

Diabète de type 2 : dédifférenciation des cellules bêta pancréatiques

M. Diedisheim*, R. Scharfmann

INSERM U1016, Institut Cochin, Université Paris Descartes. Paris. France

* marc.diedisheim@yahoo.fr

Depuis quelques années, la dédifférenciation est devenue un champ d'étude émergent dans le diabète de type 2. Ce concept remet en question le dogme d'une cellule bêta pancréatique définitivement différenciée et ouvrirait la voie à de nouvelles recherches thérapeutiques. Ce phénomène, supporté par plusieurs modèles murins robustes, demeure cependant une hypothèse chez l'Humain dans le cadre du diabète de type 2. Après avoir précisé le lien entre diabète de type 2 et cellule bêta pancréatique, nous allons passer en revue les arguments existant dans des modèles murins puis les arguments, plus indirects, chez l'Humain, supportant un tel mécanisme.

Diabète de type 2 et masse bêta pancréatique

Selon l'OMS, la prévalence du diabète a augmenté de 4,7 à 8,5 % de la population adulte entre 1980 et 2014, soit un nombre absolu d'individus diabétiques quadruplant de 108 à 422 millions. Dans plus de 95 % des cas, il s'agit d'un diabète de type 2, globalement caractérisé par une résistance à l'insuline d'une part, et une insuffisance relative dans la sécrétion d'insuline d'autre part, combinés à différents degrés selon les patients [1]. Lorsque l'insulino-résistance apparaît, les cellules bêta pancréatiques maintiennent une glycémie normale en augmentant leur sécrétion d'insuline. En revanche,

lorsque cette sécrétion se révèle insuffisante, la glycémie augmente et devient pathologique. Plusieurs études longitudinales rapportent ainsi une relation en U inversé entre la glycémie à jeun et l'insulinémie [2] : augmentation de l'insulinémie chez les sujets normoglycémiques et intolérants au glucose, associée à une glycémie normale malgré l'insulino-résistance, suivie d'une diminution de l'insulinémie lorsque la glycémie dépasse 7 mmol/l (Figure 1). De cette manière, si l'insulino-résistance est fréquente et précoce dans l'intolérance au glucose, une dysfonction de la cellule bêta avec diminution de la sécrétion d'insuline est toujours retrouvée au cours du diabète de type 2 [3].

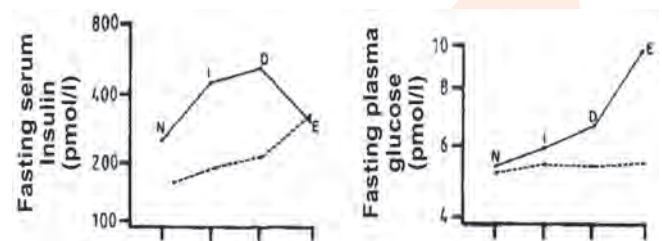


Figure 1 : Evolution des glycémies et insulinémies à jeun chez des sujets développant un diabète de type 2

N = stade normoglycémique ; I = stade d'intolérance au glucose ; D = diagnostic du diabète de type 2 ; E = dernière évaluation (Tiré de [2])

Cette diminution en cellules bêta fonctionnelles a longtemps été expliquée par deux phénomènes : la diminution de la sécrétion en insuline en réponse au

glucose [4] et la diminution du nombre de cellules bêta. Une diminution de la masse bêta, bien qu'hétérogène, est aujourd'hui acceptée par une large partie du monde scientifique, surtout lorsqu'elle est comparée à des individus appareillés pour l'indice de masse corporelle [5]. En revanche, sa chronologie au cours de l'intolérance au glucose et du diabète de type 2 est très imprécise. L'amélioration de la fonction bêta après un contrôle glycémique intensif court [6] peut être un argument pour un nombre normal de cellules bêta présentes au stade précoce de la dysrégulation glycémique. En revanche, la nécessité d'une intensification de l'arsenal thérapeutique et le moindre contrôle glycémique avec le temps [7] pourraient être expliqués par une diminution au long cours du nombre de cellules bêta. La masse bêta diminue d'ailleurs avec la durée d'évolution du diabète dans certaines études : comparée à des sujets contrôles, cette masse bêta est de 24 et 54 % plus faible chez les sujets avec moins de 5 ans et plus de 15 ans d'évolution de diabète respectivement [5]. C'est dans ce contexte que plusieurs équipes cherchent à identifier des molécules permettant de stimuler la prolifération des cellules bêta, aujourd'hui sans répercussion clinique [8].

