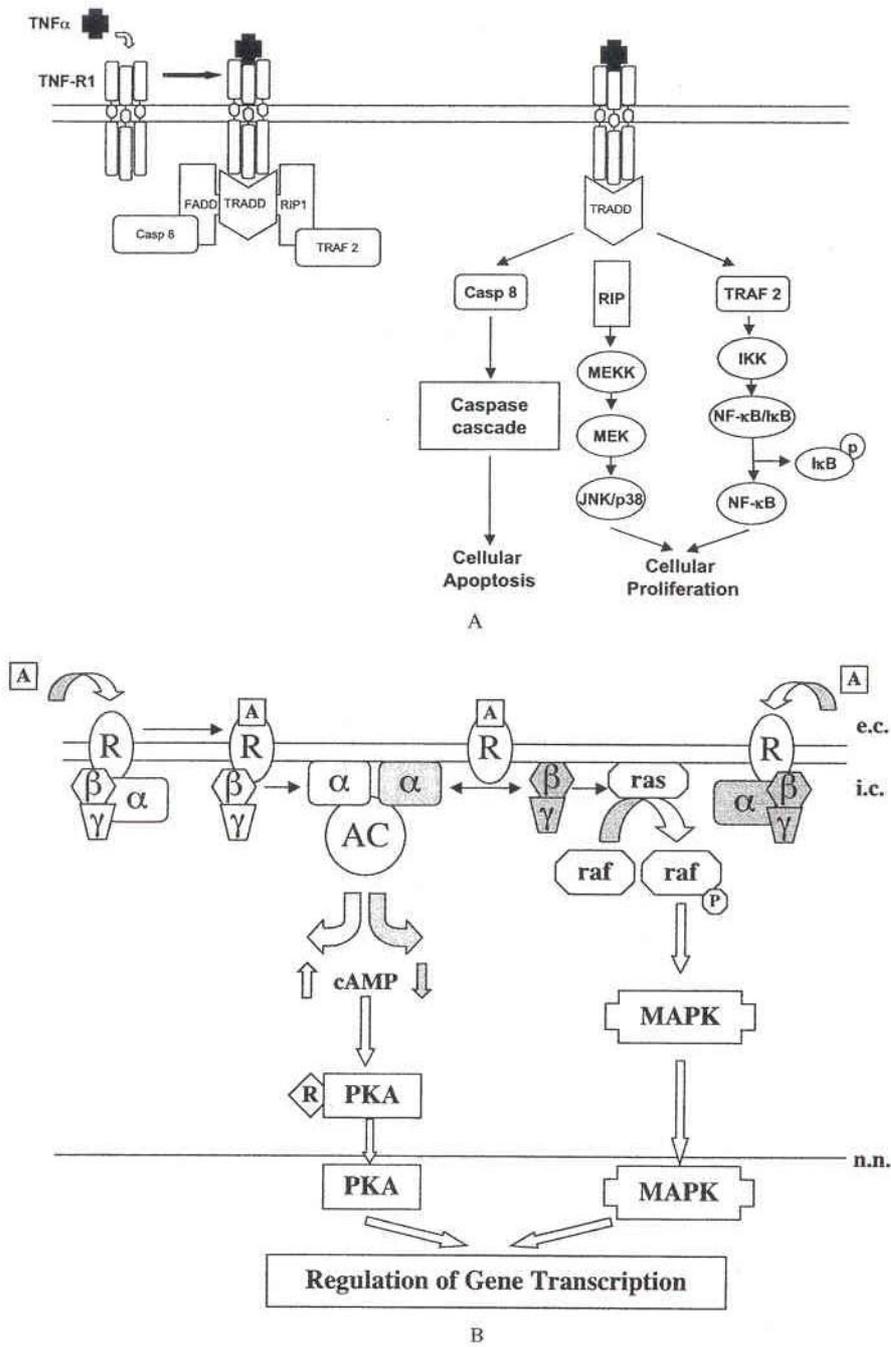
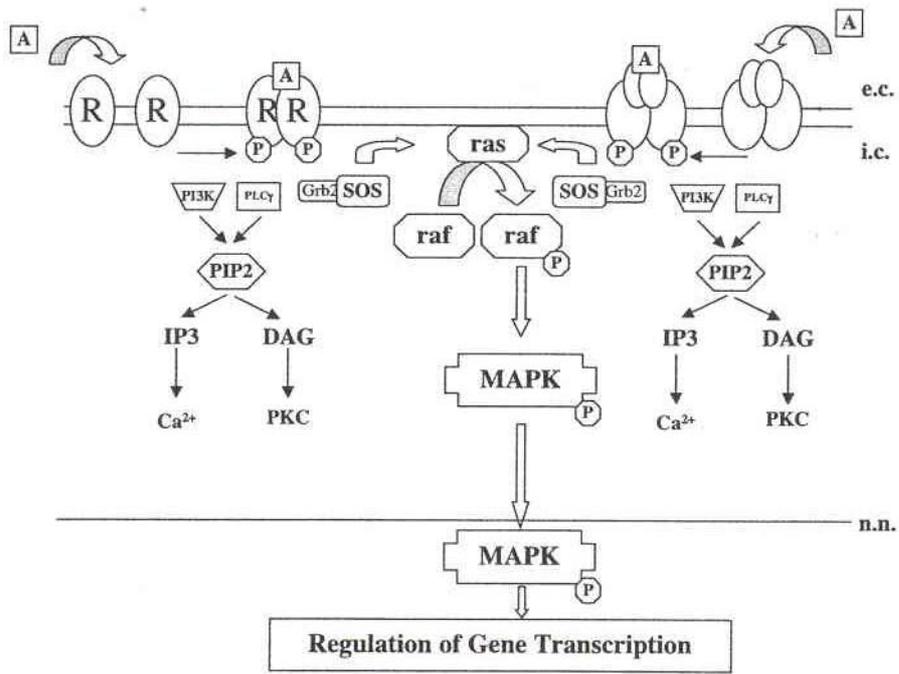
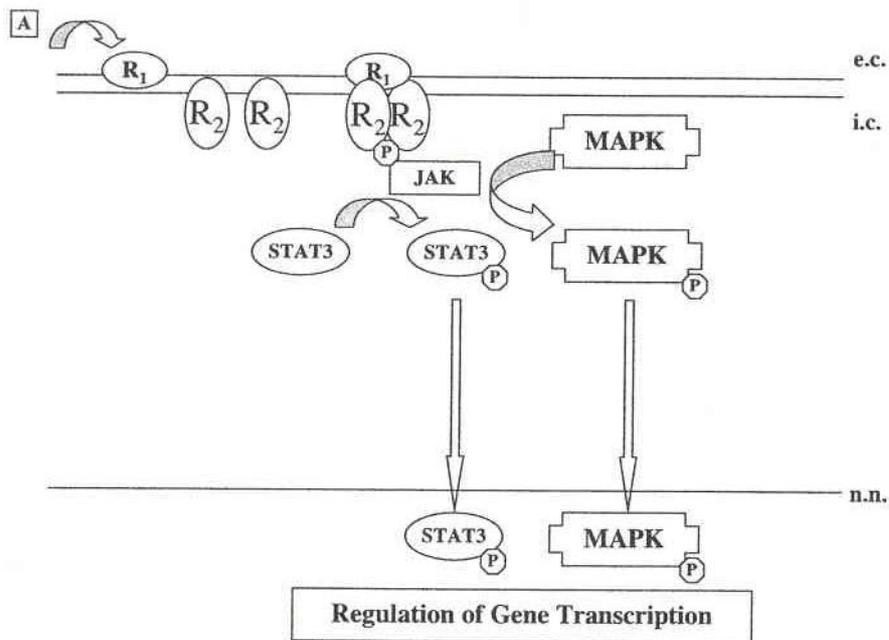


Figure 6: Voies de signalisation médiées par le TNF récepteur (A) et par les récepteurs couplés aux protéines G (B). (Extrait de Koniaris et al., 2003⁽¹¹²⁾).



C



D

Figure 6 (suite): Voies de signalisation médiées par les récepteurs à activité intrinsèque tyrosine kinase (C) et par les récepteurs activant la voie Janus kinase/STAT (D). (Extrait de Koniaris et al., 2003⁽¹¹²⁾).

L'apoptose est caractérisée par d'importantes modifications séquentielles de la morphologie cellulaire (dont présence de corps acidophiles) et du noyau (comme le fractionnement de l'ADN nucléaire), typiquement reflétées par un rétrécissement de la cellule, la perte des contacts inter-cellulaires, un ballonnement membranaire et une condensation de la chromatine ⁽¹⁰⁵⁾. Il n'y a pas de libération d'agents potentiellement toxiques pour la cellule puisque l'intégrité des fragments subcellulaires est préservée. La plupart des mitogènes ont une action anti-apoptotique et parmi les gènes impliqués dans l'apoptose, on peut citer le gardien du génome p53, l'oncogène *c-myc* ainsi que le pro-apoptotique BCl-2 ^(83,105,112).

L'apoptose nécessite des facteurs de mort et leurs récepteurs (Fas, TNF récepteur, TGFβ récepteur, TRAIL récepteur) et peut être initiée par plusieurs signaux, intra- ou extra-cellulaires, basés sur une fixation ligand/récepteur: Fas/Fas ligand, TNFα/TNF récepteur, activation de récepteurs sérine-thréonine kinase par les membres de la superfamille TGFβ dont l'activine et le TGFβ1 ^(20,112). Elle peut-être étudiée soit morphologiquement soit d'un point de vue mécanistique ⁽¹⁰⁵⁾.

Le récepteur Fas est constitutivement présent à la surface de lymphocytes T cytotoxiques; son expression à la surface des hépatocytes, dans des conditions essentiellement pathologiques (on estime à 0,01-0,05% la proportion de cellules apoptotiques dans le foie normal), permet l'apoptose dans le foie, par un processus initié par la fixation d'un ligand à ce récepteur ⁽¹⁷⁰⁾ de la superfamille des récepteurs TNF/Nerve Growth Factor ⁽¹⁵¹⁾ (**Figure 7**).

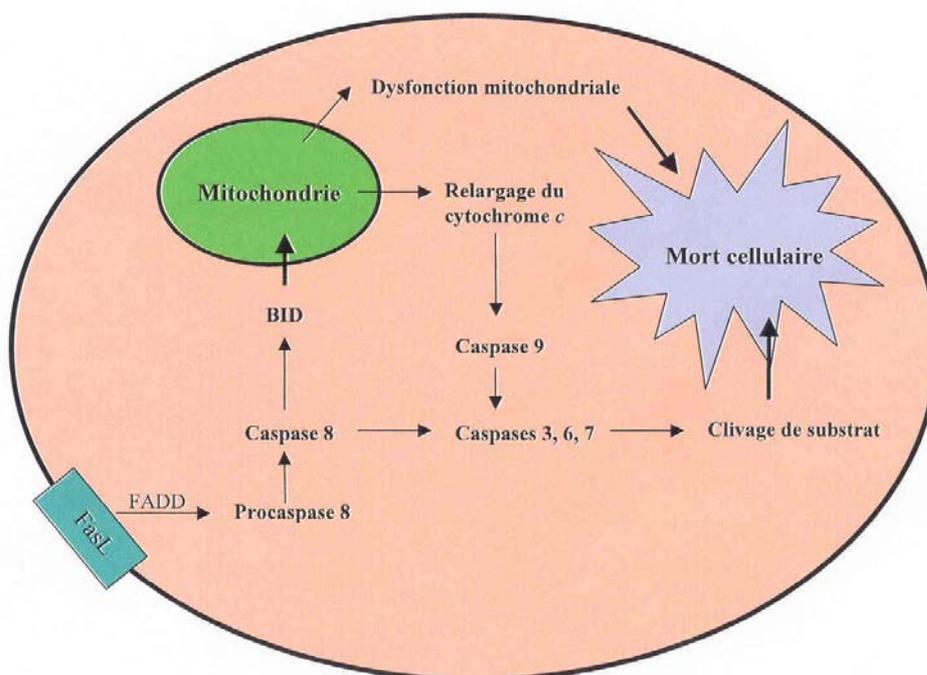


Figure 7: Schéma de l'apoptose médiée par Fas, après fixation du FasL sur son récepteur

Le mécanisme d'action est le suivant: la fixation du Fas ligand (FasL ou CD95L), une glycoprotéine transmembranaire de type II de 330 acides aminés et d'un poids moléculaire de 40 kD exprimée constitutivement par les hépatocytes, sur son récepteur transmembranaire (Fas, dénommé également CD95 ou APO-1, glycoprotéine membranaire de type I contenant 325 acides aminés chez l'homme et d'un poids moléculaire de 45 kD) permet l'oligomérisation du récepteur et la formation d'un complexe de signalisation (DISC, pour «death-inducing signaling complex») et qui comprend le récepteur lui-même ainsi que le domaine de mort associé à Fas (FADD, pour «Fas-associated death domain», motif intracytoplasmique de 80 acides aminés) et la procaspase 8 ^(61,105,148). La formation du complexe DISC résulte en l'activation protéolytique de la procaspase 8 en caspase 8 (ou anciennement FLICE pour «FADD-like interleukin-1 converting enzyme»; le terme caspase s'est imposé pour rappeler d'une part le mécanisme de protéase à cystéine et d'autre part le fait que ces protéases clivent leurs substrats au niveau d'un acide aminé appelé l'acide aspartique ⁽⁶¹⁾). La caspase 8 activée peut activer directement plusieurs caspases effectrices (caspases 3, 6 et 7) mais peut aussi cliver une protéine cytosolique de 22 kD de la famille BCL-2, BID ⁽²⁴²⁾, avec pour conséquences un relargage de cytochrome *c* à partir des mitochondries, l'activation des caspases 3 et 9, le clivage de substrats cellulaires ⁽⁶¹⁾ dont une protéine inhibitrice d'endonucléases, ce qui va permettre à cette endonucléase active de rentrer dans le noyau cellulaire et d'y initier la dégradation de l'ADN avec pour conséquence la mort cellulaire ^(12,170,244).

2. Régénération post-hépatectomie partielle

Les capacités de régénération du foie ont été observées et étudiées par de nombreux auteurs dans des modèles expérimentaux d'hépatite ou suite à une hépatectomie dans un modèle «petit animal» ou chez le primate non-humain ^(70,229). Higgins et Anderson ⁽⁹⁷⁾ ont ainsi les premiers rapporté, en 1931, qu'après hépatectomie partielle à 70% chez le rat (c'est-à-dire excision des lobes gauche et médian) les lobes résiduels augmentaient de volume et le foie reprenait sa taille initiale de 7 à 10 jours après l'intervention. Dans la littérature, au moment où les premiers travaux de cette thèse ont commencé, il était suggéré et non encore prouvé que suite à une hépatectomie, sans nécrose hépatique, toutes les cellules matures du foie participent à la régénération hépatique par multiplication cellulaire 2 fois successivement, et que les cellules

souches ne sont pas sollicitées malgré le caractère potentiellement séduisant qu'elles le soient (142).

La capacité du foie à régénérer est presque infinie, comme il l'a été montré par des résections hépatiques successives répétées chez le rat (201). Les voies de signalisation intra-cellulaires impliquées au cours de la régénération hépatique sont multiples: signalisation à partir du TNF récepteur, de récepteurs couplés aux protéines G, de récepteurs à activité tyrosine kinase ou de récepteur impliquant une signalisation de type JNK/STAT (112,139,191).

Les hépatocytes dépendent de signaux physiologiques moléculaires (dont TNF, Il6, HGF, heparin binding EGF), provenant essentiellement des cellules non-parenchymateuses pour pouvoir se répliquer (134). En fait, de nombreux facteurs influencent ce mécanisme (26,60,142) parmi lesquels les facteurs mitogènes HGF, TNF α (ce dernier de façon autocrine), epidermal growth factor (EGF), TGF α et Fibroblast Growth Factor (FGF); l'activine A (membre de la superfamille du TGF β , inhibée par la follistatine) et le TGF β étant quant à eux plutôt inhibiteurs de ce processus (39,112).

L'Il6, cytokine pro-inflammatoire, agit également comme un mitogène *in vivo* bien qu'*in vitro* il n'a pas été montré qu'il stimulait la synthèse d'ADN des hépatocytes (112). L'absence d'insuline provoque *in vivo* un retard dans la régénération hépatique. L'insuline et le glucagon, bien qu'étant incapables d'induire la synthèse d'ADN dans un foie intact, accélèrent *in vivo* la régénération hépatique après hépatectomie partielle lorsque ces hormones sont co-administrées tandis qu'*in vitro*, le glucagon possède un effet inhibiteur sur la synthèse d'ADN d'hépatocytes traités avec de l'insuline (112). D'autres facteurs sont capables d'influencer la régénération après hépatectomie partielle (PH), parmi lesquels des chémokines, des prostaglandines, des stéroïdes et l'hormone thyroïdienne T₃ qui a été montrée récemment comme stimulant la capacité de régénération du foie après hépatectomie partielle (112,133).

Après hépatectomie partielle à 70%, sous l'influence de facteurs mitogènes et co-mitogènes (comme l'insuline et l'épinéphrine) les hépatocytes sortent de leur état de quiescence (phase G₀ du cycle cellulaire) pour entrer en phase G₁ puis S (phase de synthèse d'ADN) avant

cytokinèse ^(112,238). Les hépatocytes périportaux sont les premiers à se répliquer après PH, probablement en raison de la durée peu élevée de leur phase G₁ du cycle cellulaire ⁽¹⁷⁵⁾.

De façon schématique, on distingue classiquement deux phases successives lors du processus de régénération suite à l'hépatectomie partielle ⁽¹⁴¹⁾:

- Une première phase d'hyperplasie rapide, marquée initialement par l'entrée autonome ⁽²³⁸⁾ en division des cellules sous l'influence du TNF α et de Il6) ^(21,100,230,236) puis contrôlée dans un second temps par HGF, EGF, FGF, TGF α et β , et qui aboutit pour 95% des hépatocytes à une synthèse d'ADN 20 heures après PH chez le rat et 40h après PH chez la souris ^(58,238) contre 72 à 96 h chez le chien et 7 à 10 jours chez le primate ⁽¹¹²⁾.

L'intervalle entre l'hépatectomie partielle et le pic de répllication d'ADN est variable et peut être raccourci d'environ 10 heures chez un rat soumis à des stimuli de stress ⁽¹⁴⁶⁾.

Une seconde phase d'hypertrophie, marquée par la polyploïdisation des cellules ⁽²⁰⁰⁾.

Les points les plus importants de la physiologie moléculaire de la régénération hépatique après hépatectomie partielle ont été récemment élucidés (**Figures 8 & 9**).

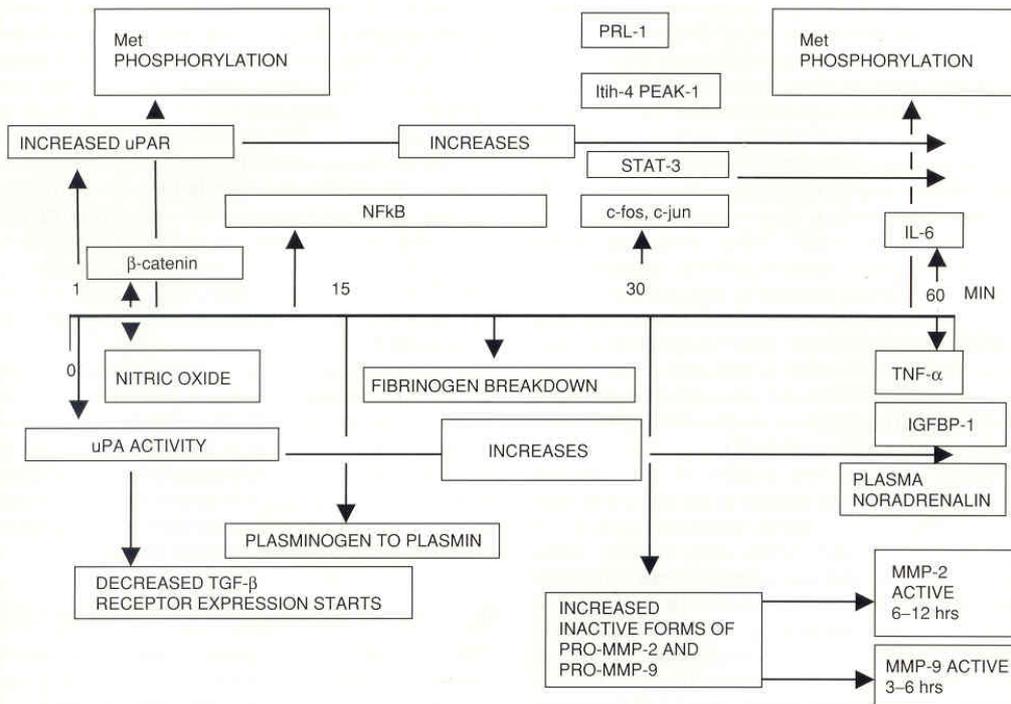


Figure 8: Evénements survenant dans les premières 60 minutes après hépatectomie partielle (extrait de Mangnall et al., 2003⁽¹³⁸⁾).

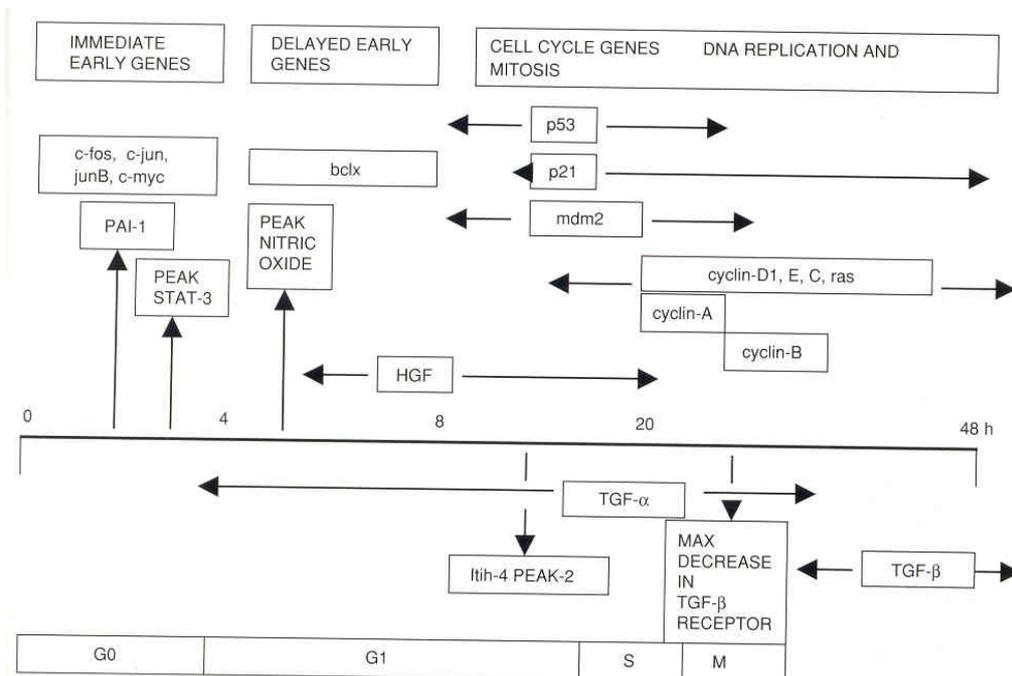


Figure 9: Evénements survenant entre 1 et 48 heures après hépatectomie partielle (extrait de Mangnall et al., 2003⁽¹³⁸⁾).

Chez des souris knock-out pour le gène *Skp2*, la réplication après PH n'est pas altérée mais il n'y a pas de mitoses; ainsi les hépatocytes deviennent plus gros et massivement polyploïdes avec 50% de noyaux présentant une ploïdie d'au moins $8n$ ⁽¹⁴⁴⁾. Une polyploïdisation accrue est également observée sans PH dans ce modèle ⁽¹⁴⁴⁾.

La réplication d'ADN est apparemment coordonnée avec l'expression de protéines impliquées dans la régulation de la taille cellulaire et de la ploïdie: des souris ayant une sous-unité ribosomale 40S déficiente ne peuvent répliquer leur ADN après PH ⁽²²⁸⁾, tandis qu'au contraire une injection de dexaméthasone dans un foie en régénération provoquera une hypertrophie hépatocytaire mais sans réplication ⁽¹⁵⁴⁾. Les cellules non-parenchymateuses jouent également un rôle dans la régénération post-PH ⁽¹³⁴⁾, avec un pic de prolifération suivant de 12 heures celui des cellules parenchymateuses chez le murin ⁽¹¹²⁾ (**Figure 10**).

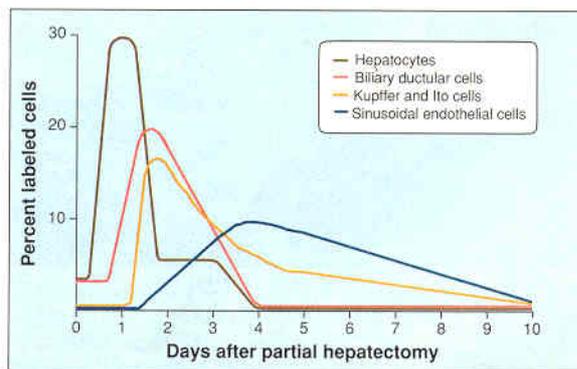


Figure 10: Cinétique de la synthèse d'ADN dans différents types cellulaires, après hépatectomie partielle (extrait de Michalopoulos G.K., DeFrances M.C. 1997 ⁽¹⁴²⁾).

3. Régénération hépatique post-apoptose et/ou post-nécrose

La mort cellulaire est un mécanisme important impliqué lors d'atteintes hépatiques dues à des drogues médicamenteuses, à la maladie de Wilson, des cancers hépatiques, des maladies hépatiques auto-immunes, des hépatites virales

L'apoptose, c'est-à-dire la mort cellulaire programmée, a été impliquée dans ces atteintes hépatiques ^(12,105,219). De même, la nécrose se produit dans de nombreuses atteintes hépatiques parmi lesquelles on peut citer l'empoisonnement dû à l'acétaminophène (ou paracétamol) ^(55,126). A la différence de la mort cellulaire programmée, la mort cellulaire accidentelle (ou nécrose), est due à une dégradation incontrôlée de la cellule avec destruction rapide des

organites intra-cytoplasmiques, perte de l'intégrité membranaire suite à une forte réponse de type inflammatoire ⁽¹²⁷⁾ qui est absente lors des phénomènes d'apoptose.

Ces deux processus, apoptose et nécrose, ne sont pas exclusifs et peuvent se produire en parallèle tout comme l'apoptose peut également conduire à la nécrose ⁽¹⁰⁵⁾. Des différences morphologiques marquées permettent de caractériser au microscope ces deux types de mort cellulaire: en général la nécrose concerne des amas de cellules et non des cellules isolées, le matériel chromatinien s'agrège de façon irrégulière pendant la nécrose et on observe une réaction inflammatoire lors de la nécrose et non pendant l'apoptose ⁽⁸³⁾.

La régénération hépatique dans des cas de cirrhoses ou d'apoptose/nécroses hépatiques apparaît différente qu'après hépatectomie. On assiste en effet à des modifications structurales et métaboliques des cellules présentes dans le tissu soumis au processus de régénération hépatique ⁽¹²²⁾. Il a été suggéré que dans ce cas, les cellules souches seraient sollicitées pour participer à la régénération du foie ^(4,56,112,196).

Il faut noter que dans certaines situations cliniques, parmi lesquelles on peut citer des atteintes toxiques aiguës graves, des états de malnutrition, de stéatose hépatique, d'infection chronique hépatique et les patients en phase terminale de cirrhose, la régénération hépatique n'est pas assez importante pour permettre la survie de l'individu ^(35,112,156).

4. Objectifs du travail

La compréhension imparfaite des mécanismes survenant lors de situations d'hépatites fulminantes, c'est-à-dire leur mise en évidence, leur prévision et les possibilités d'actions thérapeutiques ciblées dans le temps, est fort probablement responsable en partie de l'échec d'une mise au point d'une assistance hépatique transitoire efficace ⁽¹⁸⁰⁾.

De plus, le stade de différenciation optimal des cellules à transplanter pour qu'elles colonisent et reconstituent rapidement le foie receveur en insuffisance hépatique, reste à définir, et ce en fonction de l'insuffisance hépatique étudiée.

L'objectif du présent travail a consisté:

- dans un premier temps à caractériser les sous-populations hépatocytaires dans le foie de rat normal ainsi que dans un foie en régénération,
- puis d'induire chez un «petit animal», la souris Nude, des insuffisances hépatiques mimant différentes situations cliniques, tout en s'affranchissant du problème de rejet (la souris Nude étant immunodéprimée),
- enfin à suivre la capacité de différentes populations hépatocytaires de rat à s'implanter après transplantation dans le parenchyme hépatique de la souris Nude en insuffisance hépatique.

RESULTATS & PUBLICATIONS

PREMIERE PARTIE: Etude de la relation entre taille, localisation lobulaire, ploïdie et fonction hépatocytaire dans un foie de rat Sprague-Dawley

1. Introduction

Le lobule hépatique présente une hétérogénéité métabolique selon la région dans laquelle il se situe, déterminée au cours du développement ^(32,74,103). Autrement dit, la zonation de l'expression génique dans le lobule hépatique reflète le compartimentage dû à la distribution spatiale des cellules (**Figure 11**).

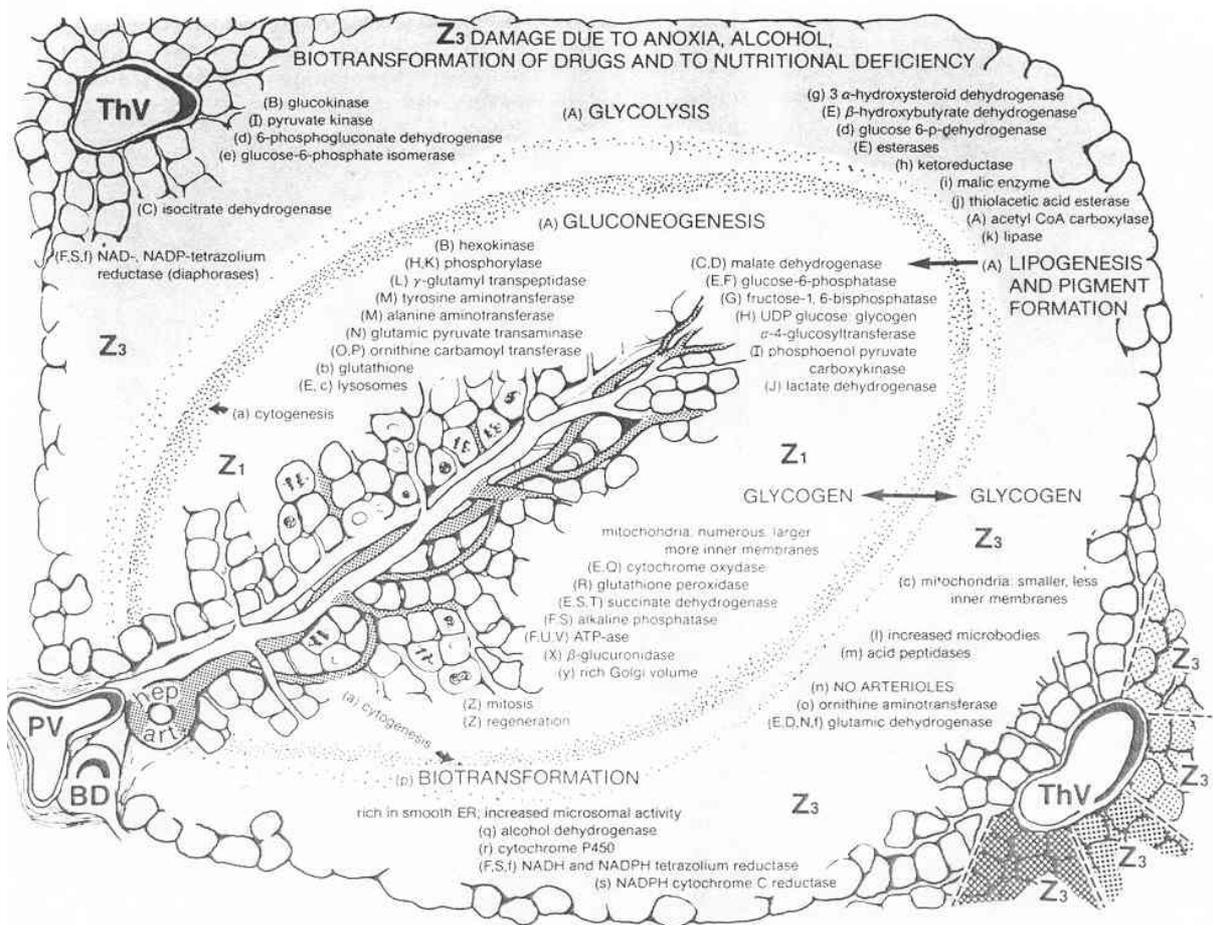


Figure 11: Hétérogénéité métabolique dans le foie (*extrait de Schiff & Schiff, 1987* ⁽¹⁸⁹⁾). PV: veine porte; ThV: veine hépatique terminale; BD: canal biliaire; hep. art.: artère hépatique; Z₁: région périportale; Z₃: région périveineuse.

