



HAL
open science

Dédifférenciation de la cellule bêta pancréatique humaine

Marc Diedisheim

► **To cite this version:**

Marc Diedisheim. Dédifférenciation de la cellule bêta pancréatique humaine. Médecine humaine et pathologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2017. Français. NNT : 2017USPCB074 . tel-02131940

HAL Id: tel-02131940

<https://theses.hal.science/tel-02131940>

Submitted on 16 May 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de Doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

Par DIEDISHEIM Marc

Né le 30 Janvier 1984 à Paris 20^e

Dédifférenciation de la cellule bêta
pancréatique humaine

Université Paris Descartes

Ecole Doctorale BioSPC

Soutenue le 24 novembre 2017 devant le jury composé de :

Miriam CNOP
Bruno FEVE
Dominique GAUGUIER
Christophe MAGNAN
Raphaël SCHARFMANN

Rapporteur
Président du Jury
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse

*« Dans le champ de l'observation, le hasard ne favorise que les
esprits préparés. »*

Louis Pasteur

Remerciements

A mon jury de thèse : en premier lieu Raphaël Scharfmann, pour m'avoir initié à la recherche lors de mon Master 2 et donné le goût à cette recherche biologique. Je remercie également chacun des membres du jury pour avoir pris de leur temps pour étudier mon travail de thèse.

A mes rencontres scientifiques et médicales, en particulier Etienne Larger pour m'avoir donné goût à « sa » diabétologie et m'avoir poussé vers le monde de la recherche.

A mes collègues de laboratoire : à Masaya mon voisin de bureau, de paillasse et de travail au quotidien, toujours disponible, et à tous ceux qui m'ont aidé durant ces 4 années, ponctuellement ou presque quotidiennement, par la transmission de savoir ou simplement par leur présence, qui ont participé aux nombreux déjeuners ou réunions improvisées, pour m'avoir répété de nombreuses fois où trouver du matériel ou les étapes d'un protocole, pour m'avoir côtoyé dans un bureau exigü pour 4, pour avoir toujours répondu à mes nombreux sms, pour avoir partagé mes joies de jeune parent, pour m'avoir aidé dans la réalisation de manips. Je ne vous citerai pas individuellement, je sais que chacun se reconnaitra.

A ma famille : mes parents et proches qui ont toujours été là quand j'en ai eu besoin et même plus. Et surtout à vous trois, ma famille, celle que j'ai choisie, celle que je ressens...

Table des Matières

Résumé	3
Introduction	5
I. Le diabète de type 2 : vue générale	7
A. Epidémiologie	7
B. Définition	8
C. Traitements actuels et limites	10
D. Mécanismes physiopathologiques du diabète de type 2	14
II. La dédifférenciation cellulaire	19
A. Différenciation : d'un processus passif à un processus actif	19
B. Dédifférenciation : exemple de l'amphibien	20
C. Dédifférenciation : exemples chez le mammifère	22
III. Dédifférenciation et cellule bêta pancréatique	23
A. La cellule bêta, une cellule différenciée par excellence	23
B. Du progéniteur pancréatique à la cellule bêta	25
C. Dédifférenciation d'une cellule bêta : définitions	28
D. Modèles murins de dédifférenciation	29
IV. Cellule bêta humaine	37
A. Différences entre l'humain et les modèles murins	37
B. Arguments pour une dédifférenciation de la cellule bêta humaine	38
C. Cellules bêta humaines : matériel disponible pour la recherche	43
Rationnel du projet	47
Le projet de recherche	51
Discussion générale	99
I. Principaux résultats	100
II. La dédifférenciation de la cellule bêta humaine	101
A. Observation d'une dédifférenciation	101
B. Devenir d'une cellule bêta dédifférenciée	102
III. Diabète de type 2 et dédifférenciation	104
A. Limites d'utilisation d'îlots d'individus diabétiques de type 2	104
B. Diabète de type 2 et dédifférenciation	106
C. Liens entre FGF, cellule bêta et diabète	107
IV. Dédifférenciation et modification de l'interaction avec l'environnement	109
A. Exemple de la voie RANK – RANKL	109
B. Dédifférenciation et diabète de type 1	110
V. Conclusion	112
Bibliographie	113
Annexes	125

