

manchettes sur la recherche

Le cyberbulletin de la recherche de la FRDJ N° 70

Mai 2008

Dans ce numéro :

- Une culture réussie de cellules bêta humaines *in vitro*
- Une thérapie des anticorps active des cellules régulatrices clés et modifie l'évolution de la maladie
- Des cellules souches humaines, une fois greffées à des souris, sont entièrement fonctionnelles

Des « descendantes » de cellules bêta adultes humaines survivent et se reproduisent *in vitro*

Des chercheurs financés par la FRDJ d'Israël et de France utilisent une démarche novatrice de lignées cellulaires pour suivre le destin de cultures de cellules bêta adultes humaines *in vitro*. Ils ont découvert que, contrairement aux cultures de cellules bêta de souris en laboratoire, les cellules bêta adultes humaines se « dédifférencient » *in vitro* et peuvent aussi proliférer énormément en culture, une propriété essentielle si on veut les développer comme traitement pour remplacer les cellules d'îlots de Langerhans. Les cellules bêta dédifférenciées sont des cellules bêta qui ont repris une forme moins spécialisée. Les auteurs expliquent qu'elles peuvent revêtir une importance thérapeutique, car elles peuvent conserver une assez grande partie de leur structure génétique originale pour permettre aux chercheurs de les transformer, par « redifférenciation », en cellules bêta productrices d'insuline fonctionnelles.

Ce sont des étudiants du troisième cycle, Holger Russ et Yael Bar, du laboratoire de Shimon Efrat à la faculté de médecine Sackler de Tel Aviv, en Israël, qui ont obtenu ces résultats, publiés dans un récent cybernuméro de la revue *Diabetes*, Philippe Ravassard, du Centre national de recherche scientifique de Paris, en France, a également participé à ces travaux. En plus d'avoir accordé des bourses pour ce projet, la FRDJ finance le programme de distribution du consortium européen des greffes de

cellules d'îlots de Langerhans, l'un des fournisseurs de cellules d'îlots de Langerhans humaines utilisées dans le cadre de ces expériences.

« Nous pensons que les cellules dédifférenciées peuvent être de bonnes candidates, peut-être encore meilleures que d'autres cellules dérivées de diverses cellules souches, affirme le docteur Efrat, pour produire des cellules bêta fonctionnelles par redifférenciation ». Il ajoute toutefois que, pour l'instant, « c'est une hypothèse qu'il reste à vérifier, par le dépistage de divers éléments et protocoles sur leur capacité de produire une telle redifférenciation et par la greffe de ces cellules sur des modèles animaux de diabète ».

Des études antérieures ont démontré que les cellules bêta adultes, même si elles sont hautement spécialisées ou différenciées, conservent leur capacité de se répliquer dans l'organisme par autodédoublage. Les scientifiques ont donc cherché à reproduire ces cellules en laboratoire afin de résoudre la grave pénurie de pancréas de donneurs disponibles pour effectuer des greffes de cellules d'îlots de Langerhans. Cependant, la reproduction d'îlots de Langerhans adultes humains *in vitro* en cellules bêta productrices d'insuline est limitée. Les tentatives pour cultiver ces cellules en laboratoire ne procurent souvent qu'une légère expansion cellulaire (seulement quelques dédoublages de toute la population de cellules) et provoquent la perte de l'expression d'insuline, désignée « perte du phénotype des cellules bêta ».

Il existe un autre obstacle au développement d'un protocole efficace pour faire croître ces cellules *in vitro* : l'absence de biomarqueur stable propre aux cellules bêta pour surveiller les changements cellulaires. En effet, dans une fiole de cellules bêta en culture qui ne produisent plus d'insuline, comment savoir si les cellules se dédifférencient, ce que l'on favorise, ou si elles meurent et sont remplacées par une expansion de cellules d'îlots de Langerhans non désirées, d'une autre origine que les cellules bêta ?