La zone périportale (PP) est spécialisée dans le métabolisme énergétique oxydatif: β -oxydation des acides gras, catabolisme des acides aminés, production d'urée et néoglucogénèse alors que la zone périveineuse (PV) est spécialisée dans la lipogénèse et, de façon non exclusive, le métabolisme des xénobiotiques ⁽¹⁶⁰⁾ (**Tableau 4**). La glycolyse et la synthèse de glycogène sont également actives dans la région périveineuse, tandis qu'il est admis que la néoglucogénèse et la glycogénolyse sont plus élevées dans la région périportale que dans la région périveineuse ^(14,101,103,140).

| Zone périportale | | Zone périveineuse | |
|------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| <i>Métabolisme général</i> | <i>Métabolisme des xénobiotiques</i> | <i>Métabolisme général</i> | <i>Métabolisme des xénobiotiques</i> |
| Métabolisme énergétique oxydatif | Production d'acides biliaires | Glycolyse | Monooxydation (P450) |
| β -oxydation des acides gras | Peroxydation du glutathion | Lipogénèse | Conjugaison du glutathion |
| Néoglucogénèse | | | Glucuronidation |
| Synthèse du cholestérol | | | |
| Synthèse de l'urée | | | |

Tableau 4: Zonation des principales voies métaboliques dans le foie (*d'après Lindros KO. 1997* ⁽¹²⁵⁾).

Cette zonation métabolique ne se limite pas au métabolisme énergétique; ainsi par exemple les hépatocytes périportaux éliminent l'ammonium sous forme d'urée tandis que les hépatocytes péricentraux glutamine synthétase positifs l'éliminent *via* cette enzyme.

Il existe un gradient d'O₂ entre les régions PP et PV avec une pression partielle deux fois plus élevée dans la région périportale. Ceci pourrait permettre une régulation différentielle de l'activation de signaux oxygène-dépendants comme des facteurs de transcription ou des voies de transduction des signaux ⁽¹⁰⁴⁾.

En culture, les hépatocytes conservent leurs caractéristiques zonales ⁽¹⁷⁴⁾. Le compartimentage fonctionnel dans le foie n'est pas lié à la différenciation des cellules souches ⁽⁵⁸⁾.

L'hétérogénéité lobulaire n'est pas limitée aux hépatocytes (**Tableau 5**).

| Type cellulaire | Hétérogénéité lobulaire |
|------------------------|---|
| Cellules endothéliales | PV: plus grandes et poreuses |
| Cellules de Kuppfer | PP: plus nombreuses PV: Activité phagocytaire accrue |
| Cellules de Ito | PV: légère prédominance |
| «Pit cells» | Inconnue |

Tableau 5. Hétérogénéité lobulaire dans les cellules hépatiques non parenchymateuses (*adapté de Gebhardt R., 1992* ⁽⁷⁴⁾). PV: périveineux; PP: périportal.

Même si la majorité des cellules somatiques normales sont diploïdes (c'est-à-dire possèdent 2 copies du génome), la polyploïdisation somatique se produit dans les tissus de quasiment tous les mammifères: des cellules polyploïdes sont présentes dans le tissu myocardique et les gros vaisseaux sanguins, le trophoblaste, le tissu nerveux, l'épithélium rétinien, le rein, la vessie et le sang ⁽²²⁶⁾. La polyploïdisation n'est rencontrée que dans des tissus combinant prolifération et différenciation et les hépatocytes de mammifère ont également la particularité de posséder un ou plusieurs noyaux eux-mêmes diploïdes ou non et de ce fait présenter des contenus en ADN différents ^(3,226). Et bien qu'il existe des différences entre espèces, la population $4n$ est prédominante dans le foie adulte tandis qu'au cours de la vie fœtale et peu après la naissance les hépatocytes sont exclusivement puis majoritairement $2n$ ⁽¹¹⁵⁾.

Les processus de polyploïdisation et de binucléation, intimement liés, sont irréversibles et la perte des capacités pluripotentes d'une cellule sont perdues définitivement suite à ces différenciations ^(24,77,89). On peut la considérer comme résultant d'un blocage du déroulement normal d'une mitose. La polyploïdisation d'une cellule diploïde se déroule ainsi: tout d'abord, elle réplique son ADN (caryosynthèse) au cours de la mitose mais sans cytokinèse, conduisant ainsi à la formation d'une cellule binucléée possédant deux noyaux diploïdes ($2 \times 2n$). Cette cellule peut alors se diviser pour donner deux cellules tétraploïdes mononucléées, qui peuvent alors se diviser normalement ou bien conduire à la formation, par une mitose sans cytokinèse, de cellules $2 \times 4n$ puis $8n$ ^(147,150,194) (**Figure 12**).

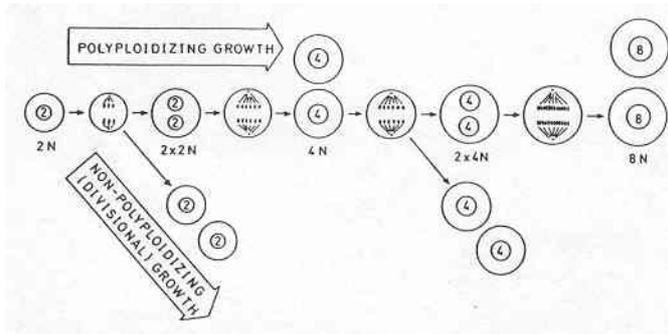


Figure 12. Polyploïdisation hépatique (issu de Seglen PO., 1997⁽¹⁹⁴⁾).

Dans le foie de rat, il peut même exister des degrés de ploïdie supérieurs, c'est-à-dire $2 \times 8n$ et même $16n$, ces cellules représentant moins d'1% de la population hépatocytaire totale. Au contraire des cellules de plantes et d'animaux inférieurs⁽⁹⁶⁾, dans les cellules de foie de mammifère des degrés de ploïdie supérieurs à $16n$ sont très rares.

Il est à noter également, que l'on n'observe pas en règle générale *in vivo* d'hépatocytes binucléés possédant deux noyaux à des degrés de ploïdie différents⁽¹⁹⁵⁾. En fait la seule exception connue concerne une espèce: le hamster *Calomyscus mystax*⁽²²⁶⁾.

La polyplôidisation hépatique est un processus évolutif, unidirectionnel, et qui se déroule progressivement au fur et à mesure du vieillissement de l'animal mais il n'en est bien sûr pas le seul indicateur^(53,76,190). Chez divers mammifères, dont l'homme, la polyplôidisation hépatique se produit de façon intensive à partir du sevrage jusqu'à la maturité sexuelle⁽²²⁶⁾.

L'hypothèse la plus communément répandue, et de loin, concernant le lignage des cellules souches hépatiques, à l'époque où nos travaux ont commencé, était celle de l'équipe de Lola Reid^(199,211): selon son concept du «streaming liver» les hépatocytes migreraient le long des travées cellulaires à partir des régions périportales vers les régions périveineuses et ce changement de position de la périphérie vers le centre des lobules hépatiques serait un moyen de différenciation conduisant à la perte des capacités répliquatives des hépatocytes puis à la mort cellulaire (**Figure 13**).

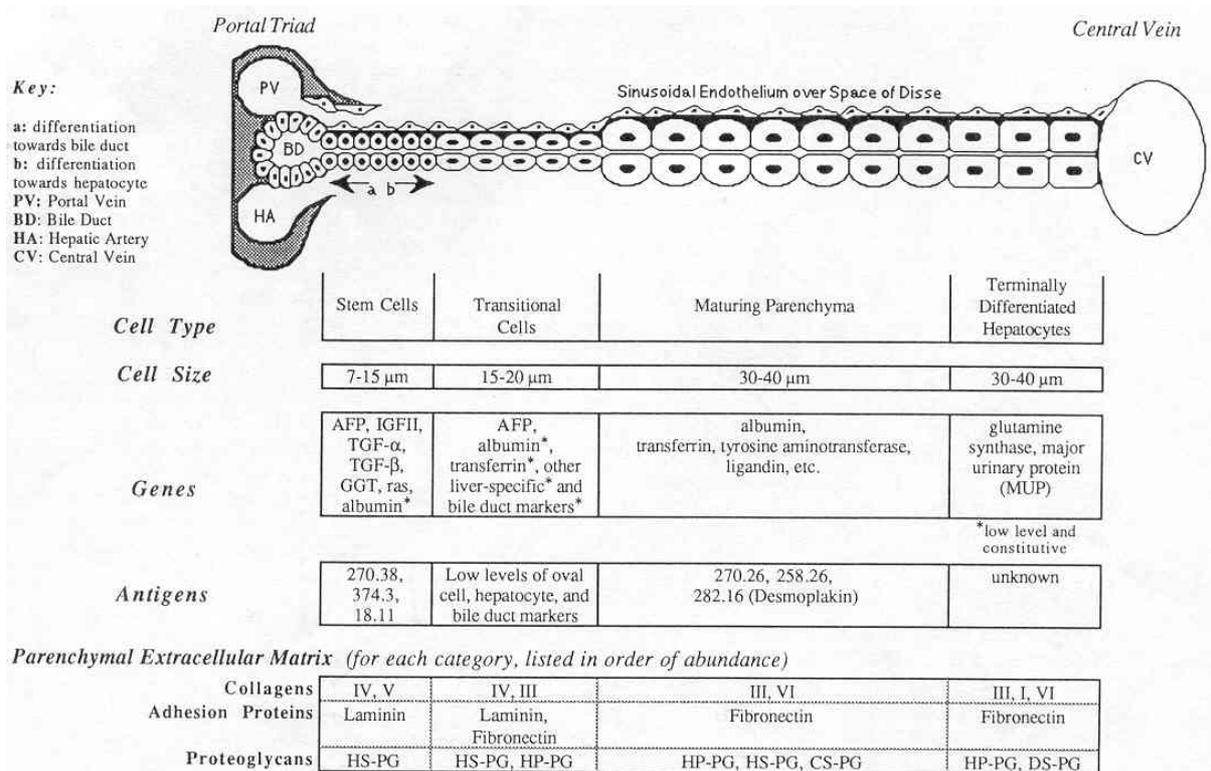


Figure 13. Hypothèse de lignage hépatique: le «streaming liver» (extrait de Sigal et al., 1992⁽¹⁹⁹⁾).

Le premier objectif de notre travail était d'étudier la relation entre fonction en culture, taille cellulaire, localisation lobulaire et ploïdie hépatocytaire dans le foie de rat Sprague-Dawley présentant ou non une régénération hépatique post-hépatectomie partielle ou post-nécrose.

2. Article «Hepatocyte ploidy in normal young rat»

Hepatocyte ploidy in normal young rat

Arnaud Gandillet, Eliane Alexandre, Vincent Holl, Cathy Royer, Jacques Cinqualbre, Philippe Wolf, Daniel Jaeck & Lysiane Richert.

Comparative Biochemistry & Physiology Part A, 134: 663-675; 2003.

Objectifs & Méthodes

Les hépatocytes, cellules parenchymateuses du foie, présentent dans leur(s) noyau(x) une quantité d'ADN $2n$, $4n$ ou $8n$ et même supérieure, se distribuant selon une progression géométrique 2^n . Il a été montré que la polyploïdisation des hépatocytes est un phénomène irréversible conduisant à une perte progressive de la pluripotence cellulaire et des capacités de réplication. Elle est ainsi généralement considérée comme reflétant un état de différenciation terminale et de sénescence.

Notre premier objectif a été de déterminer si la ploïdie des hépatocytes de jeunes rats Sprague-Dawley, déterminée par une technique innovante de cytométrie en flux basée sur l'analyse de cellules et de noyaux issus d'une même préparation, coïncidait ou non avec leur hétérogénéité en taille. Pour cela nous avons utilisé des techniques de filtration sur tamis cellulaires et d'élutriation centrifuge pour obtenir des sous-populations hépatocytaires homogènes mais différant entre elles par la taille cellulaire.

Un second objectif de ce travail a consisté en l'isolement, à l'aide de digitonine, de préparations hépatocytaires enrichies en cellules provenant soit de la région périportale soit de la zone périveineuse du lobule hépatique, de déterminer leur ploïdie et d'évaluer si l'hétérogénéité métabolique lobulaire avait un lien ou non avec le degré de ploïdie.

Résultats & Conclusions

La ploïdie hépatocytaire au sein d'une population cellulaire totale (c'est-à-dire non fractionnée), ainsi que la proportion de cellules binucléées, coïncide avec celle de travaux de la littérature utilisant d'autres méthodes comme l'observation microscopique, l'analyse d'images ou des calculs complexes suite à des analyses en cytométrie en flux. Dans un foie de rat Sprague-Dawley âgé de 10 à 12 semaines, nous avons trouvé la distribution hépatocytaire suivante en terme de ploïdie: $19.6 \pm 3.6\%$ $2n$, $18.76 \pm 2.9\%$ $2 \times 2n$, $56.2 \pm 3.2\%$ $4n$, $2.1 \pm 0.6\%$ $2 \times 4n$, $3.4 \pm 0.6\%$ $8n$. La taille de ces cellules était comprise entre 8 et 39 μm et leur morphologie en microscopie électronique à transmission ou à balayage était normale.

Grâce à la technique d'élutriation centrifuge, technique permettant la séparation en fonction de leur taille et de la densité des cellules, nous avons pu obtenir des fractions de taille moyenne différente. La distribution de la ploïdie hépatocytaire au sein de ces fractions a montré que les cellules de petite taille n'avaient pas une proportion augmentée de cellules diploïdes $2n$ par rapport à une population hépatocytaire non fractionnée et les cellules de grande taille ne présentaient pas non plus d'enrichissement en hépatocytes $8n$.

En fractionnant mécaniquement les hépatocytes à l'aide de tamis cellulaires nous avons obtenu des sous-populations comprenant respectivement des hépatocytes de taille inférieure à 10 μm , comprise entre 10 et 19 μm , comprise entre 19 et 36 μm ou comprise entre 36 et 52 μm . Par l'analyse de la ploïdie de ces différentes fractions cellulaires, nous avons confirmé que taille et ploïdie des hépatocytes n'étaient pas strictement corrélées, ceci infirmant les hypothèses de la littérature.

Des populations hépatocytaires enrichies soit en cellules périportales (marqueur: alanine aminotransférase) ou en cellules périveineuses (marqueur: glutamine synthétase) ont été analysées pour leur ploïdie. Nos résultats ont confirmé les données existantes de la littérature dans le sens où les cellules $8n$ sont préférentiellement situées dans la région périveineuse: ploïdie et localisation cellulaire corrélerent dans le lobule hépatique.

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Hepatocyte ploidy in normal young rat

Arnaud Gandillet, Eliane Alexandre, Vincent Holl, Cathy Royer, Jacques Cinqualbre, Philippe Wolf, Daniel Jaeck & Lysiane Richert

Comparative Biochemistry & Physiology Part A, 2003, Vol. 134, Pages 665-673

Pages 665-673 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
[http://dx.doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00374-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00374-4)

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

3. Etude de la relation entre localisation lobulaire et fonction hépatocytaire dans le foie de rat

Objectifs

En vue de réaliser une caractérisation fonctionnelle des différentes populations hépatocytaires, nous avons évalué, après 24h de culture, la teneur cellulaire en protéines et en albumine ainsi que les activités métaboliques de phase I et de phase II de détoxification hépatique, dans les différentes sous-populations d'hépatocytes de rat.

Matériel & Méthodes

- Isolement d'hépatocytes à partir de rats mâles Sprague-Dawley âgés de 10 à 12 semaines

Les techniques d'anesthésie, et d'isolement d'hépatocytes ont été décrites en détail dans la publication résumée ci-dessus ⁽⁷¹⁾.

- Mise en culture des hépatocytes

Les hépatocytes isolés sont ensemencés à raison de $0,25 \cdot 10^6$ cellules vivantes par puits sur des plaques 24 puits (Costar, Dutscher, France) recouverts de collagène et incubés ensuite dans une étuve à 37°C sous une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Le milieu de culture initial Williams'E (Gibco, Life Technologies, France) contenant 5% de sérum de veau foetal décomplémenté (30 minutes à 37°C) est remplacé après l'attachement des cellules (environ 3 heures après mise en culture) par du Williams'E supplémenté avec 10^{-6} M d'hémisuccinate d'hydrocortisone (Roussel, France) et 0,05% d'insuline bovine à 40 UI/ml (Organon, France).

- Fonctions métaboliques après 24 heures de culture

La production d'albumine, synthèse spécifique au foie, dans les surnageants de culture est mesurée par un dosage de celle-ci par ELISA (pour «enzyme linked immunosorbant assay» en sandwich), technique mise au point au laboratoire ⁽⁴⁰⁾.

La quantité d'albumine présente dans chaque échantillon était déterminée par régression linéaire à l'aide d'une gamme étalon.

- Les activités de détoxification de phase I sont mesurées au travers de la fonctionnalité de monooxygénases cytochrome P450 (CYP) dépendantes. La multiplicité des isoformes est telle que nous nous sommes uniquement intéressés aux principaux isoformes existants, pour

lesquels des substrats spécifiques sont décrits. Ainsi, on associe aux CYP 1A1/1A2 l'éthoxyrésorufine, au CYP 2B1 la pentoxyrésorufine ⁽²⁷⁾ et au CYP 2E1 le paranitrophénol (PNP) ⁽¹⁷⁸⁾.

L'activité des enzymes de phase II était suivie en mesurant l'activité de glucuroconjugaison (UGT-Paranitrophénol (UGT-PNP) et UGT-Bilirubine), de la glutathion-S-transférase (GST) et de son co-substrat le glutathion réduit (GSH).

Dans tous les cas, les monocouches cellulaires étaient incubées directement avec le substrat ⁽⁵⁰⁾.

- Mesure de l'activité CYP 1A1/1A2

Ces monooxygénases permettent la réaction d'éthoxyrésorufine-O-déalkylation (EROD) et donc la production de résorufine à partir de l'ajout de substrat éthoxyrésorufine. La lecture est réalisée par spectrofluorimétrie (excitation à $\lambda=530$ nm et émission à $\lambda=580$ nm) contre une gamme étalon de résorufine ce qui permet de quantifier par régression l'activité EROD en pmol/min/mg de protéine de chaque puits de culture.

- Mesure de l'activité CYP 2B1

Pour la mesure de l'activité de pentoxyrésorufine-O-déalkylation (PROD) le protocole suivi est rigoureusement identique à la détection de EROD, si ce n'est que le substrat ajouté était cette fois la pentoxyrésorufine.

- Mesure de l'activité CYP 2E1

Cet isoforme permet l'hydroxylation du PNP en 4-nitrocatechol. Nous avons utilisé la méthode employée par Dicker *et al.* ⁽⁴⁷⁾ pour mesurer cette activité. L'absorbance est déterminée par spectrophotométrie à $\lambda=546$ nm contre une courbe étalon de 4-nitrocatechol et les résultats sont exprimés en nmol/min/mg de protéine.

- Activité de la Glutathion-S-transférase (GST)

La technique de Habig & Jakoby ⁽⁹⁵⁾ a été utilisée. Sous l'effet de la GST, le chlorodinitrobenzène conduit à la formation d'un glucuroconjugué dont l'absorbance est lue à $\lambda=340$ nm contre le substrat seul. Les résultats sont exprimés en nmol/min/mg de protéine.

- Contenu en glutathion réduit (GSH)

La méthode employée est décrite dans la littérature ⁽⁷⁹⁾. La mesure de l'absorbance par spectrophotométrie est effectuée contre une gamme étalon de GSH à $\lambda=405$ nm. La quantité de glutathion réduit est ensuite exprimée en nmol/min/mg de protéine.

- Activité UGT-Bilirubine

Nous avons utilisé une technique précédemment mise au point au laboratoire ⁽²²⁷⁾. L'UDP-glucuronosyltransférase est une enzyme qui catalyse la fixation du groupement acide de l'acide uridine diphosphoglucuronique (UDPGA) pour former un glucuronoconjugué, la bilirubine conjuguée. Cette dernière par un phénomène de diazotation va être transformée en un azopigment qui sera extrait ultérieurement par un solvant organique. L'absorbance est lue en spectrophotométrie à $\lambda=530$ nm. L'activité UGT-Bilirubine est exprimée en nmol/min/mg protéine.

- Activité UGT-PNP

L'UDP-glucuronosyltransférase est une enzyme qui catalyse la fixation du paranitrophénol sur le groupement acide de l'UDPGA pour former un glucuronoconjugué. On mesure la quantité de ce dernier en déterminant le taux de PNP non conjugué, ceci par la formation d'un complexe avec du NaOH. L'absorbance est mesurée à $\lambda=405$ nm et l'activité UGT-PNP exprimée en nmol/min/mg de protéine.

- Dosage des protéines cellulaires

Sur chacun des puits de la plaque 24 puits mise en culture 200 μ l de NaOH 0,1M sont ajoutés. 20 μ l de suspension cellulaire sont alors déposés sur une plaque 96 puits Polysorp®, et ce pour chaque puits. Un kit commercial est utilisé pour constituer extemporanément le réactif de Pierce (Sigma, France), mélange d'acide bicinchoninique et de sulfate de cuivre III (50:1 v/v). L'incubation du mélange de 20 μ l de suspension cellulaire avec 200 μ l de réactif de Pierce est réalisée à 37°C pendant 30 minutes. La mesure de l'absorbance à $\lambda=550$ nm contre une courbe standard d'albumine bovine sérique permet ensuite d'exprimer les résultats en mg/ml.

- Statistiques

L'analyse statistique des données, par comparaison de moyennes par le test τ de Student pour séries non appariées a été réalisée avec le logiciel Statview version 4.5 (Abacus Concept,

Berkeley, USA). Les différences observées ont été considérées statistiquement significatives pour tout $p \leq 0,05$.

Résultats & Conclusions

L'ensemble de nos résultats obtenus pour les dosages enzymatiques (**Tableaux 6 & 7**) indique que les sous-populations hépatocytaires d'un foie de rat normal sont fonctionnelles. Les mesures des activités métaboliques dans les fractions enrichies en hépatocytes périportaux ou périveineux ⁽⁷¹⁾ et ceci 24 heures après leur mise en culture, ont montré peu de différences entre les fractions. Par exemple, *in vivo* la production d'albumine se distribue dans le lobule hépatique selon un gradient continu avec une prédominance périportale ⁽¹⁷⁶⁾ ce que nos expériences n'ont pas permis de mettre en évidence.

L'absence de différence significative entre les zones PP et PV pour l'activité GST a par contre été conforme aux données de la littérature ⁽⁸⁷⁾.

Les activités des enzymes de phase I et II mesurées *in vitro* n'ont pas révélé de zonation fonctionnelle du lobule hépatique, contrairement aux données de la littérature selon lesquelles ces enzymes auraient un pattern d'expression plus fort dans la région périveineuse ^(125,160). Il est connu que les hépatocytes présentent des réponses physiologiques très différentes en culture en comparaison de la situation *in vivo*. Ceci indique que la caractérisation des hépatocytes par les activités CYP450 en culture est délicate et ne peut servir dans notre cas qu'à compléter notre compréhension des résultats obtenus par l'analyse de la ploïdie des fractions hépatocytaires.

| Population hépatocytaire | Protéines (mg/ml) | EROD (pmol/min/mg de protéine) | PNPH (nmol/min/mg de protéine) | PROD (pmol/min/mg de protéine) | Albumine (μ g/min/mg de protéine) |
|--------------------------|-------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--|
| Contrôle (n=3) | 0,7 \pm 0,0 | 0,6 \pm 0,3 | 2,2 \pm 0,2 | 0,5 \pm 0,0 | 20,0 \pm 0,9 |
| PP (n=21) | 0,7 \pm 0,0 | 0,4 \pm 0,0 | 2,0 \pm 0,2 | 0,2 \pm 0,0 * | 12,2 \pm 1,7 |
| PV (n=15) | 0,9 \pm 0,0 * | 0,5 \pm 0,0 | 2,8 \pm 0,4 | 0,2 \pm 0,0 * | 16,3 \pm 4,4 |
| U10 (n=9) | 0,6 \pm 0,0 | 4,7 \pm 2,3 | 4,2 \pm 0,7 | 1,5 \pm 0,4 | 21,9 \pm 2,1 |
| U19 (n=7) | 0,5 \pm 0,0 * | 5,3 \pm 2,4 | 2,6 \pm 0,7 | 1,9 \pm 0,6 | 24,6 \pm 2,2 |
| U10+19 (n=3) | 0,7 \pm 0,0 | 0,7 \pm 0,1 | 2,8 \pm 0,5 | 0,0 \pm 0,0 * | 8,1 \pm 0,2 * |
| U36 (n=3) | 0,8 \pm 0,0 | 0,7 \pm 0,2 | 1,6 \pm 0,2 | 0,0 \pm 0,0 * | 5,0 \pm 0,2 * |

Tableau 6. Comparaison, après 24h de culture, des activités métaboliques de phase I (EROD, PNPH, PROD) et de la teneur en albumine et en protéines des différentes fractions isolées. Chaque pourcentage indiqué correspond à une moyenne \pm écart-moyen. *:p \leq 0,05 statistiquement différent par rapport au contrôle.

PP: périportale; PV: péricaveuse; U10: cellules de diamètre inférieur à 10 μ m; U19: cellules de diamètre compris entre 10 et 19 μ m; U10+19: cellules de diamètre inférieur à 19 μ m; U 36: cellules de diamètre compris entre 19 et 36 μ m; EROD: activité d'éthoxyrésorufine-O-déalkylation; PNPH: activité d'hydroxylation du paranitrophénol; PROD: activité de pentoxyrésorufine-O-déalkylation.

| Population hépatocytaire | GST (nmol/min/mg de protéine) | GSH (nmol/min/mg de protéine) | UGT-PNP (nmol/min/mg de protéine) | UGT-Bilirubine (nmol/min/mg de protéine) |
|--------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|---|
| Contrôle (n=3) | 12,6 ± 0,6 | 4,2 ± 0,3 | 27,4 ± 3,6 | 4,2 ± 1,9 |
| PP (n=21) | 21,1 ± 1,1 * | 22,1 ± 2,5 * | 56,1 ± 6,0 | 3,6 ± 0,5 |
| PV (n=15) | 19,6 ± 2,0 | 15,1 ± 4,4 | 51,6 ± 1,7 * | 3,9 ± 0,6 |
| U10 (n=9) | 13,4 ± 1,1 | 3,1 ± 0,2 * | 32,8 ± 2,3 | 2,9 ± 0,9 |
| U19 (n=7) | 15,6 ± 1,4 | 4,3 ± 0,7 | 33,8 ± 1,9 | 2,2 ± 1,1 |
| U10+19 (n=3) | 26,8 ± 3,0 * | 1,4 ± 0,6 * | 43,6 ± 3,7 | 0,0 ± 0,0 |
| U36 (n=3) | 19,1 ± 0,2 * | 5,8 ± 0,5 * | 36,3 ± 4,0 | 2,3 ± 1,5 |

Tableau 7. Comparaison, après 24h de culture, des activités métaboliques de phase II (GSH, GST, UGT-PNP, UGT-Bilirubine) des différentes fractions isolées. Chaque pourcentage indiqué correspond à une moyenne ± écart-moyen. *:p≤ 0,05 statistiquement différent par rapport au contrôle.

PP: périportale; PV: périveineuse; U10: cellules de diamètre inférieur à 10µm; U19: cellules de diamètre compris entre 10 et 19 µm; U10+19: cellules de diamètre inférieur à 19 µm; U 36: cellules de diamètre compris entre 19 et 36 µm; GST: activité glutathion-S-transférase; GSH: contenu en glutathion réduit; UGT-PNP: Activité UDP-glucuronosyltransférase du paranitrophénol; UGT-Bilirubine: activité UDP-glucuronosyltransférase de la bilirubine.

4. Etude de la ploïdie hépatocytaire dans un foie de rat Sprague-Dawley en régénération- Article «Hepatocyte ploidy in regenerating livers after partial hepatectomy, drug-induced necrosis, and cirrhosis»

Hepatocyte ploidy in regenerating livers after partial hepatectomy, drug-induced necrosis, and cirrhosis

Arnaud Gandillet, Eliane Alexandre, Cathy Royer, Jacques Cinqualbre, Daniel Jaeck & Lysiane Richert.

European Surgical Research, 35: 148-160; 2003.

Objectifs & Méthodes

La mise au point chez le rat Sprague-Dawley d'une technique de cytométrie en flux simple, fiable et reproductible pour la détermination de la ploïdie hépatocytaire nous a permis de mieux caractériser les cellules parenchymateuses du foie ainsi que des sous-populations hépatiques ⁽⁷¹⁾.

L'objectif principal du présent travail était d'utiliser cette technique afin de comparer, par rapport à leur témoin respectif, la répartition des populations hépatocytaires selon leur degré de ploïdie dans un foie de rat en régénération après induction d'une insuffisance hépatique aiguë (par injection unique de D-Galactosamine ou de thioacétamide), d'une cirrhose chronique (par injections tri-hebdomadaires d'une dose non létale de thioacétamide pendant 10 à 18 semaines) ou après résection de 70% de la masse parenchymateuse hépatique (hépatectomie partielle à 70%). Des prises de sang étaient réalisées afin de juger de l'atteinte hépatique par la détermination de paramètres biochimiques sériques tels que l'aspartate aminotransférase, l'alanine aminotransférase, la bilirubine totale, la bilirubine conjuguée et la bilirubine non-conjuguée.

Le second objectif de notre étude était de d'assurer de la réversibilité de l'atteinte hépatique aiguë; pour cela les mêmes paramètres sériques ont été mesurés jusqu'à 21 jours après induction du stimulus de régénération. La répartition des populations hépatocytaires selon leur degré de ploïdie a ainsi également été déterminée dans un foie de rat en régénération.