Résumé

Le diabète de type 2 résulte d'une diminution de la masse fonctionnelle de cellules bêta pancréatiques, possiblement liée à une dédifférenciation cellulaire : les cellules bêta restent présentes, mais leur production d'insuline s'effondre. Ce phénomène, s'il est avéré, ouvrirait la voie à de nouvelles recherches thérapeutiques. Mais s'il est démontré dans certains modèles murins, il n'existe que des arguments très indirects chez l'Humain. Notre objectif est d'apporter de nouveaux arguments pour ce phénomène chez l'humain en modélisant la dédifférenciation de cellules bêta humaines, en utilisant la lignée de cellules bêta pancréatiques humaines EndoC- β H1 et des îlots pancréatiques humains primaires. Nous avons découvert qu'un traitement par FGF2 effondrait la production d'insuline, et des études par RNA-Seq ont révélé un effondrement de plusieurs marqueurs spécifiques de la cellule bêta, incluant *INS*, *MAFB*, *SLC2A2*, *SLC30A8* and *GCK*. Parallèlement, le traitement par FGF2 induisait l'expression de gènes normalement absents d'une cellule bêta, tels les facteurs de transcription *MYC*, *HES1*, *SOX9* et *NEUROG3*. La dédifférenciation induite par le FGF2 était temps- et dose-dépendante, et réversible après *wash-out*. En outre, nous démontrons que la dédifférenciation modifie l'interaction de la cellule bêta avec son environnement : l'expression de TNFRSF11B (ostéoprotégerine), un récepteur tronqué pour RANKL (receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand), est induite lors du traitement par FGF2, et les cellules β sont alors protégées contre la signalisation RANKL (TNFSF11) par inhibition de la phosphorylation de P38. Enfin, les analyses des données transcriptomiques ont révélé des niveaux accrus d'ARNm de FGF2 dans les cellules canalaire, endothéliales et stellaires dans les pancréas d'individus diabétiques de type 2, alors que les taux d'ARNm de FGFR1, SOX9 et HES1 sont augmentés dans les îlots pancréatiques d'individus diabétiques de type 2.

Nous avons donc développé un modèle de dédifférenciation des cellules bêta humaines induit par le FGF2, identifié de nouveaux marqueurs de dédifférenciation, et trouvé des signes d'augmentation de FGF2, FGFR1 et des marqueurs de dédifférenciation au cours du diabète de type 2.

Introduction

Dans cette introduction, nous allons tout d'abord préciser ce qu'est le diabète de type 2, afin de mieux appréhender lors de la discussion la limite de certains modèles utilisés. La description des traitements actuels, dont la découverte est souvent le fruit du hasard, et les mécanismes impliqués dans l'apparition du diabète de type 2, va souligner l'importance de découvrir de nouvelles molécules thérapeutiques.

Nous décrirons alors le principe général d'une dédifférenciation cellulaire, avant de voir plus précisément les arguments impliquant ce phénomène dans les cellules bêta murines, puis les arguments plus indirects existant chez l'humain.

I. Le diabète de type 2 : vue générale

A. Epidémiologie

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, 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 (World Health Organization, 2016). Dans ce même rapport, l'Organisation Mondiale de la Santé estime que le diabète a causé 1,5 millions de morts en 2012 ; de plus, 2,2 millions de morts supplémentaires sont causés par une glycémie non contrôlée favorisant des maladies cardiovasculaires. Sur ce total de 3,7 millions de mort, 43% sont intervenues chez des individus de moins de 70 ans.

