

PRODUCTION DE CELLULES SÉCRÉTANT L'INSULINE À PARTIR DE CELLULES SOUCHES

par

F. MARTÍN*, J. JONES*, P. VACA*, G. BERNA* et B. SORIA*

INTRODUCTION

Les personnes qui souffrent de diabète de type 1 ne peuvent pas produire d'insuline, elles ont donc besoin d'administration externe d'insuline toute leur vie. Il existe plusieurs produits pour augmenter les taux de glucose sanguin (glucagon, catécholamines, GH, etc.) et seulement un pour les diminuer [1]. Les cellules β pancréatiques sont uniques dans leur façon de gérer le calcium intracellulaire [2], de réguler les canaux ATP-dépendants [3] et de réaliser la régulation neurohormonale [4]. C'est pourquoi, il est difficile de fabriquer des substituts de cellules β qui peuvent être utilisés en thérapie cellulaire [5].

La transplantation d'îlots comme traitement potentiel du diabète a été explorée intensivement depuis les quinze dernières années. Des résultats récents du groupe d'Edmonton ont obtenu, pour la toute première fois, l'insulino-indépendance chez des patients diabétiques de type 1 [6]. Cependant, une telle approche sera toujours limitée principalement à cause de la difficulté à obtenir des quantités suffisamment importantes d'îlots purifiés issus de cadavres de donneurs, ce qui actuellement permettrait à seulement 0,1 % des patients avec diabète d'être traités par cette méthode. Dans le but de rendre une thérapie facilement disponible, de nouvelles sources de cellules produisant de l'insuline doivent être identifiées.

Actuellement, il existe trois sources principales de cellules renouvelables qui peuvent être utilisées pour la thérapie de remplacement β -cellulaire : 1) les xéno-îlots ; 2) les lignées cellulaires tumorales ou transformées ; 3) les cellules souches.

* Institut de Bioengineering, Université Miguel Hernández, Ctra.Alicante-Valencia N332, s/n, E-03550, San Juan de Alicante, Espagne.

Traduit de l'anglais par le Docteur Catherine Alamovitch.

Concernant les xéno-îlots, le porc a été identifié comme le donneur animal le plus adapté pour la transplantation d'îlots et l'antigénicité des organes de porc peut être réduite par des approches transgéniques. Cependant, en plus du rejet de greffe, le risque de virus xénobiotiques est un problème supplémentaire des xénotransplantations [7].

De nombreux efforts ont été faits pour obtenir des substituts de cellules β en utilisant des lignées cellulaires tumorales ou transformées qui peuvent être modifiées pour exprimer le gène manquant. Cependant, l'utilisation de lignées de cellules tumorales, d'origine soit pancréatique soit neuro-endocrine dans la thérapie cellulaire du diabète, est restreinte par plusieurs inconvénients [8] : 1) les lignées cellulaires tumorales conservent leur nature néoplasique ; 2) comme conséquence de l'instabilité phénotypique et l'expression génique inadéquate, la plupart des lignées cellulaires β font preuve d'une sensibilité maximale au glucose, à des concentrations plus basses de glucose que celle observée dans les îlots normaux, et tendent à perdre la biosynthèse de l'insuline et la sécrétion réglée avec les nombreux passages successifs ; 3) les lignées cellulaires présentent des caractéristiques de différenciation primitive et même des vestiges des cellules parentales.

La dernière alternative précédemment mentionnée pour la transplantation d'organe ou de tissu est l'utilisation des cellules souches, qui sont des cellules clonogéniques capables d'autorenouvellement et de différenciation multilignage. Donc, ces cellules ont le potentiel pour proliférer, se différencier en plusieurs types de cellules et être génétiquement modifiées *in vitro*, fournissant ainsi des cellules qui peuvent être isolées et utilisées pour la transplantation. À cet égard, des travaux récents ont fourni des protocoles de différenciation bien définis, qui peuvent être utilisés pour guider les lymphocytes vers des lignages cellulaires spécifiques comme les neurones, les cardiomyocytes et les cellules sécrétant l'insuline. De plus, les cellules dérivées ont montré leur utilité dans différents modèles animaux [9]. À cet égard, plusieurs groupes ont rapporté des résultats encourageants montrant l'obtention de cellules sécrétant de l'insuline à partir des cellules souches.