Cherchant à affronter ces défis, le docteur Efrat et ses collaborateurs ont appliqué une démarche de

manchettes sur la recherche

reconstitution des lignées cellulaires pour retracer le destin des cellules bêta en culture. Jusque-là, cette technique moléculaire n'avait été utilisée qu'après d'animaux. Après avoir produit des cellules uniques à partir d'îlots de Langerhans humains isolés, ils ont infecté les cellules de deux virus conçus génétiquement. La composition de ces virus a permis aux chercheurs de trier et de suivre les cellules bêta qui les abritaient. L'étiquetage des cellules bêta avec une protéine fluorescente verte (GFP), un marqueur retraçable, était essentiel à ce processus. Puisque l'expression de la GFP était liée à la production d'une deuxième protéine virale sous le contrôle d'un promoteur de l'insuline, la Cre recombinase, il était « garanti que la GFP ne se manifesterait que dans les cellules bêta, explique le docteur Efrat. Dès ce moment, même si les cellules bêta perdaient leur expression d'insuline et leurs autres marqueurs, elles conservaient une expression stable de la GFP. Nous avons ainsi pu suivre leur destin et les isoler par triage. Les cellules autres que les cellules bêta n'étaient pas étiquetées car elles ne pouvaient pas exprimer la Cre recombinase. Cette méthode permet d'étiqueter plus de la moitié des cellules bêta. Elle est donc très efficace. »

Les chercheurs ont démontré que les cellules bêta peuvent être étiquetées *in vitro* de manière efficace et spécifique. Qui plus est, ils ont fourni des preuves directes de la survie et de la différenciation des cultures de cellules bêta adultes humaines et ont établi que ces cellules différenciées prolifèrent abondamment en laboratoire. Par exemple, ils ont observé que les cellules négatives à l'insuline mais positives à la GFP dérivées des cellules bêta se dédoublent jusqu'à 16 fois, soit environ une fois tous les sept jours. « Nous cherchons à accroître l'expansion de ces cellules, même si elle est déjà impressionnante au rythme actuel. En effet, en théorie, les cellules d'un donneur peuvent suffire pour 2¹⁶ receveurs si les cellules retrouvent leur pleine fonction », explique le docteur Efrat.

Fait intéressant, la prolifération des cellules bêta isolées et étiquetées semble dépendre de facteurs sécrétés par d'autres cellules présentes dans le mélange original de culture d'îlots de Langerhans, c'est-à-dire que les cellules bêta différenciées proliféreront *in vitro* en l'absence des autres types de cellules pancréatiques, mais seulement si

elles disposent d'autres milieux de culture conditionnés par ces autres cellules.

Des analyses similaires sur des cellules d'îlots de Langerhans de souris ont révélé une prolifération beaucoup plus limitée des cellules étiquetées dans des conditions semblables.

Les chercheurs se pencheront maintenant sur des moyens de redifférencier ces cellules. « Nous examinons les changements d'expression des gènes et voies connus [participant à la régulation de l'insuline] pour mieux comprendre les candidats potentiels à la manipulation. De plus, nous prévoyons un dépistage non biaisé des bibliothèques de produits chimiques au potentiel de redifférenciation », termine le docteur Efrat.

Chez des souris diabétiques, la thérapie des anticorps active des lymphocytes T régulateurs qui contrôlent la maladie

Une équipe de chercheurs de l'université de la Floride à Gainesville a démontré qu'un type de thérapie des anticorps, qui a fait l'objet de recherches pour la première fois à la fin des années 1970, peut modifier l'évolution de la maladie chez des souris diabétiques lorsqu'on l'administre au moment de l'apparition de la maladie ou juste avant. D'après les auteurs de l'étude, cette thérapie des anticorps, appelée ATG ou globuline antithymocyte, semble fonctionner selon deux mécanismes distincts :

- D'abord, elle réduit temporairement le nombre de lymphocytes T et provoque une forme d'immunosuppression. L'hypothèse, c'est que l'élimination des lymphocytes T, dont certains contribuent à la destruction des cellules bêta productrices d'insuline, ralentit la perte de cellules bêta du pancréas.
- Ensuite, et c'est ce qui est le plus fascinant, elle augmente la fréquence et l'activité des lymphocytes T régulateurs, un type de lymphocytes T dont le rôle consiste à atténuer ou à supprimer la réponse immune. Il a été démontré que cette « induction de l'immunorégulation » par l'ATG restaure l'autotolérance, c'est-à-dire que les lymphocytes T régulateurs induits « enseignent » aux cellules potentiellement destructrices du système immunitaire à reconnaître leurs propres cellules et molécules, sans y réagir.

