## UN MODELE DE DIABETE NID INDUIT PAR CHIRURGIE CHEZ LE LAPIN

Ce modèle expérimental concerne le développement du syndrome diabétique de type non insulino-dépendant, qui s'installe chez le lapin après ligature du canal pancréatique. L' objectif proposé est de rechercher les causes et les conséquences du dysfonctionnement glycémique en rapport avec le remaniement des différents parenchymes. Ceci a pour but de dégager un certain nombre d'éléments clefs, qui vont nous permettre de retracer une "nouvelle histoire" de l'évolution du pancréas post ligature à court, moyen et long terme, afin d'optimiser les connaissances dans l'étiologie et les complications dégénératives du diabète de type 2 non insulino-dépendant humain.

Les principaux résultats acquis dans cette étude sont les suivants:

- I Une des premières caractéristiques biologiques sur l'évolution de ce diabète concerne, à long terme, l'absence d'effets pathologiques visibles. De plus, la prise de poids corporel est relativement normale, malgré une atteinte pancréatique où la masse lipidique devient particulièrement envahissante.
- II Le paragraphe consacré aux remaniements du parenchyme exocrine montre que dès la pose de la ligature ce tissu subit les plus grandes modifications par l'installation d'une **fibrose**. Certains éléments ont permis de lui déterminer une origine fibroblastique.

Dans les tous premiers jours, on observe la présence de nombreux fibroblastes dont la multiplication est stimulée par des processus inflammatoires (lymphocytes, macrophages, granulocytes...) et indirectement par une activité enzymatique (trypsine) liée à la stagnation ou au refoulement du suc dans le canal pancréatique.

- L'analyse qualitative de cette fibrose confirme qu'elle est constituée essentiellement par du collagène de type I, reconnu comme étant synthétisé par les fibroblastes.
- Le point de départ du développement de ce collagène de type I se situe à partir des septa inter et intralobulaires qui, en s'élargissant, segmentent progressivement le pancréas et en s'enroulant réduisent les structures lobulaires. Ce collagène constitue l'essentiel de la trame fibro-conjonctive. A partir d'une étude ultrastructurale à long terme, ont été observés des fibres de collagène "intracytoplasmique" dans des cellules endocrines particulières de type mixtes à granulations  $\alpha$   $\beta$ , ce qui correspond à une localisation tout à fait exceptionnelle mais, qui symboliserait l'induction d'un processus dégénératif vis-à-vis de ces cellules.

L'utilisation d'un système d'analyse d'image vidéo appliqué à une coloration spécifique du tissu conjonctif (trichrome de Masson), a permis de déceler un développement rapide de ce tissu, puisqu'à 1 mois post ligature, il représente 95 % des parenchymes pancréatiques totaux. A cette période, la fibrose offre un aspect homogène qui permet de la classer dans la catégorie de **pancréatite chronique obstructive** de type humain. Par la suite, dès 3 mois, ce sont les phénomènes de dégénérescence qui prédominent et qui se manifestent lors du remplacement de la trame conjonctive par du tissu adipeux qui devient, à long terme (15 mois), le parenchyme dominant du pancréas. Durant cette dégénérescence, la visualisation de

nombreux cristaux de calcium dans les canaux et d'agrégats calciques parmi les fibres conjonctives, confirme l'évolution de cette fibrose, à long terme, en **pancréatite fibro-calcifiante**.

Un autre élément de "mutation" post ligature, dans ces structures exocrines, déterminant dans la restructuration pancréatique, concerne la transformation des acini en ductules dont l'épithélium n'est plus constitué que par des cellules centroacineuses hypertrophiées, et dans lesquels la lumière devient largement dilatée. Très rapidement, dès le 5e jour post ligature, la plupart de ces ductules se regroupent en complexes tubulaires multilobés. Deux événements essentiels ont pu alors être décelés, simultanément au 15e jour, au niveau de cet épithélium. Une pluristratification par multiplication des cellules centroacineuses hyperplasiées, réduisant en grande partie la lumière ductale, mime un certain état de cancer. La visualisation de nombreuses cellules claires au pôle basal des ductules, véritables cellules souches, n'est pas sans rappeler un retour à un certain stade embryonnaire et évoque le renouvellement des cellules à potentialité insulinique du tube digestif.

