

Vers une thérapie cellulaire du diabète ? Une perspective épistémologique

par Gérard Reach

INSERM U341, Service de Diabétologie, Hôtel-Dieu, 1, Place du Parvis Notre Dame, 75404 Paris

Reçu le 20 novembre 2000

RÉSUMÉ

Ce texte décrit, dans une perspective épistémologique, le développement du concept de thérapie cellulaire appliqué au traitement du diabète de type 1. L'accent est mis sur trois articles récents décrivant le succès de l'allogreffe d'îlots de Langerhans chez des patients diabétiques, le développement de néo-îlots à partir de cellules-souches isolées du pancréas de sou-

ris adultes, et l'effet de la transfection de cellules hépatiques avec un adénovirus portant le gène codant pour PDX-1, un facteur de transcription impliqué dans la maturation des îlots de Langerhans. Ce texte souligne quelques facteurs qui pourraient être impliqués dans les chances, pour ces techniques, d'atteindre le monde réel de la thérapeutique humaine.

SUMMARY Towards a cellular therapy ? An epistemological perspective

This text describes, in an epistemological perspective, the development of the concept of cellular therapy applied to the treatment of type 1 diabetes. Emphasis is put on three recent papers describing the success of islet allograft in diabetic patients, the development of neo-islets from stem cells isolated from the pancreas of adult mice, and the effect of

hepatic cell transfection with an adenovirus bearing the gene coding for PDX-1, a transcription factor involved in the maturation of islets of Langerhans. This text tries to delineate some factors which may be involved in the chances for these techniques to reach the real world of human therapeutics.

Mais j'entends aussitôt les détracteurs de la médecine expérimentale s'écrier « Vous vous bercez de vaines illusions. A quoi ont servi les découvertes que vous avez faites sur la formation du sucre dans les animaux ? Ont-elles fait avancer d'un pas le traitement du diabète ? » Sans doute, le traitement du diabète n'a pas été fixé jusqu'ici par les recherches physiologiques ; mais cela ne prouve qu'une chose, c'est que si la physiologie du diabète a fait quelques progrès, elle n'en a pas fait assez ; elle n'est pas encore complète et laisse subsister beaucoup d'obscurités que dissiperont de nouvelles recherches.

Claude Bernard, *Leçons sur le Diabète*, page 65

En 1877, lorsque Claude Bernard écrivait ces lignes, Paul Langerhans avait décrit huit ans plus tôt la présence, dans le pancréas, des îlots cellulaires qui portent son nom, mais sans en comprendre la signification. Il faudra attendre 12 ans pour que Minkowski, à Stras-

bourg, démontre l'effet diabétogène de la pancréatectomie totale chez le chien. L'an plus tard, Hédon, à Montpellier, montre que le maintien d'un pancréas vascularisé greffé au niveau du cou prévient l'apparition du diabète. Il présentera à la *Société de Biologie*, dans sa séance du 13 février 1894, une note dans laquelle il étudie « les effets de la piqûre du plancher du quatrième ventricule chez les animaux rendus diabétiques par l'extirpation du pancréas », cherchant à combiner aux effets de la pancréatectomie ceux de la piqûre diabétogène de Claude Bernard. La même année, Williams, en Angleterre, tente, sans succès, une greffe de fragments de pancréas de mouton chez un patient diabétique.

Le but de ce texte est d'essayer de décrire, dans une perspective épistémologique, le chemin qui a conduit de cette période de tâtonnements au succès récent, chez l'Homme, de la greffe d'îlots de Langerhans humains, puis à imaginer d'autres sources de tissu insulinosécréteur pour une thérapie cellulaire du diabète insulino-prive (diabète de type 1). Dans ce survol historique, nous décrirons

en détail trois publications qui ont eu un certain retentissement médiatique dans le courant de l'an 2000.

TRAITEMENT MÉDICAL ET TRAITEMENT CHIRURGICAL DU DIABÈTE AU VINGTIÈME SIÈCLE

On a vu (Tableau I) qu'une *xénogreffe* de tissu pancréatique de mouton chez l'Homme avait été tentée en 1894, avant même la découverte de l'insuline en 1921 et sa première utilisation chez un enfant diabétique en 1922, qui fera du diabète insulino-prive une des premières maladies constamment mortelles qui ait été vaincue.

La période qui suit, celle de la survie et du confort, conduit à la prise de conscience de la gravité du diabète, devenu une maladie chronique. La survie possible sur plusieurs décennies des patients, associée à un traitement plus qu'imparfait, entraînent l'apparition de complications redoutables : de manière aiguë, l'hypoglycémie sévère, nécessitant une injection de soluté glucosé hypertonique jusqu'à ce que le glucagon soit découvert en 1962 pour pouvoir être utilisé comme traitement du coma hypoglycémique ; de manière chronique surtout, les complications oculaires, rénales, neuropathiques,

macrovasculaires du diabète lui conféreront un taux de morbidité et de mortalité majeur. On comprend aisément les tentatives, au milieu des années 60, de guérir par une transplantation de tissu insulinosécréteur cette maladie qui nécessite un traitement qui apparaît à la fois inefficace et inconfortable ; ce n'est qu'à cette époque que commencent à apparaître les seringues jetables : première greffe de pancréas vascularisé à Minneapolis, description d'une méthode d'isolement des îlots de Langerhans à partir du pancréas de rat à Saint Louis, bientôt suivie par la première greffe d'îlots corrigeant le diabète expérimental du rat.