Résultats & Conclusions

L'induction d'insuffisance hépatique aiguë a été un succès au vu du suivi sérique montrant une élévation nette et transitoire des paramètres biochimiques. Nous avons démontré que la ploïdie des hépatocytes matures est différente selon le type d'insuffisance hépatique engendrée. En effet, 24 heures après hépatectomie partielle, il y avait par rapport au témoin une proportion significativement moindre en cellules $2n$ et au contraire plus élevée en hépatocytes $8n$. La proportion de cellules binucléées était également diminuée 24h après hépatectomie. Ceci confirme des données récentes de la littérature selon lesquelles ce sont bien les cellules matures qui participent à la régénération après hépatectomie partielle ^(56,200): les cellules binucléées entrent en division et donnent naissance à des cellules filles de degré de ploïdie supérieur. L'ensemble du phénomène traduit une polyploïdisation accrue des hépatocytes.

Après induction d'une insuffisance hépatique aiguë, il y avait à 24 heures, au contraire, une augmentation spectaculaire (et davantage marquée avec le thioacétamide qu'avec la D-Galactosamine) de la proportion en cellules $2n$ sans diminution significative de la proportion de cellules binucléées. La polyploïdisation dans le foie étant un phénomène connu comme étant irréversible nous en avons conclu que ces toxiques engendraient une réponse nécessitant l'apparition de cellules $2n$, peut-être souches, à la différence du phénomène observé après hépatectomie partielle. Après 21 jours dans tous les cas, la ploïdie et les valeurs sériques basales étaient restaurées, attestant ainsi d'une régénération hépatique complète et sans séquelle.

L'obtention d'une insuffisance hépatique chronique de type cirrhose macronodulaire a été réalisée avec succès chez le rat Sprague-Dawley. En accord avec des études publiées ⁽¹⁸⁵⁾, la proportion de cellules $2n$ était augmentée d'un facteur 10 par rapport à des témoins du même âge, au détriment principalement des cellules $4n$ habituellement majoritaires dans un foie de rat adulte. Ceci suggère l'implication de cellules $2n$ dans la régénération hépatique lors de la cirrhose.

Ce travail montre non seulement la réversibilité en 21 jours des modèles d'insuffisance hépatique étudiés mais surtout conduit à la découverte majeure que la régénération hépatique implique différentes cellules selon le type d'insuffisance hépatique, aiguë ou chronique ou

suite à hépatectomie partielle. Une meilleure compréhension des phénomènes post-induction de stimuli de régénération demeure toutefois nécessaire afin de pouvoir comprendre ces observations et parfaire nos connaissances sur les différents mécanismes de régénération.

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP-SCD – Service des thèses électroniques]

Hepatocyte ploidy in regenerating livers after partial hepatectomy, drug-induced necrosis, and cirrhosis

Arnaud Gandillet, Eliane Alexandre, Cathy Royer, Jacques Cinqualbre, Daniel Jaeck & Lysiane Richert.

European Surgical Research, 2003, vol. 35, pages 148-160

Pages 148 à 160 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Il est possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

5. Discussion

La purification et la caractérisation de populations hépatocytaires présentes dans le foie de rat normal indique qu'il y a une relation entre ploïdie et localisation lobulaire mais pas entre ploïdie et taille cellulaire ⁽⁷¹⁾. Ces résultats appuient l'idée formulée récemment selon laquelle malgré la présence dans le foie de cellules matures et de cellules précurseurs le foie ne se présenterait pas comme un système classique du point de vue lignage des cellules souches ⁽⁵⁸⁾, contrairement à ce que l'équipe de Lola Reid avait suggéré ^(199,211). De plus, s'il est plausible que des hépatocytes migrent en environ 200 jours dans le lobule hépatique ⁽²⁴³⁾, ceci ne constituerait pas pour autant une étape d'un processus de différenciation alors que le concept de foie fonctionnant comme un système classique de lignage des cellules souches repose sur un gradient de différenciation dans le sens PP vers PV avec des hépatocytes périportaux en majorité non différenciés ⁽⁵⁸⁾. La théorie du flux hépatocytaire intralobulaire est également fortement remise en cause ⁽¹⁹²⁾ par le fait que la division hépatocytaire ne dépend pas de la localisation lobulaire ⁽⁸⁰⁾ et que des hépatocytes transplantés exprimant la β -galactosidase restent à la même place durant 15 mois de suivi ⁽²²⁾.

A ceci on peut ajouter que l'existence incontestée d'une zonation métabolique au sein du lobule hépatique ne corrèle pas avec les patterns de différenciation que l'hypothèse du «streaming liver» pré-supposait. Ainsi le gène codant l' α -fétoprotéine (AFP), exprimé dans les hépatocytes fœtaux et néonataux devrait être exprimé selon un gradient décroissant PP/PV alors que ce n'est pas le cas ⁽¹⁶⁸⁾. De même, la notion d'un gradient croissant de différenciation au sein du lobule hépatique dans le sens périportal vers périveineux est contraire aux observations selon lesquelles les hépatocytes périveineux sont les derniers à silencer le gène de l'AFP alors que l'expression de l'albumine devient forte dans la zone périportale ⁽¹⁷¹⁾. De plus, chez une souris transgénique porteur du gène de l'AFP sous contrôle de son promoteur, l'expression génique de l'AFP était la plus élevée dans les hépatocytes périveineux ⁽⁵²⁾. En réalité, les hépatocytes périportaux ne sont pas indifférenciés et expriment au contraire un phénotype d'hépatocyte différencié en participant à la synthèse du cholestérol et de l'urée, à la glycolyse et à la néoglucogénèse.

La signification de la polyploïdisation hépatique demeure peu claire. Une étude récente a remis en cause l'opinion répandue selon laquelle un accroissement de la ploïdie augmenterait

les capacités cellulaires ou serait nécessaire à la différenciation; ainsi, la ploïdie somatique pourrait être vue comme une solution aux problèmes de croissance rencontrés lorsqu'un organe fonctionne aux limites de ses capacités ⁽²²⁶⁾. La corrélation entre ploïdie hépatocytaire et taux de croissance (plutôt qu'avec la masse de l'animal) peut s'expliquer comme étant la résultante d'une compétition entre les phénomènes de prolifération et de différenciation pour des substrats, systèmes de transport, synthèses protéiques, ou ressources énergétiques, ce que vient appuyer le fait que ploïdie cellulaire et localisation lobulaire sont liées ⁽²²⁶⁾.

Dans l'hypothèse d'une atteinte hépatique sévère, une cellule binucléée peut être avantagée puisque pouvant survivre si l'un des noyaux est pycnotique. Le pourcentage d'hépatocytes binucléés est en rapport avec l'état métabolique de base (reflétant le degré d'atteinte métabolique) tandis que la ploïdie nucléaire ne l'est pas ⁽²²⁶⁾.

En accord avec nos résultats ⁽⁷²⁾, d'autres auteurs ont rapporté que certains types d'atteintes hépatiques ont pour conséquence la prolifération de sous-populations hépatocytaires spécifiques afin de restaurer la masse parenchymateuse hépatique fonctionnelle ⁽¹¹²⁾. La caractérisation et la purification de sous-populations hépatocytaires chez le rat présentant une insuffisance hépatique laisse donc entrevoir la nécessité de greffer des sous-populations hépatocytaires différentes selon l'atteinte pour aider à la régénération d'un foie receveur.

DEUXIEME PARTIE: Mise au point de modèles de régénération hépatique chez la souris Nude

1. Introduction

Dans la littérature, ainsi que récapitulé dans le **tableau 8**, de nombreux modèles d'étude du mécanisme et de l'efficacité de la greffe d'hépatocytes ont été mis au point.

| Nature du modèle | Dénomination | Obtention du modèle | Maladie reproduite |
|------------------|---------------------------------------|---|------------------------------|
| Génétique | Rat DDPIV ^{-/-} | Mutation | Aucune |
| | Souris DDPIV ^{-/-} | Knock-out de gène | |
| | Souris FAH ^{-/-} | Knock-out de gène | Tyrosinémie de type I |
| | Rat Gunn | Mutation spontanée | Crigler-Najjar |
| | Rat LEC | Mutation spontanée | Maladie de Wilson |
| | Lapin WHHL | Mutation spontanée | Hypercholestérolémie |
| | Rat NAR | Mutation spontanée | Analbuminémie |
| | | | |
| Iatrogénique | Souris, rats, lapins, cochons, chiens | Injection de toxiques ou hépatectomie partielle | Insuffisance hépatique aiguë |
| | Rats | Injection répétée de CCl ₄ | Cirrhose hépatique |

Tableau 8. Principaux modèles animaux pour l'étude d'une thérapie cellulaire hépatique (*adapté de Gupta & Chowdhury, 2002* ⁽⁹³⁾). DDPIV: dipeptyl peptidase IV; FAH: fumaryl acéto-acétate; LEC: Long Evans Cinnamon; WHHL: Watanabe hypercholestérolémique.

On pourrait rajouter à ce tableau par exemple l'étude de la carcinogenèse chez le rat à l'aide d'un traitement par le 2-acétyl aminofluorène; il est à noter que ce traitement provoque également la formation de nodules cirrhotiques, avec un contenu nucléaire en ADN 2n ⁽⁴⁹⁾. D'autres modèles ont été largement étudiés comme la souris transgénique uPA (pour «urokinase-type plasminogen activator»), depuis que des expériences pionnières menées par Rhim *et al.* en 1994 ont montré qu'un faible nombre d'hépatocytes était requis pour repeupler quasi entièrement le foie après 10 à 15 cycles de division successifs ⁽¹⁷⁹⁾. La souris lpr

(présentant une mutation de l'antigène Fas) a également été l'objet d'études de transplantation cellulaire ⁽⁶⁶⁾.

Certains de ces modèles, notamment les animaux transgéniques, ont montré des résultats satisfaisants de transplantation cellulaire chez l'animal ⁽¹¹⁸⁾. Il faut cependant souligner qu'ils ne sont pas transposables en clinique.

Un certain nombre de composés sont susceptibles d'entraîner une insuffisance hépatique aiguë en clinique suite à des empoisonnements (dans leur ensemble, les médicaments et toxines sont responsables de 5% des cas d'hépatite aiguë ⁽⁵⁵⁾).

L'acétaminophène (ou paracétamol) est principalement éliminé par glucurono- et sulfo-conjugaison mais dont une faible quantité est convertie en un métabolite intermédiaire éliminé par conjugaison au glutathion. A de fortes doses, le stock de GSH est déplété (ce qui est réversible par administration de N-acétyl cystéine) et le métabolite intermédiaire peut se fixer de façon covalente à des protéines avec pour conséquences une élévation du taux cytosolique de Ca^{2+} conduisant à des modifications enzymatiques et structurales et enfin à la mort de la cellule ⁽¹²⁶⁾. En général, l'intoxication par l'acétaminophène se produit après une prise trop forte, notamment chez des sujets à risques, principalement alcooliques ⁽⁵⁵⁾.

L'intoxication par le tétrachlorure de carbone se produit dans l'industrie ou par l'inhalation accidentelle de certains liquides de nettoyage contenant de l'éthanol (ce qui accroît l'effet du CCl_4). Ce produit forme, par réduction, du trichlorométhyle en étant métabolisé. La formation de radicaux libres conduit à différents phénomènes comme une nécrose centrilobulaire et l'inhibition de la synthèse protéique, modification des lipides membranaires ce qui mène à la destruction des enzymes microsomales et à la perte du CYP450 ⁽¹²⁶⁾. Le tétrachlorure de carbone est également utilisé pour induire des cirrhoses expérimentales chez le rat, modèle dans lequel des xénogreffes à partir d'hépatocytes porcins se montrent prometteuses ⁽¹⁵²⁾.

L'induction d'une hépatite par l'injection de GalN conduit, selon la littérature, à une nécrose des cellules parenchymateuses hépatiques aussi bien *in vivo* que *in vitro* ^(108,188,223). Cependant, des données plus récentes mettent en évidence qu'elle entraîne une apoptose hépatocellulaire ^(149,205,222) ce qui relance le débat sur la question. La D-Galactosamine est métabolisée dans les hépatocytes en UDP-hexosamines dont l'UDP-galactosamine qui va s'accumuler dans la cellule avec pour conséquence une déplétion en UTP, en UDP-glucose et UDP-galactose dans

les cellules parenchymateuses conduisant à un blocage de la transcription et de la synthèse protéique hépatocytaire ⁽¹⁰⁸⁾. Après injection de GalN (mais non exclusivement) il y a activation de cellules progénitrices, appelées cellules ovales en raison de la forme de leur noyaux qui vont proliférer et se différencier en suivant le lignage hépatocytaire ^(38,78).

Le thioacétamide est un produit chimique de synthèse (CH_3CSNH_2), rapporté pour la première fois dans la littérature en 1921 ⁽⁹⁾ et est d'abord utilisé dans le contrôle du pourrissement des oranges, comme fongicide ⁽³¹⁾ puis dans la vulcanisation en industrie.

Il possède à haute dose des effets marginaux sur le rein ⁽¹³⁾ mais est surtout connu pour être avant tout une hépatotoxine ⁽⁶⁴⁾ ayant pour effet de stimuler la synthèse d'ADN et la division cellulaire ⁽⁴⁸⁾. Le cytochrome CYP 2E1 joue un rôle clé dans la potentialisation de la toxicité du thioacétamide ^(41,231).

Le thioacétamide est oxydé par le système FAD-monoxygénase en thioacétamide sulfoxyde ($\text{CH}_3\text{CSO}\text{NH}_2$) ce qui libère des radicaux libres responsables d'une peroxydation lipidique ayant pour conséquence une déplétion en glutathion. Puis le thioacétamide sulfoxyde est métabolisé en thioacétamide disulfoxyde ($\text{CH}_3\text{CSO}_2\text{NH}_2$), lequel est converti en acétylimidolysine, métabolite qui se lie à des macromolécules protéiques du foie et qui provoque une hépatotoxicité ^(7,29,48,137). Comme après hépatectomie partielle à 33%, l'administration de la substance stimulatrice hépatique (HSS, pour «hepatic stimulator substance»), facteur de croissance hépatique spécifique d'organe, s'avère capable de stimuler la régénération après hépatite induite par le thioacétamide et d'améliorer le taux de survie après injection de D-Galactosamine ⁽²¹⁸⁾.

L'injection répétée de thioacétamide, malgré un possible mécanisme d'autoprotection ⁽¹³⁶⁾, conduit à une cirrhose évolutive chez le rat, laquelle peut-être prévenue en diminuant le stress oxydatif à l'aide de piègeurs de radicaux libres ⁽²⁵⁾. Il a été montré très récemment que la gliotoxine, un métabolite fongique, était capable de diminuer le nombre de cellules de Ito activées lors du processus de fibrogenèse, d'engendrer une apoptose de ces mêmes cellules et des hépatocytes réduire la fibrose hépatique ⁽⁴²⁾.

L'anticorps anti-Fas JO₂ fait partie des ligands extra-cellulaires pouvant entrer en compétition agoniste avec FasL pour la fixation ligand/récepteur; ceci constitue un modèle de choix pour étudier l'apoptose *in vivo* chez la souris ⁽¹⁵⁸⁾. Une résistance à l'apoptose induite par Fas peut

être obtenue par des inhibiteurs du relargage du cytochrome *c*, tels *bcl-2* et *bcl-x* ^(114,219) ou grâce à l'implication de facteurs de croissance et de cytokines ^(105,114,148). Le mécanisme initié par la fixation JO₂/Fas implique les caspases 3 et 7 et peut être inhibé soit par des inhibiteurs de caspases soit par une surexpression de BCL-2 (ce qui empêche le relargage du cytochrome *c* mitochondrial) et ainsi protéger contre l'insuffisance hépatique ^(12,119).

2. Développement de modèles expérimentaux d'insuffisance aiguë et chronique chez la souris Nude- Article: «Experimental models of acute and chronic liver failure in Nude mice – Time course of liver regeneration»

Experimental models of acute and chronic liver failure in Nude mice – Time course of liver regeneration

Arnaud Gandillet, Eliane Alexandre, Maxime Audet, Marie-Pierre Chenard-Neu,
Daniel Jaeck & Lysiane Richert.

Soumis à Cell Transplantation, en révision

Objectifs & Méthodes

La transplantation d'hépatocytes constitue une thérapie prometteuse pour guérir l'insuffisance hépatique chez l'homme. Ainsi, le manque de modèles animaux adaptés dans lesquels le bénéfice d'une telle greffe pourrait être évalué indépendamment de toute immunosuppression nous a conduit à développer des modèles reproductibles d'insuffisance hépatique chez la souris Nude. Pour ceci nous nous sommes appuyés sur l'expérience acquise chez le rat Sprague-Dawley et avons réalisé des hépatectomies partielles ou administré une injection unique de thioacétamide ou de D-Galactosamine aux souris Nude, la souris Balb/c servant de contrôle. Un anticorps anti-Fas JO₂ spécifique de la souris a été également employé. De plus, nous avons tenté d'induire une cirrhose chez la souris Nude par injections répétées de thioacétamide.

Pour toutes ces expériences, nous nous sommes intéressés à la survie des animaux au traitement, à l'évaluation de la sévérité et à la réversibilité de l'insuffisance hépatique (en histologie et par des dosages sériques de l'alanine aminotransférase). Afin de déterminer quels mécanismes (apoptose, mitose, nécrose) étaient plus particulièrement mis en jeu dans chacun des différents modèles nous avons également détecté par immuno-histochimie la présence de cellules positives Ki67⁽⁷⁰⁾ ou caspase 3 active.

Résultats & Conclusions

Les différences entre espèces et entre souches animales au sein d'une même espèce ont nécessité des expériences préalables afin de choisir des doses à la fois non létales et permettant une atteinte hépatique maximale.

Dans les expériences définitives les résultats suivants ont été obtenus:

- Après hépatectomie partielle, nous avons détecté une forte élévation 24 heures après chirurgie du signal Ki67 traduisant des mitoses. Après 72 heures les phénomènes de mitose et d'apoptose coexistent sans nécrose, ce qui confirme les données récentes de la littérature ⁽³⁵⁾.
- Après injection de D-Galactosamine, aucun signe de nécrose n'était détecté tandis que la prolifération cellulaire et l'apoptose étaient tous deux légèrement promus, ce qui confirme également des données récentes de la littérature ⁽⁸⁸⁾. L'injection de thioacétamide se soldait quant à elle par une intense prolifération cellulaire à 24h, avec un pic d'apoptose à 72h.
- Après injection de JO₂ à une dose induisant une hépatite sub-fulminante chez la souris Nude il y avait un fort signal caspase 3 dès 24h, confirmant les observations histologiques montrant des foyers apoptotiques et des plages massives de nécroses. A 72h, l'apoptose était diminuée tandis que la prolifération cellulaire augmentait, reflétant la régénération.

Dans tous les cas, de même qu'après hépatectomie partielle à 40%, l'insuffisance hépatique aiguë était transitoire et réversible en 10 jours, tandis que l'induction de cirrhose micronodulaire (après 14 semaines de traitement) ne s'accompagnait ensuite ni de la restauration des valeurs d'alanine aminotransférase sériques normales, ni de régénération du parenchyme hépatique en histologie, le processus demeurant évolutif comme pour toute cirrhose ⁽¹⁸⁴⁾.

Les processus mis en jeu et les cinétiques de régénération hépatique dépendent donc du type d'insuffisance induite; ceci conforte nos résultats de ploïdie lors de l'étude de la régénération chez le rat Sprague-Dawley.

En conclusion, nous avons mis au point les conditions de traitement pour induire des insuffisances hépatiques chez la souris Nude, reproductibles et qui pourront être utilisés pour étudier la régénération hépatique ainsi qu'à des fins de greffe hépatocytaire.

EXPERIMENTAL MODELS OF ACUTE AND CHRONIC LIVER FAILURE IN NUDE MICE – TIME COURSE OF LIVER REGENERATION

Arnaud Gandillet ¹, Eliane Alexandre ¹, Maxime Audet ^{1,2}, Marie-Pierre Chenard-Neu ³, Daniel Jaeck ^{1,2} and Lysiane Richert ^{1,4}

¹ Laboratoire de Chirurgie Expérimentale, Fondation Transplantation, 67200 Strasbourg, France

² Centre de Chirurgie Viscérale et de Transplantation, Hôpital de Hautepierre, 67098 Strasbourg, France

³ Service d'Anatomo-pathologie, Hôpital de Hautepierre, 67098 Strasbourg, France

⁴ Laboratoire de Biologie Cellulaire, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 25030 Besançon, France

Running head : Induction of liver failure in Nude mice

Corresponding author: Eliane ALEXANDRE
Laboratoire de Chirurgie Expérimentale
Fondation Transplantation
5, Avenue Molière
67200 Strasbourg
France
Phone: +33 3 88 26 06 26
Fax: +33 3 88 26 12 26
e-mail: eliane_alexandre@yahoo.fr

Grants: This work was supported in part by Région Alsace, Université Louis Pasteur de Strasbourg, Fondation Transplantation, Strasbourg, France & Hoffmann LaRoche, Basel, Switzerland.

Abstract

Hepatocyte transplantation is a promising therapy for acute liver failure in human, there is still a lack of animal models suffering from hepatic injury in which the benefits of hepatocyte transplantation could be evaluated solely, without the bias caused by immunosuppression. As a consequence, the major aim of the study was to develop reproducible models of partial hepatectomy and of thioacetamide-, D-Galactosamine-, or JO₂ induced acute liver failure in Nude mice. Chronic liver disease was also investigated by repeated injections of sublethal doses of thioacetamide.

Survival rates, routine histologic observations, alanine aminotransferase sera content, Ki67 and caspase 3 immunodetection were investigated both after 40% partial hepatectomy and after toxic-induced damages. Liver injuries were more severe and/or precocious in Nude mice than in Balb/c mice for a same treatment, due to the atrophy of their thymus and were found to be transitory and reversible within ten days. Toxics were proven to induce apoptosis then necrosis, confirming recent published data. Onset of fibrosis leading to reproducible chronic cirrhosis in Nude mice correlated with increasing number of Ki67 positive cells, indicating that cell proliferation occurred at high levels. Chronic cirrhosis was not found to be reversible when the treatment ceased.

In conclusion, models of acute and of chronic hepatic failure in Nude mice are now available to study liver regeneration and can be used for hepatocyte transplantation purposes without any interference with immunosuppressive drugs.

Keywords: Nude mice, partial hepatectomy, regeneration, toxics, apoptosis, necrosis.

Introduction

In the past decades, numerous therapies for the treatment of liver failure in humans were developed (52). In particular, orthotopic liver transplantation has proven its efficacy in the treatment of both acute and chronic liver failure (14).

Recently, research has emerged on the evaluation of the efficacy of hepatocyte transplantation for the mainstay in human liver failure (46). Indeed, not only liver is well adapted to resisting insults because of its particular cellular characteristics, including cell cooperation, acute phase response and synthesis of protective substances (35, 56), liver also presents a unique capacity of regeneration following insult, given the insult does not destroy the liver and/or its regenerative capacities (12). Regeneration of diseased livers or after partial hepatectomy (PH) features complex mechanisms (7), with implication of parenchymal (12) and non-parenchymal cells (38), oval cells (45), and possibly of stem cells (1, 7, 12, 16). Efficient hepatocyte transplantation would allow a transient mainstay of the diseased or partial resected liver to detoxicate the organism during the time course of liver regeneration or, in the case no liver regeneration occurs, to wait for liver donation for transplantation (22, 52).

Hepatocyte transplantation in animal models with metabolic disorders was proven promising, however improvement of cell implantation in host parenchyma remains to be achieved (8, 15, 18, 22, 23, 36, 37, 46, 49). In order to conduct hepatocyte therapy experiments in acute and chronic liver failure, murine models representative of clinical hepatic failure are required (2, 53, 55). In particular, there is still a lack of animal models strictly mimicking acute and chronic human liver failure, to address therapeutic potential of hepatocyte transplantation (15, 30, 31). Indeed, transgenic animals, such as *Skp2* ^{-/-} mice (42), mice expressing human BCL₂ (39), or alb-uPA mice (50) as well as the retrorsine/CCl₄ non-surgical setting (10, 21), although powerful models for the understanding of liver repopulation capacities, do not allow

to study the efficacy of hepatocyte transplantation in clinical situations of liver failure such as toxic acute fulminant hepatitis, large resections of primary or secondary liver tumors or chronic cirrhosis.

The aim of the present work was to induce acute and chronic hepatic failure in Nude mice, which could be used to study the outcome and efficacy of hepatocyte transplantation without immunosuppression. Acute liver failure was successfully induced in Nude mice, following partial hepatectomy (PH), or injection of toxic agents such as D-Galactosamine (GalN), thioacetamide (TA) or anti-Fas antibody JO₂. Both the time course of liver injury and regeneration were determined. Chronic liver cirrhosis was induced in Nude mice, by a chronic, 8-week administration of TA.

Materials & methods

Materials

All chemicals, unless specified otherwise, were purchased from Sigma-Aldrich (France).

Animals

Male 7 week-old Balb/c mice and Nude mice were obtained from Charles River Laboratories, France. Balb/c mice were housed individually and placed under daily cycles of alternating 12 hours light/darkness. Drinking water and standard pelleted rodent diet were available *ad libidum*. Nude mice were housed individually and placed in a ventilated cabinet (Charles River Laboratories, France) under controlled air pressure and temperature conditions and under daily cycles of alternating 12 hours light/darkness. They had *ad libidum* access to sterile water and to sterile standard pelleted rodent diet.

All experiments were conducted according to local institutional guidelines for the care and the use of laboratory animals.

Surgical procedure

Animals were anaesthetized by breathing 2 L/min O₂ containing 3% isoflurane (FORENE®, Abbott, France).

Seventy percent partial hepatectomy (PH) was done in 5 Balb/c mice and in 8 Nude mice according to the technique of Higgins & Anderson (25) and the gallbladder was preserved. After median laparotomy, 40% partial hepatectomy (PH) consisted in the resection of the left lateral liver lobe of Balb/c or Nude mice, after ligation using 3 to 5 titanium 3 mm clips for stapling (LIGACLIP®, Ethicon, France). Hemostasis was performed by dabbing the bloody cut surface with caution using an hemostatic cellulose gauze (SURGICEL®, Johnson & Johnson, France). Two subgroups were done in each strain: mice in which this gauze was removed (6 Balb/c mice and 6 Nude mice), and mice in which it was kept *in situ* (6 Balb/c and 4 Nude mice). Sham-operated animals (n=3 per strain) were not hepatectomized.

We recommend the surgery not to exceed 5 minutes. After PH or sham-operation, animals were warmed-up for at least 20 minutes under heating lamp to restore their preoperative body temperature and were supplemented for 24h with 20% glucose in drinking water.

Surviving mice were sacrificed on day 10 and routine histology (hematoxylin eosin staining) was then achieved on paraffine-embedded sections.

Blood samples were taken on day 0, 1, 2 and 3 days after injection and serum ALT was assessed. Additional mice were treated in order to assess Ki67 and active caspase 3 on cryofrozen liver sections at day 1 and day 3 after PH or sham-operation.

Treatment with toxics

GalN & TA acute treatment

Single intraperitoneal injections of GalN (1 or 1.3g/kg body weight in saline) or TA (200 or 600 mg/kg body weight in saline) were done in Balb/c and Nude mice (n=5 per group). Controls (n=5 per strain) were not subjected to toxic injection.

Blood samples were taken on day 0, 1, 2 and 3 days after injection and serum ALT was assessed. Survival was followed until day 10. Additional mice were treated in order to observe histologic modifications and to assess Ki67 and active caspase 3 on cryofrozen sections at day 1 and day 3 after injection.

JO₂

The purified hamster anti-mouse Fas monoclonal antibody JO₂ (PharMingen, Becton Dickinson, France) was dissolved in phosphate buffered saline (PBS) and either a 125 µg/kg, 250 µg/kg, 375 µg/kg or 500 µg/kg body weight intraperitoneal dose was injected to 5 Balb/c and 7 Nude mice per dose.

Blood samples were taken before and 24h after the injection, before sacrifice and routine histology (hematoxylin eosin coloration on paraffin-embedded sections) was achieved. Additional mice were treated in order to assess Ki67 and active caspase 3 on liver cryofrozen sections at day 1 and day 3 after injection.

TA chronic

Fibrosis and onset of cirrhosis were expected (26) using a TA chronic treatment. Seven Balb/c mice and 7 Nude mice were subjected to 3 intraperitoneal injections of 200 mg/kg body weight TA per week up to 14 weeks.

Blood samples were taken on day 0 and after 5, 8 and 14 weeks of treatment. Mice were sacrificed after 5, 8 or 14 weeks of treatment and routine histology (trichrome and hematoxylin eosin colorations) was achieved on paraffin-embedded sections.

Serum Alanine Aminotransferase (ALT)

Blood samples were taken on anaesthetized animals via the caudal vena vein and then centrifuged 10 min at 3000 g to obtain sera. Serum ALT level (U/L) was assessed using a GPT optimized alanine aminotransferase EC 2.6.1.2 UV-Test (Sigma Diagnostics, France).

Liver Ki67 immunostaining

Cryofrozen liver sections (4µm) were fixed in cold methanol for 10 min and rinsed in PBS for 3 min before being immersed in a 10 mM citrate sodium bath (pH=6) exposed to microwaving during 10 min. After 1 hour at room temperature, slides were rinsed in PBS (5 min, thrice) and incubated overnight at 4°C with ab833 rabbit polyclonal antibody to human Ki67 antigens (Abcam, Interchim, France) diluted (1/50e) in PBS. After rinsing in PBS (5 min, thrice), a 1/200e dilution in PBS of biotinylated goat anti-mouse IgG (H+L) antibody (Vector Laboratories, Biovalley, France) was added for 1 hour. After rinsing in PBS (5 min, thrice) specific endogeneous peroxidase activity was inhibited by H₂O₂ (0.5% in methanol) for 30 min followed by another rinsing step in PBS (5 min, thrice). A commercial kit (VECTASTAIN® ELITE® ABC kit, Vector Laboratories, Biovalley, France) was used for amplification of the signal before 0.3 mg/ml diaminobenzidine (supplemented with 0.03% H₂O₂) was added on each slide as peroxidase activity revelation step (10 min, in the dark). After two successive sterile water bathes (3 min each), sections were dried for 1 hour before being mounted in EUKITT® medium (CML, France).

A qualitative scale was determined to compare Ki67 staining intensity between all samples.

Liver activated caspase 3 immunodetection

Cryofrozen liver sections (4µm) were immersed in 3% H₂O₂ in PBS for 30 minutes to block endogeneous peroxidase activity. Slides were then rinsed in distilled water and PBS (3 min

each). Endogenous biotin activity was blocked using a commercial kit (Dako Biotin Blocking System, Dako, France), aspecific sites were also blocked using PBS containing 5% normal horse serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Interchim, France) and 5% goat serum (Dako). Slides were incubated for 1 hour with rabbit anti-human/mouse caspase 3 active (R&D Systems, France) primary antibody at an optimum 1/250e dilution in PBS. After rinsing in PBS containing 1% Tween 20, slides were incubated with a 1/500e dilution in PBS of biotin-SP-conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L) secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Interchim, France). Signal amplification was obtained using a commercial kit StreptABComplex/HRP (Dako, France). Diaminobenzidine (0.3 mg/ml in PBS) was used as chromogen (20 min), then sections were counter-colored in Harris blue, dehydrated in successive alcohol and toluene bathes and mounted in EUKITT® medium (CML, France).

A qualitative scale was determined to compare active caspase 3 staining intensity between all samples.