Un point commun à toutes les études sus-citées dans la quantification des cellules bêta est leur caractérisation définie par la production d'insuline. Concrètement, une cellule dont une partie du cytoplasme contient de l'insuline en immuno-histochimie est considérée comme une cellule bêta. Pour les analyses morphométriques les plus récentes, c'est la surface immunomarquée qui est quantifiée et rapportée à la surface de coupe ; la masse bêta est donc plus précisément une masse insulinomarkée. Or, une nouvelle hypothèse pour expliquer la diminution de la masse bêta fonctionnelle serait une dédifférenciation cellulaire : les cellules bêta resteraient présentes, mais perdraient leurs propriétés de cellule bêta, dont la production d'insuline. Dans ce cas, les quantifications classiques de masses bêta basées sur la présence d'insuline seraient donc prises en défaut.

Afin d'étudier les arguments pour un tel mécanisme, nous allons tout d'abord revoir le principe de différenciation cellulaire, puis les arguments existant dans des modèles murins, avant de voir les données chez l'Humain.

Différenciation : d'un processus passif à un processus actif

Le mécanisme de différenciation cellulaire a longtemps été considéré comme une suite de choix binaires, conduisant une cellule souche à se différencier progressivement en passant par plusieurs états intermédiaires, chaque stade étant irréversiblement acquis. Plus récemment, Blau et Baltimore proposent un nouveau postulat : l'état de différenciation d'une cellule n'est pas un état finalisé et statique, mais résulte d'un processus dynamique [9]. En d'autres termes, une cellule spécialisée est dans un état de différenciation dynamique maintenu par un ensemble de facteurs régulateurs. Ainsi, l'identité cellulaire n'est pas fixée de manière irréversible, mais peut évoluer en réponse à des signaux spécifiques : des facteurs intrinsèques, incluant la diminution d'expression de facteurs de transcription clés et extrinsèques (molécule circulante par exemple), peuvent moduler l'état de différenciation cellulaire [10].

Un modèle de dédifférenciation concerne la régénération d'un membre après amputation chez le triton : après ablation d'un membre, un blastème est formé au niveau du site d'amputation, constitué d'un amas de cellules indifférenciées qui vont proliférer puis reconstituer le membre amputé en reformant l'ensemble des tissus nécessaires (cartilage, muscle, tissu conjonctif, peau, ...). Plusieurs études de traçages cellulaires ont démontré qu'une partie des cellules du blastème provient de cellules habituellement considérées dans un état de "différenciation terminale" : par exemple, les cellules dérivant du muscle donnent naissance, après dédifférenciation au sein du blastème, à l'ensemble des cellules mésenchymateuses du membre, incluant les myoblastes et chondrocytes [11].

Cellule bêta pancréatique : une cellule différenciée

La cellule bêta pancréatique est par excellence une cellule différenciée, véritable usine à produire de l'insuline : plus de 40 % des ARNm présents dans la cellule sont des ARNm codant pour l'insuline [12]. Corrélié à cet état

avancé de différenciation, la cellule bêta humaine ne prolifère pas ou très peu : Mezza et al. ne retrouve aucun marquage nucléaire KI67 (un marqueur de prolifération cellulaire) après avoir observé 37.845 cellules bêta humaines [13]. Dans le même sens, en étudiant les concentrations de carbone 14, Perl et al. concluent que les cellules bêta sont formées avant le 30^{ème} anniversaire de chaque individu, donc sans prolifération par la suite [14]. Devant ce dogme de cellule bêta dans un état de "différenciation terminale", nous allons passer en revue les arguments permettant d'affirmer la capacité d'une cellule bêta à se dédifférencier.