Parmi les problèmes qui se sont alors posés sur l'induction de ces deux processus, il est important de considérer le procédé de disparition des cellules acineuses, sous la pression du suc pancréatique, après la pose de la ligature. La présence de corps denses cytoplasmiques, au cours de la dégénérescence de ces cellules, indique un **phénomène de destruction apoptotique**, processus parallèle à des proliférations cellulaires ductales. Ces proliférations aboutissent chez le lapin, à la régénérescence de cellules endocrines, uniquement. Une remarque s'impose sur l'absence de régénérescence de cellules acineuses, qui semble d'avantage liée à un effet mécanique et "pervers" du maintien de la ligature, plutôt qu'à une absence de potentialité des cellules souches dans ce sens.

A partir de ces résultats, pour confirmer la différenciation et la multiplication des cellules endocrines, il faut tenir compte de l'observation de cellules claires qui sont de véritables cellules souches, puisqu'elles gardent le contact avec la membrane basale. Cette membrane a pu être localisée, lors de la qualification des collagènes, par la position périductulaire du collagène de type IV. Cette situation est le facteur déterminant de la différenciation. Cependant, la formation de cellules endocrines semble terminée à 1 mois, ce qui suggère un "cycle dans les processus de proliférations de ces cellules". Cette hypothèse se réfère à certains résultats décrivant un épaississement progressif du collagène de type IV qui, à 1 mois, de par sa structuration en feuillets, repousse la membrane basale et pourrait arrêter les phénomènes de différenciation du fait de la perte de contact avec les cellules souches. A cette période, ces néostructures endocrines se présentent alors, en amas rejetés à la périphérie des ductules.

Dans cette nouvelle situation, l'installation d'un cycle de régression ductale est apparue irréversible, tout au moins au cours de la période expérimentale. Cette régression débute par une involution des épithéliums pluristratifiés, qui va mettre un certain temps (6e mois) pour redonner à la plupart des ductules une structure initiale (5 jours post ligature) de complexes tubulaires à large lumière dilatée, multilobée, comme cela est particulièrement bien observé au 8e mois. Cette régression s'accentue lentement et est illustrée, à 15 mois, par la

réduction des complexes tubulaires en ductules séparés. L'épithélium n'est plus alors constitué que d'une mince couche de cellules cuboïdales d'allure dégénérée, et qui pour certains, va disparaître totalement.

En référence à tous ces résultats et pour mieux comprendre les phénomènes de "balancement" et de dégénérescence des structures ductales, il faut rappeler les données obtenues au cours de l'identification des collagènes montrant une implication des types III et IV. Chez le lapin normal, l'immunofluorescence du collagène de type III se présente avec une révélation inhabituelle de structures cellulaires plutôt qu'interstitielles, confirmant ainsi un marquage original des cellules centroacineuses. Les processus de dégénérescence post ligature de l'épithélium des ductules constitué par les cellules centroacineuses, pourraient être reliés à la présence de ce type III. Par un développement excessif à partir de la base de cet épithélium, ce collagène au-delà du premier mois, s'étalerait et s'accumulerait au niveau des cellules épithéliales hypertrophiées, entraînant ainsi leur mort. La localisation périductulaire et le suivi de l'évolution du collagène de type IV indiqueraient qu'il a un rôle actif, aussi bien dans le regroupement des ductules en complexes que dans leur individualisation, par des mécanismes mal connus. La subsistance de nombreuses membranes basales d'aspect collapsé, nettement repérées par l'immunofluorescence du collagène de type IV à 15 mois, sont les témoins de la disparition totale d'un certain nombre de ductules.

Il est donc possible d'attribuer:

- au collagène de type I, la constitution de la trame fibro-conjonctive
- au collagène de type IV, un rôle principal de promoteur dans le "cycle de formation de cellules endocrines" à partir des cellules souches ductales.
- aux collagènes de types III puis IV, une implication cette fois dans les phénomènes de dégénérescence au cours du "cycle des ductules".

Ces données soulignent l'importance fonctionnelle des collagènes dans la restructuration du pancréas après la ligature du canal pancréatique.

De l'ensemble des recherches sur le **devenir post ligature du tissu endocrine remanié**, une attention particulière est portée sur deux faits déterminants au cours de l'évolution du parenchyme endocrine néoformé:

- Les éléments cellulaires sont représentés tout d'abord par des amas (3 mois) puis des clusters (6 mois) constitués par les cellules B et enfin un regroupement en pseudoîlots (8 mois) lorsque s'attachent les cellules A. Ces phénomènes aboutissent à une
  nésidioblastose, mais qui apparaît d'un type particulier puisque l'on n'observe pas
  d'hyperinsulinémie, comme cela est le plus souvent rapporté dans l'espèce humaine. Cette
  nouvelle restructuration insulaire, à partir de 1 mois, lorsque le "cycle de proliférations" est
  terminé se situe lorsque les îlots de Langerhans sont totalement dissociés, et que le nombre
  de cellules B est le plus bas.
- Par l'étude immunohistochimique,il a pu être défini un **cycle de maturation** pour chacun des trois types cellulaires. La maturation de ces cellules semble suivre une chronologie différente de celle qui se déroule dans un pancréas embryonnaire, et à une échelle de temps beaucoup plus lente. Cette acquisition, démontrée par une réaction immunoréactive

nettement marquée dans le cytoplasme, se situe respectivement à 6 mois pour les cellules B, à 8 mois pour les cellules A et au-delà de 8 mois pour les cellules D qui présentent alors une amorce de leur prolongement cytoplasmique typique. Une certaine difficulté apparaît lors de la détermination du "cycle de maturation" des cellules A (8 mois) pour différencier les néoformées de celles provenant de la dissociation insulaire. En effet, lors de la dissociation (1 mois), ces cellules gardent leur immunoréactivité, contrairement aux cellules B, même si elle est légèrement diminuée. Par la suite à 8 mois, la nette augmentation de l'intensité du marquage d'un plus grand nombre de cellules A indique alors, que les cellules néoformées ont acquis leur maturation.

Au cours de ces processus, les principales anomalies morphostructurales cellulaires relevées se caractérisent globalement par des changements morphologiques plus marqués pour les cellules D et A, morphométriques pour les cellules B et dans la redistribution pour les cellules A qui apparaissent nettement en surnombre lors de la constitution des pseudo-îlots. Dans ces nouvelles structures insulaires type pseudo-îlots, l'augmentation des cellules A ne semble pas compenser une éventuelle diminution du nombre de cellules B car, ces dernières sont révélées en grand nombre par le peptide-c dans ces néostructures. En effet, il semble que les cellules A se regroupent autour des clusters par un "chimiotactisme", entraînant "l'étouffement" à la fois physique et fonctionnel des cellules B. Le dysfonctionnement de ces cellules B a été vérifié par certains résultats, à savoir la **perte de leur maturation** associée à une *accumulation de proinsuline*.

Il est important de retenir que chez les lapins ligaturés, les processus de nésidioblastose n'aboutissent pas à la formation de véritables îlots qui auraient retrouvé leur microarchitecture initiale, pas plus qu'à une normalisation du fonctionnement de leur cellule. Dans de telles structures, les cellules D montrent leur incapacité à restaurer totalement leurs prolongements cytoplasmiques, confirmant ainsi l'impossibilité de rétablir une régulation paracrine.

Les recherches sur les complications dégénératives post ligature ont permis de révéler, à long terme chez le lapin, la formation de dépôts amyloïdes pancréatiques, caractéristiques de certains diabètes humains non insulino-dépendants. La localisation intracytoplasmique de ces formations au niveau des cellules B est un phénomène tout à fait original et particulier au lapin; ces dépôts sont la preuve d'un dysfonctionnement chronique de ces cellules. La présence également de très nombreuses fibrilles amyloïdes (corrélée au composant-P amyloïde), au niveau du tissu fibreux de remplacement, confirme la permanence de processus inflammatoires et donc de souffrance de ce tissu. La bilocalisation de ces dépôts indique une double origine, locale liée au polypeptide IAPP (Islet Amyloid Polypeptide) pour les cellules B où systémique, liée à des fragments d'immunoglobulines en relation avec la chronicité des processus inflammatoires pour le tissu fibreux.

Une expérimentation complémentaire a permis d'établir et donc de confirmer, pour la première fois, la structure primaire de l'IAPP chez le lapin normal. Il est constitué de 37 acides aminés, comme chez tous les mammifères. Sa structure est plus proche de celle de l'homme (5 acides aminés différents) que de celle des rongeurs (10 acides aminés). La **séquence fibrillogène** de ce polypeptide a pu être identifiée en positions 25-28, qui ne diffère des

autres mammifères que par la phénylalanine au lieu de la leucine donnant ainsi le type AIFS (-alanine - isoleucine - phénylalanine - sérine-) au lieu de AILS. Ce dernier élément est une caractéristique indispensable de l'IAPP et confirme ainsi chez le lapin la capacité de former des dépôts amyloïdes dans certaines situations pathologiques, comme le développement du diabète non insulino-dépendant post ligature. L'IAPP est connu pour être co-stocké et sécrété avec l'insuline par les cellules B. Chez les lapins diabétiques, un dysfonctionnement dans la production de l'insuline a été démontré et pourrait être un facteur susceptible de favoriser les processus de polymérisation de l'IAPP en fibrilles amyloïdes, ce qui en retour aggraverait le dysfonctionnement des cellules B et donc l'état diabétique.

