

Modèle cellulaire du DNID: la cellule B

L'étude des conséquences du diabète NID à l'échelle cellulaire se concentre bien entendu sur les atteintes subies par les cellules B pancréatiques à l'origine de l'insulino-sécrétion. En effet, la diminution de la sensibilité au glucose de ces cellules, puis leur destruction, constitue avec les phénomènes d'insulino-résistance un des deux piliers de l'état diabétique. Cependant, il est important de garder présent à l'esprit que l'on ne peut isoler une cellule de son environnement: dans l'ensemble pancréatique, les relations entre tissu exocrine et endocrine sont impliqués dans le développement de la pathologie diabétique, laquelle se décrit bien mieux en terme de **problèmes de communications entre différents types cellulaires** plutôt qu'au niveau d'une défaillance subite d'un type cellulaire unique, comme cela est observé dans le diabète insulino-dépendant. Bien que l'insulino-résistance et l'obésité liée au diabète entraînent une augmentation secondaire compensatrice de la masse des cellules B, des études comparatives ont mis en évidence au contraire que **le diabète NID s'accompagne d'une réduction de la masse des cellules B**, probablement en raison de perturbations des mécanismes contrôlant la croissance, la réplication et la différenciation des cellules endocrines pancréatiques. Cette réduction, qui a de grandes conséquences fonctionnelles, reste cependant limitée en masse à une perte de 20 à 40 % pour un diabète NID installé de longue date. L'étude de l'ensemble des cellules B (la population B) et de leurs interactions avec leur milieu se révèle être une des clefs de la compréhension de l'état diabétique.

La plupart des études cellulaires prennent pour base 5 lignées de cellules B (INS1, HIT, TC, MIN6 et RIN) qui proviennent généralement de tumeurs endocriniennes, d'insulinomes de rat. Ces cellules présentent l'avantage, contrairement aux autres cellules B, de pouvoir être facilement cultivées à cause de leur capacité de prolifération. Elles permettent ainsi l'obtention de résultats reproductibles et comparables. Cependant, leur comportement vis-à-vis du glucose ne reproduit pas toujours celui des cellules B pancréatiques: les cellules des lignées RIN, HIT ou TC ne réagissent pas au glucose de façon physiologique, ce qui renforce l'intérêt de lignées possédant un comportement plus conforme à celui qui est observé dans le pancréas fonctionnel, à savoir les cellules INS1 et TC6F7. Ce problème de la **validité des modèles cellulaires *in vitro*** rend indispensable la confirmation des données recueillies par la confrontation avec les modèles animaux. Ainsi, la lignée d'adipocytes 3T3L1 utilisée couramment en culture cellulaire ne présente pas les mêmes taux relatifs de molécules IRS que les adipocytes présents *in vivo*.

MULTIPLICATION DES CELLULES B PANCREATIQUES

La maîtrise de la prolifération des cellules B pancréatique est importante car elle permettrait soit de reconstituer *in vivo* une population de cellules B fonctionnelles soit de développer *in vitro* des cellules pouvant par la suite être implantées dans l'organisme.

La multiplication spontanée des cellules B ainsi que leur différenciation à partir de cellules souches ont longtemps été regardées comme des phénomènes se produisant essentiellement à l'état embryonnaire ou bien chez le nouveau-né. Cependant, la croissance de la population B se poursuit chez l'homme pendant quelques mois après la naissance. Ce

processus peut également se produire chez l'adulte. En ce qui concerne les proliférations, on note une légère augmentation du nombre de cellules B à l'état adulte mais surtout **une hyperplasie de ces cellules pendant la grossesse**. L'accroissement de cette activité mitotique est obtenue, *in vivo* et *in vitro*, par l'exposition au lactogène placentaire (LP), à la prolactine et à l'hormone de croissance (GH). Les cellules B portent des récepteurs pour la prolactine et la GH dont le nombre augmente pendant la gestation.