Au cours des dernières décennies, on va cependant voir s'affiner le traitement médical du diabète (Tableau II) : A côté de progrès sur les outils (insulines purifiées, voire modifiées par génie génétique, stylos injecteurs, mais aussi autosurveillance glycémique et dosage de l'hémoglobine glyquée pour l'appréciation du contrôle du diabète à court et moyen terme), un progrès conceptuel majeur : la compréhension de la nécessité de corriger l'hyperglycémie et l'hypertension artérielle. Grâce à ces progrès techniques et conceptuels, transmis au patient dans le cadre d'une politique d'éducation thérapeutique, on voit les complications du diabète reculer : par exemple, l'incidence de la néphropathie chez des enfants diabétiques diminue considérablement dans une étude suédoise au cours des trois dernières décennies (Bojestig *et al.*, 1994).

En même temps, chemine l'idée d'un traitement chirurgical du diabète (Tableau I) : 10 000 greffes de pancréas vascularisées auront été réalisées au cours des 35 dernières années, avec un succès que l'on peut qualifier de bon : faible mortalité, insulino-indépendance obtenue dans environ 80 % des cas (Robertson & Sutherland, 2000). Cependant, cette option thérapeutique a des indications limitées, en raison de la nécessaire immunosuppression. La greffe de pancréas n'est en fait proposée que lorsqu'un traitement immunosuppresseur est justifié par la nécessité d'une autre transplantation, le plus souvent de rein, en raison d'une insuffisance rénale terminale, elle-même conséquence d'un diabète insuffisamment équilibré. Or, comme on l'a vu, au moins pour le diabète de type 1, l'incidence de cette complication diminue. Le nombre de patients inscrits en France sur une liste de double greffe rein-pancréas diminue, et, de fait, le nombre de greffes de pancréas réalisées au cours des dernières années a baissé de moitié au cours des cinq dernières années (Établissement Français des Greffes, 1997). Ceci peut être lié en partie à la crise générale du don d'organes, mais peut être aussi à une diminution du nombre de *receveurs* potentiels.

LES LONGS PIÉTINEMENTS DE LA GREFFE D'ÎLOTS

On voit également se développer les tentatives de greffer des îlots de Langerhans (Tableau 1). En 1988, une méthode d'isolement d'îlots de Langerhans humain a été

TABLEAU 1. – De la découverte du rôle du pancréas dans le diabète à un traitement chirurgical du diabète insulino-prive

- > 1869 : Description histologique par Paul Langerhans d'îlots cellulaires dans le pancréas
- > 1889 : La pancréatectomie chez le chien entraîne un diabète sucré (Minkowski et von Mehring, Strasbourg)
- > 1890 : Correction du diabète expérimental du chien par autogreffe de pancréas au cou (Hédon, Montpellier)
- > 1894 : Greffe de fragments de pancréas de mouton chez un patient diabétique (Williams PW, Brit Med J)
- > 1922 : Découverte de l'insuline (Banting et Best, Toronto)
- > 1966 : Première greffe de pancréas (Najarian, Minneapolis)
- > 1966 : Mise au point de l'isolement d'îlots de Langerhans à partir du pancréas de rat par Lacy à Saint Louis (Missouri)
- > 1972 : Traitement du diabète expérimental du rat par greffe d'îlots de Langerhans de rats isolés par Lacy
- > 1976-2000 : essor de la greffe de pancréas : environ 10.000 cas depuis 1966 : 80 % de succès
- > 1976 : élaboration du concept de greffe d'îlots en absence d'immunosuppression (immuno-altération, immuno-isolement)
- > 1988 : Mise au point de l'isolement d'îlots de Langerhans humains par Ricordi à Saint Louis
- > 1990 : Premier cas de guérison (pendant plus d'un mois) d'un patient diabétique par une allogreffe d'îlots de Langerhans par Scharp à Saint Louis
- > 1990-2000 : environ 400 cas répertoriés dans le monde : 5 à 8 % de succès
- > Juillet 2000 : 7 succès consécutifs d'allogreffe d'îlots de Langerhans chez des patients n'ayant pas d'insuffisance rénale (Shapiro *et al.*, Edmonton, New Eng J Med, Juillet 2000)

TABLEAU II. — Les progrès du traitement médical du diabète.

- fin des années 60 : Apparition des seringues jetables
- fin des années 60 : Apparition des seringues jetables
- fin des années 60 : Apparition des seringues jetables
- fin des années 70 : progrès dans les outils et les concepts
 - développement d'insulines purifiées, d'origine animale puis humaines
 - intérêt du laser dans la prévention des rétinopathies sévères
 - compréhension de la nécessité de traiter l'hypertension artérielle pour prévenir la néphropathie
 - compréhension du rôle délétère de l'hyperglycémie chronique sur l'apparition des complications du diabète (Pirart, Bruxelles, Tchobroutsky, Paris)
 - développement de l'autosurveillance glycémique grâce aux premiers appareils autotiqueurs
 - l'hémoglobine glyquée comme marqueur de l'équilibre glycémique à long terme
- fin du siècle : progrès dans les outils, permettant, avec une éducation des patients, d'améliorer à la fois l'efficacité et le confort du traitement
 - administration d'insuline continue utilisant une pompe externe ou interne (reste marginale)
 - stylos à insuline, à cartouches ou jetables (utilisation généralisée en Europe)
 - analogues d'insuline à action ultracourte obtenus par génie génétique
 - lecteurs de glycémies performants (résultat en 15 secondes sur 3 microlitres de sang) et miniatures
 - progrès du traitement de l'hypertension artérielle
 - Etude DCCT (1993) confirme les hypothèses (ou les conclusions?) de Pirart et Tchobroutsky
- diminution nette de l'incidence de la néphropathie diabétique dans le diabète de type I