Un aspect très marquant est la vitesse de l'augmentation de la prévalence du diabète, bien plus rapide que les estimations réalisées. En 1998, l'Organisation Mondiale de la Santé avait estimé que le nombre de patients diabétiques, estimé à 135 millions en 1995 et 150 millions en 2000, allait augmenter à 300 millions en 2025 (King et al., 1998). Alors que ces prévisions alarmistes avaient fait évoquer une « épidémie du diabète », elles ont été largement dépassées par la réalité, puisque le seuil des 420 millions d'individus a été franchi seulement 16 ans plus tard, en 2014 (*Figure 1*).

L'aspect financier est intimement lié à cette épidémie galopante. Les chiffres varient de manière importante selon les pays étudiés et ce qui est inclus dans les calculs de coûts. Pour donner un seul exemple, l'American Diabetes Association a estimé à 245 milliards de dollars le coût du diabète aux Etats-Unis en 2012, regroupant 176 milliards de coûts médicaux directs (dont 43 % de prise en charge hospitalière), et 69 milliards liés à la diminution de la productivité (American Diabetes Association, 2013).

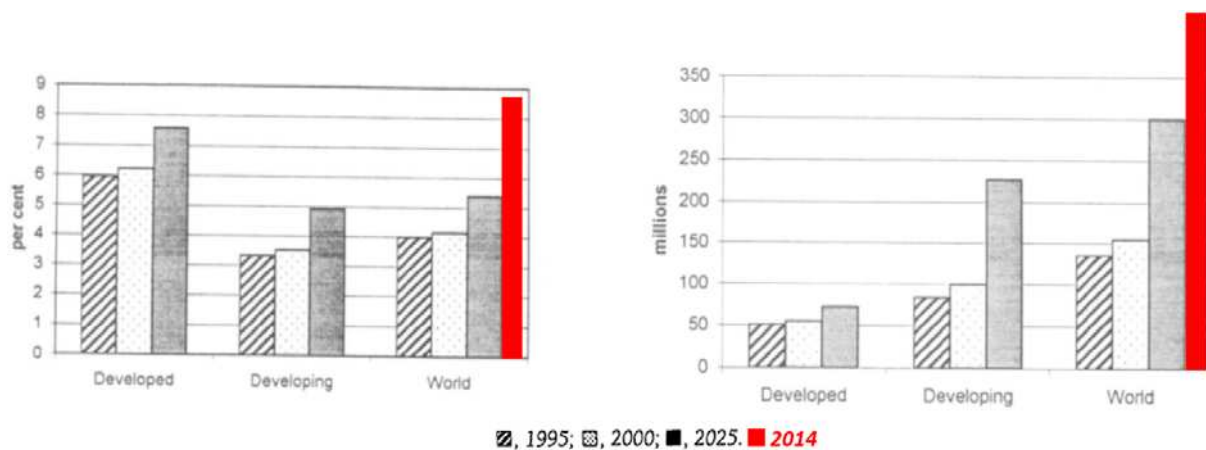


Figure 1 – Prédiction en 1998 de la prévalence du diabète et du nombre de sujets diabétiques dans le monde chez l'adulte (> 20 ans). Nombre de patients diabétiques en millions (partie gauche) et en pourcentage (partie droite) dans les pays développés, en voie de développement et dans le monde. En rouge, prévalence et nombre de diabétiques constatés en 2014. Tiré de (King et al., 1998).

B. Définition

Le diabète sucré, aujourd'hui appelé diabète, est historiquement un symptôme et non une maladie. La polyuro-polydipsie qui caractérise, entre autre, l'hyperglycémie sévère, est déjà décrite dans un papyrus découvert à Thèbes, daté de 1.550 avant J.-C. (Carpenter et al., 1998), et le caractère poisseux des urines, caractéristique du diabète sucré, est décrit dans le traité médical indien Charaka Samhita vers 1500-2000 avant J.-C. (Roy et al., 1993).