Démonstration de la plasticité de la cellule bêta murine

Dès 1999, Jonas et al. apportent des arguments pour une dédifférenciation de la cellule bêta *in vivo* chez la souris. Dans cette étude, le diabète est induit par une pancréatectomie partielle de 90 % : après deux semaines, les îlots endocrines dans la partie pancréatique restante ont un contenu effondré en ARNm spécifiques de la cellule bêta (par exemple insuline, facteurs de transcription PDX-1 et NKX6.1). En plus de ces diminutions, est associée une augmentation d'expression de gènes habituellement non exprimés dans les cellules bêta (LDH-A et c-MYC). Ces résultats pourraient suggérer une simple diminution du nombre de cellules bêta suite à la glucotoxicité. Mais les auteurs démontrent qu'une normalisation pharmacologique de la glycémie (injection de phlorizine, un inhibiteur de SGLT2) permet une restauration complète de l'expression de ces ARNm, tant pour les gènes bêta que non bêta [15].

En partant du postulat que la prolifération des cellules bêta est trop faible pour expliquer ce retour à la normale après normalisation des glycémies, ces données suggèrent un mécanisme de dédifférenciation de la cellule bêta suite à une hyperglycémie chronique : l'état diabétique induit par la pancréatectomie conduit à une diminution d'expression de gènes spécifiques dans les cellules bêta, dont l'arrêt de production de l'insuline, mais ces cellules restent présentes dans les îlots, caractérisant la dédifférenciation avec une induction de gènes non

bêta. Après normalisation de la glycémie, ces ex-cellules bêta se redifférencient en cellules bêta fonctionnelles.

Afin d'avoir des arguments directs d'une dédifférenciation de la cellule bêta, plusieurs équipes ont par la suite utilisé un système de traçage cellulaire à l'aide du système CRE-Lox : ce système permet de marquer de manière définitive une cellule bêta pancréatique par l'expression d'un fluorochrome, y compris si la synthèse d'insuline s'arrête secondairement [16].

Dans cette étude de Weinberg et al., l'hypothèse d'une prolifération des cellules bêta lors de la culture *in vitro* d'îlots murins s'est révélée négative. En revanche, les résultats démontrent la dédifférenciation d'une partie des cellules bêta lors de la culture *in vitro* d'îlots murins : si toutes les cellules exprimant le fluorochrome contiennent de l'insuline après 24h de culture *in vitro*, une partie importante des cellules fluorochrome-positives ne contiennent plus d'insuline après 14 jours de culture, ni PDX1 ou le transporteur de glucose GLUT2, deux protéines clés de la cellule bêta. Cette étude démontre donc la plasticité des cellules bêta murines, lorsqu'elles sont soumises à un stress *in vitro*. Dans la même optique, une transdifférenciation de la cellule bêta en cellule alpha par délétion spécifique du gène *Dnmt1* dans les cellules bêta est également rapportée [17].

Dédifférenciation et diabète

Talchai et al. démontrent plus clairement l'implication d'une dédifférenciation dans le développement d'un diabète [18]. Suite à la délétion d'un gène (*FoxO1*), les souris restent initialement normoglycémiques, mais deviennent diabétiques lorsqu'elles sont soumises à un stress tel que des grossesses répétées (associées à des besoins majorés en insuline). Cet état diabétique est associé à une diminution très importante du nombre de cellules bêta, définies par un immuno-marquage classique de l'insuline. Grâce à un système de traçage cellulaire, ils démontrent que l'effondrement de la masse bêta n'est pas dû à une disparition de ces cellules, mais à une dédifférenciation de la cellule bêta : ces cellules sont toujours présentes dans l'îlot, mais n'expriment plus d'insuline (Figure 2), ainsi que plusieurs facteurs de transcription clés de la cellule bêta (MAFA, PDX1).