développée (Ricordi *et al.*, 1988), permettant d'entreprendre des essais cliniques de greffe d'îlots chez l'Homme. Les résultats sont d'abord décevants : contrairement à la greffe de pancréas vascularisée, ce n'est que dans 5 à 10 % des cas qu'on peut interrompre l'insuline de manière prolongée (Bretzel *et al.*, 2000). Ce constat pessimiste demandait à être nuancé : même si l'arrêt de l'insulinothérapie n'était pas possible, la greffe d'îlots apporte parfois une source d'insuline suffisante pour obtenir un excellent contrôle glycémique associé à une diminution marquée du risque d'hypoglycémie sévère (Federlin & Pozza, 1999). Comme la greffe de pancréas vascularisé, la greffe d'îlots de Langerhans isolés nécessite toutefois une immunosuppression prolongée à vie, ce qui, également, en limite les indications.

Comment expliquer ces mauvais résultats de l'allogreffe d'îlots humains chez des patients atteints de diabète de type 1 ? Il est tout à fait remarquable de noter que l'allogreffe d'îlots réalisée chez des patients pancréatectomisés donne des résultats bien meilleurs puisque l'arrêt de l'insulinothérapie peut être obtenue dans 50 % des cas ; l'autogreffe d'îlots chez ce type de patients donne des résultats excellents (80 % de succès) (Oberholzer *et*

al., 2000). La différence entre le deuxième et le troisième groupe de patients est sans doute due à l'absence d'immunosuppression dans le cas de l'autogreffe réalisée après une pancréatectomie totale ; la différence entre le premier et le deuxième groupe de patients est sans doute due à l'effet néfaste, dans le cas de l'allogreffe réalisée chez des patients diabétiques de Type 1, d'un diabète antérieur de longue durée et de ses complications. Ces données, bien documentées par le registre international des greffes d'îlots tenu à Giessen, suggèrent qu'un élément majeur responsable de l'échec actuel de l'allogreffe d'îlots de Langerhans dans le diabète de Type 1 est l'utilisation du nécessaire traitement immunosupresseur : celui-ci, on l'a vu, limite les indications de la greffe de tissu pancréatique ; il pourrait spécifiquement limiter les résultats de la greffe d'îlots de Langerhans isolés. A vrai dire, ceci n'est pas si étonnant : il est connu que la cyclosporine est toxique pour les îlots de Langerhans lorsqu'ils sont isolés (Basadonna *et al.*, 1988) ; on peut montrer que la cyclosporine et les corticoïdes inhibent la néovascularisation des îlots (Vajkoczy *et al.*, 1999), c'est-à-dire la prise de la greffe ; il est vraisemblable que l'utilisation prolongée de cyclosporine entraîne l'apparition d'une insulino-résistance (Menegazzo *et al.*, 1998). Et comment s'étonner de l'effet néfaste, diabétogène par création d'une insulino-résistance, des corticoïdes, qui pourrait rendre illusoire l'effet du nombre limité d'îlots de Langerhans que l'on peut isoler d'un pancréas humain pour les greffer ? Des expériences d'autotransplantation d'îlots chez le chien suggèrent qu'il faut greffer au moins 6 000 îlots par kg pour corriger le diabète (Warnock & Rajotte, 1988). Extrapolées à l'homme, ces données suggèrent qu'il faut greffer 360 000 îlots pour un homme de 60 kg, ce qui représente environ le nombre d'îlots récupérés d'un pancréas qui en contient environ un million. Mais qu'en est-il en présence d'un traitement par les corticoïdes ?

LES RAISONS D'UN SUCCÈS

Annoncé dès le mois de Juin 2000 par les médias, et d'emblée disponible sur Internet dans son intégralité, publié en Juillet dans le New England Journal of Medicine (Shapiro *et al.*, 2000), un article d'une équipe canadienne a montré, pour la première fois, qu'il était possible de greffer de manière efficace des îlots de Langerhans chez des patients atteints de diabète de type 1. L'article décrit en effet une série de sept patients consécutifs, n'ayant pas d'insuffisance rénale, mais présentant des hypoglycémies sévères à répétition, ou un diabète incontrôlable, chez lesquels il a été possible d'arrêter l'insuline après une allogreffe d'îlots de Langerhans isolés.