De nos jours, l'état diabétique est défini par une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/L (7 mmol/L). Ce niveau de glycémie est antérieur à l'apparition de la polyuro-polydipsie, qui n'apparaît que pour des glycémies supérieures à 1,80 g/L, mais est associé au long cours à des complications de l'hyperglycémie chronique telles que la rétinopathie diabétique (Expert Committee, 1997) (Figure 2). L'association de l'hyperglycémie à d'autres symptômes permettent de catégoriser le diabète en plusieurs types, dont les deux plus fréquents sont le

diabète de type 1 et le diabète de type 2. Le diabète de type 1 associe à l'hyperglycémie un terrain auto-immun avec des marqueurs cliniques et/ou biologiques, et est relié à une destruction progressive et complète des cellules bêta par un processus auto-immun. Le diabète de type 2 associe l'hyperglycémie à un syndrome métabolique pouvant associer une obésité à répartition androïde, une diminution de HDL-cholestérol, une hypertension artérielle.

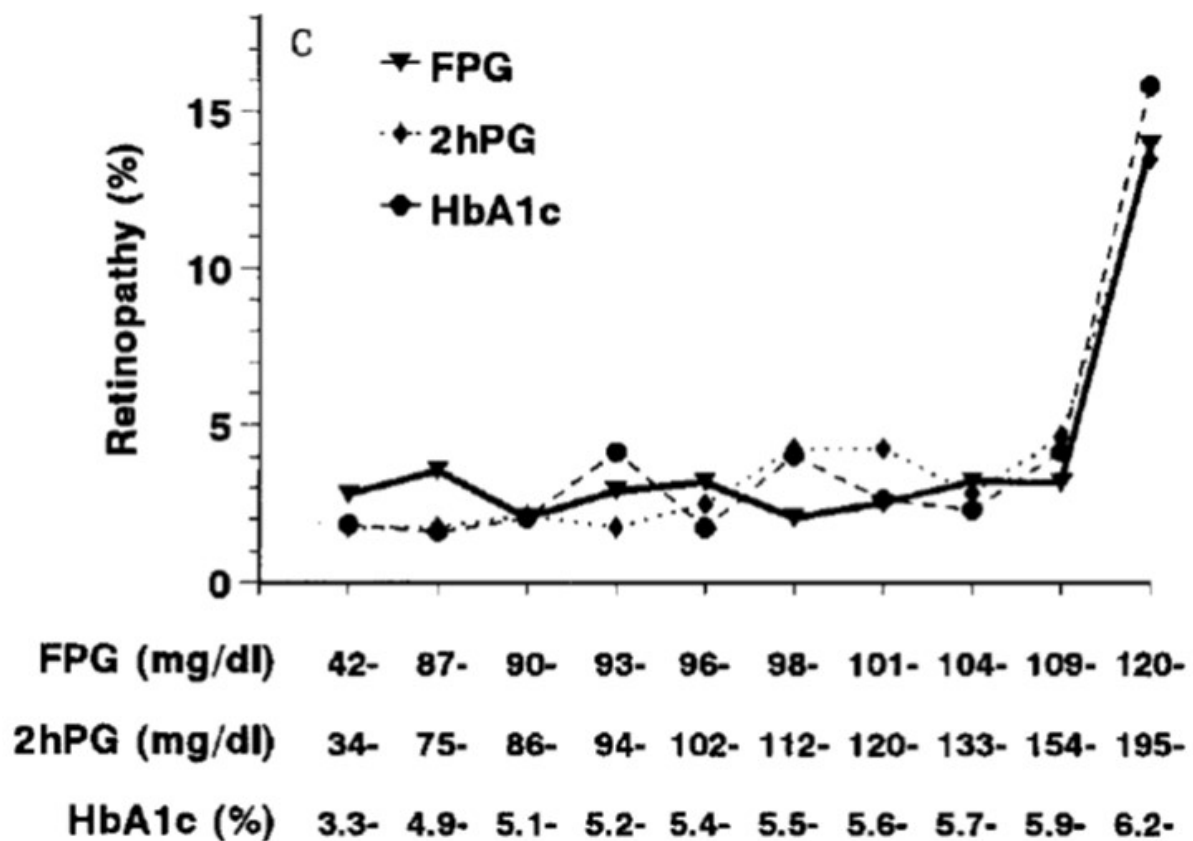


Figure 2 - Prévalence de la rétinopathie diabétique dans une population de 2.821 Américains répartis en déciles selon leur glycémie à jeun (FPG), leur glycémie veineuse 2h après ingestion de 75g de glucose (2hPG) et leur hémoglobine glyquée (HbA1c). Tiré de (Expert Committee, 1997).

Le diabète de type 2 est donc en réalité une association de symptômes, soit un syndrome, que l'on retient lorsqu'on a éliminé les autres causes de diabète (diabète de type 1, diabète monogénique, diabète pancréatique, etc). Cette définition pose un problème d'hétérogénéité

importante dans la présentation clinique des individus dits diabétiques de type 2, en lien à des processus physio-pathologiques sous-jacents variables. Cette définition syndromique du diabète de type 2 pose également des limites à la recherche biologique, par exemple dans les modèles murins qui modélisent un syndrome, et non une maladie définie par un processus physio-pathologique précis. Enfin, cette hétérogénéité est une limite aux études d'îlots pancréatiques prélevés sur des individus « diabétiques de type 2 », dont les données cliniques ne sont pas toujours rapportées (point discuté par la suite).

C. Traitements actuels et limites

