

CONTRÔLE DU DÉVELOPPEMENT DU PANCRÉAS

par

R. SCHARFMANN*, C. CRAS-MÉNEUR**,
A. BASMACIOGULLARI* et B. DUVILLIÉ*

INTRODUCTION

Nous nous intéressons depuis de nombreuses années au contrôle du développement du pancréas. De manière schématique, il existe dans le pancréas des cellules progénitrices qui ne sont pas encore caractérisées. Ces cellules prolifèrent ou se différencient en cellules à propriétés endocrines ou acinaires sous l'effet de signaux qu'il reste à déterminer. Nous nous intéressons particulièrement à la caractérisation des cellules pancréatiques progénitrices, ainsi qu'aux facteurs qui contrôlent le développement des cellules progénitrices en cellules endocrines matures (fig. 1).

FACTEURS SOLUBLES QUI CONTRÔLENT LE DÉVELOPPEMENT DU PANCRÉAS

Données de la littérature

La compréhension du développement du pancréas a fait l'objet ces dernières années de très nombreux travaux. Différents facteurs de transcription ont été impliqués comme étant nécessaires au développement harmonieux du pancréas chez les rongeurs et chez l'Homme [1]. De plus, les mécanismes et facteurs qui contrôlent le développement du pancréas commencent à être mieux compris. Dans ce cadre, il a été démontré que le développement du pancréas était contrôlé par des signaux dérivant de 3 origines : de la notochorde à des stades très précoces du développement ;

* INSERM U457 et EO363, Hôpital Robert-Debré, Paris, France.

** INSERM U457, Hôpital Robert-Debré, Paris, France.

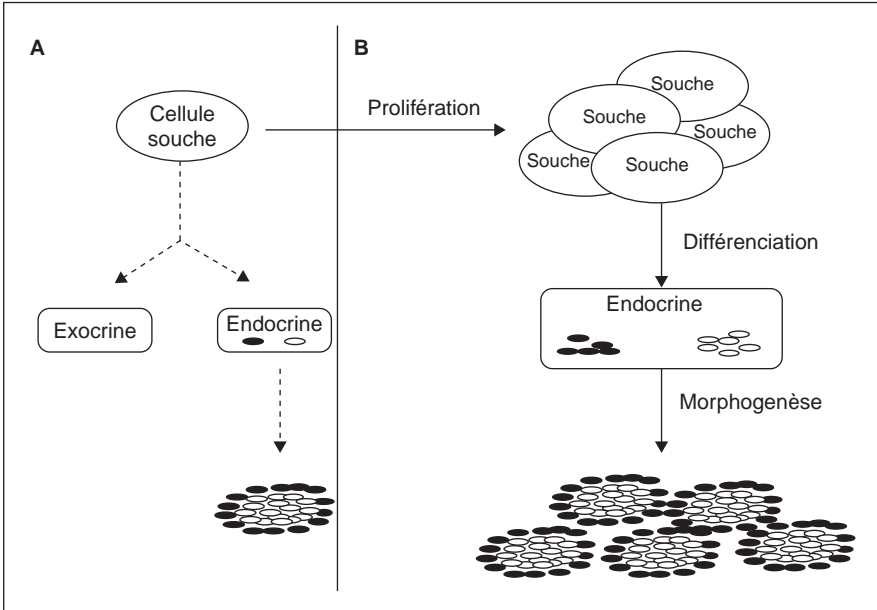


FIG. 1. — Développement du pancréas. En blanc, sont présentées les cellules β qui produisent de l'insuline ; en noir, les cellules qui produisent le glucagon.

des vaisseaux sanguins plus tard [2] et finalement du mésenchyme pancréatique [3, 4]. Nous nous intéressons aux signaux dérivant du mésenchyme et contrôlant le développement des cellules de l'épithélium pancréatique embryonnaire.

Nos résultats

Nous avons récemment mis au point un modèle expérimental simple qui nous permet de disséquer les étapes du développement du pancréas. Brièvement, nous disséquons des rudiments pancréatiques de rats au 12^e jour de vie embryonnaire. Nous mettons en culture, soit les rudiments entiers (mésenchyme + épithélium), soit l'épithélium déplété de son mésenchyme. L'épithélium représente la source de tissu qui contient les cellules précurseurs qui peuvent se différencier en tissu exocrine ou en tissu endocrine. Le mésenchyme, en revanche, représente la source possible de facteurs qui contrôlent le développement de ces cellules précurseurs.