Le récepteur à la GH possède plusieurs domaines fonctionnels intracytoplasmiques. Le signal mitogénique est ainsi transmis par la partie la plus proche de la membrane, et implique les facteurs de transcription STAT1 et STAT 3 ainsi que la mise en jeu de la tyrosine kinase JAK2. L'activation du gène de l'insuline est réalisée par la partie la plus profonde du récepteur, et nécessite, hormis le facteur STAT5, l'entrée de calcium dans la cellule. GH et prolactine stimulent également la synthèse d'une protéine comportant six motifs EGF et nommée pref-1 (preadipocyte factor 1) qui pourrait être **un facteur de croissance autocrine** jouant un rôle dans la multiplication et la différenciation des cellules B.

La prolactine agit en synergie avec le glucose pour augmenter l'expression des transporteurs de glucose GLUT2 dans la membrane des cellules B. Elle active également la transcription du gène de l'insuline, seule ou en synergie avec le glucose.

A la suite d'un traumatisme, les **cellules exocrines pancréatiques** sécrètent elles aussi des facteurs de croissance induisant leur prolifération ainsi que celle des cellules endocrines. Chez le hamster, ces sécrétions ont pu contrer le développement d'un diabète induit expérimentalement par obstruction partielle des canaux pancréatiques.

L'augmentation de la masse cellulaire B globale peut être obtenue par **croissance** de la taille des cellules, **réplication** de celles-ci ou bien **néoformation** de cellules B. La néoformation peut provenir soit de cellules souches embryonnaires soit de cellules différenciées, comme les cellules ductales, par **transdifférenciation**.

CROISSANCE ET MULTIPLICATION DES CELLULES B NECESSITENT L'ACTIVATION DES GENES REG

La régénération d'îlots pancréatiques peut être obtenue par l'administration de nicotinamide, un inhibiteur de la poly(ADP) ribose synthase. Les îlots néoformés sont plus larges, fonctionnels et formés majoritairement de cellules B. Cette néoformation est liée à **l'expression d'un gène Reg I** (Regeneration gene 1) mis en évidence chez le rat et qui code chez l'homme pour une protéine de 166 acides aminés comportant une séquence signal de 22 acides aminés. Cette protéine, débarrassée de sa séquence signal, agit comme un facteur de croissance sur les cellules B en **stimulant leur réplication et leur croissance**. Elle peut agir de façon **paracrine**, voire **autocrine**, sur les cellules B. Le peptide Reg se fixe sur un récepteur membranaire de 919 acides aminés. Ce récepteur possède un court domaine intracellulaire N-terminal, une région transmembranaire et un grand domaine extracellulaire de 868 résidus d'acides aminés. *In vitro*, de très fortes concentrations de protéine Reg peuvent induire **l'apoptose des cellules B**, indiquant un effet possible de régulation de la masse des cellules B par cette molécule pouvant déclencher prolifération ou, à forte concentration, apoptose.

Le peptide Reg possède des effets positifs sur le diabète NID de modèles animaux comme le rat ou sur le diabète ID de la souris NOD et est également produit au niveau des cellules à insuline des canaux pancréatiques en réaction à une intoxication à la streptozotocine.

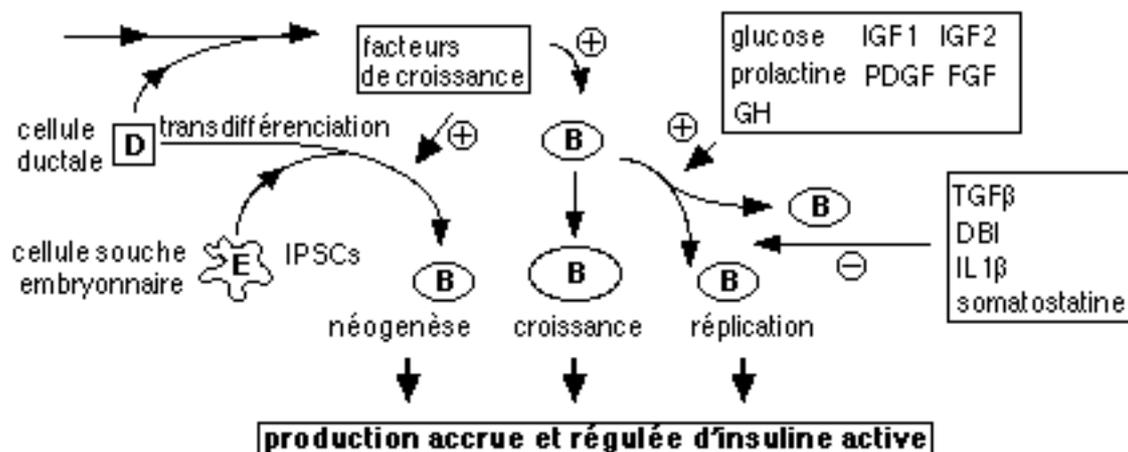
L'activation des gènes reg I (ou l'administration de la protéine Reg 1) constitue donc une nouvelle voie de traitement du diabète NID. La famille des gènes reg compte également une sous-classe (reg III) impliquée dans la **régénération et la prolifération des cellules épithéliales du tube digestif, des cellules acineuses pancréatiques ainsi que des cellules de Schwann.**