Lorsqu'une prise en charge hygiéno-diététique se révèle insuffisante pour maintenir une glycémie à jeun inférieure à 1,26 g/L, un traitement médicamenteux est introduit.

1) *Metformine*

Le premier traitement médicamenteux indiqué dans le diabète de type 2 est la metformine, un biguanide. Il s'agit de la (re)découverte du guanidine de galegine, principe actif extrait de la plante *Galega officinalis*, aussi appelée Rue-de-chèvre (*Figure 3*), utilisé pour traiter (entre autres) le diabète sucré jusqu'au début du 20^e siècle (Hartwich, 1897), puis éclipsé au début du 20^e siècle par la découverte de l'insuline. Cette molécule, introduite comme agent anti-diabétique en 1957, est un agent anti-hyperglycémiant et non hypoglycémiant, en améliorant l'insulino-sensibilité au niveau du foie, des muscles squelettiques et du tissu adipeux (DeFronzo and Goodman, 1995) ; en revanche, la metformine n'induit pas de sécrétion

d'insuline, même à de fortes doses (Jackson et al., 1987; Schatz et al., 1972). Cinquante ans plus tard, son mécanisme d'action reste encore mal défini (Madiraju et al., 2014; McCreight et al., 2016; Zhou et al., 2001).



Figure 3 - *Galega officinalis* (Rue-de-chèvre, à gauche) et Monstre de Gila (*Heloderma suspectum*, à droite), respectivement à l'origine la découverte des biguanides, dont la metformine, et des analogues du GLP-1. Tirés de Wikipédia[©]

2) Sulfamide

En seconde ligne sont disponibles les sulfamides hypoglycémiant. Cette classe de molécule a été découverte par hasard en 1942, lorsque Marcel Janbon, en testant une nouvelle molécule contre la fièvre typhoïde, le 2254 RP, constate des événements indésirables graves parfois mortels liés à des hypoglycémies sévères (Janbon et al., 1942). L'effet hypoglycémiant de cette molécule fut clairement démontré par Auguste Loubatières (Figure 4) (Loubatières-Mariani, 2007). Les sulfamides hypoglycémiant agissent directement sur la cellule bêta pancréatique : en se fixant sur la protéine SUR (SulfonylUrea Receptor) des canaux K_{ATP} , ces molécules induisent une dépolarisation de la cellule bêta et une sécrétion d'insuline, indépendamment de la glycémie. Les glinides, dérivés des sulfamides hypoglycémiant, possèdent un mécanisme d'action similaire.