LES TYPES DE CELLULES SOUCHES

Différentes sources primaires de cellules souches (fig. 1) ont été utilisées pour donner naissance à des lignées cellulaires pluripotentielle [10] : 1) les cellules souches embryonnaires (CS) dérivées de la masse cellulaire interne des embryons au stade blastocyste ; 2) les cellules germinales embryonnaires (CGE) dérivées de la région gonadique de fœtus ; 3) les cellules embryonnaires de carcinome (CEC) issues de tissu de tératocarcinome ; 4) des cellules souches adultes. Une différence fondamentale entre les lignées cellulaires est que tandis que les CS, CGE et les lignées adultes sont génétiquement normales et diploïdes, les lignées CEC sont transformées et habituellement aneuploïdes. Elles diffèrent dans l'expression des marqueurs cellulaires de surface, les conditions de culture cellulaire, la pluripotentialité et l'utilité clinique. Donc, alors que les lignées CEC ont été utilisées dans les études de différenciation cellulaire de développement précoce [11], CS, CGE, et les cellules souches adultes peuvent aussi servir comme source de cellules différenciées. Des types de cellules souches cités ci-dessus, seulement quelques-uns

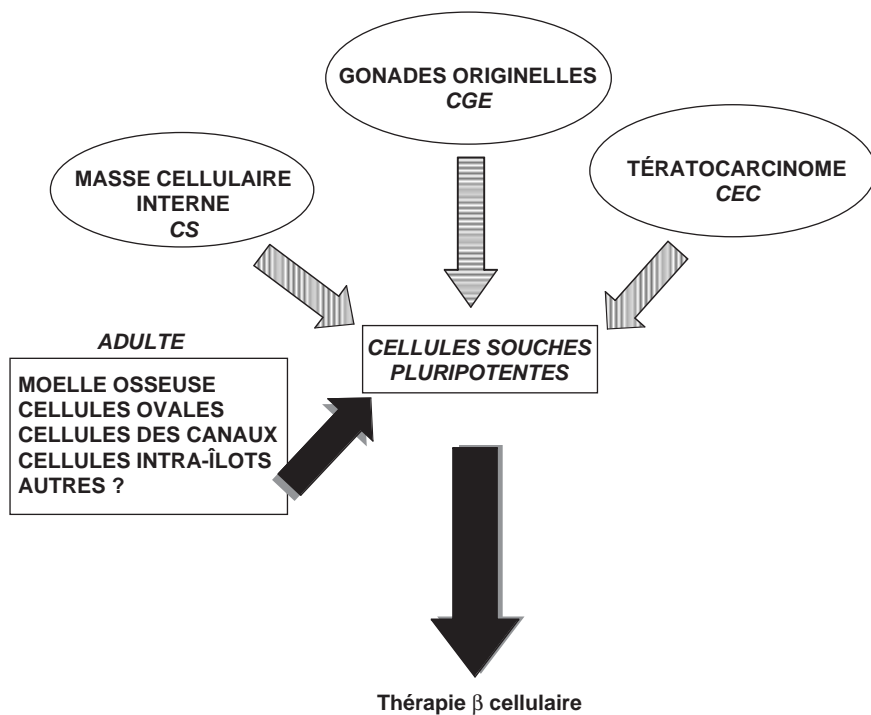


FIG. 1. — Sources de cellules souches qui peuvent donner naissance à des cellules produisant de l'insuline. CS, cellules souches embryonnaires ; CEG, cellules embryonnaires germinales ; CE, carcinome embryonnaire.

d'entre eux ont été utilisés avec succès pour se différencier en cellules produisant de l'insuline.