DES CELLULES B FONCTIONNELLES PEUVENT ETRE OBTENUES PAR TRANSDIFFERENCIATION

La différenciation de cellules B à partir de cellules souches ductales a été observées dans un modèle de diabète NID induit chez le lapin: la ligature du canal pancréatique entraîne une dégénérescence du pancréas exocrine et endocrine à laquelle succède une **régénérescence de cellules endocrines pancréatique** (nésidioblastose). On doit remarquer que **les nouvelles cellules B se forment à partir de cellules exocrines ductales** qui se dédifférencient puis se redifférencient en cellules endocrines. Il n'y aurait donc pas persistance de cellules souches dans le pancréas adulte mais production de telles cellules à partir de cellules différenciées. Ce procédé présente d'intéressantes analogies avec les phénomènes d'oncogenèse. Comme l'indique l'origine embryonnaire commune des trois types tissulaires pancréatiques, on doit considérer le pancréas comme **un ensemble intégré dont les différents composants sont capables de transdifférenciation et de régénération.**

Cependant, des lignées cellulaires ont pu être isolées chez l'animal prédiabétique, cultivées longuement, et ont alors exprimé *in vitro* **des capacités endocrines variées**: ces cellules souches "multiclines" exprimant à la fois insuline, glucagon et somatostatine ont pu être implantées avec succès chez un modèle murin de diabète insulino-dépendant qui n'a alors pas développé cette pathologie, prouvant la fonctionnalité de ces cellules dites IPSCs (islet pluripotent stem cells).

La production des cellules B est sous la dépendance de nombreux facteurs



LES CELLULES B REAGISSENT AUX MODIFICATIONS DE LEUR ENVIRONNEMENT

- **les atteintes du pancréas exocrine modifient les populations cellulaires endocrines**

Après une pancréatite nécrosante, les fonctions des cellules B sont perturbées: leur nombre diminue et une insulino résistance s'installe dans la moitié des cas. Dans la pancréatite chronique, les nombreux facteurs de croissance exprimés augmentent les capacités prolifératrices des cellules ductales et contribuent à l'instauration d'une fibrose. On doit également noter que les cellules B produisent de l'IAPP qui a la capacité de s'auto organiser en structures et fibrilles cytotoxiques.

Bien que le renouvellement physiologique des cellules B soit limité, on peut artificiellement provoquer une intense régénération de la population B en pratiquant des pancréatectomies partielles qui montrent que **la régénération pancréatique est fonction de l'hyperglycémie** provoquée par la diminution expérimentale de la population cellulaire insulinosécrétrice: une hyperglycémie modérée stimule la croissance et la réplication des cellules B survivantes alors qu'une pancréatectomie trop importante (95%) provoque une sévère hyperglycémie qui ne stimule plus la population B restante.

- **la glycémie influence directement la prolifération des cellules B**

En réponse à une augmentation de l'apport énergétique alimentaire, les cellules B se multiplient. Selon la composition de cette alimentation, elles peuvent secondairement dégénérer, aboutissant ainsi à un diabète.