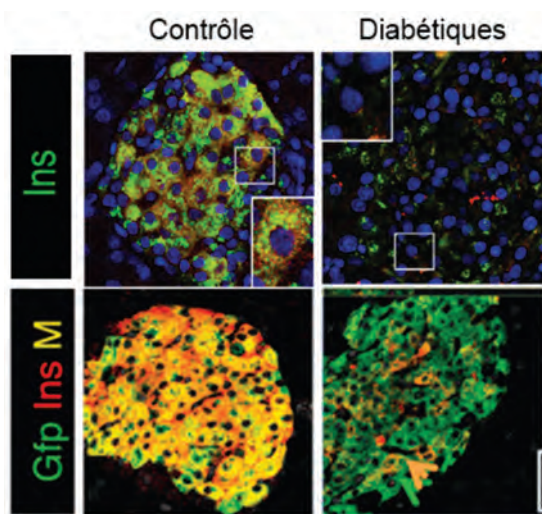


Figure 2 : Dédifférenciation chez la souris

1^{ère} ligne : diminution très importante de la quantité d'insuline dans les îlots des souris diabétiques. 2^{ème} ligne : grâce à une manipulation génétique, les cellules bêta expriment un fluorochrome vert ; on constate que l'îlot d'une souris diabétique contient toujours des cellules bêta, mais qui n'expriment plus d'insuline car dédifférenciées (Adapté de [18])

De plus, lors de cet état diabétique, ces cellules bêta dédifférenciées expriment des gènes habituellement exprimés :

- ▶ dans les progéniteurs pancréatiques (dont Neurogénine 3, un gène clé des progéniteurs pancréatiques, pouvant faire évoquer un retour vers un stade de progéniteur),
- ▶ ou dans des cellules alpha (expression du glucagon, bien que l'ensemble des facteurs de transcriptions exprimés ne soit pas similaire aux cellules alpha contrôles). Ces marqueurs "positifs" de dédifférenciation de la cellule bêta sont retrouvés dans d'autres modèles de souris spontanément diabétiques (souris db/db ou GIRKO). Dans les îlots de ces souris, les auteurs rapportent la présence de nombreuses cellules chromogranine A positives (caractérisant les cellules endocrines), mais ne contenant aucune hormone pancréatique [18].

Nous avons vu que les travaux de Jonas et al. suggéraient une réversibilité de la dédifférenciation de la cellule bêta après normalisation de la glycémie [15]. Cette réversibilité est plus clairement démontrée avec un système de traçage cellulaire dans un modèle de souris rendues diabétiques par inactivation d'un canal potassique de la cellule bêta (sous-unité Kir6.2) [19]. Dans cette étude, un ensemble de transgènes chez la souris permet :

- ▶ de faire exprimer la protéine fluorescente GFP uniquement dans les cellules exprimant l'insuline à deux mois de vie (donc dans les cellules bêta),
- ▶ et de rendre secondairement les souris diabétiques par inactivation du canal potassique. Comme dans les études précédentes, les souris devenues diabétiques présentent un effondrement du contenu en insuline dans le pancréas, mais il persiste des cellules bêta dédifférenciées au sein des îlots, dont une majorité exprime la protéine Neurogénine-3. En revanche, chez les souris dont les glycémies sont secondairement diminuées par insulinothérapie, on constate une redifférenciation de ces cellules bêta dédifférenciées en cellules bêta matures produisant à nouveau de l'insuline. La dédifférenciation de la cellule bêta dans un contexte d'hyperglycémie, et réversible lors du retour en normoglycémie, est donc clairement démontrée dans plusieurs modèles murins *in vivo*.

Données chez l'Humain

Si les modèles murins ont nettement participé à améliorer notre compréhension de la cellule bêta, il existe plusieurs différences entre ces modèles et l'Humain, empêchant un report systématique des conclusions issues de modèles murins chez l'Humain (différence d'expression génique, différence de structure, ...) [20]. Chez l'Humain, il existe des arguments plus indirects.