DES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES AUX CELLULES PRODUISANT L'INSULINE

Des études récentes sur la souris ont montré que les CS peuvent être différenciées en cellules produisant de l'insuline. Notre groupe a été le premier à fabriquer des cellules produisant de l'insuline à partir de CS de souris qui étaient capables de normaliser l'homéostasie du glucose quand elles étaient transplantées dans un modèle expérimental de diabète [12]. Ensuite, plusieurs études sont apparues décrivant des expériences dans lesquelles les CS de souris [13, 14] et humaines [15] ont été différenciées en cellules produisant de l'insuline. Cependant dans ces études, les cellules obtenues avaient le potentiel pour former des tumeurs et des niveaux faibles d'insuline comparés aux îlots pancréatiques.

Notre stratégie peut être décrite en 3 étapes [16] : différenciation, sélection de lignage cellulaire et maturation (fig. 2).

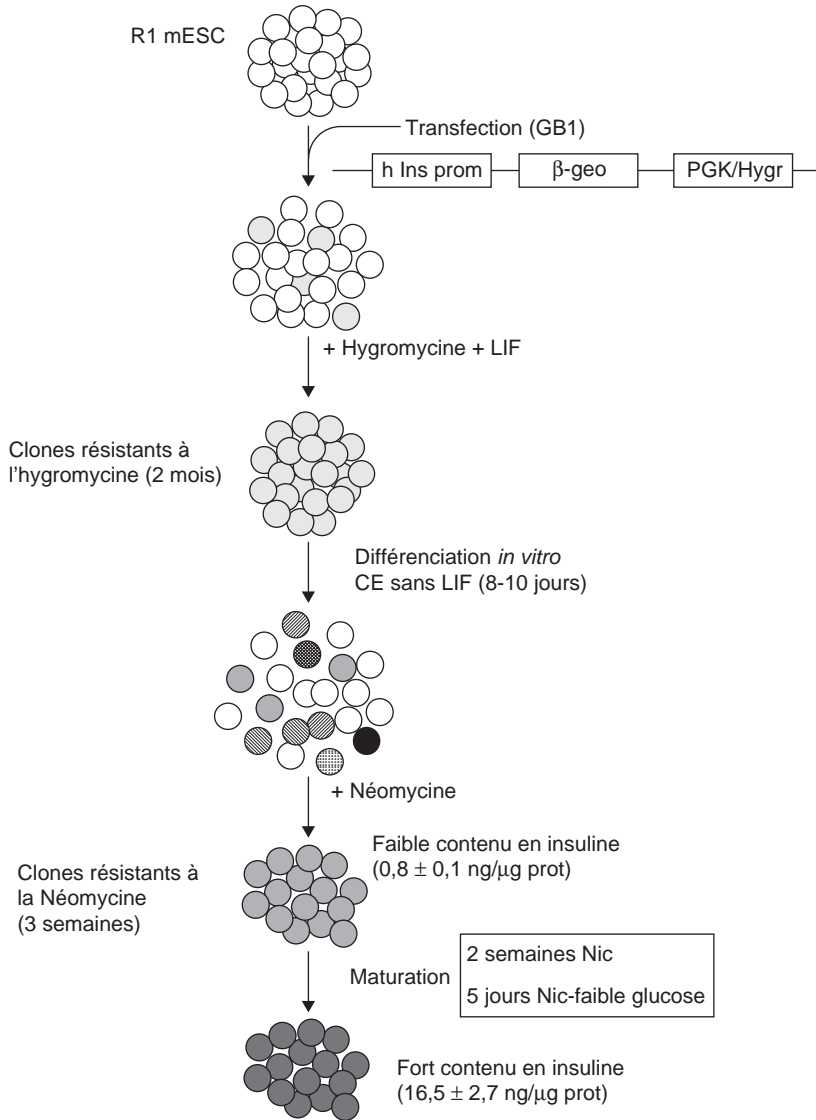


FIG. 2. — Diagramme de la voie *in vitro* de cellules souches aux cellules produisant de l'insuline.