Le stimuli principal accroissant la taille des cellules B et leur réplication n'est autre que le glucose. Chez l'animal, on a pu mettre en évidence une variabilité génétique de la réponse mitotique des cellules B au glucose. Ces variations innées pourraient être impliquées dans des prédispositions au diabète en diminuant les capacités d'adaptabilité de la population B.

LA POPULATION DES CELLULES B SE REPARTIE ENTRE UN IMPORTANT POOL QUIESCENT ET UN PETIT GROUPE CAPABLE DE PROLIFERATION

L'ensemble des cellules B actives conditionne le niveau de production d'insuline. Une diminution de la masse de ces cellules, provenant d'une croissance ou d'une réplication défailante, constitue une forte prédisposition au développement d'un diabète. *In vitro*, l'insuline stimule la réplication des cellules B, signalant ainsi une régulation **autocrine**. D'autres facteurs de croissance comme les IGF 1 et 2, le PDGF et le FGF ont une influence similaire. C'est aussi le cas pour des substances d'origine alimentaire comme le lithium ou certains acides aminés.

Les modérateurs de la croissance de la population B sont le TGF qui agit en inhibant l'effet stimulant du glucose, l'interleukine 1 (chez l'adulte seulement) et la somatostatine. Une autre molécule, le DBI (Diazepam Binding Inhibitor) produit par les cellules insulaires, se lie à l'acyl CoA et freine la multiplication des cellules B.

- **cycle cellulaire des cellules B**

Comme toutes les cellules de mammifères, la réplication des cellules B est sous le contrôle de l'ensemble des protéines du cycle cellulaire, les **cyclines** et les **kinases** qui en

dépendent, les CDKs. Le cycle cellulaire comprend les phase de quiescence (G0) où se trouvent la majorité des cellules B, puis le cycle de réplication proprement dit qui se déroule en quatre temps:

- **phase G1**. Au 2/3 de cette phase se trouve le **point de restriction R**. Avant ce point, des stimulations de facteurs de croissance sont nécessaires pour engager la cellule dans le cycle de réplication, après ils ne sont plus indispensables. Si les stimulations ont été insuffisantes ou contrebalancées par des inhibiteurs, la cellule peut encore **revenir à l'état quiescent G0**. On considère qu'après le point R la cellule se dirige vers des changements irréversibles tels que **mitose, apoptose** (si son ADN est irréparablement endommagé par exemple) ou **différenciation** selon les signaux moléculaires qu'elle reçoit. Cette phase dure 2h 30 pour les cellules B de rat
- **phase S** de synthèse d'ADN (6h30). L'activité de l'enzyme thymine kinase, décroissante avec l'âge, peut intervenir à ce niveau pour réguler les capacités de prolifération des cellules B
- **phase G2** (5h30)
- **mitose** proprement dite (phase M qui dure 30mn)

• **dans le diabète NID, les faibles capacités prolifératrices des cellules B sont encore réduites**

Le glucose agit en augmentant **la proportion de cellules B qui entrent dans le cycle cellulaire**, proportion qui est **faible dans des conditions normales** et diminue avec l'âge: alors que 10 % des cellules B foetales peuvent entrer dans le cycle de réplication, ce taux tombe à seulement **3 %** chez l'adulte. Ceci serait du à un **retrait progressif du cycle cellulaire des cellules de la population B proliférante** qui deviendraient alors définitivement quiescentes, en état G0. La majorité des cellules B est cependant dans un état quiescent **réversible**: la prolactine provoque le recrutement **limité et transitoire** de cellules B G0 qui entrent dans le cycle cellulaire. Parmi les cellules filles obtenues, seulement 25% au maximum continuent à se diviser.