manchettes sur la recherche

« À notre connaissance, écrivent les auteurs, nos résultats fournissent les premières indications selon lesquelles un court traitement à l'ATG administré seul peut restaurer l'autotolérance... une propriété auparavant attribuée aux anti-CD₃. » À la lumière de ce potentiel immunomodulateur, ils préconisent des études supplémentaires sur l'ATG, car la thérapie « peut être applicable non seulement au diabète de type 1, mais également à d'autres maladies associées à un dérèglement des réponses immunes. »

La recherche, soutenue en partie par des subventions de la FRDJ, était dirigée par Mark Atkinson et a été publiée dans un récent numéro de la revue *Diabetes*.

L'exploration de l'ATG

Les anticorps, des protéines capables de lier des cellules et molécules précises du système immunitaire, représentent une démarche thérapeutique importante dans le diabète de type 1. Des anticorps monoclonaux comme les anti-CD₃, par exemple, suppriment ou interrompent la progression du diabète à la fois chez les souris et les humains atteints. (Des partenaires industriels de la FRDJ, MacroGenics et Tolerx, conjointement avec Eli Lilly et GlaxoSmithKline, sont respectivement à développer et à commercialiser des anticorps anti-CD₃, dont les essais cliniques ont démontré l'efficacité à ralentir la progression de la maladie chez les personnes nouvellement diagnostiquées.)

Tandis que les anticorps monoclonaux ont pris le devant de la scène, les chercheurs ont également fait appel à d'autres traitements à base d'anticorps pour soigner le diabète de type 1, y compris les sérums antilymphocytaires, dont l'ATG fait partie. Dans des études menées il y a plus de 30 ans, le sérum antilymphocytaire supprimait le diabète de type 1 chez les rats, et plus récemment, il l'a fait chez des souris diabétiques. On sait depuis longtemps qu'une forme approuvée de sérum antilymphocytaire étroitement reliée à l'ATG utilisée dans les études du docteur Atkinson sur les souris et connue sous le nom de thymoglobuline, épuise les lymphocytes T *in vivo* et est utilisée dans divers milieux thérapeutiques pour contrôler la réponse immune des humains. Toutefois, une grande partie des recherches antérieures sur le sérum antilymphocytaire ne tenait pas compte du rôle des lymphocytes T régulateurs, qu'on a récemment dépisté

comme des joueurs cellulaires importants dont le potentiel immunosuppresseur pourrait être mis en valeur dans le traitement des maladies auto-immunes.

Étant donné le potentiel thérapeutique de l'ATG, mais la compréhension limitée et incomplète de son action, notamment à l'égard des lymphocytes T régulateurs, le docteur Atkinson et ses collaborateurs ont effectué plusieurs expériences *in vivo* et *in vitro* chez des souris afin de définir l'activité physiologique, immunologique et métabolique de cet agent. Ils cherchaient principalement à déterminer la manière dont l'ATG module la réponse auto-immune contre les cellules bêta et s'il retarde ou supprime le diabète de type 1 pendant les diverses phases du diabète.

Qu'est-ce que le sérum antilymphocytaire ?

Une comparaison permet de mieux comprendre : si les anticorps monoclonaux représentent la démarche spécialisée (un anticorps, une cible), le sérum antilymphocytaire représente la démarche plus vaste et plus générale (de nombreux anticorps, de nombreuses cibles). Dans le cas de l'ATG utilisée dans les études du docteur Atkinson, la thérapie se compose d'un répertoire diversifié d'anticorps produits en injectant à des lapins des lymphocytes T immatures (les thymocytes) extraits du thymus de souris. Les lapins réagissent aux antigènes des souris en formant de l'antiglobuline thymocytaire de souris (ou ATG, le terme globuline étant un synonyme d'anticorps). Les échantillons de sérum sanguin prélevés chez les lapins contiennent toute une série d'anticorps antilymphocytaires qui se lieront aux lymphocytes T et à d'autres cellules immunes de la spécificité voulue lors de leur injection aux souris des études. Les chercheurs ont effectué ces essais chez des souris diabétiques non obèses, caractérisées par le développement spontané éventuel du diabète de type 1.