Statistics

Differences among means were assessed using computer-aided ANOVA (STATVIEW® 4.5 software, Abacus Concept, Berkeley, USA). Values of $p \leq 0.05$ were considered significant.

Results

Time course of liver failure and regeneration after partial hepatectomy

A 70% PH was first performed in Balb/c and Nude mice, based on previous studies performed in rats and mice (25, 54, 56). All Balb/c mice (n=5) survived the 10-day long observation period whereas all Nude mice (n=8) died within 24h following 70% PH. A 40% PH was than

realized, with or without keeping SURGICEL® gauze *in situ*. As depicted in Figure 1, the use of gauze led to increased mortality, survival rates being respectively 67% and 25% in Balb/c and Nude mice compared to 100% in the absence of gauze, 3 days after 40% PH. No mice died between day 3 and day 10. As Kaya et al. (29) linked augmentation of intra-abdominal pressure to impairment of liver regeneration after PH, one may hypothesize that the increased mortality was due to increased intra-abdominal pressure, placing viscera under ischemic conditions due to compression, and the use of gauze was then avoided in our study.

In Nude mice submitted to 40% PH (n=6), serum ALT increased on day one following surgery to twice the day zero value (Table 1) and returned to basal levels within 3 days. Histological observations of livers demonstrated signs of nuclear activity (*e.g.* enlarged nuclei, chromatin pattern) on day 1 following 40% PH (Figure 2A). This was confirmed by a strong Ki67 signal, as depicted by immunostaining of this antibody (Table 1). On day 3 following PH, Ki67 signal was lower than on day 1 while an abundant number of cells underwent mitosis (Figure 2B), suggesting that the high level of Ki67 positive cells on day 1 gave rise to the numerous cells in mitosis on day 3. Apoptosis, as depicted by immunostaining of activated caspase 3, was low both on day 1 and day 3 following 40% PH (Table 1); similarly no histological signs of necrosis could be detected (Figure 2B).

Ten days after 40% PH, liver mass of Nude mice was restored, the mean weight being 490.9 ± 20.3 mg *versus* 497.0 ± 22 mg in sham-operated mice. Similar results were obtained with Balb/c mice (data not shown). Nude mice still displayed very slight hyperchromatic nuclear enlargement, without any inflammation, which is in favor of a nearly complete regenerative process (Figure 2C).

Time course of liver failure and regeneration after toxic injury

Based on previous studies performed in rats (16) and preliminary studies in mice (data not

shown), both Balb/c and Nude mice were first subjected to a single 1g/kg GalN or 200 mg/kg TA injection. Although a significant and transitory increase in the serologic ALT was observed 24h after treatment, liver histology in treated mice was normal both on day 1 and 3, with only few cells undergoing apoptosis and no histological signs of necrosis (data not shown).

This prompted us to increase the dose levels and single injections of 1.3 g/kg GalN and 600 mg/kg TA were performed. Survival rate on day 10 was 100% in both strains. Serum ALT values reached respectively 4 times and 10 times the day 0 values 24 hours after GalN and TA injection to Nude mice; a return to basal values being observed on day 3 (Table 1). Similar results were obtained after treatment of Balb/c mice (data not shown).

On day 1 following 1.3 g/kg GalN injection, histological observation of livers of treated Nude mice revealed rare necrotic micro-areas regarding about 1% of hepatocytes in the parenchyma, with neutrophilic infiltrate (Figure 2D). The clarified aspect of some hepatocytes was also a sign of cytotoxic damage. No sign of portal inflammation was detected. GalN treatment only slightly increased cell proliferation and apoptosis rate (Table 1).

From day 3 following GalN injection, the parenchyma looked sane with also no sign of portal inflammation (Figure 2E). On day 10, no area with clarification of hepatocytes was detected confirming the parenchyma had fully recovered from the injury (Figure 2F).

Histological observations of hematoxylin eosin stained sections revealed necrosis involving the centrilobular and mid-zonal areas 24h after 600 mg/kg TA injection to Nude mice. Only about one third of the hepatocytes were preserved, usually in periportal location. The cocardious aspect of necrosis suggested fulminant hepatitis (Figure 2G). On day 3, there was a huge portal inflammation with numerous lymphocytes and polymorphonuclear leukocytes. As shown in figure 2H, both proliferative and apoptotic phenomena occurred on day 3. Some

isolated acidophilic apoptotic bodies could be found throughout the parenchyma. The presence of some eosinophils suggested a drug-induced hepatitis. TA strongly induced cell proliferation 24 hours after treatment, as evidenced by the strong Ki67 signal (Table 1). The rate of apoptosis, moderately increased on day 1 following TA treatment, was strongly increased on day 3 following treatment, as depicted by caspase 3 immunodetection (Table 1). On day 10, the aspect of the parenchyma was homogenous. Regeneration was quite complete and without aftermath: hepatocytes perfectly surrounded veins and replaced previously necrotic areas. Hepatocytes still had large hyperchromatic nuclei reflecting a regenerative process (Figure 2I).

The specific anti-mouse Fas monoclonal antibody JO₂ was injected at either 125 µg/kg, 250 µg/kg, 375 µg/kg or 500 mg/kg intraperitoneal dose to Balb/c (n=5 per dose) and Nude mice (n=7 per dose). The dose levels were chosen according to previous studies (19, 24, 44). We found that, whatever the dose used, survivors at 24h after treatment all survived thereafter (data not shown). We therefore decided to shorten the observation period for survival to 24h.

As displayed in figure 3 and as expected (19) there was a dose-dependent effect of JO₂ on Balb/c mice, with a survival rate at 24h decreasing from 100% for 125 and 250 µg/kg JO₂ to 80% for 350 µg/kg JO₂ and 60% for 500µg/kg JO₂. Nude mice appeared more sensitive than Balb/c mice to 375 and 500 µg/kg JO₂ (respectively 42% and 28% of survival) (Figure 3A). In both mouse strains, serum ALT values were transiently significantly increased from 375 µg/kg JO₂, 24 hours after treatment, increases being more important in Nude mice than their Balb/c counterparts (Figure 3B). ALT values returned to basal within 3 days in both Nude mice (Table 1) and Balb/c mice (data not shown).

Histological observations confirmed the higher sensitivity of Nude mice (Figures 4B, 4D, 4F, 4H, 4J) to JO₂ treatment compared to Balb/c mice (Figures 4A, 4C, 4E, 4G, 4I). Indeed, in the

latter strain, although hepatocellular apoptosis and necrosis were observed 24h after 375 $\mu\text{g}/\text{kg}$ JO₂ injection (Figure 4G), the effect being accentuated at 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ JO₂ (Figure 4I), only some mice exhibit clear signs of massive hepatic necrosis (with less than 40% of healthy parenchyma). In opposition, in Nude mice, massive necrosis (with less than 5% of healthy parenchyma) was observed in all Nude mice at 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ JO₂. Severe pan-lobular and pan-acinar necrosis already occurred at 375 $\mu\text{g}/\text{kg}$ JO₂ on day 1 after treatment (Figure 4H). With this dose, features of apoptosis and necrosis were clearly detected, both at day 1 (Figure 2J) and day 3 (Figure 2K) following treatment. There was a strong active caspase 3 signal at day 1, which was decreased at day 3, while cell proliferation, evidenced by Ki67, increased from day 1 to day 3 (Table 1). Almost complete regeneration was observed 10 days after treatment (Figure 2L).

Time course of chronic liver failure after chronic TA treatment

All Balb/c mice (n=7) survived to the first 5 weeks of chronic treatment. Nude mice were more sensitive to repeated TA injections in that only 5 mice out of 7 survived this period. In both strains, between 5 and 14 weeks of treatment, no mice died unless being sacrificed for histologic purposes.

Macroscopically, the liver of Nude mice presented a slightly rough surface after 5-8 weeks of treatment, while that of Balb/c mice was nearly smooth; after 14 weeks of treatment, the surfaces were rather rough in both strains (data not shown). A similar observation was made by Honda et al. (26) after treatment of C57Bl/6 mice with repeated 200 mg/kg TA injections, 8 weeks after the beginning of the treatment. Increase in ALT sera content reflected liver injury (9). In accordance with the survival rate and macroscopic observations, serological ALT values, 2 times higher in Nude mice (109 ± 18 U/L) compared to Balb/c mice (50 ± 11 U/L) 5 weeks after treatment, confirmed that liver damages within the initial period of

treatment were more severe in Nude than in Balb/c mice.

Histological observations showed that Balb/c mice did not develop micronodular cirrhosis but only sparse fibrous extensions onset of fibrosis after 5 weeks of treatment (Figure 5A). After 8 weeks of treatment these features were also observed. Micronodular patterns of cirrhosis were observed after 14 weeks (Figure 5B) with thin fibrous septa extending from portal tracts to adjacent central veinules or portal tracts, delimiting micronodules, as observed with trichrome coloration. There was an infiltration of the portal tracts by inflammatory cells.

In opposition to the observations in Balb/c mice, all Nude mice exhibited a spectacular fibrosis and onset of cirrhosis from 5 weeks of treatment. Lobulation was accentuated, with some nearly complete rings of conjunctive tissue surrounding lobules (Figure 5C). Micronodular cirrhosis was observed after 14 weeks (Figure 5D). Again, the time-course response to TA chronic treatment appears different in both mice strains but leads to similar results (*i.e.* cirrhosis) after 14 weeks (Figures 5B, 5D).

As depicted in figure 6, both caspase 3 (Figures 6C-H) and Ki67 immunodetections (Figures 6K-P) after 5, 8 weeks and 14 weeks of treatment were higher than in control livers (Figures 6A, 6B, 6I, 6J). Caspase 3 positive cells number remained rather unchanged during the treatment period, suggesting that apoptosis is a necessary but not prominent mechanism in fibrosis and cirrhosis.

Ki67 positive cells were more numerous after 14 weeks of treatment compared to 5 weeks of treatment, reflecting intense proliferation of hepatocytes (Figures 6I-P). At all stages, Ki67 positive cells in the parenchyma were not restricted to a specific area but disseminated homogeneously in the parenchyma.

Discussion

Prerequisites for the evaluation of the efficacy of hepatocyte transplantation for the mainstay in human liver failure are both the availability of small animal models strictly mimicking acute and chronic human liver failure (15, 53) and the possibility to assess the efficacy of hepatocyte transplantation, *i.e.* the visualization of their implantation rate into recipient liver parenchyma (8, 23, 31, 36, 48) and/or assessment of their benefit in terms of survival and metabolic supply. According to preliminary data of our group, integration of xenogenic transplanted hepatocytes could be assessed in livers from Nude mice via class I major histocompatibility complex (unpublished data). We (8) and others (15, 18, 22, 23, 36, 37, 48) found that improvement of cell implantation into host parenchyma presenting injury was necessary in case of no selective advantage of transplanted hepatocytes over host hepatocytes. The aim of the present work was thus to develop reproducible models of acute and chronic hepatic failure in Nude mice. This would allow a unique chance to assess the efficacy of transplanted hepatocytes to integrate host liver strictly mimicking clinical liver failure.

In the present study, 70% PH, a major surgical trauma leading to certain inflammatory response and edema in the remnant liver (29), was lethal for all athymic Nude mice, while as previously reported (5) their counterparts much more readily survived this trauma. Although Strom et al. (54) briefly referred to a two-third PH performed in Nude mice preceding hepatocyte transplantation, this group did not comment on survival rate, and the present report is to our knowledge the first on the increased sensitivity to PH of Nude mice compared to other mouse strains.

All Nude mice survived a 40% PH. Histologic features of liver regeneration, Ki67 and caspase 3 expression proved that both mechanisms of apoptosis and cell proliferation coexist without any necrotic stage during liver regeneration. This confirms literature data (7).

Restoration of liver mass occurred within 10 days, an observation also made in Balb/c mice after either 40% or 70% PH (present study) and in Sprague-Dawley rats after 70% PH (16), confirming that the size of tissue removed is not of critical importance regarding these kinetics (54).

The aminosugar GalN, exclusively metabolized in hepatocytes, has been shown to induce a selective transcriptional block of hepatocytes by depletion of uridine nucleotides (41).

All Nude mice survived a single injection of 1.3 g/kg GalN. The transitory peak of serum ALT 24h after the injection was not as spectacular as that observed after a 800 mg/kg injection to C57Bl/6 mice (41). Strain differences in response to GalN have also been reported for rats (4, 16, 23). Slight features of transitory apoptosis and necrosis were detected, a finding also reported in rats treated with TA (20).

Thioacetamide hepatotoxic effects have been shown to be caused by acetylimidolysine, an intermediate protein-binding metabolite (40). A single 200 mg/kg TA injection led to a quickly reversible non-fulminant hepatic injury, far less marked than in rats (16). A tripled single injection of 600mg/kg was also found no lethal in Nude mice, an observation made by Mangipudy (40) for rats, while Chanda & Mehendale (6) reported death of treated rats. A single 600 mg/kg TA injection to Nude mice induced acute hepatic failure with numerous features of apoptosis and cell proliferation. Our histological observations of liver injury and regeneration in Nude mice after a single TA treatment are in accordance with recently published data in wild-type C57Bl/6 mice (47).

Stimulation of the Fas pathway in response to Fas ligand binding to Fas (a type I transmembrane protein) results in the formation of the death-inducing signaling complex which is followed by procaspase 8 activation, leading to cleavage of bid and then to cytochrome *c* release from mitochondria, with recruitment of caspase 9 and caspase 3 (3, 28, 43).

The dose dependent effect of the anti-Fas antibody JO₂ in mice has been well established (19, 24, 44). Elevation of serological ALT was more pronounced and both apoptotic and necrotic injury was far much massive in Nude compared to Balb/c mice. Survival rate correlated with histologic observations. The higher sensitivity of Nude compared to Balb/c mice can be related to their thymus atrophy leading to depletion in lymphocytes T, since the latter have been shown responsible for Fas ligand signal mediation (13, 17). Given the fact that BCL₂ protects from lethal acute failure mediated by 10 µg JO₂ per animal (32, 51) one may also hypothesize that Nude mice were somewhat deficient in BCL₂ signalization pathway. We may suggest that C/EPB β level may also have a role in those strain dependent observations, as Fas-induced apoptosis in mouse hepatocytes is dependent on it (43). Liver regeneration occurred within 10 days, reflecting reversibility of the injury.

Chronic injections of TA during 5 to 8 weeks induced a fibrogenic response, with typical features of fibrosis and onset of cirrhosis in Nude mice, and only onset of fibrosis in Balb/c mice. Cirrhosis was observed in both strains after 14 weeks of treatment. Honda et al. (26) also reported that 4 to 8 weeks of treatment C57Bl/6 mice led to fibrosis, further treatment to cirrhosis. Our previous results (9, 16) as well as the current study confirm that the time-course of cirrhosis onset is both species and strain dependent (26).

As reported for rats (34), the effect of TA chronic treatment of mice was found highly reproducible, with toxic and cytologic changes occurring (11, 27, 33). Ki67 positive cells were gradually more and more numerous from 5 to 14 weeks, reflecting intense proliferation of hepatocytes.

In summary, our results show that 40% PH in Nude mice represents a reproducible model of liver regeneration after large resection. Single injections of GalN, TA or JO₂ successfully

induced acute toxicity on day 1 in Nude mice, followed by liver regeneration which was completed within 10 days, liver injury being modest with the former drug, while massive hepatic necrosis (corresponding to fulminant hepatitis) was achieved in the two latter models. Finally, Nude mice developed cirrhosis after a 14-week chronic administration of TA. Taken altogether, our results show that both acute and chronic liver failure could be induced with success in Nude mice. Strictly mimicking major liver failures, these models are valuable tools in which to assess the efficacy of transplanted hepatocytes to integrate diseased host livers.

References

1. Alison, M. R. Liver regeneration with reference to stem cells. *Semin Cell Develop Biol.* 13:385-387; 2002.
2. Alison, M. Hepatic stem cells. *Transplant Proc.* 34:2702-2705; 2002.
3. Bajt, M. L.; Lawson, J. A.; Vonderfecht, S. T.; Gujral, J. S.; Jaeschke, H. Protection against Fas receptor-mediated apoptosis in hepatocytes and nonparenchymal cells by a caspase-8 inhibitor in vivo: evidence for a postmitochondrial processing of caspase-8. *Toxicol Sci.* 58:109-117; 2000.
4. Baumgartner, D.; LaPlante-O'Neil, P. M.; Sutherland, D. E. R.; Najarian, J. S. Effects of intrasplenic injection of hepatocytes, hepatocyte fragments and hepatocyte culture supernatants on D-galactosamine-induced liver failure in rats. *Eur Surg Res.* 15:129-135 ; 1983.

5. Blindenbacher, A.; Wang, A.; Langer, I.; Savino, R.; Terracciano, L.; Heim, H. M. Interleukin 6 is important for survival after partial hepatectomy in mice. *Hepatology*. 38:674-682; 2003.
6. Chanda, S.; Mehendale, H. M. Role of nutrition in the survival after hepatotoxic injury. *Toxicology*. 111:163-178; 1996.
7. Court, F. G.; Wemyss-Holden, S. A.; Dennison, A. R.; Maddern, G. J. The mystery of liver regeneration. *Br J Surg*. 89:1089-1095; 2002.
8. David, P.; Alexandre, E.; Audet, M.; Chenard-Neu, M. P.; Wolf, P.; Jaeck, D.; Azimzadeh, A.; Richert, L. Engraftment and albumin production of intrasplenically transplanted rat hepatocytes (Sprague Dawley), freshly isolated versus cryopreserved, into Nagase analbuminemic rats (NAR). *Cell Transplant*. 10:67-80; 2001.
9. David, P.; Alexandre, E.; Chenard-Neu, M. P.; Wolf, P.; Jaeck, D. Richert, L. Failure of liver cirrhosis induction by thioacetamide in Nagase analbuminemic rats. *Lab Anim*. 36:158-164; 2002.
10. Dahlke, M. H.; Popp, F. C.; Bahlmann, F. H.; Aselmann, H.; Jäger, M. D.; Neipp, M.; Piso, P.; Klempnauer, J.; Schlitt, H. J. Liver regeneration in a retrorsine/CCl4 - induced acute liver failure model: do bone marrow-derived cells contribute?. *J Hepatol*. 39:365-373; 2003.
11. Farrell, G.C. Drug-induced hepatic injury. *J Gastroenterol Hepatol*. 12:S242-S250; 1997.

12. Fausto, N.; Campbell, J. S. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev.* 120:117-130; 2003.
13. Feldmann, G.; Lambole, C.; Moreau, A.; Bringuier, A. Fas-mediated apoptosis of hepatic cells. *Biomed Pharmacotherapy.* 52:378-385; 1998.
14. Fortner, J. G.; Blumgart, L. H. A historic perspective of liver surgery for tumors at the end of the millenium. *J Am Coll Surg.* 193:210-222; 2001.
15. Fox, I.J. Transplantation into and inside the liver. *Hepatology.* 36:249-251; 2002.
16. Gandillet, A.; Alexandre, E.; Royer, C.; Cinqualbre, J.; Jaeck, D.; Richert, L. Hepatocyte ploidy in regenerating livers after partial hepatectomy, drug-induced necrosis, and cirrhosis. *Eur Surg Res.* 35:148-160 ; 2003.
17. Guettier, C.; Zioli, M. L'apoptose dans le foie normal et pathologique. *Gastroenterol Clin Biol.* 22:381-393; 1998.
18. Guha, C.; Parashar, B.; Deb, N. J.; Garg, M.; Gorla, G. R.; Singh, A.; Chowdhury, N. R.; Chowdhury, J. R. Normal hepatocytes correct serum bilirubin after repopulation of Gunn rat liver subjected to irradiation/partial resection. *Hepatology.* 36:354-362; 2002.

19. Guidotti, J. E.; Mallet, V. O.; Parlier, D.; Mitchell, C.; Fabre, M.; Jaffray, P.; Lambert, M.; Kahn, A.; Gilgenkrantz, H. Fas/CD95 pathway induces mouse liver regeneration and allows for highly efficient retrovirus-mediated gene transfer. *Hepatology*. 33:10-15; 2001.
20. Gujral, J.S.; Farhood, A.; Jaeschke, H. Oncotic necrosis and caspase-dependent apoptosis during galactosamine-induced liver injury in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 190:37-46; 2003.
21. Guo, D.; Fu, T.; Nelson, J. A.; Superina, R. A.; Soriano, H. E. Liver repopulation after cell transplantation in mice treated with retrorsine and carbon tetrachloride. *Transplantation*. 73:1818-1824; 2002.
22. Gupta, S.; Chowdhury, J. R. Therapeutic potential of hepatocyte transplantation. *Semin Cell Develop Biol*. 13:439-446; 2002.
23. Gupta, S.; Rajvanshi, P.; Irani, A. N.; Palestro, C. J.; Bhargava, K. K. Integration and proliferation of transplanted cells in hepatic parenchyma following D-galactosamine-induced acute injury in F344 rats. *J Pathol*. 190:203-210; 2000.
24. Hara, A.; Yoshimi, N.; Yamada, Y.; Matsunaga, K.; Kawabata, K.; Sugie, S.; Mori, H. Effects of Fas-mediated liver cell apoptosis on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in mice. *Brit J Cancer*. 82:467-471; 2000.

25. Higgins, G. M.; Anderson, R. M. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol.* 12:186-202; 1931.
26. Honda, H.; Ikejima, K.; Hirose, M.; Yoshikawa, M.; Lang, T.; Enomoto, N.; Kitamura, T.; Takei, Y.; Sato, N. Leptin is required for fibrogenic responses induced by thioacetamide in the murine liver. *Hepatology.* 36:12-21; 2002.
27. Ikejima, K.; Honda, H.; Yoshikawa, M.; Hirose, M.; Kitamura, T.; Takei, Y.; Sato, N. Leptin augments inflammatory and profibrogenic responses in the murine liver induced by hepatotoxic chemicals. *Hepatology.* 34:288-297; 2001.
28. Kanzler, S.; Galle, P. R. Apoptosis and the liver. *Semin Cancer Biol.* 10:173-184; 2000.
29. Kaya, Y.; Aral, E.; Coskun, T.; Erkasap, N.; Var, A. Increased intrabdominal pressure impairs liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Surg Res.* 108:250-257; 2002.
30. Kobayashi, N.; Ito, M.; Nakamura, J.; Cai, J.; Hammel, J. M.; Fox, I. J. Treatment of carbon tetrachloride and phenobarbital-induced chronic liver failure with intrasplenic hepatocyte transplantation. *Cell Transplant.* 9:671-673; 2000.
31. Laconi, E.; Laconi, S. Principles of hepatocyte repopulation. *Semin Cell Develop Biol.* 13:433-438; 2002.

32. Lacronique, V.; Mignon, A.; Fabre, M.; Viollet, B.; Bouquet, N.; Molina, T.; Porteu, A.; Henrion, A.; Bouscary, D.; Varley, P.; Joulin, V.; Kahn, A. Bcl-2 protects from lethal hepatic apoptosis induced by an anti-Fas antibody in mice. *Nature Med.* 2:80-86; 1996.
33. Lee, H. S.; Huang, G. T.; Chen, C. H.; Chiou, L. L.; Lee, C. C.; Yang, P. M.; Chen, D. S.; Sheu, J. C. Less reversal of liver fibrosis after prolonged carbon tetrachloride injection. *Hepatogastroenterology.* 48:1312-1315; 2001.
34. Li, X.; Benjamin, I. S.; Alexander, B. Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. *J Hepatol.* 36:488-493; 2002.
35. Losser, M. R.; Payen, D. Mechanisms of liver damage. *Semin Liver Dis.* 16:357-367; 1996.
36. Malhi, H.; Annameni, P.; Slehria, S.; Joseph, B.; Bhargava, K. K.; Palestro, C. J.; Novikoff, P. M.; Gupta, S. Cyclophosphamide disrupts hepatic sinusoidal endothelium and improves transplanted cell engraftment in rat liver. *Hepatology.* 36:112-121; 2002.
37. Malhi, H.; Irani, A. N.; Volenberg, I.; Schilsky, M. L.; Gupta, S. Early cell transplantation in LEC rats modeling Wilson's disease eliminates hepatic copper with reversal of liver disease. *Gastroenterology* 122:438-447; 2002.
38. Malik, R.; Selden, C.; Hodgson, H. The role of non-parenchymal cells in liver growth. *Semin Cell Develop Biol.* 13:425-431; 2002.

39. Mallet, V. O.; Mitchell, C.; Mezey, E.; Fabre, M.; Guidotti, J. E.; Renia, L.; Coulombel, L.; Kahn, A.; Gilgenkrantz, H. Bone marrow transplantation in mice leads to a minor population of hepatocytes that can be selectively amplified in vivo. *Hepatology* 35:799-804; 2002;
40. Mangipudy, R. S.; Chanda, S; Mehendale, H. M. Tissue repair response as a function of dose in thioacetamide hepatotoxicity. *Environ Health Perspect.* 103:260-267; 1995.
41. Mignon, A.; Rouquet, N.; Fabre, M.; Martin, S.; Pages, J. C.; Dhainaut, J .F.; Kahn, A.; Briand, P.; Joulin, V. LPS challenge in D-galactosamine-sensitized mice accounts for caspase-dependent fulminant hepatitis; not for septic shock. *Am J Respir Crit Care Med.* 159:1308-1315; 1999.
42. Minamishima, Y. A.; Nakayama, K.; Nakayama, K. I. Recovery of liver mass without proliferation of hepatocytes after partial hepatectomy in Skp2-deficient mice. *Cancer Res.* 62:995-999; 2002.
43. Mukherjee, D.; Kaestner, K. H.; Kovalovich, K. K.; Greenbaum, E. Fas-induced apoptosis in mouse hepatocytes is dependent on C/EBP β . *Hepatology.* 33:1166-1172; 2001.
44. Ogasawara, J.; Watanabe-Fukunaga, R.; Adachi, M.; Matsuzawa, A.; Kasugai, T.; Kitamura, K.; Itoh, N.; Suda, T.; Nagata, S.. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature.* 364:806-809; 1993.

45. Oh, S. H.; Hatch, H. M.; Petersen, B. E. Hepatic oval 'stem' cell in liver regeneration. *Semin Cell Develop Biol.* 13:405-409; 2002.
46. Ohashi, K., Park, F.; Kay, M.A. Hepatocyte transplantation: clinical and experimental application. *J Mol Med.* 79:617-630; 2001.
47. Okuyama, H.; Nakamura, H.; Shimahara, Y.; Araya, S.; Kawada, N.; Yamaoka, Y.; Yodoi, J. Overexpression of thioredoxin prevents acute hepatitis caused by thioacetamide or lipopolysaccharide in mice. *Hepatology.* 37:1015-1025; 2003.
48. Oren, R.; Dabeva, M. D.; Petkov, P. M.; Hurston, E.; Laconi, E.; Shafritz, D. A. Restoration of serum albumin levels in Nagase analbuminemic rats by hepatocyte transplantation. *Hepatology.* 29:75-81; 1999.
49. Parker Ponder, K.; Gupta, S.; Leland, F.; Darlington, G.; Finegold, M.; DeMayo, J.; Ledley, F. D.; Chowdhury, J. R.; Woo, S. L. C. Mouse hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intrasplenic transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88:1217-1221; 1991.
50. Rhim, J. A.; Sandgren, E. P.; Palmiter, R. D.; Brinster, R. L. Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92:4942-4946; 1995.
51. Ryo, K.; Kamogawa, Y.; Ikeda, I.; Yamauchi, K.; Yonehara, S.; Nagata, S.; Hayashi, N. Significance of Fas antigen-mediated apoptosis in human fulminant hepatic failure. *Am J Gastroenterol.* 95:2047-2055; 2000.

52. Stockmann, H. B. A. C.; Ijzermans J. N. M. Prospects for the temporary treatment of acute liver failure. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 14:195-203; 2002.
53. Strom, S.; Fisher, R. Hepatocyte transplantation: new possibilities for therapy. *Gastroenterology.* 124:568-571; 2003.
54. Strom, S. C.; Jirtle, R. L.; Jones, R. S.; Novicki, D. L.; Rosenberg, M. R.; Novotny, A.; Irons, G.; McLain, J. R.; Michalopoulos, G. Isolation, culture, and transplantation of human hepatocytes. *J Natl Cancer Inst.* 68:771-778; 1982.
55. Susick, R.; Moss, N.; Kubota, H.; Lecluyse, E.; Hamilton, G.; Luntz, T. L.; Ludlow, J.; Fair, J.; Gerber, D.; Bergstrand, K.; White, J.; Bruce, A.; Drury, O.; Gupta, S.; Reid, L. M. Hepatic progenitors and strategies for liver cell therapies. *Ann NY Acad Sci.* 944:398-419; 2001.
56. Weglarz, T. C.; Sandgren, E. P. Timing of hepatocyte entry into DNA synthesis after partial hepatectomy is cell autonomous. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:12595-12600; 2000.

Figure Captions

Figure 1

Survival of male Balb/c and Nude mice using Kaplan Meier test was determined during a 10-day follow-up following 40% partial hepatectomy. Maintain of an haemostatic gauze (SURGICEL®) in the body after surgery was done in S+ groups and not in S- groups. *Open*

and *closed circles* respectively represent Balb/c S- and S+ groups. *Open and closed triangles* respectively represent Nude S- and S+ groups.

Figure 2

Liver histology after hematoxylin eosin staining of either 40% PH (A-C), 1.3 g/kg GalN (D-F), 600 mg/kg TA (G-I), 375 µg/kg JO₂ (J-L) treated male Nude mice, on day 1 (A, D, G, J), day 3 (B, E, H, K) and day 10 (C, F, I, L) following a single injection of drugs.

Black arrows, blue arrows and green arrowheads respectively indicate apoptotic loci, necrotic loci and mitotic cells.

Photomicrographs were taken using Olympus DP70 microscope with an original magnification of 100X.

Figure 3

Panel A depicts survival rate of male Balb/c and Nude mice using Kaplan Meier test during the first 24 hours after a single JO₂ injection of 250 (upper panel), 375 (mid panel) or 500 (lower panel) µg/kg.

Open circles and open triangles respectively represent Balb/c and Nude mice.

Panel B shows serum alanine aminotransferase (ALT) of Balb/c and Nude mice, 24 hours after a single injection of either 125, 250, 375 or 500 µg/kg JO₂.

* p< 0.05 versus control.

p< 0.05 Balb/c versus Nude (same dose).

Figure 4

Liver histology after hematoxylin eosin staining of male Balb/c (A, C, E, G, I) and Nude (B, D, F, H, J) mice in controls (A, B) and after either a single JO₂ injection of either 125 (C, D),

250 (E, F), 375 (G, H) or 500 µg/kg. Photomicrographs were taken using Olympus DP70 microscope with an original magnification of 100X.

Black and *blue arrows* respectively indicate apoptotic foci and necrotic foci.

Figure 5

Liver histology after trichrome staining of male Balb/c (A, B) and Nude mice (C, D), 5 weeks (A, C), and 14 weeks (B, D) after the beginning of the thioacetamide cirrhotic treatment.

Black arrows indicate fibrous extensions.

Photomicrographs were taken using Olympus DP70 microscope with an original magnification of 40X.

Figure 6

Active caspase 3: left panel (A-H) and Ki67: right panel (I-P) immunodetections were performed on Nude (A, C, E, G, I, K, M, O) and Balb/c (B, D, F, H, J, L, N, P) liver sections in controls (A, B, I, J) or after a thioacetamide chronic treatment (thrice a week 200 mg/kg intraperitoneal injections: 5 weeks (C, D, K, L), 8 weeks (E, F, M, N) and 14 weeks (G, H, O, P)).