En présence de mésenchyme, l'épithélium prolifère de manière massive, et se différencie principalement en tissu acinaire alors que peu de cellules endocrines se développent. De plus, ces quelques cellules endocrines sont immatures. Par contre, en absence de mésenchyme, les cellules de l'épithélium ne prolifèrent pratiquement pas et se différencient principalement en tissu endocrine. Ces cellules endocrines sont nombreuses et matures. Par exemple, la sécrétion d'insuline par ces cellules est contrôlée par le glucose [5]. Le mésenchyme contrôle donc de manière positive la prolifération des cellules de l'épithélium pancréatique embryonnaire. Il contrôle aussi de manière positive le développement des cellules acinaires. Par contre, le mésenchyme réprime le développement des cellules de

l'épithélium pancréatique en cellules à propriétés endocrines [4]. Nous avons alors utilisé ce modèle expérimental pour disséquer les facteurs qui contrôlent ces différentes étapes du développement.

Nous avons d'abord étudié l'implication de signaux transduits par la voie MAP kinase dans la prolifération et la différenciation des cellules de l'épithélium pancréatique immature. Des expériences de pertes de fonction *in vitro* en utilisant des inhibiteurs spécifiques, nous ont permis de montrer que l'inhibition de la voie MAP kinase réprimait la prolifération des cellules épithéliales et activait la différenciation endocrine [6, 7]. Nous avons alors réalisé des expériences de gain de fonction utilisant des ligands de récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK). Nous avons testé les effets de l'EGF et de différents FGF. Le choix de ces ligands est basé sur un criblage que nous avons fait pour des ligands de RTK exprimés dans l'épithélium pancréatique embryonnaire [8]. Il est aussi basé sur nos données indiquant que les cellules de l'épithélium pancréatique embryonnaire de souris déficientes en FGF-10 ne prolifèrent pratiquement pas, générant un pancréas atrophique [9]. Nos résultats indiquent que l'EGF et différents FGF activent la prolifération des cellules de l'épithélium pancréatique embryonnaire [6, 10, 11].

De plus, nos résultats indiquent que les cellules épithéliales qui ont proliféré en présence d'EGF ou de FGF sont des cellules progénitrices. En effet, quand des épithéliums pancréatiques sont d'abord cultivés en présence d'EGF ou FGF pour accroître la masse de cellules épithéliales immatures, le retrait de l'EGF/FGF dans un deuxième temps induit une différenciation en masse de ces cellules immatures en cellules β matures [6, 7].

CARACTÉRISATION DES CELLULES PROGÉNITRICES DU PANCRÉAS

Données de la littérature

Peu de données existent dans la littérature concernant les cellules progénitrices du pancréas. Il est établi que ces cellules sont d'origine endodermique, qu'elles sont localisées dans l'épithélium pancréatique embryonnaire, qu'elles n'expriment pas de marqueurs de différenciation terminale et qu'elles exprimeraient le facteur de transcription PDX-1 [12]. On peut aussi aisément imaginer que leur présence est plus fréquente dans le pancréas embryonnaire que dans le pancréas adulte. Toutefois, on manque de 3 outils cruciaux pour avancer dans la caractérisation de telles cellules : 1) des marqueurs membranaires permettant de trier ces cellules comme c'est le cas dans le système hématopoïétique ou le cerveau [13] ; 2) des bio-essais dans lesquels ces cellules peuvent se développer ; 3) des facteurs solubles qui contrôlent la prolifération et la différenciation de ces cellules progénitrices.

Nos résultats

Nous suivons actuellement différentes approches qui pourraient nous permettre de définir de nouveaux marqueurs des cellules progénitrices du pancréas.

Une première approche consiste à rechercher dans le pancréas embryonnaire l'expression de marqueurs de membranes connus qui sont exprimés dans les

cellules progénitrices d'autres tissus. C'est par exemple ce que nous avons fait pour CD117 (c-Kit) dont nous avons retrouvé l'expression dans les cellules pancréatiques embryonnaires immatures [14].