Des découvertes essentielles

Ce qui est le plus frappant, c'est que les chercheurs ont démontré que l'ATG retarde le développement du diabète de type 1 en fonction du temps. Chez les souris ayant reçu des injections d'ATG entre quatre et huit semaines de vie, l'apparition de la maladie n'était pas retardée de manière significative par rapport aux souris témoins, tandis que les souris injectées à 12 semaines de vie demeuraient sans maladie pendant beaucoup plus longtemps. À

manchettes sur la recherche

30 semaines de vie, 89 % des souris traitées à l'ATG à 12 semaines possédaient des taux de glucose dans la plage normale, tandis que seulement 22 % des souris témoins demeuraient « normoglycémiques ». (Les souris de 12 semaines de vie sont considérées être dans la phase prédiabétique tardive.)

Le traitement à l'ATG supprime également le diabète de type 1 à l'apparition de la maladie, c'est-à-dire à l'apparition visible de l'hyperglycémie. Sur les sept souris à qui on avait alors injecté de l'ATG, quatre ont démontré une suppression importante de la maladie, leur glycémie chutant rapidement d'une moyenne d'environ 400 mg/dL à environ 150 mg/dL au bout d'une semaine, les bienfaits persistant jusqu'à la fin de la période de surveillance de six semaines. Par contre, aucune des souris témoins, à qui on n'avait pas administré d'ATG, n'a affiché de signe de suppression de la maladie.

D'autres recherches laissent croire que les lymphocytes T régulateurs assurent la médiation de ces bienfaits. Lorsqu'elle est administrée à des souris à 12 semaines de vie, l'ATG supprime l'insulite, une inflammation des îlots de Langerhans du pancréas provoquée par une infiltration des lymphocytes, qui peut détruire les cellules bêta productrices d'insuline. Non seulement a-t-on observé des taux d'infiltration de lymphocytes T considérablement plus faibles chez ces souris par rapport aux souris témoins, mais une forme moins grave d'insulite s'est développée au fil du temps. Ainsi, d'après les auteurs : « au-delà de l'épuisement initial des lymphocytes T que provoque l'ATG, cet agent peut produire des mécanismes protecteurs qui atténuent la migration des cellules vers les îlots de Langerhans du pancréas ». La découverte d'une meilleure réponse au glucose (chez les souris traitées à l'ATG), ainsi que de cellules présentatrices de l'antigène de plus en plus nombreuses dans la rate et les ganglions lymphatiques du pancréas, vient étayer cette observation.

Les chercheurs ont également pu démontrer que l'ATG augmente directement et considérablement la fréquence et l'activité fonctionnelle des lymphocytes T régulateurs, grâce à la suppression des lymphocytes T effecteurs, c'est-à-dire les cellules qui ciblent et détruisent les cellules bêta dans le diabète de type 1.

Il existe toutefois une restriction, car puisque l'ATG ne retarde la maladie qu'à des phases précises, on fait face à

une fenêtre limitée pour retarder ou supprimer le diabète de type 1 avec ce médicament, d'après sa capacité d'améliorer l'activité des lymphocytes T régulateurs.

Du laboratoire au chevet du patient

Le docteur Atkinson et d'autres chercheurs de l'université de la Floride, y compris le docteur Michael Haller, continuent d'étudier le mode d'induction de l'immunorégulation de l'ATG chez les souris. Ils font également passer aux essais cliniques ce traitement sécuritaire et prometteur du diabète de type 1 qui, selon le docteur Atkinson « semble fonctionner aussi bien seul qu'en association avec d'autres médicaments ».

