

## **Thérapie cellulaire dans le diabète type 1**

### **1. Le diabète de type 1 :**

#### **Définition**

Autrefois appelé diabète insulino-dépendant (ou encore diabète juvénile), cette maladie apparaît le plus souvent de manière brutale chez l'enfant ou chez le jeune adulte. Elle se caractérise par une émission d'urine excessive (polyurie) et une soif intense (polydipsie). Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune aboutissant à une destruction totale des cellules bêta des îlots de Langerhans qui sont responsables de la production de l'insuline ;

Chez les mammifères, la sécrétion d'insuline par ces cellules joue un rôle majeur dans l'homéostasie énergétique et le contrôle de la glycémie. Une augmentation du débit de sécrétion de l'insuline est le seul moyen dont l'organisme dispose pour lutter contre l'hyperglycémie, alors qu'il existe plusieurs facteurs nerveux ou hormonaux hyperglycémisants dont la libération est déclenchée par l'hypoglycémie.

La destruction de ces cellules situées dans le pancréas a pour conséquence une absence d'insuline dans le sang. Les diabétiques de type 1 doivent donc s'injecter de l'insuline plusieurs fois par jour tout au long de leur vie.

Les contraintes liées à cette maladie sont grandes. De nombreuses recherches sont faites pour tenter de trouver un traitement moins contraignant.

La thérapie cellulaire utilisant les cellules souches suscite de plus en plus d'espoir. En effet, ces cellules pourraient permettre le remplacement des cellules non fonctionnelles.

### **2. Présentation générale du pancréas**

Le pancréas est une glande formée de 3 compartiments épithéliaux comprenant :

- 1) le système canalaire
- 2) le compartiment exocrine ou acini

3) les amas cellulaires endocrine.

Le pancréas remplit deux fonctions essentielles.

- La sécrétion de nombreux sucs (ou enzymes) nécessaire à la transformation des aliments en substances simples.
- La sécrétion des hormones :
  - les cellules alpha permettent la sécrétion de glucagon par exemple
  - les cellules bêta qui sont responsables de la sécrétion d'insuline
  - les cellules delta sécrètent la somatostatine
  - et les cellules gamma qui sont responsables de la sécrétion du peptide pancréatique.

### **3. La thérapie cellulaire :**

La transplantation d'îlots comme traitement potentiel du diabète a été explorée intensivement depuis ces quinze dernières années. Le but de la greffe d'îlots est d'améliorer l'équilibre glycémique du receveur, dans l'espoir d'améliorer sa qualité de vie et de le protéger des complications liées au diabète.

Ceci se fait au prix d'un traitement immunosuppresseur (anti-rejet) potentiellement à vie. La transplantation d'organes provenant d'humain a montré des résultats positifs. Cependant, la « disponibilité des organes » pose de gros problèmes. En effet, la proportion donneur / receveur est très faible. Les chercheurs ont tenté de trouver des solutions à cette « pénurie » d'organes.

Actuellement, il existe trois sources principales de cellules renouvelables qui peuvent être utilisés.

1. Les xeno-îlots.

2. Les lignées tumorales ou les lignées transformées

3. Les cellules souches.

- Concernant les xeno-îlots, le porc a été identifié comme le donneur animal le plus adapté. Cependant, en plus du rejet de greffes, le risque de

contamination virale est un problème supplémentaire des xéno transplantations.

- En ce qui concerne les lignées tumorales ou transformées, d'origine pancréatique, leur utilisation dans la thérapie cellulaire du diabète est restreinte par plusieurs inconvénients comme par exemple une grande sensibilité au glucose, pour des concentrations faibles en glucose.
- Et la dernière alternative utilisée pour la transplantation d'organes ou de tissus est l'utilisation de cellules souches, qui comme nous avons pu le voir précédemment sont des cellules capables d'auto renouvellement et de différenciation multi lignages.

Le concept de remplacement des cellules bêta par des cellules souches a été proposé pour la première fois par Paul Laucy en 1967

L'utilisation de cellules souches en tant que source potentielle des cellules bêta permettrait de résoudre le problème de la quantité d'îlots disponibles. Cette voie de recherche est à l'heure la plus prometteuse.

### **3.1 Utilisation des cellules souches embryonnaires :**

Les cellules ES sont considérées comme une source potentiellement illimitée de cellules appropriées à la génération des cellules sécrétant de l'insuline.

En effet, ces cellules sont capables de normaliser l'homéostasie du glucose lorsqu'elles sont transplantées dans un modèle expérimental de diabète ;

Afin d'obtenir ces cellules qui ont la capacité de sécréter de l'insuline, trois étapes sont nécessaires :

- La différenciation
- La sélection de lignage
- La maturation

Le processus de différenciation commence avec des ES non différenciées pluripotente qui sont cultivées en l'absence de facteur inhibiteur de leucémie (FIL) et cultivées dans des plaques bactériennes, formant des corps embryoïdes (CE). Les CE expriment des transcriptions de gènes spécifiques endocrines (insuline,

glucagon et Peptide pancréatique) et exocrines (amylase, élastase et carbopeptidase), suggérant que les facteurs transcriptionnels impliqués dans leur régulation sont fonctionnels dans ces cellules souches embryonnaires.

Pour améliorer la différenciation, il faudra utiliser des conditions de culture adéquate afin d'augmenter la proportion des précurseurs d'îlots. En effet, lorsque les cellules ES se différencient en l'absence de facteurs de différenciation spécifiques, une fraction faible de cellules possède les caractéristiques des cellules bêta.