Comment expliquer ce succès ? L'analyse qui précède suggérait que la solution consisterait à greffer les îlots en l'absence de traitement immunosupresseur, ou au moins avec un traitement immunosupresseur moins délétère sur la fonction insulaire, et à les greffer plus tôt dans

l'évolution de la maladie. C'est effectivement la stratégie que l'équipe de Ray Rajotte a adoptée. Premièrement, le traitement immunosuppresseur ne comportait pas de corticoïdes. Il avait recours à une combinaison de deux nouveaux agents, le sirolimus (Rapamune®) et le tacrolimus (Prograf®). Il avait été montré que l'utilisation d'une combinaison de ces deux agents avec des corticoïdes était associée à un taux très faible de rejet dans la transplantation hépatique, rénale ou pancréatique. Pour éviter l'effet diabétogène des corticoïdes, le traitement immunosuppresseur comprenait un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de l'interleukine-2, le daclizumab (Zenapax®). Cette combinaison empêche l'activation de la cascade immunitaire en inhibant l'activation des lymphocytes T, la production d'interleukine-2 et d'autres cytokines, la liaison du récepteur de l'interleukine 2 à son ligand, et l'expansion clonale des lymphocytes. A noter qu'un tel traitement protège théoriquement les îlots non seulement vis-à-vis du rejet de greffe, mais aussi de l'auto-immunité. Le point capital est l'absence d'utilisation de glucocorticoïdes et de cyclosporine, remplacés par un traitement immunosuppresseur qui n'a pas entraîné d'insulinorésistance.

Une deuxième cause possible du succès de l'équipe canadienne est le nombre d'îlots greffés (11 000/kg au lieu de 6 000/kg, antérieurement). Troisièmement, ces patients n'avaient pas d'insuffisance rénale. Avaient ils moins de micro-angiopathie qui aurait pu gêner la néo-vascularisation des îlots greffés, moins d'insulinorésistance que chez les patients antérieurs, greffés au stade d'une insuffisance rénale terminale ?

D'un point de vue épistémologique, cet article est intéressant sur plusieurs plans ; d'abord parce qu'il montre le succès d'un changement de stratégie thérapeutique (traitement immunosuppresseur différent, indications différentes) justifié par l'analyse des échecs antérieurs ; ensuite, parce que la stratégie adoptée, greffer les patients en l'absence d'insuffisance rénale terminale, risque d'élargir considérablement les indications de la greffe d'îlots de Langerhans. Or, en parallèle, l'augmentation du nombre d'îlots transplantés (la plupart des patients ont reçu les îlots isolés à partir de deux pancréas humains, dans un cas, trois), fera se poser à terme la source des îlots à greffer. Enfin, parce que le succès de la stratégie adoptée souligne la responsabilité du traitement immunosuppresseur dans les échecs antérieurs, ce qui conduira à intensifier les recherches visant à permettre la greffe d'îlots de Langerhans en l'absence de toute immunosuppression.

Or on a vu (Tableau 1) que c'est dès 1976 que ce concept a été envisagé, essayant par différentes méthodes d'immuno-altérer les îlots de Langerhans pour les rendre moins immunogènes (culture à faible température etc. ou de les immuno-isoler par une membrane artificielle protectrice (Lee & Bee, 2000). Au cours des deux dernières décennies, on a vu émerger une autre approche, guidée par les progrès de l'immunologie et de la compréhension de la physiopathologie du diabète de type 1, maladie auto-immune : l'induction d'une tolérance aux îlots greffés (Waldmann, 1999). A ce jour, ces deux décennies

d'effort n'ont pas abouti, sauf cas anecdotiques, à des applications cliniques, et en sont encore au stade de l'expérimentation animale. Mais si l'une ou l'autre de ces approches aboutissent, on verra alors se lever la barrière imposée par le traitement immunosuppresseur, et les indications en théorie illimitées de la greffe d'îlots devront faire envisager d'autres sources de tissu insulinosécréteur (Levine, 1997) : cellules animales ou production de cellules insulinosécrétrices par ingénierie cellulaire (Tableau III).

TABLEAU III. – Sources de tissu insulinosécréteur : les différentes possibilités (les cellules β sont les cellules insulinosécrétrices des îlots de Langerhans).

- Cellules β ou cellules non β transformées
- Cellules primaires ou lignées cellulaires
- Cellules allogéniques, ou xénogéniques, ou autologues

LA XÉNOGREFFE D'ÎLOTS DE LANGERHANS : EN ATTENDANT LA FIN D'UNE CONTROVERSE

On a dit que le premier tissu insulinosécréteur greffé chez l'Homme avait été des fragments de pancréas de mouton... en 1894. L'auteur de cette tentative pouvait il imaginer l'ampleur que prendrait, au cours de la fin du siècle suivant, le domaine des xénogreffes ? Concernant son application au domaine du diabète, on peut remarquer que l'isolement d'îlots de Langerhans de porc est au point ; il semble que la physiologie de l'îlot de porc soit proche de celle de l'îlot humain ; l'insuline de porc est utilisée depuis 1923 chez l'Homme ; des greffes de cellules porcines chez l'Homme ont déjà été réalisées par une équipe suédoise en 1994 (Groth *et al.*, 1994) mettant en évidence pendant quelques mois un peu de peptide C porcin dans l'urine des patients greffés ; l'élevage des porcs exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) est au point (au zoopôle de Ploufragan en France, par exemple), permettant d'éviter la survenue de zoonoses banales ; il devient possible de créer des porcs transgéniques dont les tissus seraient moins sensibles au rejet superau.