Enfin, un des derniers points intéressant de l'étude de ce modèle concerne l'analyse du suc pancréatique présent encore à long terme, après la ligature. En particulier, l'élévation du pH d'une unité (8,35 à 9,40) serait vraisemblablement due à une sécrétion accrue des bicarbonates liée à une hyperactivité des cellules centroacineuses. On ne peut pas exclure, dans les structures périductulaires et notamment dans les cellules endocrines B néoformées, une même élévation de pH qui permettrait de comprendre en partie, l'altération de certains mécanismes distaux dans la production d'insuline active et la formation des fibrilles amyloïdes. Dans le premier cas, l'impossibilité de maintenir l'acidité du contenu vésiculaire entraînerait la non transformation des vésicules épineuses en vésicules lisses (étape précédant l'exocytose de l'insuline). Dans le deuxième cas, l'élévation du pH pourrait lever l'inhibition de la proline (en position 30 dans le polypeptide IAPP) qui en milieu acide est déterminante pour empêcher la polymérisation de l'IAPP en dépôts amyloïdes.

La restructuration morphologique du pancréas post ligature, permet de mieux comprendre les principales **caractéristiques biochimiques** de ce modèle définit à long terme. Ainsi, la dérégulation glycémique pourrait s'expliquer, globalement, à partir de tous ces résultats par la constatation d'un **hypofonctionnement précoce et chronique des cellules B** s'opposant à un hyperfonctionnement des cellules A à court et à long termes.

La détermination des différents paramètres biochimiques montre:

- une hyperglycémie fluctuante qui s'installe rapidement au cours des 3 premiers mois et qui réapparaît tardivement à 450 jours, que nous avons pu associer à une hyperglucagonémie (maximale à 30 et 450 jours) dominante par rapport à une hypoinsulinémie précoce et transitoire (30 jours). L'hyperglucagonémie à court terme peut être due à l'absence de régulation paracrine des cellules A par les cellules D, du fait de la perte du prolongement cytoplasmique, durant la dissociation des îlots de Langerhans. A la même période, une hypertrophie nucléaire des cellules A confirme l'hyperactivité transitoire de ces cellules. A long terme, corrélée à une accumulation pancréatique du glucagon, lors de l'évolution des pseudo-îlots, l'hyperglucagonémie est associée à une élévation du nombre et à l'hyperfonctionnement des cellules A, traduisant une nésidioblastose de type A.
- L'hypoinsulinémie à court terme, parallèle à une réserve pancréatique en insuline réduite de moitié, peut être reliée à une diminution du nombre de cellules B et à leur hypoactivité, lors des processus de dissociation des îlots, et à l'absence de maturation des cellules nouvellement formées.

- L'hypo-c-peptidémie, chronique à partir du 30<sup>ème</sup> jour, qui n'est plus corrélée à l'insulinémie, confirme l'hypofonctionnement des cellules B. Ce phénomène a été rapporté chez l'homme atteint d'un diabète de type 2.
- Une intolérance au glucose résultant principalement d'un défaut de mobilisation de l'insuline, qui persiste même lors de la formation des clusters néoformés et qui s'aggrave encore à long terme (450 jours) lors de la reconstitution des pseudo-îlots. L'évolution de ces pseudo-îlots se fait au profit des cellules A et au détriment des cellules B qui présentent une altération des mécanismes cellulaires distaux, impliqués dans la synthèse d'une insuline biologiquement active.

Cependant, une étape privilégiée à caractère éphémère semble apparaître lors de la constitution des pseudo-îlots (à 8 mois) durant laquelle le fonctionnement des cellules B, comme celui des cellules A, se rapproche de la normalité, laissant supposer l'amorce d'une évolution vers un pancréas endocrine en voie de retrouver son état initial.

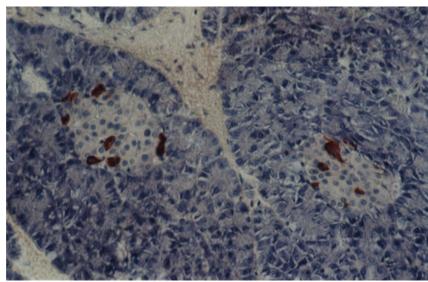
L'étude cinétique des constantes biochimiques comme de celle des remaniements des parenchymes pancréatiques, confirme une dérégulation de la glycémie "irréversible" lors de l'évolution du diabète non insulino-dépendant post ligature chez le lapin. L'hypofonctionnement des cellules B comme l'hyperfonctionnement des cellules A semble découler d'une même "loi" qui serait, une impossibilité de communications à la fois entre cellules homologues et hétérologues (paracrinie), aussi bien lors de la perte de la microarchitecture des îlots de Langerhans que lors de la reconstitution des pseudo-îlots.