La stratégie de sélection de lignage cellulaire est basée sur l'expression de l'insuline. Les cellules ES sont transfectées par une construction chimérique contenant le gène de la néomycine (antibiotique) et le gène de la bêta-galactosidase. Ces deux gènes sont sous le contrôle de la région promotrice du gène de l'insuline. Ceci permet donc la sélection de cellules sécrétant l'insuline.

De plus, l'expression de la  $\beta$ -galactosidase rend possible l'identification histochimique de cellules transplantées. Le système de sélection de lignage cellulaire peut avoir de multiples variants, comme l'utilisation de région promotrice d'autres marqueurs, par exemple Pdx-1 (pancreatic duodenum homeobox) et PP (polypeptide pancréatique).

Le point le plus difficile est d'atteindre un équilibre entre la prolifération des précurseurs, nécessaire pour obtenir une masse adéquate, et le processus de maturation de cellules. Les signaux qui favorisent la prolifération ne rendent pas les cellules mûres.

Bien que les étapes exactes à travers lesquelles les cellules passent pendant la différenciation *in vitro* soient inconnues, la différenciation *in vitro* peut récapituler certaines des étapes du développement *in vivo*. Par conséquent, la majorité des protocoles de maturation sont basés sur les connaissances acquises lors d'études sur les îlots foetaux, la régénération pancréatique du rat et les cellules adultes du canal pancréatique.

Les meilleurs résultats ont été obtenus en exposant les cultures de cellules proliférantes à 10 mM de nicotinamide + 25 mM de glucose pendant 2 semaines

puis 10 mM de nicotinamide + 5 mM de glucose pendant 5 jours. Ce protocole a donné des cellules ayant un fort contenu en insuline.

Quand ces cellules contenant de l'insuline ont été transplantées à des souris diabétiques, leur glycémie se normalisait dans la semaine et le poids corporel se rétablissait en quatre semaines. Le suivi à long terme de ces animaux montrait que le glucose restait à des taux normaux après 40 semaines. De plus, l'immunohistochimie retrouvait des cellules positives pour l'insuline 4 mois après la greffe.

Certains facteurs sont nécessaires pour obtenir des cellules sécrétrices d'insuline. Parmi ceux-ci on cite Pdx1 et Pax-4. Leur implication a été montrée chez des souris.

En effet, les souris possédant Pdx-1 mutant ne développent pas de pancréas. De plus, les souris déficientes en Pax-4 sont toutes diabétiques. Les auteurs ont donc analysé l'influence de l'expression constitutive des gènes Pdx1 et Pax4 sur la différenciation des cellules ES en cellules pancréatiques.

Pour induire la formation de cellules sécrétrices d'insuline, les chercheurs ont utilisé une stratégie permettant la surexpression du gène Pax4 dans les cellules ES.

Cette stratégie a permis d'obtenir un nombre important de cellules sécrétant de l'insuline. Ces résultats prouvent que le gène Pax1 doit jouer un rôle important dans la différenciation des cellules ES en cellules bêta pancréatiques. De plus, le fait que les cellules alpha et bêta se développent à partir de précurseur positif Pdx-1 suggère que toutes les cellules des îlots de Langerhans proviennent d'un progéniteur endocrine commun.

### **3.2 Utilisation de cellules souches foetales :**

Plusieurs groupes de chercheurs étudient l'utilisation du tissu foetal comme source potentielle pour la production de cellules composant les îlots de Langerhans. Par exemple, les chercheurs ont transplanté des îlots foetaux d'humains isolés ou le tissu entier chez des souris Nude.

Les chercheurs ont conclu que les cellules précurseurs des îlots cultivés pouvaient proliférer et se différencier en un tissu fonctionnel. Cependant, les cellules extraites des îlots (donc déjà différenciées) ne pourraient plus proliférer une fois greffées. Malgré ces résultats encourageants, les chercheurs ont trouvé,

### 3.3 Utilisation des cellules souches adultes :

La possibilité de générer une nouvelle cellule bêta à partir de cellules souches adultes isolées permettrait d'éviter les problèmes d'éthique liés à l'utilisation des cellules ES.

Les candidats proposés sont :

- les cellules « nestin-positives » isolées d'îlots murins et humains ;
- des cellules précurseurs intra îlot exprimant la somatostatine et le facteur de transcription Pdx-1 ;
- les cellules souches adultes hépatiques (cellules ovales);
- les cellules des canaux.

Parmi tous ces candidats, les cellules souches pancréatiques semblent être les cellules des canaux. Le tissu des canaux de pancréas humain peut être étalé en culture et puis être dirigé vers une différenciation en tissu des îlots répondant au glucose in vitro. Les «bourgeons» d'îlots humains obtenus à partir de cellules des canaux pancréatiques humains exprimaient plusieurs des facteurs de transcription qui sont normalement observés dans l'ontogenèse pancréatique. De plus, les « bourgeons » multipliaient par deux l'insuline sécrétée quand ils étaient exposés à des concentrations stimulantes de glucose. Donc, l'identité des cellules souches adultes pancréatiques est encore inconnue, mais une meilleure caractérisation des candidats cellulaires mentionnés ci-dessus (particulièrement les précurseurs cellulaires obtenus à partir des cellules des canaux) devrait permettre l'identification correcte des cellules souches adultes pancréatiques.