Cependant, le domaine entier de la xénogreffe a été récemment bouleversé par la découverte de la capacité de rétrovirus endogènes porcins (PERV) à infecter en culture des cellules humaines (Stoye *et al.*, 1998), faisant évoquer par certains, dans un scénario catastrophe, la création d'une nouvelle maladie virale chez l'Homme, et demander un moratoire de tout essai clinique de xénogreffe chez l'Homme (Bach & Fineberg, 1998). Depuis 1998, les essais cliniques de xénogreffe sont soumis en France au régime de l'autorisation. Clairement, toutes les études qui ont été faites pour déceler les stigmates d'une telle infection par les PERV, chez des patients à qui on a antérieurement greffé des cellules porcines, ont été négatives (Paradis *et al.*, 1999), en particulier concernant les dix patients suédois qui ont reçu des cellules insulinosécrétrices porcines (Heneine *et al.*, 1998).

Cependant, le cas de l'application au diabète du concept de xénogreffe est exemplaire : d'une part, le risque doit être évalué de manière particulièrement soignée puisque cette maladie a déjà un traitement ; d'autre part, l'application potentielle à un très grand nombre de patients augmente la probabilité de voir émerger un risque se présentant sous la forme d'un événement rare. L'avenir de la xénogreffe et, par conséquent, singulièrement de la xénogreffe d'îlots, dépendra de la réponse à ce débat qui représente en fait, comme par exemple l'avenir des OGM, un enjeu majeur de société. Il a été suggéré récemment que l'avènement d'autres solutions, en particulier dérivant de l'utilisation de cellules souches, pourrait également modifier la visibilité que l'on peut avoir de l'avenir de la xénogreffe (Wilmut *et al.*, 2000).

L'INGÉNIERIE CELLULAIRE

Une autre option consiste à utiliser des lignées cellulaires insulinosécrétrices. Cette option présente l'avantage de la reproductibilité du tissu utilisé et du contrôle du risque infectieux. Elle présente l'inconvénient de faire reposer la production d'insuline sur une régulation qui n'a sans doute pas la finesse de celle que l'on observe dans les cellules insulinosécrétrices natives primaires, ce qui pourrait diminuer l'efficacité de ces cellules à corriger de manière parfaite le diabète des patients chez qui elles seraient transplantées. Les risques inhérents à ces techniques relevant de la thérapie génique restent largement inconnus.

Jusqu'à présent, on faisait porter des espoirs sur des lignées cellulaires développées à partir de tumeurs spontanées ou obtenues de manière expérimentale, ou de cellules non β chez lesquelles on introduisait par transfection les gènes codant pour les principaux éléments de la machinerie insulinosécrétrice, ou, plus simplement, le gène de l'insuline mis sous le contrôle d'un promoteur sensible au glucose. L'intérêt de ces deux dernières approches est de pouvoir envisager l'utilisation de cellules autologues : par exemple, on isole à partir d'un tissu prélevé sur le patient des cellules qu'on transforme en cellules insulinosécrétrices, et on les réinjecte au patient. Les prouesses de l'ingénierie cellulaire permettent en particulier de faire se multiplier ces cellules pour obtenir la masse désirée, puis à interrompre la multiplication cellulaire (Levine, 1997, Efrat, 1998).

Récemment, deux articles, également largement commentés dans les médias ont décrit deux nouvelles approches permettant la création de cellules ayant une expression phénotypique de cellules insulinosécrétrices. Plus spécifiquement, il s'agit ici de créer, à partir de cellules-souches, des tissus transplantables utilisables dans différentes maladies. Ces cellules souches peuvent être obtenues à partir d'embryons, mais aussi de tissus adultes. On se rapproche ici de plusieurs autres domaines traités ailleurs dans ce volume.

DES ÎLOTS DE LANGERHANS PRODUITS À PARTIR DE CELLULES-SOUCHES CORRIGENT LE DIABÈTE EXPÉRIMENTAL DE LA SOURIS

Un article publié en Mars 2000 dans *Nature Medicine* (Ramiya *et al.*, 2000), largement commenté dans les médias, décrit la production d'îlots de Langerhans fonctionnels à partir de cellules souches de souris adultes. Ces équipes de Floride et de Californie ont fait pousser en culture des cellules souches isolées à partir du pancréas prélevé à partir de souris NOD (un modèle auto-immun de diabète) avant qu'elles soient diabétiques. Ces cellules forment des néo-îlots, qui par repiquage successifs pendant trois ans, ont abouti à la formation d'un nombre d'îlots 10 000 fois supérieur à celui qu'on peut obtenir normalement à partir d'un pancréas. Ces néo-îlots sécrètent de l'insuline en réponse au glucose, et les auteurs ont montré sur, il est vrai, un petit nombre d'expériences, qu'ils sont capables de corriger le diabète de souris NOD en l'absence de toute immunosuppression. Ceci est intéressant car des îlots « normaux » devraient être rejetés par le processus auto-immun.

Si ces données sont confirmées (certaines lacunes de cet article ont été en effet soulignées en particulier, le faible nombre d'animaux, la faible quantité d'insuline produite par les néo-îlots, la nécessité de retirer les néo-îlots greffés pour démontrer qu'ils sont bien responsables de la correction du diabète), et si de telles recherches étaient appliquées à l'Homme, on pourrait donc imaginer (Sachs & Bonner-Weir, 2000) de prélever un fragment de pancréas sur un patient au moment de l'apparition de son diabète, de développer à partir des cellules-souches qu'il contient des îlots de Langerhans afin d'être en mesure de les lui réimplanter lorsqu'il serait devenu insulino-dépendant. De manière moins ambitieuse, on pourrait imaginer de produire à partir de pancréas de donneurs en état de mort apparente, une source importante de néo-îlots qui seraient greffés dans le cadre d'allogreffes, en présence d'un traitement immunosuppresseur.