Photomicrographs were taken using Olympus DP70 microscope with an original magnification of 100X.

Table 1: Serum alanine aminotransferase (ALT) content, liver active caspase 3 and liver Ki67 in Nude mice on day 1 and day 3 following surgery (PH 40%) or a single injection of GalN, TA or JO₂.

| Treatment | Observation | ALT (U/L) | Ki67 | Caspase 3 |
|-----------------------------|-------------|------------|------|-----------|
| Control | Day1 | 39 ± 14 | +/- | +/- |
| | Day3 | 44 ± 11 | +/- | +/- |
| PHx 40% | Day1 | 73 ± 7 | +++ | +/- |
| | Day3 | 52 ± 8 | + | +/- |
| GalN (1.3 g/kg) | Day1 | 182 ± 58 | + | +/- |
| | Day3 | 53 ± 13 | +/- | +/- |
| TA (600 mg/kg) | Day1 | 1160 ± 205 | ++ | ++ |
| | Day3 | 126 ± 48 | + | +++ |
| JO ₂ (375 µg/kg) | Day1 | 837 ± 89 | +++ | + |
| | Day3 | 44 ± 9 | + | ++ |

Alanine aminotransferase (ALT) was measured in sera. Active caspase 3 and Ki67 were immunodetected on cryofrozen sections of liver samples, 1 and 3 days following treatment (see Materials & Methods section).

According to the number of positive cells (*i.e.* signal strength), a quantitative data was given in all cases from the following scale:

- +/- Rare positive hepatocytes
- + Several positive hepatocytes
- ++ Numerous positive hepatocytes
- +++ Great number of positive hepatocytes

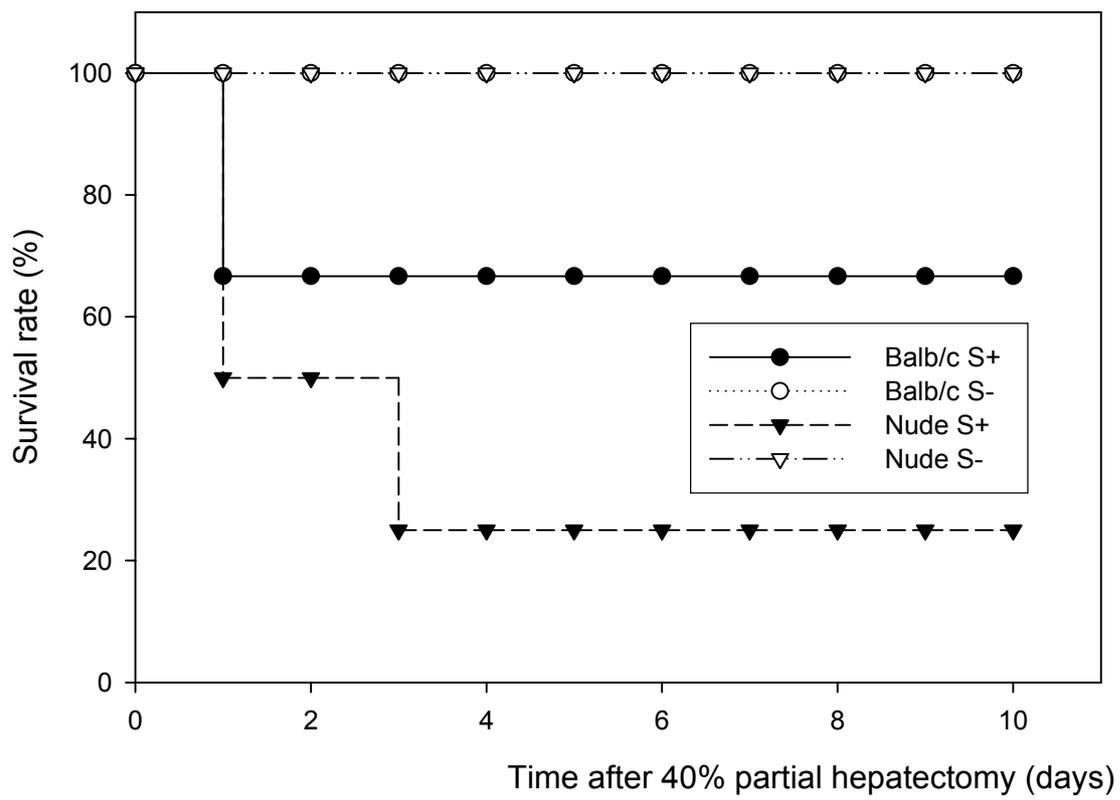


Figure 1

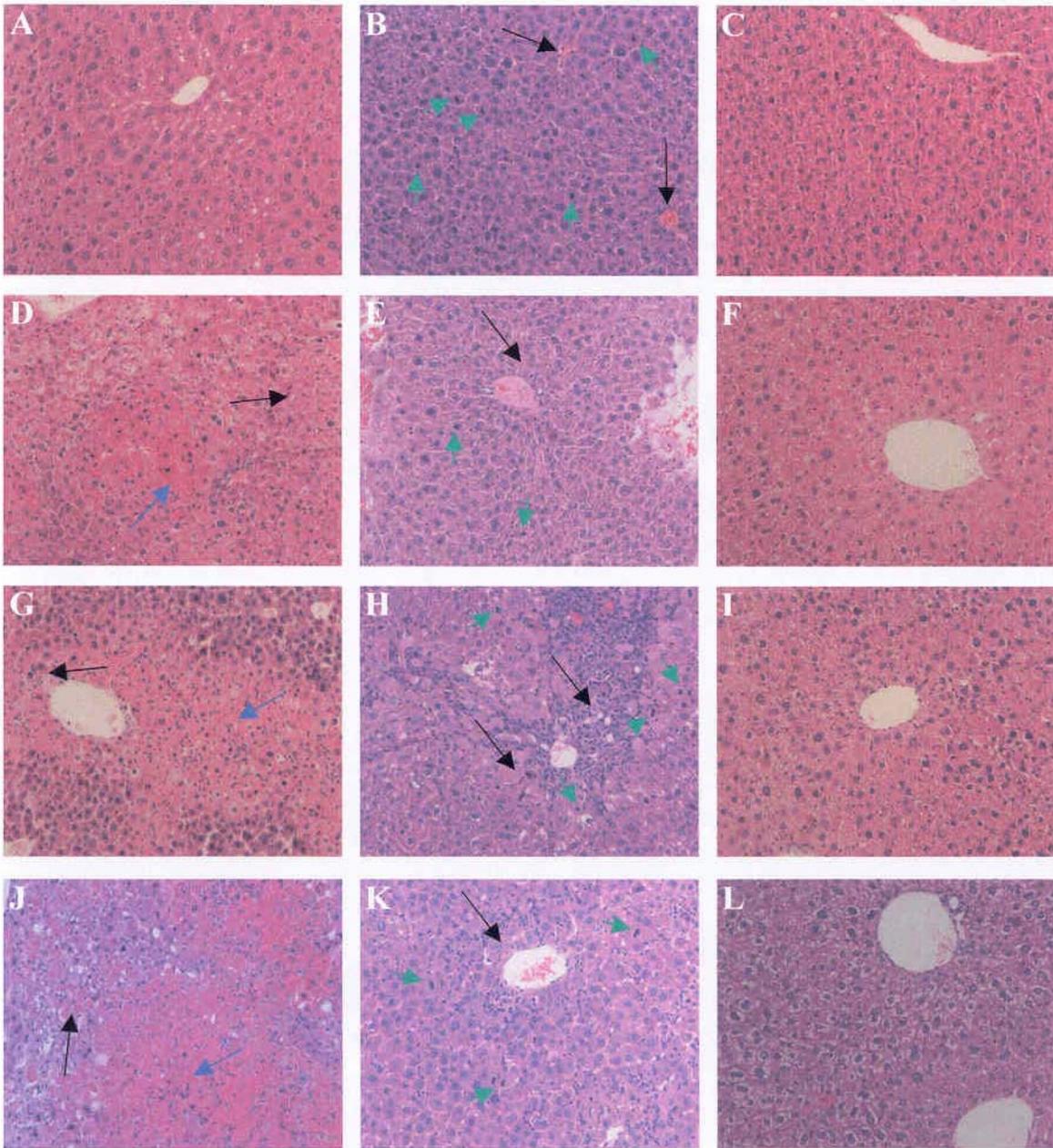


Figure 2

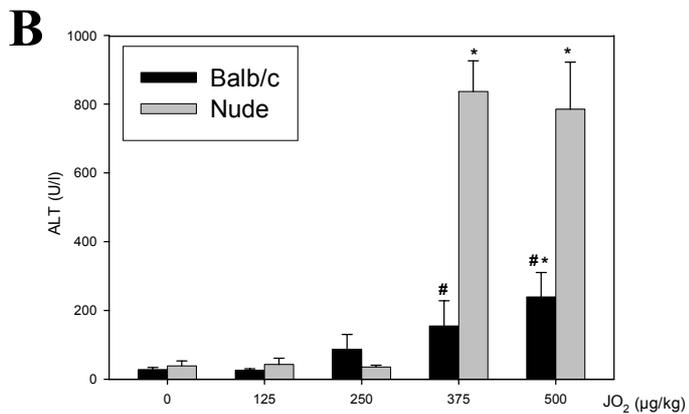
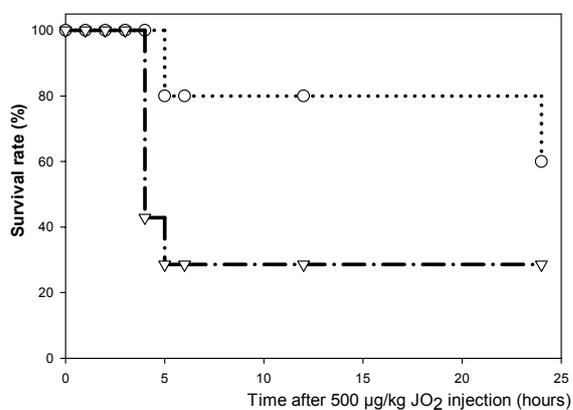
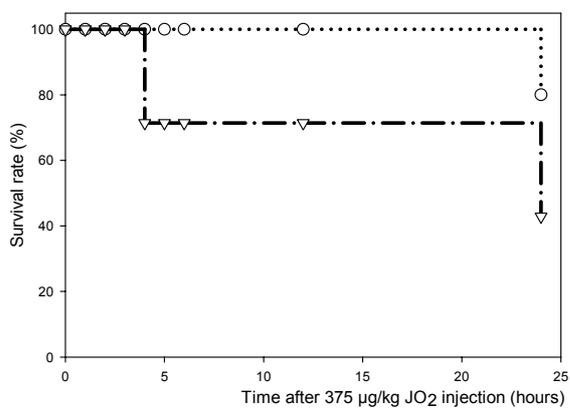
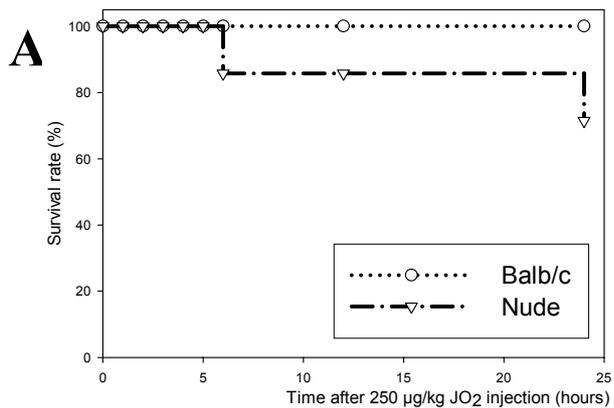


Figure 3

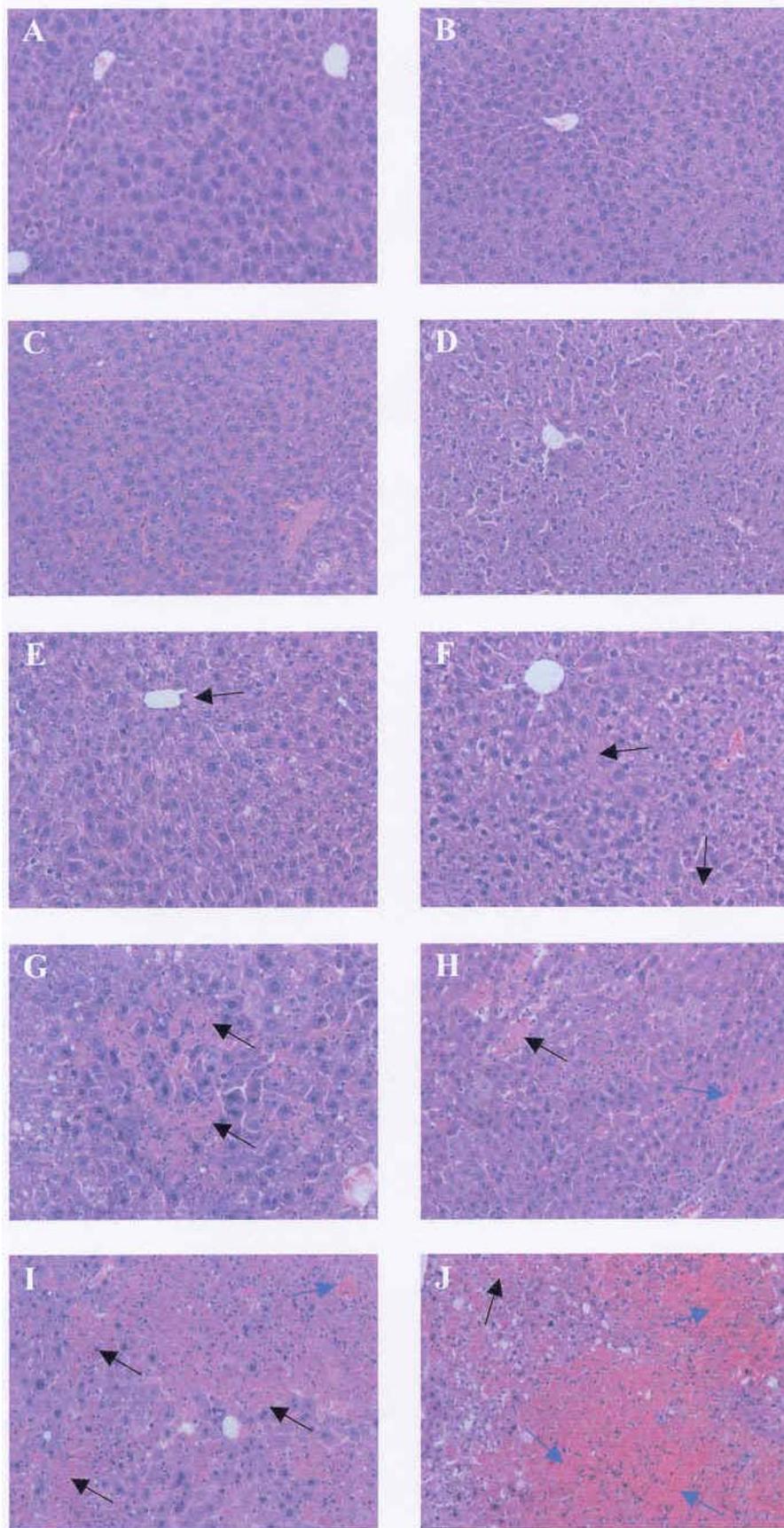
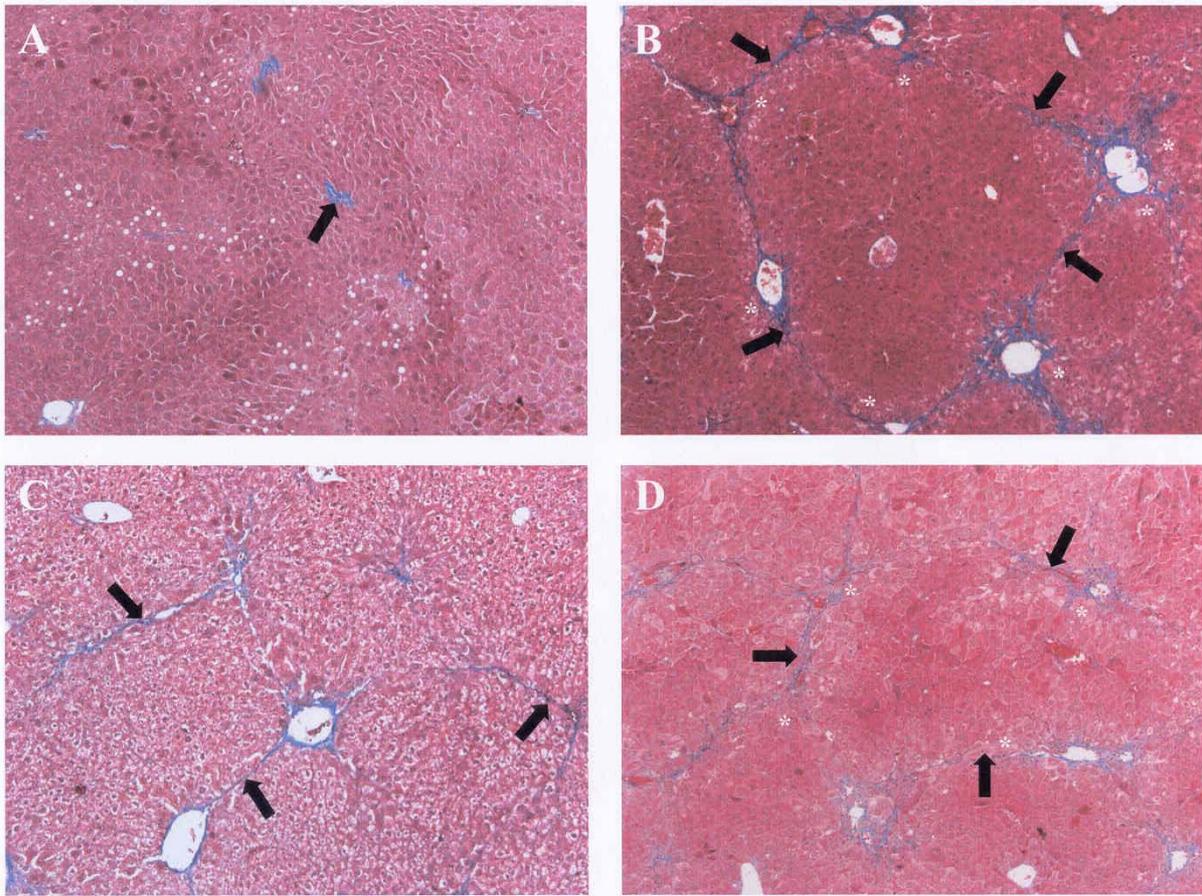
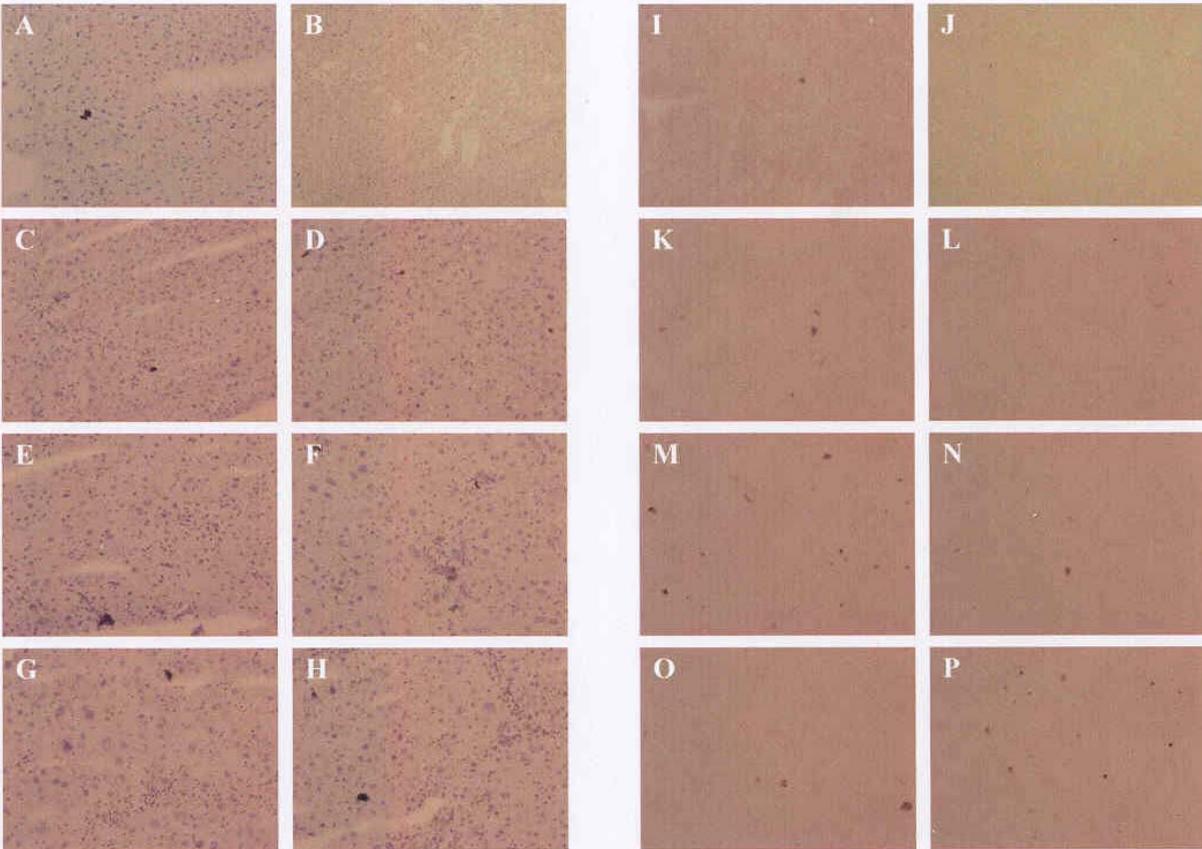


Figure 4



Figures 5 (haut) et 6 (bas)



3. Discussion

Sachant qu'une atteinte entraînant une hépatite aiguë par induction d'apoptose peut causer la mort cellulaire par nécrose ⁽¹⁸⁰⁾ et que le mode de régénération hépatique n'est pas le même avec selon les cas participation des cellules matures (après hépatectomie partielle) ou de cellules précurseurs (après injection de toxiques) ⁽⁷²⁾, il était important de déterminer quels mécanismes (apoptose, mitose, nécrose) étaient plus particulièrement mis en jeu dans chacun des différents modèles d'atteinte reproductible et réversible que nous avons développés.

Outre par des observations histologiques, la mitose était appréciée par un immunomarquage Ki67 ⁽⁷⁰⁾ (anticorps monoclonal réagissant avec une protéine nucléaire exprimée dans les phases G₁, S, G₂ et M du cycle cellulaire mais jamais G₀; les cellules G₁ après mitose sont toujours Ki67 positives ⁽¹⁹³⁾) et l'apoptose par la détection d'un signal caspase 3 active. Nous avons clairement mis en évidence que, conformément aux conclusions observées après étude de la régénération hépatique chez le rat ⁽⁷²⁾, les phénomènes de mitose, d'apoptose et de nécrose ne contribuaient pas de la même façon à la régénération dans tous les différents cas.

En conséquence, ces données renforcent l'idée selon laquelle les mécanismes entrant en jeu lors de la régénération hépatique diffèrent selon l'insuffisance hépatique infligée. De plus, la réalisation de ce travail chez la souris Nude, animal immunodéprimé, fait que ces modèles pourront être employés non seulement pour étudier la régénération hépatique mais aussi à des fins de transplantation hépatocytaire.

TROISIEME PARTIE: Transplantation d'hépatocytes chez la souris Nude en insuffisance hépatique ou non

1. Introduction

Le foie est un organe indispensable à la vie de par ses fonctions métaboliques. L'insuffisance hépatique sévère, qu'elle soit aiguë ou chronique, n'est pas compatible avec la survie de l'individu. Dans le cadre d'hépatites fulminantes, où passé le cap de l'insuffisance aiguë, le foie peut régénérer spontanément; la transplantation d'hépatocytes pourrait éviter une greffe d'organe et au cas où le foie ne régénérerait pas, elle permettrait toutefois de prolonger transitoirement l'attente d'un greffon et ainsi de fortement diminuer le nombre de patients décédant chaque année avant d'être transplantés.

C'est pourquoi de nombreuses équipes se sont penchées ces dernières années sur l'étude de l'efficacité de transplantation dans des modèles animaux d'insuffisance hépatique.

En ce qui concerne les sites d'implantation, plusieurs sites potentiels ont été évalués dans la littérature pour l'injection des hépatocytes ⁽¹³¹⁾ et nous avons retenu la rate en raison de résultats précédents menés au laboratoire ⁽³⁹⁾.

Chez le rat, après transplantation intra-splénique, 55% des hépatocytes migrent dans le foie en une minute, 15% restent dans la rate, 3% dans le poumon et 1% dans le pancréas ⁽⁹⁰⁾. Des études utilisant le radiomarquage d'hépatocytes transplantés ont montré qu'après transplantation dans la pulpe splénique jusqu'à 90% des cellules peuvent gagner le foie ⁽¹³¹⁾.

L'analyse de la distribution des cellules dans les branches de la veine porte et dans les sinusoides hépatiques, après greffe d'hépatocytes, indique que la plupart des cellules (60-70%) sont situées dans les branches de la veine porte et ne pourront s'implanter ni survivre plus de 48h ⁽⁹²⁾.

Deux heures après injection, des hépatocytes sont retrouvés dans les sinusoides hépatiques et ce jusqu'à ce que l'endothélium sinusoidal ait perdu son intégrité c'est-à-dire 16 à 20 heures après transplantation ⁽¹³⁰⁾. Du fait du faible diamètre des sinusoides (7-9µm) par rapport à celui des hépatocytes (en général 20-40µm), les 2 à 3 premières heures après transplantation s'accompagnent de perturbations transitoires de la micro-circulation hépatique avec des embolisations très localisées des veinules portales avec pour conséquence une ischémie

transitoire et hypertension portale après la transplantation, laquelle disparaît en quelques minutes ^(91,131).

Les hépatocytes transplantés gagnent ensuite l'espace de Disse et à 24 heures après greffe, seulement 30% des hépatocytes greffés sont retrouvés dans le foie, les autres étant phagocytés dans les espaces portes ^(39,92), menant à la restauration d'un flux sanguin hépatique normal. De légères différences entre espèces existent, liées à la différence de diamètre relatif entre les hépatocytes et les sinusoides hépatiques ⁽¹³¹⁾.

Les hépatocytes sont complètement intégrés dans le foie en 3 jours (avec de nouveau présence de jonctions intercellulaires et formation de canalicules biliaires permettant l'excrétion des toxines - dont bilirubine, cuivre et sels biliaires- dans la bile) et ne sont donc pas fonctionnels avant ce délai ^(91, 130). Des interactions de cellule à cellule et entre cellule et matrice extra-cellulaire existent (également *via* des facteurs hormonaux) entre les cellules implantés au sein des travées hépatocytaires, permettant tout au long de la vie de l'animal une prolifération de ces cellules.

En ce qui concerne le choix des cellules d'origine hépatique transplantées, une reconstitution fonctionnelle du foie receveur en insuffisance après transplantation d'hépatocytes matures a été rapportée ⁽¹⁶³⁻¹⁶⁴⁾. Ces mêmes auteurs ont rapporté également que les hépatocytes de taille intermédiaire auraient un potentiel prolifératif supérieur à celui de cellules plus petites ⁽¹⁶⁴⁾. De précédents travaux menés au laboratoire ont montré ⁽⁴⁰⁾ que chez le rat NAR (rat analbuminémique de souche Sprague-Dawley) environ 7% des cellules transplantées s'implantaient, de façon homogène, dans le foie. Ces hépatocytes fraîchement isolés étaient transitoirement fonctionnels (pendant 5 à 7 semaines), puisque sécrétant de l'albumine. Des résultats similaires ont été observés par d'autres groupes de recherche ^(46,111).

Les études, après hépatectomie partielle, de transplantation d'hépatocytes isolés ont mis en évidence que ce sont majoritairement les hépatocytes matures $4n$ qui s'implantaient dans le parenchyme hépatique ⁽¹⁶⁴⁾, ceci s'accompagnant d'un vieillissement accru des cellules transplantées ⁽²⁰⁰⁾ lesquelles perdaient leur fonctionnalité ⁽⁴⁰⁾. Ces résultats sont en accord avec les résultats du laboratoire, à savoir qu'après hépatectomie partielle un doublement de l'implantation était observé, mais sans fonctionnalité des hépatocytes chez le rat NAR ⁽³⁹⁻⁴⁰⁾. Ces résultats sont également en accord avec ceux rapportés ci-dessus de polyploïdisation (première partie) et de mitoses (deuxième partie) des hépatocytes du foie en régénération post-hépatectomie partielle ⁽⁷³⁾.

Les études de transplantation de cellules de moelle osseuse se traduisent chez des animaux en insuffisance hépatique par leur colonisation du foie receveur puis leur différenciation en hépatocytes, ce qui conduit à une régénération hépatique ⁽¹²⁰⁾. Un mécanisme de fusion cellulaire a été récemment avancé ^(224,234) mais la question demeure débattue ⁽¹⁰⁾.

L'équipe de Markus Grompe a obtenu une meilleure reconstitution fonctionnelle lorsque les hépatocytes transplantés étaient matures ⁽¹⁶³⁻¹⁶⁴⁾. En 2000, Sakamoto *et al.* ⁽¹⁸³⁾ ont montré que, dans la régénération suivant la nécrose induite par la concanavaline A, des cellules souches du foie et des cellules souches présentes dans la moelle osseuse étaient sollicitées.

L'évaluation de l'efficacité de l'implantation des hépatocytes transplantés dans des foies receveurs nécessite la visualisation des hépatocytes du donneur, au sein du parenchyme receveur. Plusieurs approches sont possibles, parmi lesquelles on peut citer le marquage des hépatocytes par un transgène ou à l'aide d'isotopes radioactifs tels l'indium 111 ou le technétium 99 ⁽¹³¹⁾. En ce qui nous concerne, nous avons testé la possibilité de distinguer les hépatocytes de rat transplantés à des souris Nude par la visualisation du système du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).

Ainsi, le but de ce travail était de greffer par voie intra-splénique différentes populations hépatocytaires, triées ou non par cytométrie en flux, dans des souris Nude, présentant une insuffisance hépatique ou non ⁽⁷³⁾. Les souris Nude ont été soumises à une hépatectomie partielle ou à une induction d'une insuffisance hépatique aiguë induite par des toxiques, et l'implantation des hépatocytes a été appréciée par immunodétection d'anticorps anti-CMH de classe I, 21 jours après transplantation, délai que nous avons montré suffisant pour permettre la régénération hépatique complète.

2. Matériel & Méthodes

- Animaux

Les rats Sprague-Dawley mâles, âgés de 8 à 10 semaines ainsi que les souris Nude mâles, âgés de 7 semaines étaient obtenus chez Charles River Laboratories (France). Les rats étaient placés dans des cages individuelles avec eau de boisson et nourriture disponibles à volonté et en présence d'un cycle jour/nuit. Les souris étaient placées dans des cages stériles dans une armoire ventilée sous des conditions de température et de pression contrôlées. Le cycle

jour/nuit était respecté et les animaux avaient accès *ad libitum* à de l'eau stérile et de la nourriture stérile pour rongeurs. Dans le cas d'hépatectomie partielle l'eau de boisson des souris était supplémentée pendant 24h avec du glucose à 20%.