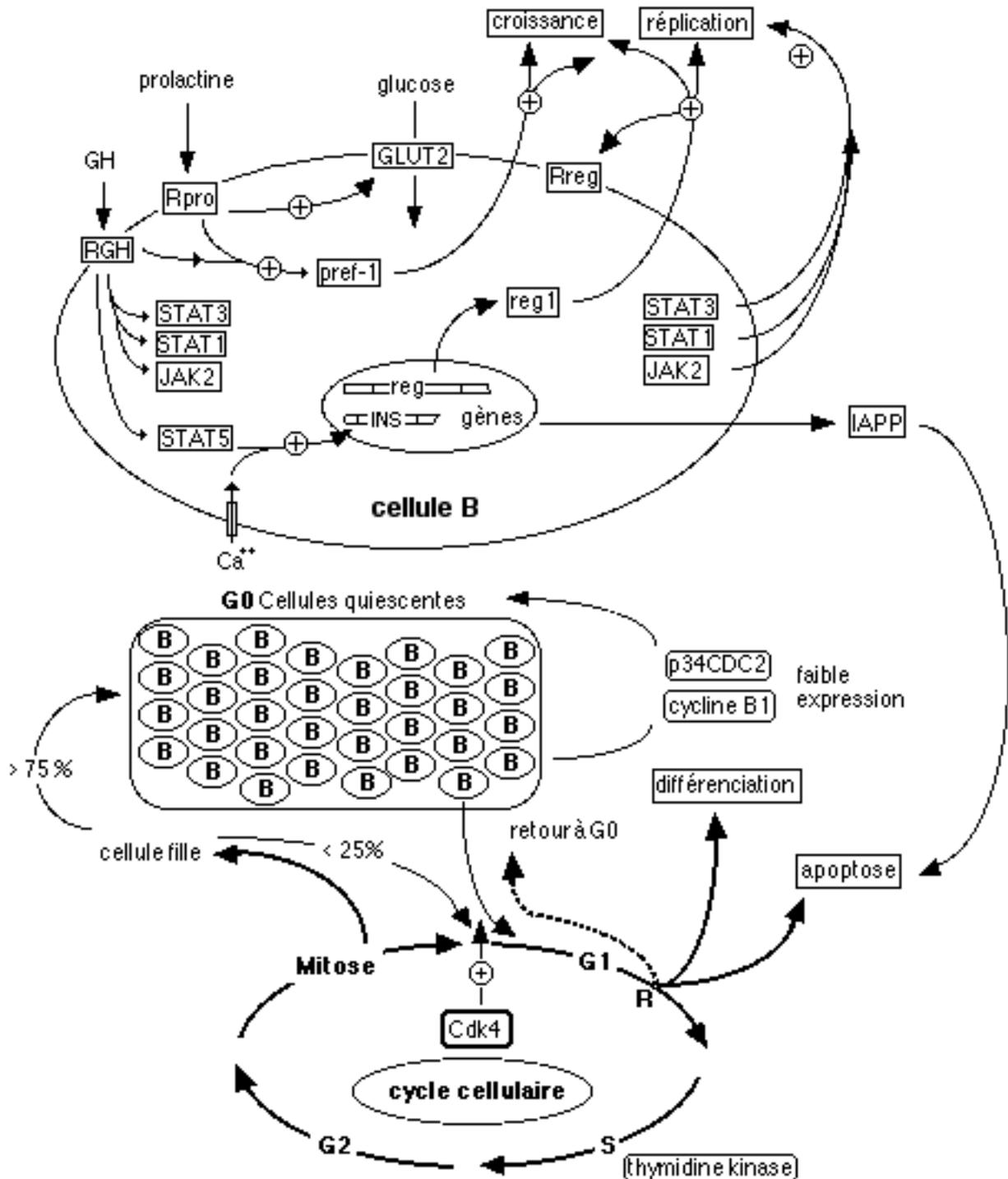
Au niveau moléculaire, les **faibles capacités prolifératrices des cellules B** sont liées en partie à la faible expression de la cycline B1 et de la sérine/ thréonine kinase p34CDC2. Elles semblent surtout conditionnées par l'expression de l'enzyme **tyrosine kinase cycline dépendante 4** (Cdk4). L'étude de souches murines transgéniques montre que le contrôle de la réplication cellulaire n'est pas dans tous les tissus sous la dépendance des mêmes cyclines.