IL EST POSSIBLE DE PRODUIRE DES CELLULES INSULINOSÉCRÉTRICES À PARTIR DE CELLULES SOUCHES PRÉSENTES DANS LE FOIE, ET CE, *IN VIVO*

A l'âge adulte, le facteur de transcription PDX-1 (pancreatic and duodenal homeobox gene 1), également appelé STF-1, IPF-1, intervient dans le contrôle de l'expression de nombreux gènes, dont celui de l'insuline, du transporteur de glucose Glut-2, et de la glucokinase, qui interviennent dans le mécanisme de la réponse insulinosécrétrice au glucose (Sander & German, 1997). Mais de plus, il joue un rôle majeur dans la différenciation des cellules souches du pancréas, qui se trouvent sans doute dans les canaux pancréatiques, en îlots de Langerhans. Par exemple, l'absence du gène codant pour PDX-1

entraîne une agénésie du pancréas (Stoffers *et al.*, 1997) et des mutations du gène sont responsables de certaines formes de diabète de type MODY (Stoffers *et al.*, 1998).

S. Ferber et ses collaborateurs, à Tel Aviv, ont réussi à faire apparaître, dans le foie de souris, des cellules insulinosécrétrices (Ferber *et al.*, 2000). Ces auteurs ont administré par voie veineuse à des souris adultes non diabétiques un adénovirus recombinant porteur de la séquence codant pour PDX-1. Le gène s'est exprimé dans le foie de plusieurs de ces souris. Or chez ces animaux, l'expression du gène s'est accompagnée de celle des deux gènes codant pour l'insuline et le gène codant pour l'enzyme qui transforme la pro-insuline en insuline : le foie de ces animaux contenait de l'insuline mature qui était sécrétée dans la circulation puisque leur insulémie était trois fois plus haute que celle de souris témoins, et leur glycémie un peu plus basse. La deuxième étape a consisté à réaliser cette expérience chez des souris rendues diabétiques par la streptozotocine. La glycémie de ces animaux s'est améliorée progressivement pour atteindre une valeur normale en une dizaine de jours (malheureusement la figure présentant ces résultats « s'arrête » au moment où la glycémie est normalisée et on aurait aimé savoir si la glycémie a continué à baisser...).

Ce travail fascinant montre que l'expression de PDX-1 dans le foie s'accompagne de la transformation de cellules, sans doute des cellules-souches non identifiées, en des cellules ayant définitivement une expression phénotypique de cellules insulinosécrétrices, capables de sécréter l'insuline dans la circulation, ayant au moins un effet hypoglycémiant. Si, à nouveau, ces données étaient un jour applicables à l'Homme, on pourrait imaginer de donner à des patients diabétiques la possibilité de produire, à partir de leurs propres cellules hépatiques, des cellules capables de sécréter de l'insuline. Plus que de manière *in vivo*, comme cela a été réalisé dans cette étude chez la souris, ceci pourrait être réalisé *in vitro* sur un fragment de foie prélevé sur le patient. Il est évident qu'il faudra avoir démontré que ces cellules insulinosécrétrices néoformées sont capables de répondre *in vivo* au glucose d'une façon qui assure l'homéostasie glycémique, que l'on a la possibilité de moduler l'effet de façon à ne pas entraîner la formation de ce qui ne serait rien d'autre qu'un insulinome, enfin qu'elles ne sont pas vulnérables au processus auto-immun.

VERS UNE CONCLUSION ?

Cette analyse montre d'abord que l'avenir d'un concept thérapeutique innovant comme la thérapie cellulaire doit être considéré dans le contexte de son application. Ainsi, le cas particulier de l'utilisation de cellules insulinosécrétrices dans le traitement du diabète insulino-noprive pourrait dépendre de la conjonction de plusieurs facteurs.

Premièrement, évidemment, du contexte scientifique est-ce actuellement techniquement faisable ? Plu-

sieurs exemples donnés dans ce texte montrent que la concrétisation du concept, le passage de l'idée innovante à l'outil thérapeutique, évolue en fonction des progrès scientifiques. Progrès dans les technologies scientifiques d'abord : apparition de nouveaux traitements immuno-suppresseurs conduisant à modifier non seulement la stratégie d'immunosuppression, mais aussi les indications de l'allogreffe d'îlots, avènement des techniques de transgénèse chez le porc permettant d'envisager la production de porcs moins sensibles au rejet de xéno greffe, développement de l'ingénierie cellulaire lié à l'explosion de la biologie moléculaire permettant de fabriquer des cellules possédant une machinerie insulinosécrétrice ; mais aussi, progrès, issus de la recherche fondamentale, de la physiologie, illustrant en quelque sorte l'attente de Claude Bernard citée en épigraphe de ce texte, épigraphe qui résume l'esprit de la médecine expérimentale – la connaissance de la physiologie nous permettra de guérir les maladies : connaissance, évidemment, du rôle des îlots de Langerhans et de leur destruction dans l'apparition du diabète, mais aussi, celle, moderne, renversant un dogme, de l'existence des cellules souches totipotentes et de la plasticité cellulaire ; et, par exemple, celle du rôle de PDX-1 dans l'organogenèse des îlots de Langerhans, conduisant Sarah Ferber à l'idée de l'utiliser pour transformer des cellules hépatiques en cellules insulinosécrétrices.