Tout d'abord, nous avons pu modéliser *in vitro* la dédifférenciation de la cellule bêta humaine : un traitement par le *fibroblast growth factor 2* (FGF2) induit une dédifférenciation d'une lignée bêta humaine (les cellules EndoC-βH1) et d'îlots pancréatiques humains [21]. Concernant la lignée de cellules bêta, le nombre de cellules ne varie pas en présence de FGF2, mais la production d'insuline diminue de manière drastique, ainsi celle de plusieurs gènes clés de la cellule bêta, caractérisant le mécanisme de dédifférenciation. Parallèlement, les cellules dédifférenciées expriment des marqueurs habituellement non exprimés dans une cellule bêta mature, mais exprimés entre autres dans les progéniteurs pancréatiques (SOX9, HES1). L'étude d'îlots pancréatiques humains a permis de confirmer ces résultats sur des cellules bêta primaires.

Nous avons également pu démontrer que le processus de dédifférenciation modifie la réponse de la cellule bêta

à des signaux extra-cellulaire, par la sécrétion de récepteurs solubles inhibant la liaison d'un ligand extra-cellulaire à son récepteur membranaire. Nos travaux confirment donc qu'une cellule bêta humaine qui arrête de produire de l'insuline n'est pas forcément morte, mais peut rester présente au sein de l'îlot pancréatique dans un statut dédifférencié.

L'inducteur de la dédifférenciation dans notre modèle *in vitro* est donc le FGF2. De manière intéressante, nous avons identifié que le gène *FGF2* est très nettement plus exprimé dans plusieurs cellules pancréatiques péri-insulaires : cellules canalaire, endothéliales et pancréatiques stellaires (Figure 3). Chez des individus diabétiques de type 2, ces cellules pourraient donc être une source de FGF2, qui par une action paracrine dédifférencierait les cellules bêta, entraînant une diminution de la synthèse de l'insuline et donc une hyperglycémie. En ce sens, nous avons identifié que les îlots pancréatiques de patients diabétiques de type 2 surexpriment (en ARNm) le récepteur du FGF2, ainsi que deux marqueurs de dédifférenciation identifiés dans notre modèle, SOX9 et HES1 (Figure 3) [21].

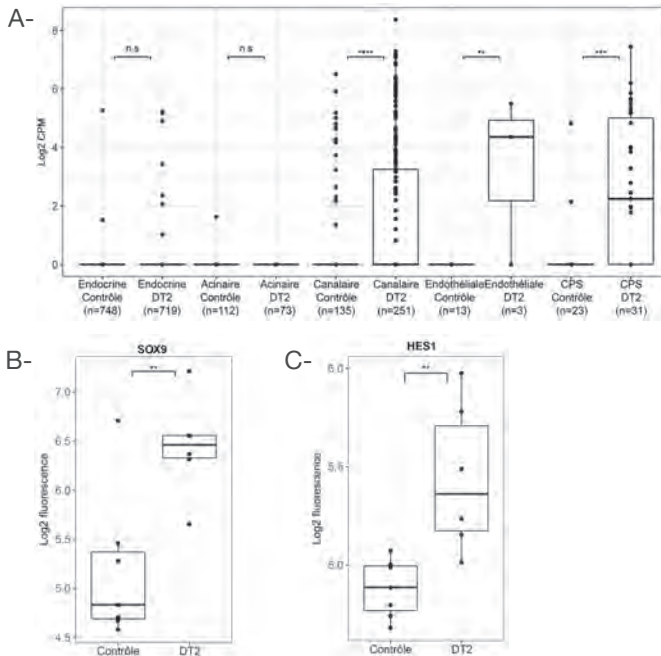


Figure 3 : (A) Expression de *FGF2* dans plusieurs types cellulaires pancréatiques chez des individus contrôles ou diabétiques de type 2. (B) Expression de *SOX9* et (C) *HES1* dans des îlots pancréatiques d'individus contrôles ou diabétiques de type 2

p < 0.01, *p < 0.001. DT2 : diabète de type 2 ; CPS : cellules pancréatique stellaire (Tiré de [21])