Une seconde approche que nous avons débutée consiste à soustraire les ADNc d'un tissu différencié, pauvre en cellules progénitrices, d'un tissu peu différencié et riche en cellules progénitrices. Comme décrit précédemment, en absence de facteurs de croissance, un épithélium pancréatique précoce se différencie et peu de cellules indifférenciées persistent. En présence de FGF-7 en revanche, la différenciation est limitée et la masse de cellules indifférenciées est accrue. Nous avons choisi d'utiliser ces deux tissus pour réaliser cette soustraction

Une autre approche consiste à marquer les cellules progénitrices et à suivre leur devenir. Notre hypothèse, basée sur des données existantes dans d'autres tissus telle par exemple la peau, est que les cellules progénitrices pancréatiques prolifèrent rarement *in vivo*. Il serait donc possible de marquer ces cellules à des stades précoces et de suivre puis sélectionner de telles cellules pour leur capacité à retenir le BrdU. Nos premiers résultats indiquent la faisabilité d'une telle approche.

Une dernière approche consiste en un crible par hybridation *in situ* sur poisson médaka entier d'ADNc dérivant de différents organes. Ce poisson de petite taille qui se reproduit aisément est transparent durant les stades embryonnaires. Il peut aisément être utilisé dans des cribles par hybridation *in situ in toto*. Brièvement, une banque est construite à partir d'un organe, des sondes ARN sont préparées à partir de cette banque et des médakas à différents stades de leur développement sont hybridés. Le profil d'expression de la sonde d'intérêt dans le pancréas peut être analysé et les candidats qui ont un profil d'expression qui nous intéresse sont alors sélectionnés. Nos critères de sélection sont : expression dans le pancréas ; expression plus précocement que l'insuline lors du développement ; expression non-ubiquitaire ; co-expression dans le cerveau ; expression dynamique qui s'éteint quand le développement progresse. Ces clones d'intérêt sont séquencés et analysés en détail : analyse de séquence et recherche d'homologues dans d'autres espèces ; ontogénie fine ; co-expression avec des marqueurs pancréatiques. Nous réaliserons aussi dans le futur des expériences de perte de fonction en utilisant des antisens morpholino, une approche très efficace chez ce type de poissons [15]. Nous avons récemment caractérisé en détail le développement du pancréas chez médaka en générant et validant les outils dont nous allons avoir besoin pour cette approche et analysé en détail une collection de médakas hybridés avec 500 clones différents dérivés d'une banque de cerveaux réalisée antérieurement [16]. Nous avons ensuite préparé une banque à partir d'organes digestifs de médakas embryonnaires. Nos premiers résultats qui démontrent la faisabilité des expériences proposées ont été récemment publiés [17].

APPLICATIONS À L'HOMME

Il nous a semblé important depuis plusieurs années, d'étendre à l'homme les résultats obtenus chez l'animal. L'objectif reste le même : caractériser les cellules pancréatiques progénitrices et les facteurs qui contrôlent leur développement.

Nous avons dans un premier temps réanalysé en détail le profil d'apparition des cellules endocrines pendant les étapes précoces du développement pancréatique

[18]. Ce travail a permis de définir précisément le moment d'apparition des premières cellules endocrines et la possible localisation des cellules progénitrices. Nous avons alors mis au point un modèle dynamique de développement de pancréas embryonnaire humain. Brièvement, nous greffons sous la capsule rénale de souris immuno-incompétentes SCID des pancréas embryonnaires humains immatures. Ces tissus se développent en termes de masse, de différenciation endocrine et de fonction. Par exemple, après s'être développé 3 mois dans la souris, le tissu humain est capable de réguler parfaitement et pendant plusieurs semaines la glycémie de souris diabétiques [19].

CONCLUSION

Ces différentes approches permettront de progresser sur un plan cognitif dans la compréhension du développement de deux organes dérivant du pancréas.

Les données sur le pancréas seront aussi importantes dans le contexte de greffe de cellules β au sujet diabétique. En effet, il est maintenant démontré qu'un sujet diabétique greffé avec des îlots pancréatiques humains peut vivre sans insuline exogène pendant plusieurs années. Toutefois, le grand nombre d'îlots nécessaires pour la greffe et le peu de donneurs exclut que ce type d'approche soit utilisé à grande échelle. Le type d'approche que nous proposons : caractérisation des cellules souches, amplification et différenciation pourrait permettre de générer des cellules β en masse. Finalement, alors qu'il est clair que le diabète de type 1 est dû à une destruction massive des cellules β , il n'existe pas de données quant à la capacité des cellules souches résiduelles à se différencier pour repeupler le pancréas. Ce manque de données est dû à l'absence d'informations sur les cellules souches pancréatiques et le contrôle de leur différenciation. Mieux connaître ces aspects devrait permettre de définir de nouvelles molécules qui activeront le développement des souches en cellules β matures.