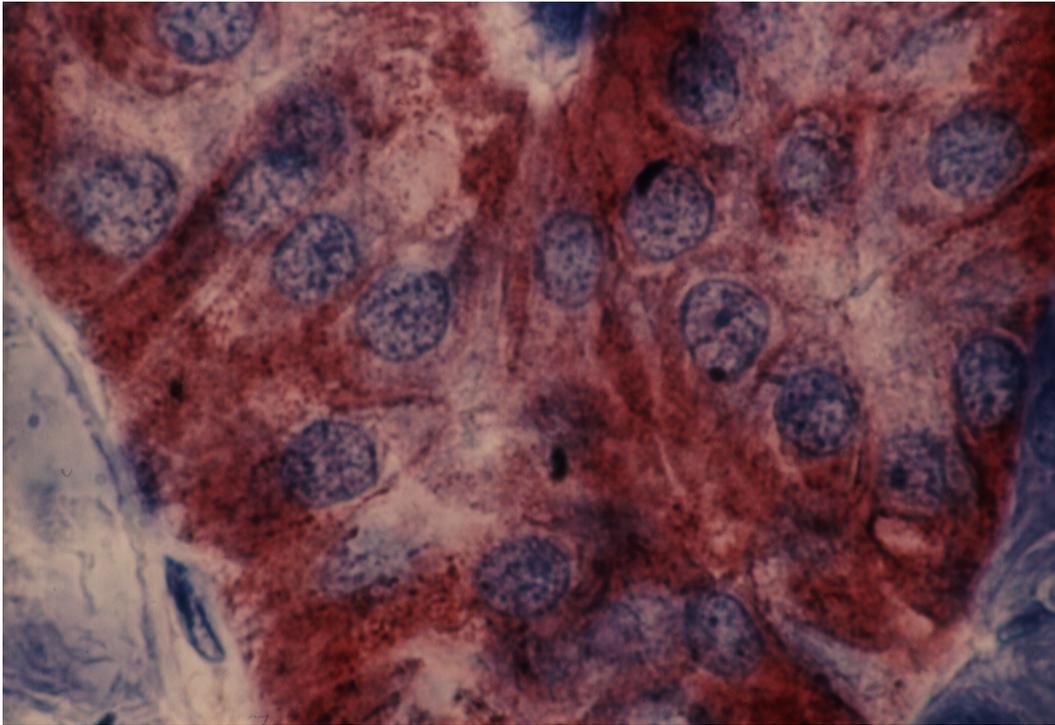
L'arrêt de l'expression de Cdk4 aboutit à une réduction de 90% de la production d'insuline associée à une glycémie 2 à 3 fois supérieure à la normale qui augmente encore avec l'âge de l'animal, signalant ainsi une insulino-résistance modérée. Le pancréas de ces souris transgéniques contient un **nombre très réduit de petits îlots**: leur taille est 13 à 15 fois inférieure à la normale. Si au contraire on provoque une surexpression de Cdk4, les îlots pancréatiques sont **hyperplasiques** (leur surface étant multipliée par un facteur 7 à 10). Comme dans les deux cas, la production de glucagon et de somatostatine est normale, **la molécule Cdk4 est donc un régulateur spécifique du cycle cellulaire des cellules B**.

Il apparaît donc que la population de cellules B doit être considérée dans son intégralité comme faisant partie d'un ensemble dynamiquement régulé. L'efficacité de cette régulation diminue avec l'âge et chez le diabétique NID, la prolifération adaptative des cellules

B est réduite, ce qui concourt notamment à une réponse inadaptée à l'hyperglycémie. Cette difficulté des cellules B à compenser l'hyperglycémie et la perte d'efficacité de l'insuline par leur prolifération se conjugue aux autres facteurs déclenchant et aggravant le diabète NID (gluco- et lipo-toxicité, insulino-résistance, atteintes dégénératives) pour mettre le pancréas dans un état de détresse physiologique ne lui permettant plus de remplir pleinement son rôle endocrine.

La cellule B baigne dans un flux d'informations décidant de son évolution





Cellules B immunoréactives dans un îlot de Langerhans d'un individu sain. Le marquage présente une intensité irrégulière, plus importante au pôle apical où l'insuline est stockée dans les granulations localisées au voisinage d'un capillaire sanguin. (x 1200).