D'autres équipes rapportent également des arguments pour une dédifférenciation de la cellule bêta au cours du diabète de type 2, essentiellement par immunohistochimie. Ainsi, des immunomarquages d'îlots pancréatiques d'individus diabétiques de type 2 révèlent des cellules insulaires chromogranine-positives (donc des cellules endocrines), présentant des granules d'exocytose en microscopie électronique compatibles avec une cellule bêta, mais ne contenant aucune hormone pancréatiques (insuline, glucagon, somatostatine), suggérant que des cellules bêta ont perdu la capacité de produire de l'insuline, tout en restant présentes dans l'îlot [22]. Une autre étude a permis une quantification plus fine de ces possibles cellules bêta dédifférenciées (définies donc par la présence de cellules endocrines n'exprimant aucune hormone insulaire) : ces cellules représentent 8 % des cellules bêta chez les individus non diabétiques, vs 32 % chez les individus diabétiques de type 2 (Figure 4) [23].

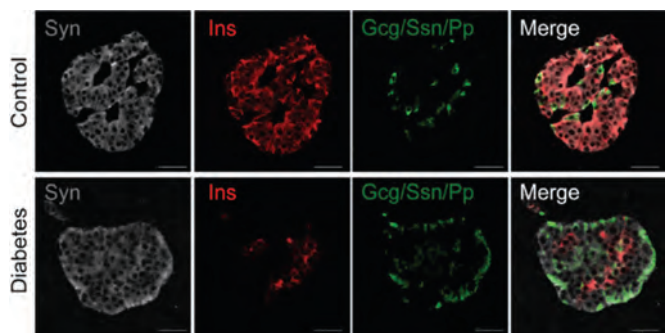


Figure 4 : Dédifférenciation de la cellule bêta humaine au cours du diabète de type 2

Immunomarquage d'îlots pancréatiques d'individus sains ou diabétiques de type 2 pour la synaptophysine (Syn : marqueur endocrinien) et des hormones pancréatiques (insuline : Ins, glucagon : Gcg, somatostatine : Ssn, polypeptide pancréatique : Pp). La proportion de cellules endocrines (synaptophysine-positives, gris) n'exprimant aucune hormone insulaire augmente de 6,5 à 16,8 % chez les patients diabétiques de type 2, représentant 8,4 et 31,7 % du nombre de cellules bêta respectivement (Tiré de [23])

Mais tous ces arguments restent indirects chez l'Humain, et parfois contradictoires. Ainsi, une autre étude ne retrouve qu'une proportion bien plus faible de cellules endocrines ne contenant aucune hormone au sein des pancréas d'individus diabétiques de type 2, avec en moyenne une cellule tous les 10 îlots [24]. Cet aspect contradictoire d'études similaires entre plusieurs équipes est un phénomène relativement récurrent dans le domaine de la diabétologie. Une

des raisons, lors d'études de tissus issus de patients "diabétiques de type 2", est l'hétérogénéité de ce diagnostic clinique. Par exemple, l'indice de masse corporel des individus donneurs d'îlots peut varier de 20 à 40 kg/m², suggérant un phénotype et donc une physiopathologie du diabète différente entre les individus étudiés. C'est pourquoi plusieurs équipes appellent aujourd'hui à mieux caractériser les individus donneurs d'îlots pancréatiques, afin de mieux préciser les résultats et leur reproductibilité [25].

Conclusion

Il est aujourd'hui certain qu'une cellule bêta peut se différencier. Longtemps considérée comme vouée à synthétiser de l'insuline ou à disparaître, la cellule bêta peut donc perdre ses caractéristiques de cellule différenciée. Elle revient alors dans un état plus proche de progéniteurs pancréatiques, devenant alors invisible aux quantifications classiques de masse bêta basées sur des immuno-marquages de l'insuline. Cette différenciation est elle-même dynamique, pouvant régresser après normalisation de la glycémie dans plusieurs modèles murins. Chez l'Humain, un tel mécanisme est étayé par plusieurs études, mais reste à confirmer. Cette hypothèse, si elle était confirmée au cours du diabète de type 2, ouvrirait la voie à de nouvelles recherches thérapeutiques, dont l'objectif serait de redifférencier ces cellules différenciées en cellules bêta productrices d'insuline, voire de prévenir cette différenciation.