Ce processus de différenciation commence avec des CS non différenciées pluripotielles qui sont cultivées en l'absence de facteur inhibiteur de leucémie (FIL) et cultivées dans des plaques bactériennes, formant des corps embryoides (CE). Les CE reproduisent certaines des conditions nécessaires pour la différenciation cellulaire : 1) polarisation ; 2) interactions cellule à cellule ; 3) présence de contacts asymétriques ; 4) production de facteurs de croissance. Dans un cas, une

ligne cellulaire espèce 129 de CS, appelée ENS CS, a été cultivée pendant 21 jours formant un CE et exprimant des transcriptions de gènes spécifiques endocrines (insuline, glucagon et PP) 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, deux aspects devraient être pris en compte : 1) améliorer les conditions de culture pour augmenter la proportion des précurseurs d'îlots et l'expression de plus d'un marqueur d'îlot ; 2) biofabriquer l'expansion cellulaire pendant cette période sauf quand un progéniteur de cellule mitotique est sélectionné.

La stratégie de sélection de lignage cellulaire est basée sur l'expression de l'insuline. En résumé, les cellules sont transfectées par un gène qui amorce la région de contrôle du gène de l'insuline avec β -geo, un gène chimérique qui code à la fois pour l'activité β -galactosidase et la résistance à la néomycine. Ceci permet la sélection de cellules exprimant l'insuline quand elles sont en culture avec la néomycine car elles expriment également le gène de résistance à la néomycine. De plus, l'expression de la β -galactosidase rend possible l'identification histo-chimique 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 et PP [10].

De plus, une procédure de sécurité pour protéger contre des virulences imprévisibles peut être ajoutée. Cela consiste à lier le gène de la thymidine kinase de l'herpès à la construction, rendant possible de cette façon la suppression cellulaire en traitant avec du gancyclovir.

Le point le plus difficile dans la stratégie *in vitro* de différenciation est d'atteindre un équilibre entre la prolifération des précurseurs, nécessaire pour obtenir une masse adéquate, et le processus de maturation de cellules post-mitotiques. D'une manière générale, il est juste de dire que les signaux qui favorisent la prolifération ne rendent pas les cellules matures. Bien que les étapes exactes à travers lesquelles les cellules passent pendant la différenciation *in vitro* soient inconnues, on peut penser que 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 fœtaux, la régénération pancréatique du rat et les cellules adultes du canal pancréatique. Nous avons essayé différentes stratégies de maturation (butyrate de sodium, mytomycine C, nicotinamide, glucose bas et haut, LY294002) avec des résultats variés sur la prolifération cellulaire et la différenciation. Par exemple, le butyrate de sodium était efficace pour augmenter le contenu en insuline, mais la plupart des cellules mouraient pendant le processus. En se fondant sur quelques protocoles qui utilisaient la nicotinamide comme facteur de différenciation [17], ainsi que d'autres études indiquant que le glucose était le modulateur principal de l'expression génique dans les cellules β [18], nous sommes arrivés à une stratégie de maturation basée sur l'utilisation de nicotinamide et de concentrations de glucose non stimulantes (voir fig. 2). 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 qui répondaient aux sécrétagogues physiologiques [12]. Quand ces cellules contenant de l'insuline ont été transplantées à des souris rendues diabétiques par la streptozotocine, leur

glycémie se normalisait dans la semaine et le poids corporel se rétablissait en quatre semaines. Alors que le test de tolérance intrapéritonéal au glucose montrait un rétablissement plus lent chez les souris transplantées versus les contrôles, la normalisation de la glycémie après un repas test était similaire [12]. 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 [8].

L'approche de Lumelsky et coll. consistait en des conditions de culture à plusieurs étapes qui étaient utilisées pour générer des cellules neurales, qui commençaient avec la production d'une population enrichie de cellules positives en nid. Ces cellules étaient ensuite étendues et maturaient en ajoutant dans le milieu de culture, du facteur basique de croissance des fibroblastes, du supplément B 27 et de la nicotinamide. Hori et coll. [14] utilisent également un protocole de culture à plusieurs étapes, très similaire au précédent, mais avec l'ajout de LY294002 à la dernière étape. Malheureusement, dans les deux cas, les cellules produisant de l'insuline, issues de CS, étaient incapables de normaliser la glycémie de modèles animaux de diabète. Finalement, les CS humaines qui se sont spontanément différenciées dans un CE, étaient positives pour l'insuline et les autres marqueurs β -cellulaires. De plus, ces cellules avaient une libération d'insuline non régulée [15].