Remerciements : Ces travaux n'auraient pas été réalisés sans l'aide financière de l'AFD (Association Française des Diabétiques) et de l'AJD (Association d'Aide aux Jeunes Diabétiques).

BIBLIOGRAPHIE

1. EDLUND E. Transcribing pancreas. *Diabetes*, 1998, 47 : 1817-1823.
2. LAMMERT E, CLEAVER O, MELTON D. Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science*, 2001, 294 : 564-567.
3. SCHARFMANN R. Control of early development of the pancreas in rodents and humans : implications of signals from the mesenchyme. *Diabetologia*, 2000, 43 : 1083-1092.
4. ST-ONGE L, WEHR R, GRUSS P. Pancreas development and diabetes. *Curr Opin Genet Dev*, 1999, 9 : 295-300.
5. MIRALLES F, SERUP P, CLUZEAUD F et al. Characterization of beta cells developed in vitro from rat embryonic pancreatic epithelium. *Dev Dyn*, 1999, 214 : 116-126.
6. CRAS-MENEUR C, ELGHAZI L, CZERNICHOV P et al. Epidermal growth factor increases undifferentiated pancreatic embryonic cells in vitro : a balance between proliferation and differentiation. *Diabetes*, 2001, 50 : 1571-1579.

7. ELGHAZI L, CRAS-MENEUR C, CZERNICHOW P et al. Role for FGFR2IIIb-mediated signals in controlling pancreatic endocrine progenitor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, *99* : 3884-3889.
8. LEBRAS S, CZERNICHOW P, SCHARFMANN R. A search for tyrosine kinase receptors expressed in the rat embryonic pancreas. *Diabetologia*, 1998, *41* : 1474-1481.
9. BHUSHAN A, ITOH N, Kato S et al. Fgf10 is essential for maintaining the proliferative capacity of epithelial progenitor cells during early pancreatic organogenesis. *Development*, 2001, *128* : 5109-5117.
10. LEBRAS S, MIRALLES F, BASMACIOGULLARI A et al. Fibroblast growth factor 2 promotes pancreatic epithelial cell proliferation via functional fibroblast growth factor receptors during embryonic life. *Diabetes*, 1998, *47* : 1236-1242.
11. MIRALLES F, CZERNICHOW P, OZAKI K et al. Signaling through fibroblast growth factor receptor 2b plays a key role in the development of the exocrine pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, *96* : 6267-6272.
12. KIM S K, HEBROK M. Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes Dev*, 2001, *15* : 111-127.
13. WEISSMAN IL, ANDERSON DJ, GAGE F. Stem and progenitor cells : Origins, Phenotypes, Lineage Commitments, and Transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001, *17* : 387-403.
14. RACHDI L, EL GHAZI L, BERNEX F et al. Expression of the Receptor Tyrosine Kinase KIT in Mature beta-Cells and in the Pancreas in Development. *Diabetes*, 2001, *50* : 2021-2028.
15. NASEVICIUS A, EKKER SC. Effective targeted gene « knockdown » in zebrafish. *Nat Genet*, 2000, *26* : 216-220.
16. NGUYEN V, JOLY J, BOURRAT F. An in situ screen for genes controlling cell proliferation in the optic tectum of the medaka (*Oryzias latipes*). *Mech Dev*, 2001, *107* : 55-67.
17. ASSOULINE B, NGUYEN V, MAHE S et al. Development of the pancreas in medaka. *Mech Dev*, 2002, *117* : 299-303.
18. POLAK M, BOUCHARREB-BANAELI L, SCHARFMANN R et al. Early pattern of differentiation in the human pancreas. *Diabetes*, 2000, *49* : 225-232.
19. CASTAING M, PEAULT B, BASMACIOGULLARI A et al. Blood glucose normalization upon transplantation of human embryonic pancreas into beta-cell-deficient SCID mice. *Diabetologia*, 2001, *44* : 2066-2076.