- Hépatectomie partielle et induction d'insuffisance hépatique aiguë

Les techniques de réalisation de l'hépatectomie partielle à 40% (**Figure 14**) et d'induction d'insuffisance hépatique aiguë chez la souris Nude (GalN, TA, JO₂) sont détaillées dans une partie précédente du travail ⁽⁷³⁾.

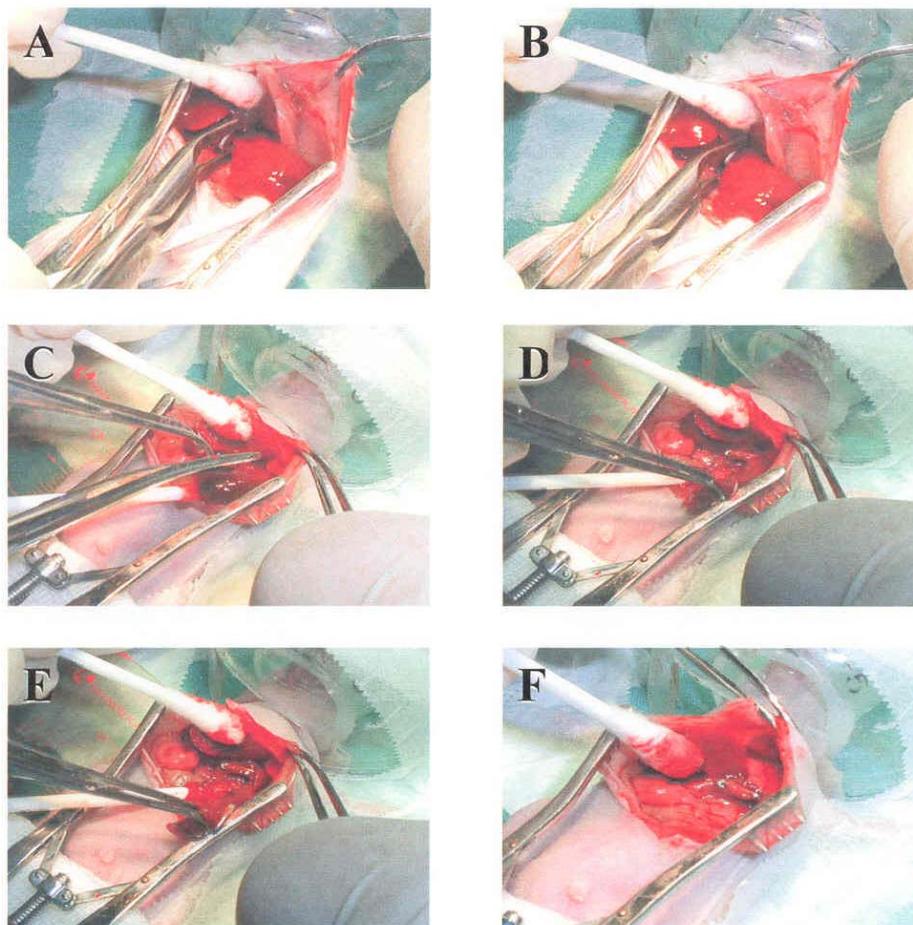


Figure 14. Etapes de l'hépatectomie partielle à 40% chez la souris Nude

A, B: pose de clips assurant l'hémostase du lobe à réséquer.

C, D, E: résection progressive du lobe gauche, par pose de clips et section, pas à pas.

F: vérification de l'hémostase et lavage de la cavité péritonéale.

- Tri cellulaire

Des fractions enrichies en hépatocytes $2n$ d'une part et $4n$ d'autre part ont été recueillies dans 0,5 ml de milieu RM-B00 (Mabio International, France) après passage d'hépatocytes de rat fraîchement isolés (obtenus tel que décrit précédemment ⁽⁷¹⁾) dans un cytomètre en flux équipé d'un dispositif permettant le tri en conditions stériles (FACS Diva, Becton Dickinson, France)

et le comptage cellulaire. Pour cela les cellules étaient incubées avec du Hoechst 33342 (2 µg/ml) pendant au moins 15 minutes avant tri. L'enrichissement des fractions en hépatocytes $2n$ et $4n$ était compris pour toutes les expériences entre 50% et 95%.

- Transplantation des hépatocytes de rat chez la souris Nude receveur

Pour un même isolement d'hépatocytes, nous avons greffé une souris Nude avec la population enrichie en cellules $2n$, une souris avec la population enrichie en $4n$ et une souris avec des hépatocytes non triés (conservés à +4°C pendant toute la durée du tri).

Pour cela, sous anesthésie générale (2 L/min O₂ contenant 3% d'isoflurane (Forène®, Abbott, France)) et après laparotomie médiane un maximum de $0,5 \cdot 10^6$ hépatocytes vivants en suspension dans 100 µl de liquide physiologique (0,9% NaCl) est injecté (Microlance® 26,5 G, Becton Dickinson, France) dans le pôle inférieur de la rate de souris Nude. L'hémostase est assurée en comprimant délicatement la zone d'injection avec de la cellulose oxydée et régénérée (Surgicel®, Johnson & Johnson, USA) ⁽⁴⁰⁾. La fermeture en deux plans (cutané et sous-cutané) était ensuite réalisée avec du fil 3/0 (Vicryl®, Ethicon, France). Les animaux étaient alors placés sous une lampe chauffante jusqu'au réveil de l'animal.

- Suivi sérologique par dosage de l'ALT

Les échantillons sanguins sont prélevés à différents temps après induction d'une insuffisance hépatique et après transplantation (**Figure 15**) par la veine caudale chez des animaux anesthésiés.

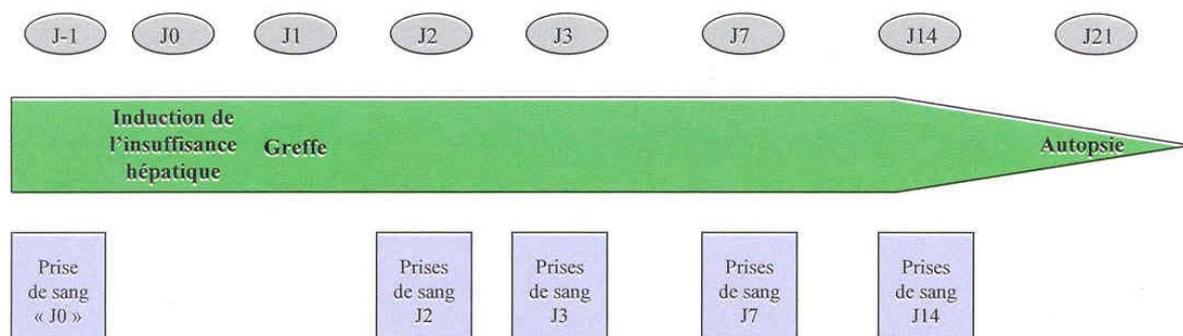


Figure 15. Programme d'induction d'une insuffisance hépatique chez la souris et suivi sérologique après greffe d'hépatocytes.

Les sérums sont obtenus par centrifugation (10 min à 3000g). Le taux sérique d'ALT (U/L) est déterminé en utilisant un kit commercial (alanine aminotransférase EC 2.6.1.2 UV-Test (Sigma Diagnostics, France)).

Dans tous les cas une augmentation transitoire du taux sérique d'ALT était observée, avec un retour à la normale obtenu à J7 après greffe. Les valeurs mesurées n'étaient toutefois pas significativement différentes de celles que nous avons mesurées sans greffer les souris Nude⁽⁷³⁾.

- Sacrifice des animaux

Le foie, la rate, le cœur et les poumons de chaque animal sont prélevés lors de l'autopsie 21 jours après greffe.

Une moitié de chaque organe est enchâssée dans une matrice protectrice (Cryomatrix®, Shandon, CML, France), puis congelée dans de l'isopentane (2-méthyl-butane) refroidi à -20°C par de l'azote liquide puis conservés à -80°C. Des coupes de 4µm d'épaisseur sont ensuite réalisées à partir de ces échantillons à l'aide d'un cryomicrotome (-23°C).

L'autre moitié des prélèvements est conservée dans un bain de formol à 10% puis enrobée dans de la paraffine.

- Immunodétection des hépatocytes de rat greffés chez la souris Nude

Les coupes à congélation (4µm) sont fixées dans deux bains consécutifs de paraformaldéhyde à 4% (5 min plus 10 min), puis lavées dans un tampon de rinçage (tampon phosphate salin (PBS) (Gibco, Life Technologies, France) contenant 0,05% v/v Tween 20). Les coupes sont incubées pendant 30 minutes à l'obscurité avec le tampon de saturation (tampon de rinçage additionné de 1% de sérum de chèvre normal). Le blocage des sites antigéniques aspécifiques est réalisé en utilisant un kit commercial (BEAT™ Blocker Kit (Zymed, France)) selon les instructions du fabricant. Les coupes sont incubées ensuite une nuit à 4°C en présence d'un anticorps primaire de souris anti-rat (clone F16.4.4., Sérotec, France) dilué (1/1000) dans du tampon de saturation.

Après rinçage (2 x 10 min), les coupes sont incubées 45 min en présence d'une dilution au 1/2000 dans du tampon de saturation de l'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG, IgA et IgM de souris, couplé à la fluorescéine (FITC) (Cappel, France) (1/2000). Les lames sont rincées (10 min) puis le Hoechst 33342 est déposé 10 minutes (dilution au 1/500) dans de l'eau

distillée à partir d'une solution stock à 1 mg/ml) afin de marquer les noyaux et ainsi contrôler que le signal émis par la fluorescéine n'est pas artefactuel.

Après rinçage, les lames sont montées entre lame et lamelle dans un milieu aqueux commercial (Immu-Mount®, Thermo Shandon, CML, France) ou préparé au laboratoire (**voir annexe**) puis conservées à -20°C à l'obscurité jusqu'à observation sous microscope à fluorescence (Olympus AX60). L'acquisition des images est réalisée à l'aide du logiciel analySYS® (Soft Imaging System, Allemagne).

L'évaluation de l'implantation hépatocytaire au sein du parenchyme receveur est obtenue après un double comptage des cellules de rat FITC positives sur dix champs oculaires identiques, choisis arbitrairement. Afin de limiter les erreurs d'interprétation, plusieurs expériences d'immuno-histochimie ont été réalisées pour les conditions où il n'y avait qu'un seul animal étudié.

Dans tous les cas, les résultats ont été exprimés en nombre d'hépatocytes implantés par mm² de surface parenchymateuse.

- Statistiques

L'analyse statistique des données, par analyse de variance (ANOVA), a été réalisée avec le logiciel Statview version 4.5 (Abacus Concept, Berkeley, USA). Les différences observées sont considérées comme statistiquement significatives pour toute valeur de $p \leq 0,05$.

3. Résultats & Discussion

Visualisation des hépatocytes de rat implantés dans le parenchyme hépatique receveur de souris Nude

Les hépatocytes de rat transplantés présentant à leur surface des antigènes du CMH de classe I, nous avons émis l'hypothèse que la présence de tels antigènes permettrait de visualiser par immuno-histochimie l'implantation de ces hépatocytes de rat dans le parenchyme hépatique receveur de souris Nude comme illustré dans la **Figure 16**.

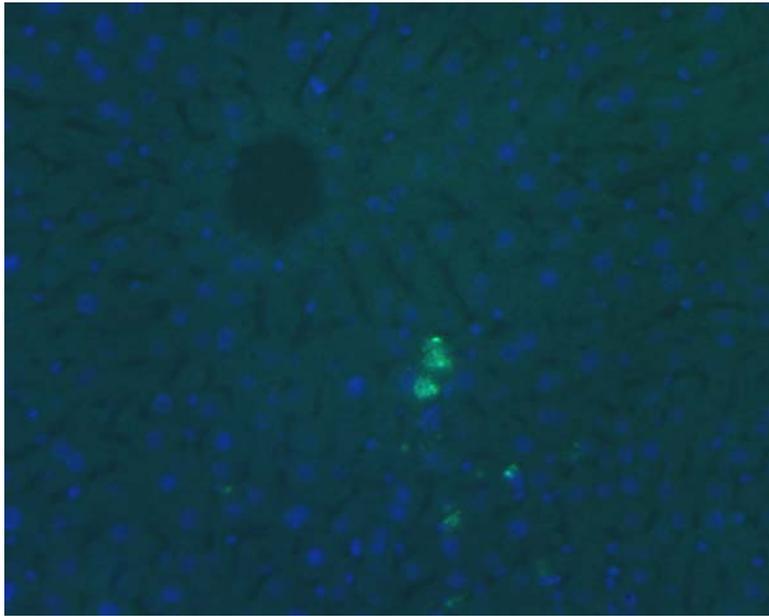


Figure 16. Détection des hépatocytes transplantés à l'aide d'un marquage anti-CMH I. En bleu: marquage des noyaux (Hoechst 33342). En vert: marquage des cellules transplantées (FITC)

Au cours d'une expérience pilote, 21 jours après hépatectomie partielle à 40%, nous avons cherché à déterminer quelle était la quantité minimale d'hépatocytes à transplanter pour obtenir une implantation maximale dans le parenchyme de souris Nude. Pour cela des quantités variables d'hépatocytes (de 10^3 à $0,5 \cdot 10^6$ cellules vivantes) ont été greffées. Nous avons observé qu'au-delà de 10000 hépatocytes vivants transplantés le taux d'implantation dans le parenchyme hépatique atteignait un plateau. En conséquence, seules les préparations comportant un nombre suffisant de cellules ont été utilisées.

Efficacité de transplantation d'hépatocytes de rat dans le foie de souris Nude témoin

Dans le foie, l'implantation des hépatocytes de rat transplantés à des souris Nude contrôles ($n=3$), est de l'ordre de 7,3 cellules par mm^2 de parenchyme hépatique de souris Nude. Ainsi, dans notre modèle de transplantation xénogénique, le taux d'implantation des hépatocytes de rats dans le parenchyme hépatique de la souris Nude non greffée est comparable à celui obtenu dans les mêmes conditions chez le rat ^(39-40,46) ou la souris ⁽¹⁶⁵⁾, soumis à une transplantation d'hépatocytes syngéniques.

Aucun hépatocyte n'a été mis en évidence 21 jours après transplantation dans la rate, le cœur et même le poumon ⁽¹³¹⁾, ce qui est conforme avec les résultats antérieurs obtenus au laboratoire chez le rat NAR ⁽³⁹⁾.

Efficacité de transplantation d'hépatocytes de rat dans le foie de souris Nude après PH

Chez les souris ayant été soumises à une hépatectomie partielle à 40% (n=10) 4 heures avant la transplantation, l'implantation à 21 jours est équivalente au témoin puisque de l'ordre de 6,9 cellules par mm² de foie receveur (**Tableau 9**).

Le doublement de l'implantation hépatocytaire observé chez le rat ^(39,90) n'est pas retrouvé. La littérature rapporte un cas de transplantation de cellules de rat dans une souris Nude après hépatectomie (avec un suivi sur des temps brefs de l'ordre de 2 à 3 jours), mais avec des cellules greffées possédant un avantage sélectif par rapport aux cellules hôtes de souris puisque ces dernières sont soumises à l'expression ciblée, hépatotoxique, du transgène uPA. ⁽²³⁸⁾. Dans un tel modèle les hépatocytes de rat s'implantent remarquablement bien. Un tel modèle n'est pas comparable avec le nôtre qui ne présente aucun avantage sélectif aux cellules transplantées.

Toutefois, le fait que nous ne retrouvons pas de doublement de l'implantation basale dans notre modèle d'hépatectomie partielle est surprenant par rapport à nos attentes car nous avons suggéré que suite à l'hépatectomie partielle, des signaux de régénération induisaient l'entrée en mitose des hépatocytes matures, aussi bien ceux du foie propre que ceux transplantés, permettant ainsi la régénération hépatique ^(39,72). Ceci est peut-être lié en partie au fait que des cellules xénogéniques aient été transplantées. En effet, bien que les signaux du foie receveur soient suffisants pour induire la régénération des hépatocytes xénogéniques, il faut noter que les hépatocytes transplantés conservent leur cinétique de mitose propre, c'est-à-dire de manière espèce dépendante.

Ainsi, il a été rapporté que la transplantation d'hépatocytes de rat chez la souris soumise à une hépatectomie partielle résultait en un pic de synthèse d'ADN 24 heures après PH, ce qui correspond à la cinétique de réponse des hépatocytes de rat après PH alors que les hépatocytes de souris présentent un pic de réponse 48 heures après PH ⁽¹¹²⁾. De plus, des différences entre souches ne sont toutefois pas à exclure et il est envisageable que nos résultats soient spécifiques à la souris Nude. Afin de le déterminer, des études comparatives entre les souris Balb/c et Nude devraient être réalisées, en présence d'immunosuppression, et si les résultats demeurent peu satisfaisants dans ce modèle de greffe après hépatectomie partielle il faudra revenir à un modèle non xénogénique.

| | Témoin | JO ₂ | GalN | TA | PHx |
|-------------|---------|-----------------|----------|----------|----------|
| Pop. totale | 7,3 [3] | 8,0 [1] | 5,5 [1] | 11,2 [2] | 6,9 [10] |
| “2n” | 6,3 [2] | 13,3 [1] | 17,6 [1] | 29,8 [1] | 5,5 [2] |
| “4n” | 6,0 [2] | 7,0 [1] | 9,5 [1] | 9,4 [1] | 8,8 [2] |

Tableau 9. Implantation (nombre de cellules par mm²) d'hépatocytes de rat 21 jours après greffe dans le parenchyme hépatique de souris Nude. Le nombre d'animaux est indiqué entre crochets. Pop. totale: population hépatocytaire non triée; “2n” ou “4n”: population hépatocytaire enrichie en hépatocytes 2n ou 4n.

Efficacité de transplantation d'hépatocytes de rat dans le foie de souris Nude en régénération post-apoptose et/ou post-nécrose

A notre connaissance, l'implantation après greffe d'hépatocytes n'a pas été étudiée jusqu'à présent après injection unique à la souris Nude receveur de JO₂, GalN ou de TA.

Chez la souris Nude en insuffisance hépatique, l'implantation hépatocytaire dans le parenchyme hépatique receveur est également peu différente du témoin (de 5,5 à 11,2 cellules par mm²) et ce pour toutes les conditions étudiées (chez la souris Nude préalablement soumise à une induction de nécrose hépatique massive par l'anticorps anti-Fas JO₂, ou après injection de GalN ou de TA) (**Tableau 9**).

Pourtant, il a été rapporté que dans le cas de greffe syngénique dans un modèle de nécrose induite chez la souris par le tétrachlorure de carbone, le taux basal d'implantation d'hépatocytes de souris greffés était quadruplé ⁽²⁴¹⁾. Plusieurs explications paraissent plausibles pour expliquer nos résultats:

- soit le modèle xénogénique en lui-même est responsable de cette relative absence de réponse dans notre cas, que ce soit par décalage des cinétiques cellulaires propres à chaque espèce ou du fait de voies de signalisations cellulaires inadéquates,
- soit l'insuffisance hépatique induite dans notre cas par le JO₂, la GalN ou le TA n'était pas suffisante pour que le foie receveur favorise l'implantation d'hépatocytes donneurs.

Il est cependant particulièrement intéressant de noter que si la greffe d'une fraction hépatocytaire fortement enrichie en hépatocytes 4n se solde par un taux d'implantation équivalent à celui observé après greffe d'une population non enrichie, le taux d'implantation d'une fraction hépatocytaire enrichie en hépatocytes 2n est fortement augmenté, d'un facteur

2 à 3, dans un foie receveur en régénération suite à l'induction d'une insuffisance hépatique injection de GalN, TA ou JO₂ (**Tableau 9**).

Malgré le faible nombre d'animaux greffés nous empêchant de tirer des conclusions hâtives définitives, ceci suggère que, conformément à notre hypothèse de travail, la greffe d'hépatocytes *2n*, dont l'implication dans la régénération hépatique après injection de TA ou de GalN a été démontrée dans une partie précédente du travail ⁽⁷²⁾, permet d'améliorer l'implantation obtenue après greffe d'une population hépatocytaire non triée.

Le fait que des résultats similaires aient été obtenus chez les souris Nude soumis à un traitement JO₂ n'est pas surprenant dans le sens où nous avons comparé l'histologie, les taux sériques d'ALT, la présence d'apoptose et de nécrose après injections uniques de TA, GalN ou JO₂ ⁽⁷³⁾ et trouvé d'importantes similitudes en caractérisant ces 3 modèles.

En ce qui concerne l'hépatectomie partielle à 40%, nous avons anticipé que la greffe d'hépatocytes *2n* n'allait pas augmenter l'implantation puisque ce ne sont pas ces cellules qui interviennent lors de la régénération hépatique dans ce modèle ⁽⁷²⁾; dans ce contexte, nous avons cependant été surpris que la greffe d'hépatocytes *4n* ne se solde pas par une augmentation du taux d'implantation de cellules dans le parenchyme d'un foie en régénération post-hépatectomie partielle. Il est imaginable que la population d'hépatocytes binucléés *2x2n* soit une meilleure candidate pour améliorer l'efficacité de transplantation dans ce modèle, puisque nous avons montré que c'est elle qui est impliquée dans la régénération après hépatectomie partielle avec pour conséquence, après division, une polyploïdisation accélérée des hépatocytes ⁽⁷²⁾. Les techniques actuelles de tri ne permettent toutefois pas d'isoler cette population cellulaire.

Il est également possible que nos résultats soient liés au modèle Nude: on peut là encore imaginer que l'implantation d'hépatocytes xénogéniques de rat *4n* dans le foie de souris Nude en régénération post-hépatectomie soit différente, pour des raisons non élucidées, de celle dans un foie en régénération d'un modèle syngénique rat.

En résumé, dans ce présent travail, nous montrons d'une part que l'implantation d'une population totale d'hépatocytes, c'est-à-dire non triés, est identique à celle obtenue dans d'autres études portant sur des greffes syngéniques (souris/souris ou rat/rat) ou xénogéniques.

La transplantation d'hépatocytes dans un foie en régénération post-hépatectomie partielle ou post-insuffisance hépatique toxique, réalisée en absence d'avantage sélectif est peu efficace malgré un turnover cellulaire supérieur aux niveaux basaux d'un foie normal dans nos modèles de régénération ⁽⁷²⁾. Ceci signifierait alors qu'il faudrait bloquer la prolifération du foie receveur de façon répétée ou définitive, ou bien modifier les capacités de prolifération des hépatocytes transplantés avec les risques de croissance tumorale que cela impliquerait puisque le comportement phénotypique à long terme de telles cellules est encore inconnu ⁽¹¹⁸⁾.

Toutefois 21 jours après greffe de fractions cellulaires enrichies (mais non pures) en hépatocytes diploïdes, la détection d'un nombre augmenté (par rapport au témoin) d'hépatocytes de rat dans le parenchyme hépatique de souris Nude en insuffisance hépatique aiguë suite à l'injection de toxique, indique que même en absence d'avantage sélectif une greffe d'une sous-population cellulaire impliquée dans la régénération hépatique pourrait être bénéfique au cours d'une transposition clinique de notre approche. Des essais de transplantation de populations cellulaires enrichies, par tri en cytométrie en flux, en hépatocytes $2n$, $4n$ ou $8n$ avaient déjà montré des résultats similaires entre eux en terme de capacité à repeupler un foie dans un modèle de souris uPA ⁽²³⁷⁾.

Il est à noter que nos expériences menées chez l'animal l'ont été dans des modèles non létaux afin d'étudier l'implantation hépatocytaire et qu'il faut donc se garder de déduire à partir de ces résultats prometteurs qu'une amélioration en terme de survie pourra effectivement être obtenue lors d'une approche clinique qui nécessitera de plus une immunosuppression.

L'amélioration des résultats après greffe hépatocytaire passe par la connaissance des mécanismes régulant l'implantation des cellules transplantées puisque celle-ci demeure peu élevée même des conditions d'insuffisance hépatique. Il est en effet souhaitable, malgré la possibilité d'injecter plusieurs fois des cellules, d'améliorer le repeuplement hépatique en vue de situations cliniques telles les déficiences enzymatiques ou les insuffisances chroniques. Le

cyclophosphamide a récemment montré son efficacité dans l'amélioration de l'implantation ⁽¹³⁰⁾ tandis que des données récentes ont indiqué que la modification des distributions cellulaires dans les sinusoides hépatiques, l'interférence avec les phénomènes de phagocytose engendrés par la greffe cellulaire et la manipulation pré-opératoire des sinusoides endothéliaux pourraient avoir des effets bénéfiques sur l'implantation cellulaire et donc la repopulation hépatique ⁽⁹³⁾. D'autres manipulations sont possibles (immortalisation réversible, activation de la télomérase) afin d'améliorer la colonisation du foie receveur ⁽⁹³⁾. L'augmentation de la prolifération des hépatocytes transplantés par manipulation pré-opératoire (irradiation) du foie receveur avait été suggérée par la même équipe ⁽⁸⁵⁾.

Il a été également suggéré récemment que la voie d'administration des hépatocytes transplantés pourrait influencer directement l'implantation et la fonctionnalité hépatocytaire et pourrait expliquer les difficultés rencontrées en clinique au regard des résultats obtenus chez l'homme ⁽¹⁵³⁾. Cependant, ce qui limite actuellement l'obtention de meilleurs résultats cliniques est la faible expansion d'hépatocytes transplantés dans le parenchyme hépatique receveur ^(82,118). Ceci peut s'expliquer en premier lieu par le faible renouvellement cellulaire hépatique, estimé à un taux de moins de 0,1% dans un foie normal ⁽⁵⁸⁾, qui ne permettrait qu'une implantation et une multiplication faible des cellules transplantées. Néanmoins, en situation d'insuffisance hépatique les altérations structurales du foie ainsi que les phénomènes de prolifération hépatocytaire devraient conduire en théorie à une implantation bien meilleure. Un facteur pouvant entrer en compte pour optimiser cette technique serait de conférer aux hépatocytes transplantés une capacité accrue de réponse aux stimuli spécifiques ce qui permettrait de les multiplier sélectivement. C'est ce que l'on appelle l'avantage sélectif.

Des études récentes ont montré qu'une augmentation de l'implantation des cellules transplantées était observée si les cellules transplantées présentaient un avantage prolifératif par rapport aux cellules du foie receveur, ou si les cellules du foie-hôte présentaient un turnover inférieur ^(81,118). L'inhibition de l'implantation dans des situations d'insuffisance hépatique aiguë, comparée à l'état normal, pourrait également permettre de connaître mieux de quelle façon le foie est repeuplé après transplantation d'hépatocytes, comme cela a été évalué chez la souris en utilisant un toxique, le ganciclovir, activé par un transgène ⁽²³⁾.

Il existe trois grands types de modèles expérimentaux permettant de conférer aux hépatocytes transplantés un avantage sélectif sur les hépatocytes hôtes ⁽¹³¹⁾:

1) Le blocage, par irradiation du foie, de la prolifération des hépatocytes du foie receveur du fait de l'arrêt du cycle cellulaire ⁽⁸⁴⁾. L'administration de rétroisine (alcaloïde potentiellement oncogène pouvant se fixer à l'ADN) a pour effet de bloquer les cellules en phase G₀ ⁽¹¹⁶⁻¹¹⁷⁾ et entraîne le même effet. Il est à noter qu'une hépatectomie à 70%, ou l'administration répétée de l'hormone thyroïdienne T₃ (une hormone régulatrice de la prolifération et de la polyploïdisation hépatique ⁽²²⁰⁾), augmente la polyploïdie initiée par l'effet de la rétroisine ^(131,161).

2) L'utilisation d'animaux receveurs dont le fond génétique est modifié. Ainsi, des modèles ont été développés sur des souris génétiquement modifiées de façon à obtenir un avantage prolifératif (souris transgéniques uPA ou souris FAH^{-/-}) ⁽¹³¹⁾. Dans ces modèles uPA et FAH^{-/-}, les hépatocytes sains transplantés, non affectés par le transgène, vont proliférer pour atteindre un repeuplement hépatique de 70 à 80% ⁽¹¹⁸⁾.

Dans le modèle uPA, les hépatocytes transplantés ou les hépatocytes hôtes délétés de leur transgène prolifèrent tandis que les hépatocytes résidents sont détruits de façon protéolytique. Des stratégies de repeuplement hépatique à l'aide de sous-populations hépatocytaires enrichies en 2*n*, 4*n* ou 8*n* ont été testées en 2000 dans un modèle de souris uPA par l'équipe américaine de Teresa Weglarz et Eric Sandgren ⁽²³⁷⁾: les résultats obtenus par cette équipe indiquent que dans ce modèle les populations d'hépatocytes 4*n* et 8*n* prolifèrent de façon clonale, la population 2*n* ne permettant qu'un repeuplement égal à celui d'une préparation hépatocytaire totale, non triée.

Dans le modèle FAH^{-/-}, les hépatocytes sauvages transplantés présentent un avantage de croissance par rapport aux hépatocytes résidents à cause de l'accumulation dans ces derniers d'intermédiaires toxiques du métabolisme de la tyrosine ^(131,161). Le repeuplement hépatique à partir d'hépatocytes triés selon la taille et la densité par élutriation centrifuge ⁽¹⁶⁴⁾ a été rapporté dans un modèle FAH^{-/-}: parmi les 3 sous-populations étudiées (taille moyenne des hépatocytes de 16 µm, 21 µm ou 27 µm de diamètre) les petits hépatocytes étaient ceux qui possédaient la capacité de repeuplement la plus faible.

3) La greffe d'hépatocytes ayant une survie favorisée par rapport à ceux du foie hôte. Par exemple, des souris soumises à un traitement chronique par un inducteur d'apoptose (anticorps anti-Fas, JO₂) auront un taux d'implantation élevé (proche de 70%) si les

hépatocytes transplantés surexpriment BCl₂, empêchant l'induction d'apoptose dans ces cellules ^(135,143,240).

Il semble difficile d'envisager la mise en pratique en clinique d'une telle approche, à savoir la destruction du foie receveur avant transplantation. La transplantation d'hépatocytes ne pourra présenter un intérêt en clinique uniquement si un moyen d'augmenter l'efficacité de transplantation sans destruction des cellules du foie propre est trouvé, ce qui souligne l'intérêt de trouver des cellules progénitrices qui auraient un potentiel de prolifération augmenté sans être nécessairement transfectées.

**CONCLUSION GENERALE
& PERSPECTIVES**

L'utilisation clinique de la greffe d'hépatocytes est conditionnée par trois étapes:

- la première concerne la mise au point des procédures optimales favorisant l'implantation, la survie et la fonctionnalité des cellules,
- la seconde consiste en la démonstration de l'efficacité thérapeutique d'une telle approche dans des modèles animaux,
- enfin, la recherche d'autres cellules servant d'alternatives aux hépatocytes matures pourrait permettre de favoriser le développement de programmes cliniques.

D'autres approches doivent également être étudiées si l'on veut parvenir à optimiser en clinique les techniques de greffe cellulaire.

1. Recherche des conditions optimales d'implantation et de fonctionnalité des hépatocytes transplantés

C'est dans ce contexte que notre travail de thèse a été réalisé. Nous avons clairement mis en évidence que le processus et les mécanismes de régénération hépatique suite à une hépatectomie partielle ou à une intoxication aiguë sont différents, ceci par les études concernant les relations entre taille hépatocytaire, localisation lobulaire, ploïdie et fonction hépatocytaire chez le rat Sprague-Dawley ⁽⁷¹⁾, les cinétiques de régénération hépatique et la ploïdie hépatocytaire lors de la régénération hépatique chez le rat Sprague-Dawley ⁽⁷²⁾, ou encore l'analyse des phénomènes de mitose, d'apoptose et de nécrose chez des souris Nude en insuffisance hépatique ⁽⁷³⁾.