Mais deuxièmement, le contexte médical de l'application du concept peut également évoluer au cours du temps : La question devient : est-ce toujours nécessaire ? C'est dans ce sens que nous avons tenu à rappeler que, grâce au progrès de la médecine, la physiologie du diabète s'est, depuis la naissance du concept de thérapie cellulaire du diabète au milieu des années 60, modifiée dans le sens d'un meilleur confort du patient et, surtout, d'une bien plus grande efficacité du traitement qui commence à porter ses fruits (Tableau II). Cette notion sera importante dans l'évaluation du rapport bénéfice risque (Fig. 1) qui doit être à la base de toute réflexion éthique visant à définir le bien fondé d'une thérapeutique innovante.

Troisièmement, l'apparition de faits nouveaux peut également intervenir dans le développement d'une thérapeutique innovante : y a-t-il maintenant d'autres solu-

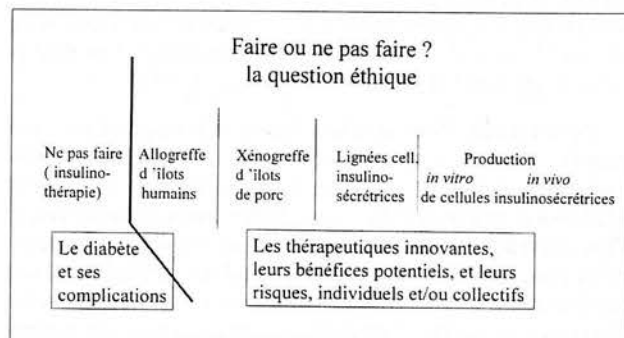


FIG. 1. – Vers une thérapie cellulaire du diabète ?

tions plus efficaces ou moins dangereuses ? Par exemple, on a vu l'annonce – qui avait peut être des arrières-pensées – que les possibilités issues de l'application des cellules souches pourraient rendre caduc le concept de xénogreffe ; autre exemple : trois jours avant cette Journée Claude Bernard consacrée à la thérapie cellulaire, à laquelle ce numéro de la revue est consacré, les médias annonçaient l'implantation par une équipe montpelliéraine d'un capteur de glucose intravasculaire couplé à une pompe à insuline également implantée, concept visant à une guérison, non pas biologique, mais électromécanique, du diabète.

Quatrièmement enfin, l'appréhension des risques, pour l'individu transplanté, mais peut être aussi, à l'échelle de la société (on a vu la controverse au sujet des PERV), peut évoluer, et devra être prise en compte dans l'évaluation du rapport bénéfices/risques. Cette question sera particulièrement sensible dans une société qui a été marquée au cours des deux dernières décennies par des catastrophes telles que celles du sang contaminé et, de manière plus actuelle, de la maladie de la vache folle et de sa transmission à l'Homme, pouvant être ressentie comme une punition qui arrive à ceux qui ont voulu jouer aux apprentis sorciers. La société pourrait ainsi avoir son mot à dire, qui pourrait peser dans le développement de ces nouvelles approches thérapeutiques. Ceci conduit à réfléchir sur la généralisation de l'information du public, notamment depuis l'avènement d'Internet. Il est significatif que les quatre avancées dans le traitement du diabète citées dans ce texte (allogreffe d'îlots, production de néo-îlots, cellules hépatiques transformées en cellules insulinosécrétrices, capteur de glucose intravasculaire) ont, chacune, fait la une de la presse, répondant à l'attente du public, ou peut être la devançant ?

Alors, quel avenir pour la thérapie cellulaire du diabète ? Il n'en reste pas moins en effet que, pour les patients comme pour leurs médecins, le diabète reste une maladie souvent difficile à traiter, que chez certains patients on a du mal à éviter des complications graves, que son traitement reste inconfortable, et, dans quelques cas, inacceptable.

Aussi, ces risques évoqués doivent-ils d'abord être appréhendés de manière lucide, et ensuite inciter à utiliser au maximum un principe de prudence, pour ne pas dire de précaution, lorsqu'il s'agira du passage aux essais cliniques d'abord, puis à l'utilisation de ces thérapeutiques innovantes. Mais ils ne doivent cependant pas conduire à interrompre *a priori* des recherches dans ces domaines ; ils doivent plutôt inciter à développer le domaine scientifique de l'évaluation du risque et des programmes de recherche visant à les contourner ou à les surmonter : « Ce qui caractérise l'homme prudent, c'est la délibération bien conduite, qui lui permet d'éviter la démesure, d'apprécier les obstacles, de tenir compte des cas particuliers, de choisir le moment opportun, de prévoir même l'imprévisible » (Aristote, *Éthique de Nicomaque*, livre VI).

Peut-on rappeler que le mot « risque » vient de risicare, doubler un promontoire ? Sa présence est inévitable dans toute exploration, toute découverte, tout progrès.