Bien que la différenciation *in vitro* soit encore une science nouvelle et plutôt que de parler de méthodes établies, nous pouvons seulement parler de recettes, ces cellules montrant le potentiel de ces cellules souches embryonnaires.

Une meilleure connaissance du développement des cellules β , ainsi qu'une identification prospective et une purification des cellules précurseurs convenables aideront à obtenir de meilleures cellules produisant de l'insuline.

Comme indiqué précédemment, les cellules GE ont la même pluripotentialité que les CS. Malgré cela, jusqu'à maintenant, aucun rapport n'est apparu montrant la possibilité d'utiliser les cellules GE pour obtenir des cellules produisant de l'insuline.

LES CELLULES SOUCHES ADULTES COMME SOURCE POUR LES CELLULES DES ÎLOTS

Certains tissus (peau, épithélium intestinal ou cellules sanguines) gardent la capacité à régénérer durant toute la vie grâce à la présence de cellules souches. D'autres tissus, comme le foie et le muscle, peuvent régénérer après une lésion. Il est généralement admis que les cellules totalement différenciées ont suspendu leurs possibilités de différenciation et maintiennent un phénotype fixe avec un potentiel de division négligeable. Cependant, en raison de récents travaux, cette idée commence à être discréditée. Plus récemment cette année, des cellules souches adultes pluripotentiellles ont été retrouvées dans la moelle osseuse [19]. Les cellules souches issues de la moelle osseuse sont capables, *in vitro* et *in vivo*, de se différencier en cellules avec des caractéristiques viscérales mésodermiques, neuro-ectodermiques et endodermiques. L'existence de telles cellules souches adultes suggère qu'elles sont des sources potentielles de nouvelles cellules des îlots. Bien qu'aucune cellule souche adulte pancréatique identifiable n'ait encore été retrouvée, il y a des preuves

considérables que de telles cellules existent. Le manque de marqueurs concluants et de systèmes d'essai fiables a rendu difficile la caractérisation et la vérification de telles cellules. Les candidats proposés sont : 1) les cellules « nestin-positives » isolées d'îlots murins et humains [20] ; 2) des cellules précurseurs intra-îlot exprimant la somatostatine et le facteur de transcription PDX-1 (pancreatic duodenum homeobox) [21] ; 3) les cellules souches adultes hépatiques (cellules ovales) [22] ; 4) les cellules des canaux [23, 24].

Parmi tous ces candidats, les cellules souches pancréatiques putatives semblent être les cellules des canaux. Bonner-Weir et coll. [24] ont démontré que 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.

LE FUTUR

La recherche sur les cellules des îlots et les cellules souches est faite pour se développer rapidement. Des techniques décrites ci-dessus, la plus prometteuse est la génération de cellules β à partir des cellules souches embryonnaires et des cellules des canaux pancréatiques. Des avantages potentiels des cellules souches embryonnaires sont que : 1) elles peuvent être cultivées pour générations ; et 2) en théorie, elles peuvent être fabriquées pour exprimer les gènes appropriés qui pourront leur permettre d'échapper ou de diminuer la détection du système immunitaire. Néanmoins, la plupart des chercheurs s'accordent sur le fait que toutes les sources potentielles d'îlots doivent être intensément examinées, dont les cellules souches adultes et embryonnaires.

Les études décrites ici indiquent que dans les années à venir, le développement d'un système humain de cellules souches qui pourra être conduit à une différenciation en îlots fonctionnels produisant de l'insuline sera possible. L'existence d'une source illimitée de cellules qui peuvent synthétiser et libérer de l'insuline d'une façon régulée, en réponse à une stimulation de glucose, pourra conduire à un traitement pour le diabète, par transplantation cellulaire largement disponible.

Remerciements : Ces études ont été financées par l'Union Européenne (1-FD97-1065-CO3-02 ; QLK3-CT-2002-0177), Fundació Marató TV3 (99-1210), Ministry of Science and Technology (PM98-105 ; PM99-0142 ; GEN2001-4748-C05-05), Juvenile Diabetes Foundation (1-2000-575), European Foundation for the Study of Diabetes, Generalitat Valenciana (CTIDIB/2002/130), Fundación Salud 2000 and Cardion A. Le travail technique de N. Illera est grandement remercié.