Nous avons ensuite montré qu'il était possible d'induire différents types d'insuffisance hépatique chez la souris Nude ⁽⁷³⁾ et avons montré qu'il était possible de détecter, par immunofluorescence sur coupe à l'aide d'un anticorps anti-CMH I, dans le parenchyme de souris Nude receveur des cellules de rat Sprague-Dawley transplantées. Nous avons ainsi pu évaluer l'implantation d'hépatocytes transplantés chez la souris Nude en régénération hépatique post-hépatectomie partielle ou post-apoptose et/ou post-nécrose, selon des modèles mimant des situations cliniques d'insuffisance hépatique, et en s'affranchissant de l'immunosuppression. Nos résultats préliminaires mettent en évidence une colonisation faible du parenchyme hépatique receveur par les hépatocytes transplantés, et ceci dans tous les

modèles d'insuffisance hépatique aiguë testés. Les essais de transplantation chez les souris Nude présentant une cirrhose seront également réalisés. Dans la littérature il a été montré que les cellules transplantées sont capables de s'intégrer et de proliférer dans un foie cirrhotique malgré les perturbations vasculaires dues à des phénomènes de capillarisation sinusoidale hépatique ⁽¹³¹⁾. Les hépatocytes transplantés dans la rate de rat F344 DPPIV^{-/-} après cirrhose induite par le CCl₄ s'implantent et survivent ⁽⁶⁸⁾.

L'ensemble de nos résultats, en accord avec des données récentes de la littérature (voir discussion de la troisième partie), indique qu'une optimisation de la colonisation du foie receveur par des hépatocytes greffés nécessite des études complémentaires des mécanismes de régénération hépatique, la recherche de la/des population(s) cellulaire(s) à transplanter, ainsi que des moyens de conférer aux cellules transplantées un avantage sélectif par rapport aux cellules hôtes et/ou un équivalent pour le repeuplement du foie en cours de régénération. Les différents modèles d'insuffisance hépatique que nous avons développés chez la souris Nude seront d'une aide précieuse pour les travaux ultérieurs à ce sujet.

Dans ce contexte de caractériser la/les sous-population(s) implantée(s), leur ploïdie devrait fournir des pistes intéressantes et une collaboration avec l'équipe du Dr. Stanislas Du Manoir à l'IGBMC (Illkirch-Graffenstaden) a été engagée.

2. Démonstration de l'efficacité thérapeutique de la greffe d'hépatocytes dans des modèles animaux

Jusqu'à présent l'efficacité thérapeutique de la greffe d'hépatocytes a été démontrée dans des modèles animaux d'insuffisance hépatique causée par des maladies métaboliques ^(43,86,93,132,179). De même, les succès cliniques rencontrés avaient pour cadre des déficiences métaboliques. Afin de rendre cette technique prometteuse disponible pour d'autres applications, il convient en premier lieu d'élargir les types d'insuffisance hépatique que l'on sait guérir chez l'animal. Pour cela, des modèles adéquats, compatibles avec la clinique sont requis. Ainsi, le développement des modèles d'insuffisance hépatique aiguë et chronique chez la souris Nude nous permet d'envisager dans un futur proche des essais de greffe cellulaire dans une optique de guérison donc en terme de survie. Pour cela, l'une des conditions requises est d'adapter le traitement infligé à la souris Nude de telle façon que la survie soit inférieure à 100% chez des animaux non transplantés. Par ailleurs, la comparaison de nos résultats obtenus dans des

modèles animaux mimant la clinique avec ceux obtenus dans des modèles animaux non extrapolables à la clinique, tels que les animaux transgéniques ⁽¹¹⁸⁾ ou les modèles permettant de conférer un avantage sélectif aux cellules transplantées ⁽¹³¹⁾, suggère qu'il est nécessaire de mieux connaître les signaux hépatiques présents dans les foies réceptifs à une colonisation afin de mieux appréhender les signaux requis pour une efficacité de transplantation suffisante afin d'envisager une efficacité thérapeutique.

Une des perspectives susceptibles de mener à une compréhension meilleure des mécanismes entrant en jeu lors de l'insuffisance hépatique et donc de chercher à cibler les facteurs clés du développement et de la progression de ces maladies repose sur l'analyse poussée de profilage de gènes- il y en a plus de 39000 chez l'homme ⁽²²⁵⁾ - dans l'espoir d'une détermination des gènes impliqués lors de pathologies hépatiques ^(67,198). Une première cartographie de référence des noyaux hépatiques humains (1497 spots) a d'ores et déjà été établie par une technique d'électrophorèse bi-dimensionnelle ⁽¹⁰²⁾ et une étude par une technique GenChip, de l'expression génique de gènes après hépatectomie partielle a été réalisée chez la souris ⁽²⁰⁹⁾ comme chez le rat ⁽⁶⁷⁾. De tels travaux sont envisageables également pour d'autres types d'atteinte hépatique.

3. Recherche, dans une optique clinique, d'alternatives aux hépatocytes

Il a été envisagé d'utiliser ou d'expérimenter d'autres sources de cellules que des hépatocytes matures, telles que des cellules hépatiques fœtales ou des cellules souches hématopoïétiques ⁽⁹³⁾.

3.1. Cellules souches hépatiques

Des avancées récentes concernant les cellules souches ou progénitrices, isolées à partir du foie ou d'autres organes, offrent de nouvelles perspectives de thérapie cellulaire ^(28,93,202).

D'un point de vue lignage cellulaire au cours du développement et ce pour de nombreux organes, les cellules souches sont d'abord indifférenciées et possèdent des capacités de

prolifération et de différenciation, pouvant ainsi donner naissance à des types cellulaires de plus en plus limités et définis pour aboutir à des cellules pleinement différenciées et fonctionnelles ⁽³⁴⁾. Les cellules souches sont douées de plasticité ⁽¹⁷³⁾ et ce domaine en expansion ne se confine pas au foie ⁽⁶⁹⁾. Il existe des cellules souches dans différents organes et l'hypothèse d'une transdifférenciation d'un type cellulaire à un autre est devenue très récemment très en vogue bien qu'encore controversée ^(34,172).

De plus, dans le foie, les hépatocytes les plus jeunes, diploïdes, auraient des caractéristiques de cellules souches totipotentes c'est-à-dire qu'ils possèderaient encore la capacité *in vitro* de se différencier, soit en cellules épithéliales biliaires, soit en hépatocytes matures ⁽³⁶⁾.

L'existence de cellules souches hépatiques d'origine hématopoïétique, présentes dans le foie adulte, normal ou en insuffisance hépatique, a été récemment démontrée aussi bien dans des modèles animaux ^(159,167,196) que chez l'homme ^(5,207,216-217). Dès que la présence de cellules souches dans le foie a été reconnue, les auteurs ont pensé que ces cellules douées de plasticité étaient responsables de la régénération hépatique ⁽¹⁹²⁾. Leur implication dans les phénomènes de régénération hépatique est cependant complexe, car dépendant tout particulièrement de la capacité proliférative des cellules résiduelles du foie; ainsi les hépatocytes greffés pourraient donner $7,3 \cdot 10^{20}$ hépatocytes (ce qui équivaut à plus de 80 divisions sans perte de leur potentiel répliatif) dans le modèle de greffe chez la souris FAH^{-/-} ⁽¹⁶³⁾. Cependant, la nature et les fonctions des cellules souches ne sont pas encore élucidées, ce qui complique leur utilisation comme thérapeutique efficace ^(59,182,215). L'identification et la propagation des cellules souches hépatiques est actuellement un champ d'étude en expansion ⁽²¹³⁾ (**Figure 17**).

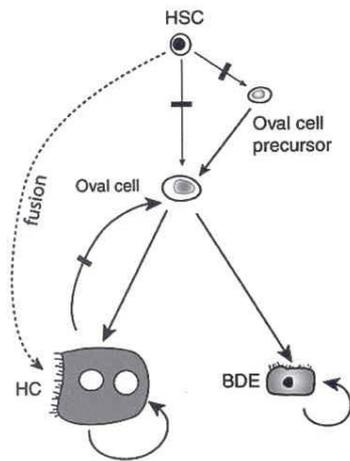


Figure 17. Modèle de hiérarchie entre cellules souches hépatiques (*extrait de Wang et al., 2003* ⁽²³³⁾). HC: hépatocytes; BDE: épithélium des canaux biliaires; HSC: cellules souches hématopoïétiques.

Les résultats fort intéressants, quoique préliminaires, que nous avons obtenus suite à la transplantation de populations enrichies en cellules $2n$ dans un foie en insuffisance aiguë, à savoir une implantation des hépatocytes doublée, voire triplée, comparée à l'implantation d'une population hépatocytaire non triée, tentent à confirmer que les cellules issues des cellules souches présenteraient la plus grande efficacité de transplantation.

3.2. Cellules épithéliales biliaires

Le rôle des cellules épithéliales biliaires au cours de la régénération hépatique a été également bien étudié. Au cours du développement embryonnaire, les hépatoblastes donnent naissance à deux lignées de cellules: les hépatocytes d'une part et les cellules épithéliales biliaires d'autre part ⁽⁵⁸⁾.

Les cellules épithéliales biliaires tapissent les canaux biliaires intra-hépatiques. Dans les espaces portes, les parties terminales du système biliaire sont en relation avec les hépatocytes *via* les canaux de Hering, lesquels acheminent la bile à partir des canalicules biliaires jusqu'aux canaux biliaires ⁽¹⁸⁷⁾. Elles pourraient représenter des cellules souches ayant la capacité à générer des cellules ovales qui sont des cellules progénitrices exprimant à la fois des caractéristiques d'hépatocytes fœtaux et de cellules biliaires ^(124,233). Dans le foie adulte, de telles cellules progénitrices, caractérisées par le marqueur Thy1 et des marqueurs de lignage hépatique tels l'albumine et les cytokératines 7 et 19 ^(58,62), peuvent générer à la fois des hépatocytes et des cellules biliaires ^(54,58). Elles ont été reconnues comme sollicitées au cours de plusieurs maladies hépatiques chez l'homme ⁽²¹⁴⁾ comme dans des modèles animaux ⁽¹⁶⁶⁾: il y a ainsi activation du gène de l'AFP après injection de CCl_4 ou de GalN ⁽²²¹⁾ ce qui corrèle bien avec la prolifération des cellules ovales rencontrée après GalN ⁽¹²³⁾.

3.3. Autres types cellulaires

La différenciation de cellules souches embryonnaires en hépatocytes a été étudiée *in vivo* dans un modèle d'intoxication par le CCl₄ ⁽²³⁹⁾; celle de cellules souches hématopoïétiques purifiées en hépatocytes *in vivo* dans le modèle de souris FAH^{-/-} ⁽¹²⁰⁾. L'utilisation de cellules pancréatiques adultes de souris dans ce modèle FAH^{-/-} a été réalisée avec succès, démontrant l'existence, dans le pancréas adulte de souris, de cellules progénitrices hépatiques capables d'aider au repeuplement thérapeutique du foie ⁽²³²⁾.

L'utilisation de cellules fœtales est également envisageable et même si on n'a pas encore pu caractériser une cellule souche hépatique le lignage hépato-biliaire est de mieux en mieux compris ⁽³⁷⁾.

En conclusion, la possibilité d'envisager la greffe d'hépatocytes comme alternative à la transplantation hépatique orthotopique pour le traitement clinique de l'insuffisance hépatique repose essentiellement sur les succès futurs de colonisation du foie receveur par des cellules greffées. Définir la nature des cellules transplantées, maîtriser les facteurs d'implantation et de fonctionnalité des cellules transplantées, tels sont les enjeux. Pour ceci, il est impératif entre autres d'affiner la compréhension des mécanismes régissant la régénération hépatique selon le type d'insuffisance rencontré et d'identifier les facteurs conférant un environnement hépatique propice à l'implantation des cellules greffées. Les progrès réalisés ces dernières années dans la connaissance des mécanismes de régulation de l'homéostasie hépatique et de plasticité cellulaire sont porteurs d'espoir quant à l'utilisation thérapeutique de la greffe d'hépatocytes à moyen terme chez l'homme.

BIBLIOGRAPHIE

1. Alexandre E., Cahn M., Abadie-Viollon C., Meyer N., Heyd B., Mantion G., Cinqualbre J., David P., Jaeck D., Richert L. Influence of pre-, intra-, and post-operative parameters of donor liver on the outcome of isolated human hepatocytes. *Cell Tissue Banking*. 3:223-233, 2002.
2. Alexandre E., Viollon-Abadie C., David P., Gandillet A., Coassolo P., Heyd B., Mantion G., Wolf P., Bachellier P., Jaeck D., Richert L. Cryopreservation of adult human hepatocytes obtained from resected liver biopsies. *Cryobiology*. 44:103-113, 2002.
3. Alfert M., Geshwind I.I. The development of polysomaty in rat liver. *Exp. Cell Res.* 15:230-235, 1958.
4. Alison M.R. Liver regeneration with reference to stem cells. *Semin. Cell Develop. Biol.* 13:385-387, 2002.
5. Alison M.R., Poulson R., Jeffery R., Dhillon A.P., Quaglia A., Jacob J., Novelli M., Prentice G., Williamson J., Wright N.A.. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature*. 406:257, 2000.
6. Allen J.W., Bhatia S.N. Improving the next generation of bioartificial liver devices. *Semin. Cell Develop. Biol.* 13:447-455, 2002.
7. Ammon R., Berninger H., Haas H.J., Landsberg I. Thioacetamide sulfoxide, a metabolite of thioacetamide. *Arzneim. Forsch.* 17: 522-523, 1967.
8. Arkadopoulos N., Cilja H., Suh K.S., Demetriou A.A., Rozga J. Intrasplenic transplantation of allogeneic hepatocytes prolongs survival in anhepatic rats. *Hepatology*. 28, 1365-1370, 1998.
9. Arni P. Review on the genotoxic activity of thioacetamide. *Mutation Res.* 221:153-162, 1989.
10. Austin W., Lagasse E. Hepatic regeneration from hematopoietic stem cells. *Mech. Develop.* 120:131-135, 2003.
11. Baccarani U., Sanna A., Cariani A., Sainz-Barriga M., Adani G.L., Zambito A.M., Piccolo G., Risaliti A., Nanni-Costa A., Ridolfi L., Scalamogna M., Bredasola F., Donini A. Isolation of human hepatocytes from livers rejected for liver transplantation on a national basis: results of a 2-year experience. *Liver Transpl.* 9:506-512, 2003.
12. Bajt M.L., Lawson J.A., Vonderfecht S.L., Gujral J.S., Jaeschke H. Protection against Fas receptor-mediated apoptosis in hepatocytes and nonparenchymal cells by a caspase-8 inhibitor *in vivo*: evidence for a postmitochondrial processing of caspase-8. *Toxicol. Sci.* 58:109-117, 2000.
13. Barker E.A., Schmuckler E.A. Nonhepatic thioacetamide injury. II. The morphologic features of proximal renal tubular injury. *Am. J. Pathol.* 74:575-590, 1974.

14. Bartels H., Linnemann H., Jungermann K. Predominant localization of phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA in the periportal zone of rat liver parenchyma demonstrated by *in situ* hybridization. *FEBS Lett.*, 248:188-194, 1989.
15. Bathgate A.J., Lee P., Hayes P.C., Simpson K.J. Pretransplantation tumor necrosis factor- α production predicts acute rejection after liver transplantation. *Liver Transpl.* 6:721-727, 2000.
16. Baumgartner D., LaPlante-O'Neill P.M., Sutherland D.E.R., Najarian J.S. Effects of intrasplenic injection of hepatocytes, hepatocyte fragments and hepatocyte culture supernatants on D-Galactosamine-induced liver failure in rats. *Eur. Surg. Res.* 15:129-135, 1983.
17. Belghiti J., Durand F. Living donor transplantation: present and future. *Br. J. Surg.* 87:1441-1443, 2000.
18. Bilir B.M., Guinette D., Karrer F., Kumpe D.A., Krsyl J., Stephens J., McGavran L., Ostrowska A., Durham J. Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl.* 6:32-40, 2000.
19. Binda D., Nicod L., Viollon-Abadie C., Rodriguez S., Berthelot A., Coassolo P., Richert L. Strain difference (WKY, SRPD) in the hepatic antioxidant status in rat and effect of hypertension (SHR, DOCA). *Ex vivo* and *in vitro* data. *Mol. Cell. Biochem.* 218:139-146, 2001.
20. Bissell D.M., Roulot D., George J. Transforming growth factor β and the liver. *Hepatology.* 34:859-866, 2001.
21. Blindenbacher A., Wang X., Langer I., Savino R., Terracciano L., Heim M.H. Interleukin 6 is important for survival after partial hepatectomy in mice. *Hepatology.* 38:674-682, 2003.
22. Bralet M.P., Branchereau S., Bréchet C., Ferry N. Cell lineage study in the liver using retroviral mediated gene transfer. *Am. J. Pathol.* 144:896-905, 1994.
23. Braun K.M., Degen J.L., Sandgren E.P. Hepatocyte transplantation in a model of toxin-induced liver disease: variable therapeutic effect during replacement of damaged parenchyma by donor cells. *Nature Med.* 6:320-326, 2000.
24. Brodsky W.Y., Uryvaeva I.V. Cell polyploidy: its relation to tissue growth and function. *Int. Rev. Cytol.* 50:275-332, 1997.
25. Bruck R., Shirin H., Aeed H., Matas Z., Hochman A., Pines M., Avni Y. Prevention of hepatic cirrhosis by hydroxyl radical scavengers. *J. Hepatol.* 35:457-464, 2001.

26. Bucher N.L.R., Farmer S.R. Liver regeneration following partial hepatectomy: genes and metabolism. London: Strain A., Diehl A.M. 1998. p. 3-27.
27. Burke M.D., Thompson S., Elcombe C.R., Halpert J., Haaparanta T., Mayer R.T. Ethoxy-, pentoxy-, and benzyloxy- phenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. *Biochem. Pharmacol.* 34:3337-3345, 1985.
28. Cai J., Rao M.S. Stem cell and precursor cell therapy. *Neuromolec. Med.* 2:233-249, 2002.
29. Chanda S., Mehendale H.M. Role of nutrition after hepatotoxic injury. *Toxicology.* 111:163-178, 1996.
30. Cheng T., Rodrigues N., Dombkowski D., Stier S., Scadden D.T. Stem cell repopulation efficiency but not pool size is governed by p27(kip1). *Nature Med.* 6:1235-1240, 2000.
31. Childs J.F.L., Siegler E.A. Uses of thioacetamide in agriculture. *Science.* 102:68-72, 1945.
32. Christoffels V.M., Sassi H., Ruijter J.M., Moorman A.F.M., Grange T., Lamers W.H. A mechanistic model for the development and maintenance of portocentral gradients in gene expression in the liver. *Hepatology.* 29:1180-1192, 1999.
33. Cinqualbre J., Alexandre E., Gandillet A., Richert L. La greffe d'organes. Paris: Masson. 2004.
34. Cogle C.R., Guthrie S.M., Sanders R.C., Allen W.L., Scott E.W., Petersen B.E. An overview of stem cell research and regulatory issues. *Mayo Clin. Proc.* 78:993-1003, 2003.
35. Court F.G., Wemyss-Holden S.A., Dennison A.R., Maddern G.J. The mystery of liver regeneration. *Br. J. Surg.* 89:1089-1095, 2002.
36. Crosby H.A., Kelly D.A., Strain A.J. Human hepatic stem-like cells using *c-kit* or CD34 can differentiate into biliary epithelium. *Gastroenterology.* 120:534-544, 2001.
37. Crosby H.A., Nijjar S.S., de Ville de Goyet J., Kelly D.A., Strain A.J. Progenitor cells of the biliary epithelial cell lineage. *Semin. Cell Develop. Biol.* 13:397-403, 2002.
38. Dabeva M.D., Alpini G., Hurston E., Shafritz D.A. Models for hepatic progenitor cell activation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204:242-252, 1993.
39. David Pascale. Transplantation d'hépatocytes isolés: de la disponibilité en cellules humaines à l'application dans un modèle rat *in vivo*. Th: Sciences du vivant: Strasbourg I: 2000, 252 p.

40. David P., Alexandre E., Audet M., Chenard-Neu M.P., Wolf P., Jaeck D., Azimzadeh A., Richert L. Engraftment and albumin production of intrasplenically transplanted rat hepatocytes (Sprague Dawley), freshly isolated *versus* cryopreserved, into Nagase analbuminemic rats (NAR). *Cell Transplant.* 10:67-80, 2001.
41. David P., Alexandre E., Chenard-Neu M.P., Wolf P., Jaeck D., Richert L. Failure of liver cirrhosis induction by thioacetamide in Nagase analbuminaemic rats. *Lab. Anim.* 36:158-164, 2002.
42. Dekel R., Zvibel I., Brill S., Brazovsky E., Halpern Z., Oren R. Gliotoxin ameliorates development of fibrosis titre cirrhosis in a thioacetamide rat model. *Dig. Dis. Sci.* 48:1642-1647, 2003.
43. Demetriou A.A., Levenson S.M., Novikoff P.M., Novikoff A.B., Roy Chowdhury N., Whiting J., Reisner J., Chowdhury J.R. Survival, organization and function of microcarrier-attached hepatocytes transplanted in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:7475-7479, 1986.
44. Demetriou A.A., Reisner A., Sanchez J., Levenson S.M., Moscioni A.D., Chowdhury J.R. Transplantation of microcarrier-attached hepatocytes in 90% partially hepatectomized rats. *Hepatology.* 8:1006-1009, 1988.
45. Demma I., Houssin D., Capron M.M., Morin J., Gigou M., Szekely A.M., Bismuth H. Therapeutic efficacy of the transplantation of isolated hepatocytes in rats with surgically induced acute hepatic failure: a study of the mechanism. *Eur. Surg. Res.*, 18:12-18, 1986.
46. de Roos W.K., Von Geusau B.A., Bouwman E., Van Dierendonck J.H., Rinkes I.H.M.B., Terpstra O.T. Monitoring engraftment of transplanted hepatocytes in recipient liver with 5-bromo-2'-deoxyuridine. *Transplantation.* 63:513-518, 1997.
47. Dicker E., McHugh T., Cederbaum A.I. Increased oxidation of p-nitrophenol and aniline by intact hepatocytes isolated from pyrazole-treated rats. *Biochem. Biophys. Acta.* 1035:249-256, 1990.
48. Diez-Fernandez C., Bosca L., Fernandez-Simon L., Alvarez A., Cascales M. Relationship between genomic DNA ploidy and parameters of liver damage during necrosis and regeneration induced by thioacetamide. *Hepatology.* 18:912-918, 1993.
49. Digernes V., Iversen O.H. Flow cytometry of nuclear DNA content in liver cirrhosis and liver tumours in rats exposed to acetylaminofluorene. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 47:139-146, 1984.
50. Donato M.T., Gomez-Lechon M.J., Castell J.V. A microassay for measuring cytochrome P450IA1 and P450IIB1 activities in intact human and rat hepatocytes cultured in 96-well plates. *Anal. Biochem.* 218:29-33, 1993.

51. Eguchi S., Kamlot A., Ljubimova J., Hewitt W.R., Lebow L.T., Demetriou A.A., Rozga J. Fulminant hepatic failure in rats: survival and effect on blood chemistry and liver regeneration. *Hepatology*. 24:1452-1459, 1996.
52. Emerson J.A., Vacher J., Cirillo L.A., Tilghman S.M., Tyner A.L. The zonal expression of alpha-fetoprotein transgenes in the livers of adult mice. *Develop. Dyn.* 195:55-66, 1992.
53. Enesco H.E., Shimokawa I., Yu B.P. Effect of dietary restriction and aging on polyploidy in rat liver. *Mech. Ageing Develop.* 59:69-78, 1991.
54. Farber E. Similarities in the sequence of early histologic changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* 16:142-149, 1956.
55. Farrell G.C. Drug-induced hepatic injury. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 12:S242-S250, 1997.
56. Fausto N. Liver regeneration. *J. Hepatol.* 32:19-31, 2000.
57. Fausto N. Liver regeneration: from laboratory to clinic. *Liver Transplant.* 7:835-844, 2001.
58. Fausto N., Campbell J.S. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech. Develop.* 120:117-130, 2003.
59. Fausto N., Lemire J.M., Shiojiri N. Cell lineages in hepatic development and the identification of progenitor cells in normal and injured liver. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204:237-241, 1993.
60. Fausto N., Laird A.D., Webber E.M. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J.* 9:1527-1536, 1995.
61. Feldmann G., Lamboley C., Moreau A., Bringuier A. Fas-mediated apoptosis of hepatic cells. *Biomed. Pharmacother.* 52:378-385, 1998.
62. Fiegel H.C., Park J.J.H., Lioznov M.V., Martin A., Jaeschke-Melli S., Kaufmann P.M., Fehse B., Zander A., Kluth D. Characterization of cell types during rat liver development. *Hepatology*. 37:148-154, 2003.
63. Fisher R.A., Bu D., Thompson M., Tisnado J., Prasad U., Sterling R., Posner M., Strom S. Defining hepatocellular chimerism in a liver failure patient bridged with hepatocyte infusion. *Transplantation*. 69:303-307, 2000.
64. Fitzhugh O.G., Nelson A.A. Liver tumors in rats fed thiourea or thioacetamide. *Science*. 108:626-628, 1948.

65. Fortner J.G., Blumgart L.H. A historic perspective of liver surgery for tumors at the end of the millenium. *J. Am. Coll. Surg.* 193:210-222, 2001.
66. Fujino M., Li X.K., Kitazawa Y., Funeshima N., Guo L., Okuyama T., Amnao T., Amemiya H., Suzuki S. Selective repopulation of mice liver after Fas-resistant hepatocyte transplantation. *Cell Transplant.* 10:353-361, 2003.
67. Fukuhara Y., Hirasawa A., Li X.K., Kawasaki M., Fujino M., Funeshima N., Katsuma S., Shiojima S., Yamada M., Okuyama T., Suzuki S., Tsujimoto G. Gene expression profile in the regenerating rat liver after partial hepatectomy. *J. Hepatol.* 38:784-792, 2003.
68. Gagandeep S., Rajvanshi P., Sokhi R.P., Slehria S., Palestro C.J., Bhargava K.K., Gupta S. Transplanted hepatocytes engraft, survive, and proliferate in the liver of rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *J. Pathol.* 191:78-85, 2000.
69. Gage F.H. Cell therapy. *Nature.* 392:18-24, 1998.
70. Gaglio P.J., Liu H., Dash S., Cheng S., Dunne B., Ratterree M., Baskin G., Blanchard J., Bohm R., Theise N.D., LaBrecque D. Liver regeneration investigated in a non-human primate model (*Macaca mulatta*). *J. Hepatol.* 37:625-632, 2002.
71. Gandillet A., Alexandre E., Holl V., Royer C., Bischoff P., Cinqualbre J., Wolf P., Jaeck D., Richert L. Hepatocyte ploidy in normal young rat. *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* 134:665-673, 2003.
72. Gandillet A., Alexandre E., Royer C., Cinqualbre J., Jaeck D., Richert L. Hepatocyte ploidy in regenerating livers after partial hepatectomy, drug-induced necrosis, and cirrhosis. *Eur. Surg. Res.* 35:148-160, 2003.
73. Gandillet A., Alexandre E., Audet M., Chenard-Neu M.P., Jaeck D., Richert L. Experimental models of acute and chronic liver failure in Nude mice – Time course of liver regeneration. (*En révision*).
74. Gebhardt R. Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacol. Ther.* 53:275-354, 1992.
75. Gerlach J.C., Zeilinger K., Sauer I.M., Mieder T., Naumann G., Grünwald A., Pless G., Holland G., Mas A., Vienken J., Neuhaus P. Extracorporeal liver support: porcine or human cell based systems. *Int. J. Artif. Organs.* 25:1013-1018, 2002.
76. Gerlyng P., Abyholm A., Grotmol T., Erikstein B., Huitfeldt H.S., Stokke T., Seglen P.O. Binucleation and polyploidization patterns in developmental and regenerative rat liver growth. *Cell Prolif.* 26:557-565, 1993.

77. Gorla G.R., Malhi H., Gupta S. Polyploidy associated with oxidative injury attenuates proliferative potential of cells. *J. Cell Sci.* 114:2943-2951, 2001.
78. Gournay J., Auvigne I., Pichard V., Ligeza C., Bralet M.P., Ferry N. *In vivo* cell lineage analysis during chemical hepatocarcinogenesis in rats using retroviral-mediated gene transfer: evidence for dedifferentiation of mature hepatocytes. *Lab. Invest.* 82:781-788, 2002.
79. Griffith O.W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathion reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106:207-212, 1980.
80. Grisham J.W. Migration of hepatocytes along hepatic plates and stem cell-fed hepatocyte lineage. *Am. J. Pathol.* 144:849-854, 1994.
81. Grompe M., Laconi E., Shafritz D.A. Principles of therapeutic liver repopulation. *Semin. Liver Dis.* 19:7-14, 1999.
82. Grossmann M., Raper S.E., Kozarsky K., Stein E.A., Engelhardt J.F., Muller D., Lupien P.J., Wilson J.M. Successful *ex vivo* gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nature Genet.* 4:335-341, 1994.
83. Guettier C., Ziol M. L'apoptose dans le foie normal et pathologique. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 22:381-393, 1998.
84. Guha C., Sharma A., Gupta S., Alfieri A., Gorla G.R., Gagandeep S., Sokhi R., Chowdhury N.R., Tanaka K.E., Vikram B., Chowdhury J.R. Amelioration of radiation-induced liver damage in partially hepatectomized rats by hepatocyte transplantation. *Cancer Res.* 59:5871-5874, 1999.
85. Guha C., Deb N.J., Sappal B.S., Dhosh S.S., Chowdhury N.R., Chowdhury J.R. Amplification of engrafted hepatocytes by preparative manipulation of the host liver. *Artif. Organs.* 25:522-528, 2001.
86. Guha C., Parashar B., Deb N.J., Garg M., Gorla G.R., Singh A., Chowdhury N.R., Chowdhury J.R. Normal hepatocytes correct serum bilirubin after repopulation of Gunn rat liver subjected to irradiation/partial resection. *Hepatology.* 36:354-362, 2002.
87. Guibert E.E., Mediavilla M.G., Mamprin M.E., Rodriguez J.V. Hypothermic storage of periportal or perivenous rat hepatocytes. *Cell Transplant.* 7:345-355, 1998.
88. Gujral J.S., Farhood A., Jaeschke H. Oncotic necrosis and caspase-dependent apoptosis during galactosamine-induced liver injury in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 190:37-46, 2003.