Conflit d'intérêt

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt.

Références

1. Kahn CR. Banting lecture: Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes*. 1994;43:1066-84.
2. Saad MF et al. Sequential changes in serum insulin concentration during development of non-insulin-dependent diabetes. *Lancet*. 1989;1:1356-9.
3. Weir GC. Which comes first in non-insulin-dependent diabetes mellitus: insulin resistance or beta-cell failure? Both come first. *JAMA*. 1995;273:1878-9. (1995).
4. Gerich JE. The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: Impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocrine Reviews*. 1998;19:491-503.
5. Rahier J et al. Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2008;10 Suppl 4:32-42.
6. Kosaka K et al. Increase in insulin response after treatment of overt maturity-onset diabetes is independent of the mode of treatment. *Diabetologia*. 1980;18:23-8.
7. U.K. Prospective Diabetes Study. U.K. Prospective diabetes study 16: Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: A progressive disease. *Diabetes*. 1995;44:1249-58.
8. Aguayo-Mazzucato C, Bonner-Weir S. Pancreatic β Cell Regeneration as a Possible Therapy for Diabetes. *Cell Metab*. 2018;27(1):57-67.
9. Blau HM, Baltimore D. Differentiation requires continuous regulation. *J Cell Biol*. 1991;112:781-3.
10. Szabat, M. et al. Maintenance of beta-cell maturity and plasticity in the adult pancreas: developmental biology concepts in adult physiology. *Diabetes*. 2012;61:1365-71.
11. Namenwirth, M. The inheritance of cell differentiation during limb regeneration in the axolotl. *Dev.Biol*. 1974;41:42-56.
12. Nica AC et al. Cell-type, allelic, and genetic signatures in the human pancreatic beta cell transcriptome. *Genome Res*. 2013;23:1554-62.
13. Mezza T et al. Insulin Resistance Alters Islet Morphology in Nondiabetic Humans. *Diabetes*. 2014;63:994-1007.
14. Perl SY et al. Significant human β -cell turnover is limited to the first three decades of life as determined by in vivo thymidine analog incorporation and radiocarbon dating. *J Clin Endocrinol. Metabolism*. 2010;95:E234-E239.
15. Jonas JC et al. Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic β cell differentiation in an animal model of diabetes. *J Biol Chem*. 1999;274:14112-21.
16. Weinberg N et al. Lineage tracing evidence for in-vitro dedifferentiation, but rare proliferation, of mouse pancreatic β cells. *Diabetes*. 2007;56:1299-304.
17. Dhawan S et al. Pancreatic β Cell Identity Is Maintained by DNA Methylation-Mediated Repression of *Arx* *Dev Cell*. 2011;20:419-29.
18. Talchai C et al. Pancreatic beta cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic beta cell failure. *Cell*. 2012;150:1223-34.
19. Wang Z et al. Pancreatic β cell dedifferentiation in diabetes and redifferentiation following insulin therapy. *Cell Metab*. 2014;19:872-82.
20. Brissova M et al. Assessment of Human Pancreatic Islet Architecture and Composition by Laser Scanning Confocal Microscopy. *J Histochem Cytochem*. 2005;53:1087-97.
21. Diedisheim M et al. Modeling human pancreatic beta cell dedifferentiation. *Mol Metab*. 2018;10:74-86.
22. Marselli L et al. Are we overestimating the loss of beta cells in type 2 diabetes? *Diabetologia*. 2014;57:362-5.
23. Cinti, F. et al. Evidence of β -cell dedifferentiation in human type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol Metab*. 2016;101:1044-54.
24. Butler AE et al. β -Cell deficit in obese type 2 diabetes, a minor role of β -Cell dedifferentiation and degranulation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101:523-32.
25. Poutout V et al. A call for improved reporting of human islet characteristics in research articles. *Diabetologia*. 2019;62:209-11.