De l'ensemble de ces données, à long terme, il ressort que ce modèle de diabète expérimental de type 2, qui se développe chez le lapin après ligature du canal pancréatique, est un bon modèle d'étude aussi bien pour l'installation et le développement du diabète non insulino-dépendant que pour les complications dégénératives qui lui sont associées. Ainsi, ce modèle par ces trois possibilités, mime particulièrement bien un certain diabète de type 2 humain, mais se démarque d'avantage des autres modèles animaux cytotoxiques, pancréatectomisés et de diabète spontané chez le rat. En outre, il permet de mieux comprendre les nombreux échecs obtenus après ligature du canal pancréatique, dans les cas de transplantation du pancréas, dans un but de thérapie antidiabétique.

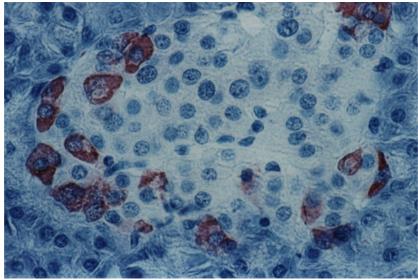
# Situation du modèle Iapin N.I.D. par rapport au modèle rat et à l'Homme

Caractéristiques	Rat N.I.D.	Lapin N.I.D.	Homme N.I.D.
hyperglycémie	permanente	transitoire	transitoire
intolérance au glucose		chronique	. <u>J</u>
hypoinsulinémie	non	transitoire	+
hypo c-peptidémie		+	+
hyperglucagonémie	?	+	+
peu de cellules B	+	+	+
beaucoup de cellules A	?	+	+
nésidioblastose		+	+
fibrose		interstitielle et périductale	interstitielle et périductale
pancréatite: - chronique obstructive		+	+
- calcifiante		+	+
dépôts amyloïdes	?	+	+

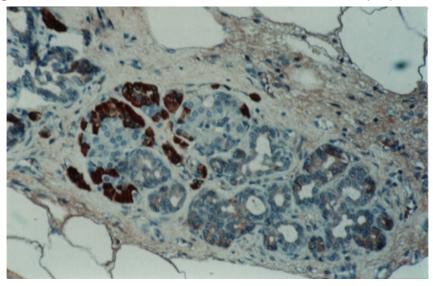
#### Photo a



#### Photo b

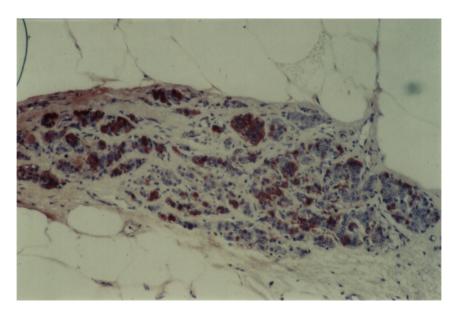


- **a aspect général d'un pancréas témoin** montrant deux îlots de Langerhans au sein d'un tissu acineux compact disposé en lobules séparés par du tissu conjonctif. Les cellules endocrines colorées en rouge sont immunoréactives vis-à-vis du glucagon. (x 192).
- b llot de Langerhans montrant des cellules A situées essentiellement en périphérie. (x 480).

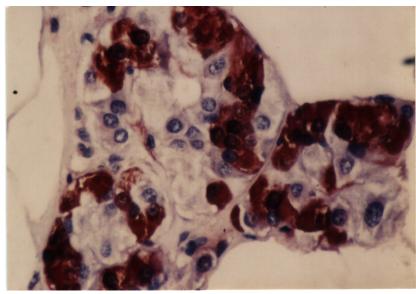


**Aspect d'un pancréas diabétique**. On distingue des clusters de cellules endocrines avec un nombre important de cellules A très immunoréactives, quelques ductules, entourés par du tissu fibro-conjonctif et adipeux. (x 192).

#### Photo a



### Photo b



- a aspect général d'un pancréas diabétique montrant de nombreux clusters composés en majorité de cellules A comprimés au sein d'un tissu fibro-conjonctif entouré par du tissu adipeux. (x 120).
- **b** Intense immunoréactivité des cellules A en nombre important dans chaque cluster composé essentiellement de cellules néoformées à dominance A. Ces structures endocrines sont entourées de gros adipocytes. (x 480).

Schéma récapitulatif:
Corrélation du dysfonctionnement endocrine
et des remaniements cellulaires chez le modèle lapin NID.