89. Gupta S. Hepatic polyploidy and liver growth control. *Cancer Biol.* 10:161-171, 2000.
90. Gupta S., Aragona E., Vemuru R.P., Bhargava K.K., Burk R.D., Chowdhury J.R. Permanent engraftment and function of hepatocytes delivered to the liver: implications for gene therapy and liver repopulation. *Hepatology.* 14:144-149, 1991.
91. Gupta S., Bhargava K.K., Novikoff P.M. Mechanisms of cell engraftment during liver repopulation with hepatocyte transplantation. *Semin. Liver Dis.* 19:15-26, 1999.
92. Gupta S., Rajvanshi P., Sokhi R.P., Slehria S., Yam A., Kerr A., Novikoff P.M. Entry and integration of transplanted hepatocytes in liver plates by disruption of hepatic sinusoidal endothelium. *Hepatology.* 29:509-519, 1999.
93. Gupta S., Chowdhury J.R. Therapeutical potential of hepatocyte transplantation. *Semin. Cell Develop. Biol.* 13:439-446, 2002.
94. Guyton A.C. The liver as an organ. *Textbook of Medical Physiology* 2nd edition, 1995. p.835-840.
95. Habig W.H., Jakoby W.B. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Meth. Enzymol.* 77: 398-405, 1981.
96. Hieter P., Griffiths T. Polyploidy - More is more or less. *Science.* 285:210-211, 1999.
97. Higgins G.M., Anderson R.M. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.* 12:186-202, 1931.
98. Horslen S.P., McCowan T.C., Goertzen T.C., Warkentin P.I., Cai H.B., Strom S.C., Fox I.J. Isolated hepatocyte transplantation in an infant with a severe urea cycle disorder. *Pediatrics.* 111:1262-1267, 2003.
99. Hughes R.D., Cochrane A.M.G., Thomson A.D., Murray-Lyon I.M., Williams R. The cytotoxicity of plasma from patients with acute liver failure to isolated rabbit hepatocytes. *Br. J. Exp. Pathol.* 57:348-353, 1976.
100. Iwai M., Cui T.X., Kitamura H., Saito M., Shimazu T. Increased secretion of tumor necrosis factor and interleukin 6 from isolated, perfused liver of rats after partial hepatectomy. *Cytokine.* 13:60-64, 2001.
101. Jones C.G., Titheradge M.A. Measurement of metabolic fluxes through pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, pyruvate dehydrogenase, and pyruvate carboxylase in hepatocytes of different acinar origin. *Arch. Biochem. Biophys.* 326:202-206, 1995.

102. Jung E., Hoogland C., Chiappe D., Sanchez J.C., Hochstrasser D.F. The establishment of a human liver nuclei two-dimensional electrophoresis reference map. *Electrophoresis*. 21:3483-3487, 2000.
103. Jungermann K., Katz N. Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiol. Rev.* 69:708-764, 1989.
104. Jungermann K., Kietzmann T. Oxygen: modulator of metabolic zonation and disease of the liver. *Hepatology*. 31:255-260, 2000.
105. Kanzler S., Galle P. R. Apoptosis and the liver. *Semin. Cancer Biol.* 10:173-184, 2000.
106. Karnezis A.N, Dorokhov M., Grompe M., Zhu L. Loss of p27^{Kip1} enhances the transplantation efficiency transferred into diseased livers. *J. Clin. Invest.* 108:383-390, 2001.
107. Keeffe E.B. Liver transplantation: current status and novel approaches to liver replacement. *Gastroenterology*. 120:749-792.
108. Keppler D., Lesch R., Reutter W., Decker K. Experimental hepatitis induced by D-Galactosamine. *Exp. Mol. Pathol.* 9:279-290, 1968.
109. Kim D.K., McSweeney J., Yeh S.D., Fortner J.G. Tumors of the liver as demonstrated by angiography, scan, laparotomy. *Surg. Gynecol. Obstet.* 141:409-410, 1975.
110. Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* 161:1-151, 2001.
111. Kocken J.M., Bouwman E., Rinkes I.H.M.B. Sinaasappel M., Terpstra O.T. Observations on initial cell loss after intraportal hepatocyte transplantation of 5¹-bromo-deoxy-uridine- labeled hepatocytes. *Eur. Surg. Res.* 29:411-420, 1997.
112. Koniaris L.G., McKillop I.H., Schwartz S.I., Zimmers T.A. Liver regeneration. *J. Am. Coll. Surg.* 197:634-659, 2003.
113. Koolman J, Röhm KH. Atlas de Poche de Biochimie. Paris: Médecine-Sciences Flammarion. 1994. 426 p.
114. Kovalovich K., Li W., DeAngelis R., Greenbaum L.E., Ciliberto G., Taub R. *J. Biol. Chem.* 276:26605-26613, 2001.
115. Kudryavtsev BN, Kudryavtseva MV, Sakuta GA, Stein GI. Human hepatocyte polyploidization kinetics in the course of life cycle. *Virchows Arch. B Cell Pathol.* 64:387-393, 1993.

116. Laconi E., Oren R., Mukhopadhyay D.K., Hurston E., Laconi S., Pani P., Dabeva M., Shafritz D. Long-term, near-total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine. *Am. J. Pathol.* 153:319-329, 1998.
117. Laconi S., Pillai S., Porcu P.P., Shafritz D.A., Pani P., Laconi E. Massive liver replacement by transplanted hepatocytes in the absence of exogenous growth stimuli in rats treated with retrorsine. *Am. J. Pathol.* 158:771-777, 2001.
118. Laconi E, Laconi S. Principles of hepatocyte repopulation. *Semin. Cell Develop. Biol.* 13:433-438, 2002;
119. Lacronique V., Mignon A., Fabre M., Viollet B., Rouquet N., Molina T., Porteu A., Henrion A., Bouscary D., Varlet P., Joulin V., Kahn A. *Nature Med.* 2:80-86, 1996.
120. Lagasse E., Connors H., Al-Dhalimy M., Reitsma M., Dohse M., Osborne L., Wang X., Finegold L., Weissman I.L., Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nature Med.* 6:1229-1234, 2000.
121. Lamers W.H., Geerts W.J., Jonker A., Verbeek F.J., Wagenaar G.T., Moorman A.F. Quantitative graphical description of portocentral gradients in hepatic gene expression by image analysis. *Hepatology.* 26:398-406, 1997.
122. Leevy C.B. Abnormalities of liver regeneration: a review. *Digest. Dis.* 16:88-98, 1998.
123. Lemire J.M., Shiojiri N., Fausto N. Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-Galactosamine. *Am. J. Pathol.* 139:535-552, 1991.
124. Libbrecht L., Roskams T. Hepatic progenitor cells in human liver diseases. *Semin. Cell Develop. Biol.* 13:389-396, 2002.
125. Lindros K.O. Zonation of cytochrome P450 expression, drug metabolism and toxicity in liver. *Gen. Pharmacol.* 28:191-196, 1997.
126. Losser M.R., Payen D. Mechanisms of liver damage. *Semin. Liver Dis.* 16:357-367, 1996.
127. Majno G., Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 146:3-15, 1995
128. Makowka L., Rotstein L.E., Falk J.A., Nossal N.A., Langer B., Blendis L.M., Phillips M.J. Cellular transplantation in the treatment of experimental hepatic failure. *Science.* 210:901-903, 1980.

129. Makowka L., Rotstein L.E., Falk R.E., Falk J.A., Zuk R., Langer B., Blendis L.M., Phillips M.J. Allogeneic and xenogeneic hepatocyte transplantation. *Transplant. Proc.* 13:855-859, 1981.
130. Malhi H., Annamaneni P., Slehria S., Joseph B., Bhargava K.K., Palestro C.J., Novikoff P.M., Gupta S. Cyclophosphamide disrupts hepatic sinusoidal endothelium and improves transplanted cell engraftment in rat liver. *Hepatology.* 36:112-121, 2002
131. Malhi H., Gupta S. Hepatocyte transplantation: new horizons and challenges. *J. Hepatobiliary Pancr. Surg.* 8:40-50, 2001.
132. Malhi H., Irani A.N., Volenberg I., Schilsky M.L., Gupta S. Early cell transplantation in LEC rats modeling Wilson's disease eliminates hepatic copper with reversal of liver disease. *Gastroenterology.* 122:438-447, 2002.
133. Malik R., Mellor N, Selden C, Hodgson H. Triiodothyronine enhances the regenerative capacity of the liver following partial hepatectomy. *Hepatology.* 37:79-86, 2003.
134. Malik R., Selden C., Hodgson H. The role of non-parenchymal cells in liver growth. *Semin. Cell Develop Biol.* 13:425-431, 2002.
135. Mallet V.O., Régimbeau J.M., Mitchell C., Guidotti J.E., Soubrane O., Gilgenkrantz H. Stratégies de repeuplement du foie par avantage sélectif. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 26:480-485, 2002.
136. Mangipudy R.S., Chanda S., Mehendale H.M. Hepatocellular regeneration: key to thioacetamide autoprotection. *Pharm. Toxicol.* 77:182-188, 1995.
137. Mangipudy R.S., Chanda S., Mehendale H.M. Tissue repair response as a function of dose in thioacetamide hepatotoxicity. *Environ. Health Perspect.* 103:260-267, 1995.
138. Mangnall D., Bird N.C., Majeed A.W. The molecular physiology of liver regeneration following partial hepatectomy. *Liver Int.* 23:124-138, 2003.
139. Marderstein E.L., Bucher B., Guo Z., Feng X., Reid K., Geller D.A. Protection of rat hepatocytes from apoptosis by inhibition of c-Jun N-terminal kinase. *Surgery.* 134:280-285, 2003.
140. Matsumura T., Kashiwagi T., Meren H., Thurman R.G. Gluconeogenesis predominates in periportal regions of the liver lobule. *Eur. J. Biochem.* 144:409-415, 1984.
141. Mead J.E., Braun L., Martin D.A., Fausto N. Induction of replicative competence ("priming") in normal liver. *Cancer Res.* 50:7023-7030, 1990.

142. Michalopoulos G.K., DeFrances M.C. Liver regeneration. *Science*. 276:60-66, 1997.
143. Mignon A., Guidotti J.E., Mitchell C., Fabre M., Wernet A., De la Coste A., Soubrane O., Gilgenkrantz H., Kahn A. Selective repopulation of normal mouse liver by Fas/CD95-resistant hepatocytes. *Nature Med*. 4:1185-1188, 1998.
144. Minamishima Y.A., Nakayama K., Nakayama K.I. Recovery of liver mass without proliferation of hepatocytes after partial hepatectomy in Skp2-deficient mice. *Cancer Res*. 62:995-999, 2002.
145. Minato M., Houssin D., Demma I., Morin J., Gigou M., Szekely A.M., Bismuth H. Transplantation of hepatocytes for treatment of surgically induced acute hepatic failure in rat. *Eur. Surg. Res*. 16:162-169, 1984.
146. Moolten F.L., Oakman N.J., Bucher N.L.R. Accelerated response of hepatic DNA synthesis to partial hepatectomy in rats pretreated with growth hormone or surgical stress. *Cancer Res*. 30:2353-2357, 1970.
147. Mossin L., Blankson H., Huitfleddt H, Seglen P.O. Ploidy-dependent growth and binucleation in cultured rat hepatocytes. *Exp. Cell Res*. 214: 551-560, 1994.
148. Mukherjee D., Kaestner K.H., Kovalovich K.K., Greenbaum L.E. Fas-induced apoptosis in mouse hepatocytes is dependent on C/EBPbeta. *Hepatology*. 33:1166-1172, 2001.
149. Muntane J., Montero J.L., Marchal T., Perez-Seoane C., Lozano J.M., Fraga E., Pintado C.O., de la Mata M., Mino G. Effect of PGE1 on TNF-alpha status and hepatic D-galactosamine-induced apoptosis in rats. *J. Gastroenterol. Hepatol*. 13:197-207, 1998.
150. Nadal C. Polyploidie hépatique chez le rat. Mode de formation des cellules binucléées. *J. Microscopie*. 9:611-618, 1970.
151. Nagata S., Golstein P. The Fas death receptor. *Science*. 267:1449-1456, 1995.
152. Nagata H., Ito M., Cai J., Edge A.S., Platt J.L., Fox I.J. Treatment of cirrhosis and liver failure in rats by hepatocyte xenotransplantation. *Gastroenterology*. 124:422-431, 2003.
153. Nagata H., Ito M., Shirota C., Edge A., McCowan T.C., Fox I.J. Route of hepatocyte delivery affects hepatocyte engraftment in the spleen. *Transplantation*. 76: 732-734, 2003.
154. Nagy P., Teramoto T., Factor V.M., Sanchez A., Schnur J., Paju S., Thorgeirsson S.S. Reconstitution of liver mass *via* cellular hypertrophy in the rat. *Hepatology*. 33:339-345, 2001.

155. Nelsen C.J., Hansen L.K., Rickheim D.G., Chen C., Stanley M.W., Krek W., Albrecht J.H. *Oncogene*. 20:1825-1831, 2001.
156. Neuschwander-Tetri B.A., Caldwell S.H. Non alcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD single topic conference. *Hepatology*. 37:12102-1219, 2003.
157. Nyberg S.L., Misra S.P. Hepatocyte liver-assist systems – a clinical update. *Mayo Clin. Proc.* 73:765-771, 1998.
158. Ogasawara J., Watanabe-Fukunaga R., Adachi M., Matsuzawa A., Kasugai T., Kitamura K., Itoh N., Suda T., Nagata S. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature*. 364:806-809, 1993.
159. Oh S.H., Hatch H.M., Petersen B.E. Hepatic oval stem cell in liver regeneration. *Semin. Cell Develop. Biol.* 13:405-409, 2002.
160. Oinonen T., Lindros K.O. Zonation of hepatic cytochrome P-450 expression and regulation. *Biochem. J.* 329:17-35, 1998.
161. Oren R., Dabeva M.D., Karnezis A.N., Petkov P.M., Rosencrantz R., Sandhu J.P., Moss S.F., Wang S., Hurston E., Laconi E., Holt P.R., Thung S.N., Zhu L., Shafritz D.A. Role of thyroid hormone in stimulating liver repopulation in the rat by transplanted hepatocytes. *Hepatology*. 30:903-913, 1999.
162. Oren R., Dabeva M.D., Petkov P.M., Hurston E., Laconi E., Shafritz D.A. Restoration of serum albumin levels in Nagase analbuminemic rats by hepatocyte transplantation. *Hepatology*. 29:75-81, 1999.
163. Overturf K., Al-Dhalimy M., Ou C.N., Finegold M., Grompe M. Serial transplantation reveals the stem-like potential of adult mouse hepatocytes. *Am. J. Pathol.* 151:1273-1280, 1997.
164. Overturf K., Al-Dhalimy M., Finegold M., Grompe M. The repopulation potential of hepatocyte populations differing in size and prior mitotic expansion. *Am. J. Pathol.* 155:2135-2143, 1999.
165. Parker-Ponder K., Gupta S., Leland F., Darlington G., Finegold M., DeMayo J., Ledley F.D., Chowdhury J.R., Woo S.L.C. Mouse hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intrasplenic transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88:1217-12221, 1991.
166. Petersen B.E., Zajac V.F., Michalopoulos G.K. Hepatic oval cell activation in response to injury following chemically induced periportal or pericentral damage in rats. *Hepatology*. 27:1030-1038, 1998.
167. Petersen B.E., Bowen W.C., Patrene K.D., Mars W.M., Sullivan A.K., Murase N., Boggs S.S., Greenberger J.S., Goff J.P. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*. 284:1168-1170, 1999.

168. Petropoulos C.J., Yaswen P., Panzica M., Fausto N. Cell lineages in liver carcinogenesis: possible clues from studies of the distribution of alpha-fetoprotein RNA sequences in cell populations isolated from normal, regenerating, and preneoplastic rat livers. *Cancer Res.* 45, 5762-5768, 1985.
169. Phelps C.J., Koike C., Vaugh T.D. *et al.* Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science.* 299:411-414, 2003.
170. Pinkowski M.J., Brunner T., Green D.R., Lin T. Fas and Fas ligand in gut and liver. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278:G354-G366, 2000.
171. Poliard A.M., Bernuau D., Tournier I., Legres L.G., Schoevaert D., Feldmann G., Sala-Trepat J.M. Cellular analysis by *in situ* hybridization and immunoperoxidase of alpha-fetoprotein and albumin gene expression in rat liver during the perinatal period. *J. Cell Biol.* 103:777-786, 1986.
172. Preston S.L., Alison M.R., Forbes S.J., Direkze N.C., Poulson R., Wright N.A. The new stem cell biology: something for everyone. *Molec. Pathol.* 56:86-96, 2003.
173. Prockop D.J. Further proof of the plasticity of adult stem cells and their role in tissue repair. *J. Cell Biol.* 160:807-809, 2003.
174. Quistorff B., Dich J., Grunnet N. Periportal and perivenous hepatocytes retain their zonal characteristics in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 139:1055-1061, 1986.
175. Rabes H. Kinetics of hepatocellular proliferation after partial resection of the liver. *Prog. Liver Dis.* 5:83-99, 1976.
176. Racine L., Scoazec J.Y., Moreau A., Bernuau D., Feldmann G. Effects of digitonin on the intracellular content of rat hepatocytes: implications for its use in the study of intralobular heterogeneity. *J. Histochem. Cytochem.* 41:991-1001, 1993.
177. Régimbeau J.M., Mallet V.O., Bralet M.P., Gilgenkrantz H., Houssin D., Soubrane O. Transplantation d'hépatocytes isolés - Principes, mécanismes, applications expérimentales et résultats chez l'homme. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 26:591-601, 2002.
178. Reinke L.A., Moyer M.J. p-Nitrophenol hydroxylation. A microsomal oxidation which is highly inducible by ethanol. *Drug Metab. Dispos.* 13:548-552, 1985.
179. Rhim J.A., Sandgren E.P., Degen J.L., Palmiter R.D., Brinster R.L. Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science.* 263:1149-1152, 1994.

180. Riordan S.M., Williams R. Mechanisms of hepatocyte injury, multiorgan failure, and prognostic criteria in acute liver failure. *Semin. Liver Dis.* 23:203-215, 2003.
181. Roger V., Balladur P., Honiger J., Baudrimont M., Robert A., Calmus Y., Capeau J., Nordlinger B. Un bon modèle d'insuffisance hépatique aiguë: l'hépatectomie de 95%. Traitement par la transplantation d'hépatocytes. *Chirurgie.* 121:470-473, 1996.
182. Rosenthal N. Prometheus' vulture and the stem-cell promise. *N. Engl. J. Med.* 349:267-274, 2003.
183. Sakamoto T., Ezure T., Lunz J., Murase N., Tsuji H., Fung J.J., Demetris A.J. Concanavalin A simultaneously primes liver hematopoietic and epithelial progenitor cells for parallel expansion during liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology.* 32:256-267, 2000.
184. Sakuta G.A., Kudriavtsev B.N. The cellular mechanisms of the regeneration of the cirrhotic liver in rats. I. The correlation of the processes of cellular proliferation, polyploidization and hypertrophy after the cessation of chronic exposure to carbon tetrachloride. *Tsitologiya.* 38:1158-1170, 1996.
185. Sanz N., Diez-Fernandez C., Fernandez-Simon L., Alvarez A., Cascales M. Relationship between antioxidant systems, intracellular thiols and DNA ploidy in liver of rats during experimental cirrhogenesis. *Carcinogenesis.* 16:1585-1593, 1995.
186. Sauer I.M., Zeilinger K., Pless G., Kardassis D., Theruvath T., Pascher A., Goetz M., Neuhaus P., Gerlach J.C. Extracorporeal liver support based on primary human liver cells and albumin dialysis - Treatment of a patient with primary graft non-function. *J. Hepatol.* 39:649-653, 2003.
187. Saxena R., Theise N.D., Crawford J.M. Microanatomy of the human liver - Exploring the hidden interfaces. *Hepatology.* 30:1339-1346, 1999.
188. Schanne F.A.X., Pfau R.G., Farber J.L. Galactosamine-induced cell death in primary cultures of rat hepatocytes. *Am. J. Pathol.* 100:25-38, 1980.
189. Schiff L., Schiff E.R. Diseases of the liver. 6th edition. Philadelphia: J.B. Lippicott Company. 1987. 1506p.
190. Schmucker D.L. Hepatocyte fine structure during maturation and senescence. *J. Electron Microsc. Techn.* 14:106-125, 1990.
191. Schwabe R.F., Bradham C.A., Uehara T., Hatano E., Bennett B.L., Schoonhoven R., Brenner D.A. c-Jun-N-terminal kinase cyclin D1 expression and proliferation during liver regeneration. *Hepatology.* 37:824-832, 2003.

192. Scoazec J.Y. Cellules souches et régénération hépatique. *Encycl. Med. Chir.* Paris: Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS. Hépatologie. 7-005-A-34, 6 p., 2003.
193. Scotté M., Laquerrière A., Masson S., Hiron M., Hémet J., Lebreton J.P., Daveau M. Transforming growth factor α (TGF- α) expression correlates with DNA replication in regenerating rat liver whatever the hepatectomy extent. *Liver*. 17:171-176, 1997.
194. Seglen P.O. DNA ploidy and autophagic protein degradation as determinants of hepatocellular growth and survival. *Cell Biol. Toxicol.* 13:301-315, 1997.
195. Seglen P.O., Saeter G., Schwarze P.E. Proliferation of diploid hepatocytes and nonparenchymal (oval) cells during rat liver regeneration in the presence of 2-acetylaminofluorene. *Int. J. Oncol.* 5:805-810, 1994.
196. Sell S. Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology*. 33:738-750, 2001.
197. Sen S., Williams R. New liver support devices in acute liver failure: a critical evaluation. *Semin. Liver Dis.* 23:283-294, 2003.
198. Shackel N.A., Gorrell M.D., McCaughan G.W. Gene array and the liver. *Hepatology*. 36: 1313-1325, 2002.
199. Sigal S.H., Brill S., Fiorino A.S., Reid L.M. The liver as a stem cell lineage system. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 263:G139-G148, 1992.
200. Sigal S.H., Rajvanshi P., Gorla G.R., Sokhi R.P., Saxena R., Gebhard D.R., Reid L.M, Gupta S. Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 276:G1260-G1276, 1999.
201. Simpson G.E.C., Finckh E.S. The pattern of regeneration of rat liver after repeated partial hepatectomies. *J. Path. Bact.* 86:361-370, 1963.
202. Smith A. In search of pluripotency. *Curr. Biol.* 8:R802-R804, 1998.
203. Sokal E.M., Smets F., Bourgois A., Van Maldergem L., Buts J.P., Reding R., Bernard Otte J., Evrard V., Latinne D., Vincent M.F., Moser A., Soriano H.E. Hepatocyte transplantation in a 4-year-old girl with peroxisomal biogenesis disease: technique, safety, and metabolic follow-up. *Transplantation*. 76:735-738, 2003.
204. Sommer B.G., Sutherland D.E.R., Matas A.J., Simmons R.L., Najarian J.S. Hepatocellular transplantation for treatment of D-galactosamine-induced acute liver failure in rats. *Transplant. Proc.* 11:578-584, 1979.

205. Stachlewitz R.F., Seabra V., Bradford B., Bradham C.A., Rusyn I., Germolec D., Thurman R.G. Glycine and uridine prevent D-galactosamine hepatotoxicity in the rat: role of Kupffer cells. *Hepatology*. 29:737-745, 1999.
206. Stockmann H.B.A.C., Ijzermans J.N.M. Prospects for the temporary treatment of acute liver failure. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 14:195-203, 2002.
207. Strain A.J., Crosby H.A.. Hepatic stem cells. *Gut*. 46:743-745, 2000.
208. Strain A., Neuberger J.M. A bioartificial liver – State of art. *Science*. 295:1005-1009, 2002.
209. Su A.I., Guidotti L.G., Pezacki J.P., Chisari F.V., Schultz P.G. Gene expression during the priming phase of liver regeneration after partial hepatectomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99:11181-11186, 2002.
210. Sun T., Chan M.L., Zhou Y., Xu X., Zhang J., Lao X., Wang X., Quek C.H., Chen J.P., Leong K.W., Yu H. Use of ultrathin shell microcapsules of hepatocytes in bioartificial liver-assist device. *Tissue Eng.* 9:S65-S75, 2003.
211. Susick R., Moss N., Kubota H., LeCluyse E., Hamilton G., Luntz T., Ludlow J., Fair J., Gerber D., Bergstrand K., White J., Bruce A., Drury O., Gupta S., Reid L.M. Hepatic progenitors and strategies for liver cell therapies. *Ann. NY Acad. Sci.* 944:398-419, 2001.
212. Sutherland D.E.R, Numata M., Matas A.J., Simmins R.L., Najarian J.S. Hepatocellular transplantation in acute liver failure. *Surgery*. 82:124-132, 1977.
213. Suzuki A., Nakauchi H. Identification and propagation of liver stem cells. *Semin. Cell Develop. Biol.* 13:455-461, 2002.
214. Tan J., Hytioglou P., Wiczorek R., Park Y.N., Thung S.N., Arias B., Theise N.D. Immunohistological evidence for hepatic progenitor cells in liver diseases. *Liver*. 22:365-373, 2002.
215. Theise N.D. Liver stem cells: the fall and rise of tissue biology. *Hepatology*. 38: 804-806, 2003.
216. Theise N.D., Bavde S., Saxena R., Henegariu O., Sell S., Crawford J.M., Krause D.S.. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology*. 31:235-240, 2000.
217. Theise N.D., Saxena R., Portmann B.C., Thung S.N., Yee H., Chiriboga L., Kumar A., Crawford J.M.. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology*. 30, 1425-1433, 1999.

218. Theocharis S.E., Marglei A.P., Agapitos E.V., Mykoniatis M.G., Kittas C.N. Effect of hepatic stimulator substance administration on tissue regeneration due to thioacetamide-induced-liver injury in rats. *Scand. J. Gastroenterol.* 33:656-663, 1998.
219. Thompson C. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of human disease. *Science.* 267:1456-1462, 1995.
220. Torres S., Diaz B.P., Cabrera J.J., Diaz-Chico J.C., Diaz-Chico B.N., Lopez-Guerra A. Thyroid hormone regulation of rat hepatocyte proliferation and polyploidization. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 276:G155-G163, 1999.
221. Tournier I., Legres L., Schoevaert D., Feldmann G, Bernuau D. Cellular analysis of alpha-foetoprotein gene activation during carbon tetrachloride and D-galactosamine-induced acute liver injury in rats. *Lab. Invest.* 59:657-665, 1998.
222. Tsutsui S., Hirasawa K., Takeda M., Itagaki S., Kawamura S., Maeda K., Mikami T., Doi K. Galactosamine-induced apoptosis in the primary mouse hepatocyte cultures. *Exp. Toxicol. Pathol.* 49:301-306, 1997.
223. Ujike K., Shinji T., Hirasaki S., Shirahara H., Nakamura M., Tsuji T., Koide N. Kinetics of expression of connective tissue growth factor gene during liver regeneration after partial hepatectomy and D-galactosamine-induced liver injury in rats. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 277:448-454, 2000.
224. Vassilopoulos G., Wang P.R., Russell D.W. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature.* 422:901-904, 2003.
225. Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., *et al.* The sequence of the human genome. *Science.* 291:1304-1351, 2001.
226. Vinogradov A.E., Anatskaya O.V., Kudryavtsev B.N. Relationship of hepatocyte ploidy levels with body size and growth rate in mammals. *Genome.* 44:350-360, 2001.
227. Viollon-Abadie C., Bigot-Lasserre D., Nicod L., Carmichael N., Richert L. Effects of model inducers on thyroxine UDP-Glucuronosyl-transferase activity *in vitro* in rat and mouse hepatocyte cultures. *Toxicol. In Vitro.* 14:505-512, 2000.
228. Volarevic S., Stewart M.J., Ledermann B., Zilberman F., Terracciano L., Montini E., Grompe M., Kozma S.C., Thomas G. Proliferation, but not growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6. *Science.* 288:2045-2047, 2000.

229. Vons C., Loux N., Simon L., Mahieu-Caputo D., Dagher I., Andreoletti M., Borgnon J., Di Rico V., Bargy F., Capron F., Weber A., Franco D. Transplantation of hepatocytes in nonhuman primates: a preclinical model for the treatment of hepatic metabolic diseases. *Transplantation*. 72:811-818, 2001.
230. Wallenius V., Wallenius K., Jansson J.O. Normal pharmacologically-induced, but decreased regenerative liver growth in interleukin-6-deficient (IL-6^{-/-}) mice. *J. Hepatol*. 33:967-974, 2000.
231. Wang T., Shankar K., Ronis M.J.J., Mehendale H.M. Potentiation of thioacetamide liver injury in diabetic rats is due to induced CYP2E1. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 294:473-479, 2000.
232. Wang X., Al-Dhalimy M., Lagasse E., Finegold M., Grompe M. Liver repopulation and correction of metabolic liver diseases by transplanted adult mouse pancreatic cells. *Am. J. Pathol.* 158:571-579, 2001.
233. Wang X., Foster M., Al-Dhalimy M., Lagasse E., Finegold M., Grompe M. The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:S11881-S11888, 2003.
234. Wang X., Willenbring H., Akkari Y., Torimaru Y., Foster M., Al-Dhalimy M., Lagasse E., Finegold M., Olson S., Grompe M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow derived hepatocytes. *Nature*. 422:897-901, 2003.
235. Watanabe F.D., Mullon C.J., Hewitt W.R., Arkadopoulos N., Kahaku E., Eguchi S., Khalili T., Arnaout W., Shackleton C.R., Rozga J., Solomon B., Demetriou A.A. Clinical experience with a bioartificial liver in the treatment of severe liver failure A phase I clinical trial. *Ann. Surg.* 225:484-494, 1997.
236. Webber E.M., Bruix J., Pierce R.H., Fausto N. Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat. *Hepatology*. 28:1226-1234, 1998.
237. Weglarz T.C., Degen J.L., Sandgren E.P. Hepatocyte transplantation into diseased mouse liver. Kinetics of parenchymal repopulation and identification of the proliferative capacity of tetraploid and octoploid hepatocytes. *Am. J. Pathol.* 157:1963-1974, 2000.
238. Weglarz T.C., Sandgren E.P. Timing of entry into DNA synthesis after partial hepatectomy in cell autonomous. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:12595-12600, 2000.
239. Yamamoto H., Quinn G., Asari A., Yamanokuchi H., Teratani T., Terada M., Ochiya T. Differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes: biological functions and therapeutic applications. *Hepatology*. 37:983-993, 2003.

240. Yamane A., Seetharam L., Yamaguchi S., Gotoh N., Takahashi T., Neufeld G., Shibuya M. A new communication system between hepatocytes and sinusoidal endothelial cells in liver through vascular endothelial growth factor and Flt tyrosine kinase receptor family (Flt-1 and KDR/Flt-1). *Oncogene*. 9:2683-2690, 1994.
241. Yazigi N.A., Carrick T.L., Bucuvalas J.C., Schmidt C.S., Balistreri W.F., Bezerra J.A. Expansion of transplanted hepatocytes during liver regeneration. *Transplantation*. 64:816-820, 1997.
242. Yin X.M. Bid, a critical mediator for apoptosis induced by the activation of Fas/TNF-R1 death receptors in hepatocytes. *J. Molec. Med.*78:203-211, 2000.
243. Zajicek G., Oren R., Weinreb M. The streaming liver. *Liver*. 5:293-300, 1985.
244. Zvibel I., Smets F., Soriano H. Anoikis: roadblock to cell transplantation. *Cell Transplant*. 11:621-630, 2002.

ANNEXE

PREPARATION DU MILIEU DE MONTAGE

- Préparer un tampon phosphate (pH=7,4) contenant 0,1M KH_2PO_4 et 0,15M NaCl .
- Préparer un tampon carbonate/bicarbonate (pH=9) contenant 0,35M Na_2CO_3 et 0,35M NaHCO_3 .
- Mélanger 10 ml de tampon phosphate avec 100 mg de paraphénylène diamine et ajuster le pH à 8 à l'aide du tampon carbonate/bicarbonate.
- Compléter à 100 ml avec du glycérol. Répartir en aliquots et conserver à l'abri de la lumière à -20°C jusqu'à utilisation.