BIBLIOGRAPHIE

- Bach F. H. & Fineberg H. V. Call for moratorium on xenotransplants. *Nature*, 1998, 391, 326.
- Basadonna G., Montorsi F., Kakizaki K. & Merrell R. C. Cyclosporin A and islet function. *Am. J. Surg.*, 1988, 156, 191-193.
- Bojestig M., Arnqvist H. J., Hermansson G., Karlberg B. E. & Ludvigsson J. Declining incidence of nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, 1994, 330, 15-18.
- Bretzel R. G., Hopt U. T. & Schatz H. Transplantations in patients with diabetes mellitus. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 2000, 108, 241-242.
- Efrat S. Prospects for gene therapy of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia*, 1998, 41, 1401-1409.
- Etablissement Français des Greffes. *Rapport Annuel*, 1997.
- Federlin K. & Pozza G. Indications for clinical islet transplantation today and in the foreseeable future-the diabetologist's point of view. *J. Mol. Med.*, 1999, 77, 148-152.
- Ferber S., Halkin A., Cohen H., Ber I., Einav Y., Goldberg I., Barshack I., Seijfers R., Kopolovic J., Kaiser N. & Karasik A. Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat. Med.*, 2000, 6, 568-572.
- Groth C. G., Korsgren O., Tibell A., Tollema J., Moller E., Bolinder J., Ostman J., Reinholt F. P., Hellerstrom C. & Andersson A. Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients. *Lancet* 1994, 344, 1402-1404.
- Heneine W., Tibell A., Switzer W. M., Sandstrom P., Rosales G. V., Mathews A., Korsgren O., Chapman L. E., Folks T. M. & Groth C. G. No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts. *Lancet* 1998, 352, 695-699.
- Lee M. K. & Bae Y. H. Cell transplantation for endocrine disorders. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2000, 42, 103-120.
- Levine F. Gene therapy for diabetes : strategies for β -cell modification and replacement. *Diabetes/Metabolism Reviews*, 1997, 13, 209-246.
- Menegazzo L. A., Ursich M. J., Fukui R. T., Rocha D. M., Silva M. E., Ianhez L. E., Sabbaga E. & Wajchenberg B. L. Mechanism of the diabetogenic action of cyclosporin A. *Horm. Metab. Res.* 1998, 30, 663-7.
- Oberholzer J., Triponez F., Mage R., Anderegg E., Buhler L., Cretin N., Fournier B., Goumaz C., Lou J., Philippe J. & Morel P. Human islet transplantation : lessons from 13 autologous and 13 allogeneic transplantations. *Transplantation* 2000, 69, 1115-1123.
- Paradis K., Langford G., Long Z., Heneine W., Sandstrom P., Switzer W. M., Chapman L. E., Lockey C., Onions D. & Otto E. Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. *Science*, 1999, 285, 1236-1241.
- Ramiya V. K., Maraist M., Arfors K. E., Schatz D. A., Peck A. B. & Cornelius J. G. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nature Medicine*, 2000, 6, 278-282.
- Ricordi C., Lacy P. E., Finke E. H., Olack B. J. & Scharp D. W. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes*, 1988, 37, 413-420.
- Robertson R. P., Davis C., Larsen J., Stratta R. & Sutherland D. E. Pancreas and islet transplantation for patients with diabetes. *Diabetes Care*, 2000, 23, 112-116.
- Sachs D. H., Bonner-Weir S. Editorial : New islets from old. *Nature Medicine* 2000, 6, 250-251.
- Sander M. & German M. S. The beta cell transcription factors and development of the pancreas. *J. Mol. Med.* 1997, 75, 327-340.

- Shapiro A. M., Lakey J. R., Ryan E. A., Korbitt G. S., Toth E., Warnock G. L., Kneteman N. M. & Rajotte R. V. Islet transplantation in seven patients with typical 1 diabetes mellitus using has glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N. Engl. J. Med.*, 2000, *343*, 230-238.
- Stoffers D. A., Stanojevic V. & Habener J. F. Insulin promoter factor- 1 gene mutation linked to early-onset type 2 diabetes mellitus directs expression of a dominant negative isoprotein. *J. Clin. Invest.*, 1998, *102*, 232-241.
- Stoffers D. A., Zinkin N. T., Stanojevic V., Clarke W. L. & Habener J. F. Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat. Genet.*, 1997, *15*, 106-110.
- Stoye J. P., Le Tissier P., Takeuchi Y., Patience C. & Weiss R. A. Endogenous retroviruses : a potential problem for xenotransplantation? *Ann. NY Acad. Sci.*, 1998, *862*, 67-74.
- Vajkoczy P., Volímar B., Wolf B. & Menger M. D. Effects of cyclosporine A on the process of vascularization of freely transplanted islets of Langerhans. *J. Mol. Med.*, 1999, *77*, 111-114.
- Waldmann H. Transplantation tolerance-where do we stand? *Nat. Med.*, 1999, *5*, 1245-1248.
- Warnock G. L. & Rajotte R. V. Critical mass of purified islets that induce normoglycemia after implantation into dogs. *Diabetes*, 1988, *37*, 467-70.
- Wilmot L., Clark J. & Harley C. B. Laying hold on eternal life? *Nat. Biotechnol.*, 2000, *18*, 59-600.
-