BIBLIOGRAPHIE

1. SORIA B. Physiology and Pathophysiology of the Islets of Langerhans. Adv Exp Biol, New York, Plenum Press, 1997, vol. 426.
2. QUESADA I, MARTÍN F, SORIA B. Nutrient modulation of polarized and sustained submembrane Ca^{2+} microgradients in mouse pancreatic islet cells. J Physiol Lond, 2000, 525 : 159-167.
3. MARTIN F, PINTOR J, ROVIRA JM et al. Intracellular diadenosine polyphosphate : a novel second messenger in stimulus-secretion coupling. FASEB J, 1998, 12 : 1499-1506.
4. NADAL A, ROPERO AB, LARIBI O et al. Non-genomic action of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor alfa and estrogen receptor beta. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 97 : 11603-11608.
5. SORIA B, ANDREU E, BERNA G et al. Engineering pancreatic islets. Pflügers Arch, 2000, 440 : 1-18.
6. SHAPIRO AMJ, LAKEY JRT, RYAN EA et al. Islet transplantation in seven patients with Type 1 Diabetes Mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. N Engl J Med, 2000, 343 : 230-238.
7. SERUP P, MADSEN OD, MANDRUP-POULSEN T. Islet and stem cell trasplantation for treating diabetes. Br Med J, 2001, 322 : 29-32.
8. SORIA B, SKOUDY A, MARTIN F. From stem cells to beta cells : new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. Diabetologia, 2001, 44 : 407-415.
9. EIGES R, BENVENISTY N. A molecular view of pluripotent stem cells. FEBS Letters, 2002, 529 : 135-141.
10. BERNÁ G, LEÓN-QUINTO T, ENSEÑAT-WASER R et al. Stem cells and diabetes. Biomed Pharmacother, 2001, 55 : 206-212.
11. THOMPSON S, STERN PM, WEBB M et al. Cloned human teratoma cell differentiate into neuron-like cells and other cell types in retinoic acid. J Cell Sci, 1984, 72 : 37-44.
12. SORIA B, ROCHE E, BERNÁ G et al. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. Diabetes, 2000, 49 : 157-162.
13. LUMELSKY N, BLONDEL O, LAENG P et al. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. Science, 2001, 292 : 1389-1394.
14. HORI Y, RULIFSON IC, TSAI B et al. Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99 : 16105-16110.
15. ASSADY S, MAOR G, AMIT M et al. Insulin production by human embryonic stem cells. Diabetes, 2001, 50 : 1691-1697.
16. SORIA B. In vitro differentiation of pancreatic β -cells. Differentiation, 2001, 68 : 205-219.
17. OTONKOSKI T, BEATTIE GM, MALLY MI et al. Nicotinamide is a potent inducer of endocrine differentiation in cultured human fetal pancreatic cells. J Clin Invest, 1993, 92 : 1459-1466.
18. MAESTRE I, ROCHE E, MARTÍN F et al. Nutrient toxicity in pancreatic β -cell dysfunction. J Physiol Biochem, 2000, 56 : 123-134.
19. JIAN Y, JAHAGIRDAR BN, REINHARDT RI et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature, 2002, 870 : 41-49.
20. ZULEWSKI H, ABRAHAM EJ, GERLACH MJ et al. Multipotential nestin-positive cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine and hepatic phenotypes. Diabetes, 2001, 50 : 521-533.
21. GUZ Y, NASIR I, TEITELMAN G. Regeneration of pancreatic beta cell from intra-islet precursors in an experimental model of diabetes. Endocrinology, 2001, 142 : 4956-4968.
22. YANG L, LI S, HATCH H et al. In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99 : 8078-8083.
23. RAMIYA VK, MARAIST M, ARFORS KE et al. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. Nature Med, 2000, 6 : 278-282.
24. BONNER-WEIR S, TANEJA M, WEIR GC et al. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97 : 7999-8004.