Ces observations étayent un récent essai de l'ATG sur les humains entrepris de manière autonome par Steve Gitelman, MD, à l'université de la Californie à San Francisco, en affiliation avec le réseau de tolérance immunitaire financé par la FRDJ. L'essai vise à déterminer si l'ATG peut interrompre la progression du diabète de type 1 *de novo* lorsqu'elle est administrée dans les six semaines suivant le diagnostic. Le docteur Gitelman déclare : « Nous avons bon espoir de pouvoir appliquer aux humains les découvertes du docteur Atkinson et de ses collaborateurs faites sur des souris et de modifier l'évolution naturelle du diabète de type 1 en étouffant la réponse auto-immune destructrice avec un seul bref traitement à l'ATG. Nous devons déterminer si cette démarche sera encore plus efficace que les essais cliniques initiaux avec l'anticorps monoclonal anti-CD₃. » De l'information plus détaillée au sujet de cet essai figure dans le site anglais www.clinicaltrials.gov, et est accessible par la recherche des termes « Gitelman and START ».

Décrivant des recherches non encore publiées, les docteurs Atkinson et Haller ont observé récemment qu'une polythérapie d'ATG et d'un anticancéreux, le facteur stimulant la formation de colonies de granulocytes (G-CSF), lorsqu'elle est administrée à des souris atteintes d'une maladie *de novo*, supprimera l'hyperglycémie chez presque tous les animaux traités. « Chez presque toutes les souris qui ont reçu les deux médicaments, explique le docteur Atkinson, le diabète disparaît pour toujours. »

Cependant, la polythérapie comporte des défis pratiques lors de sa mise en œuvre. À la première étape du

manchettes sur la recherche

processus, le docteur Haller a entrepris un petit essai du G-CSF chez des patients atteints d'un diabète de type 1 *de novo* (un autre projet soutenu par la FRDJ, détaillé dans le site anglais www.clinicaltrials.gov, accessible par la recherche des termes « Haller and G-CSF »). En juin, les deux groupes de recherche (université de la Floride et université de la Californie à San Francisco) se réuniront pour discuter d'un projet d'essai sur les humains faisant appel à cette polythérapie.

Des cellules souches humaines, une fois greffées à des souris, répondent au glucose et sécrètent de l'insuline

Des scientifiques de l'entreprise Novacell de San Diego, en Californie, ont réussi à développer une lignée cellulaire primitive à partir de cellules souches d'embryons humains qui, lorsqu'elle est implantée dans des souris, a pu supprimer un diabète induit chimiquement. La FRDJ a partiellement financé le développement des lignées de cellules souches utilisées dans cette recherche, dont les résultats sont publiés dans la revue *Nature Biotechnology*.

Les cellules primitives, choisies en vue d'être implantées parce que leur profil biologique correspondait étroitement à celui de l'endoderme pancréatique, des tissus pancréatiques précurseurs importants, ont commencé à produire de l'insuline humaine dans les souris au bout de un à trois mois. Il a également été démontré que les cellules implantées produisaient des taux sanguins de peptide C comparables à ceux observés dans les souris ayant reçu des greffes d'environ 3 000 îlots de Langerhans humains isolés et qu'elles protégeaient les souris contre l'hyperglycémie.

L'étude démontre que « dans les bonnes conditions à l'intérieur de l'organisme, les cellules d'embryons humains peuvent finir par être différenciées pour devenir des cellules bêta sécrétrices d'insuline », explique Julia Greenstein, Ph. D., directrice du programme de remplacement des cellules bêta de la FRDJ. « C'est une percée importante, non seulement en raison de son potentiel d'accélérer les progrès à comprendre le développement des cellules productrices d'insuline, mais également pour le domaine du remplacement des cellules bêta, l'un des cinq domaines de la recherche sur les

thérapies curatives que la FRDJ a établi comme les plus prometteurs pour guérir le diabète de type 1. »

Le docteur Greenstein a également souligné qu'il s'agit encore de recherches préliminaires et que dans les prochaines recherches, il faudra purifier les cellules endodermiques, car quelques souris ont développé des tumeurs.