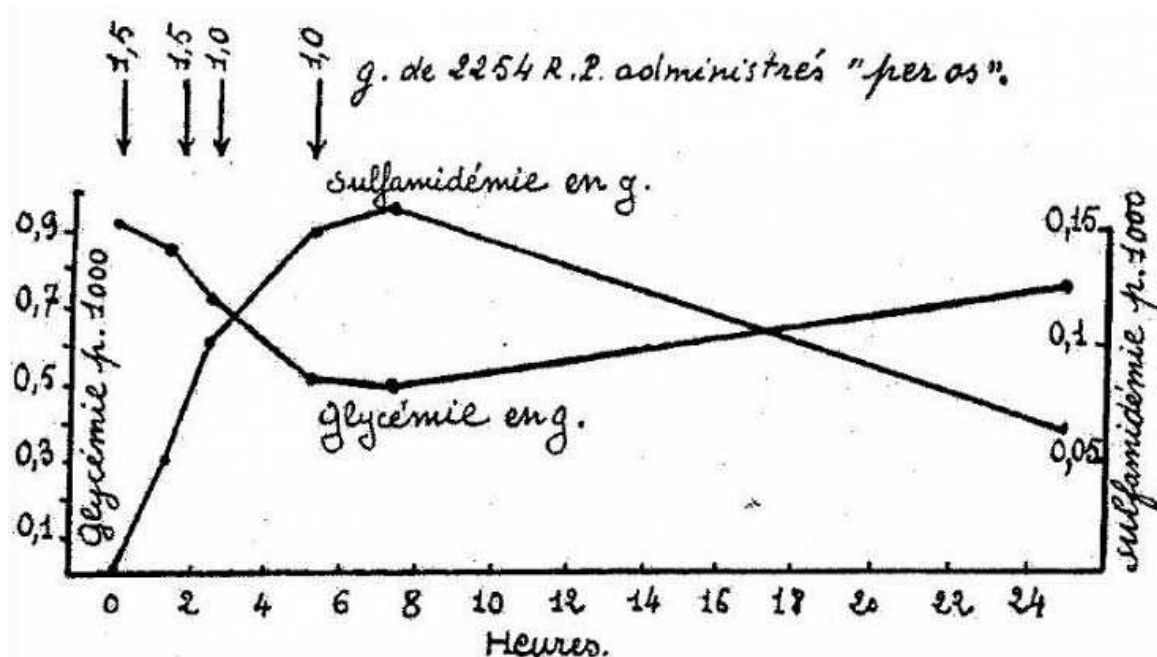


Figure 4 - Effets sur la glycémie de l'ingestion de doses répétées de 2254 RP. Variations en fonction de la sulfamidémie.

3) Analogue du GLP-1 et inhibiteurs de la DPP4

Début des années 1990, l'étude du venin du Monstre de Gila (*Heloderma suspectum*, Figure 3) permet l'identification de la famille des exendines (Eng et al., 1992), famille de sécrétagogues pancréatiques dont la fonction précise dépend du membre de cette famille. De l'exendine-4 dérivera la découverte du système du GLP-1, et le développement thérapeutique des analogues du GLP-1, puis des inhibiteurs de la dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4), enzyme inactivant le GLP-1. L'activation de la voie du GLP-1 permet d'augmenter la sécrétion d'insuline de manière glucose-dépendante, en amplifiant, via un récepteur couplé à la protéine G, la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC).

4) *Autres et insuline*

D'autres classes thérapeutiques sont actuellement à la marge en France : les thiazolidinediones, retirées du marché français, les inhibiteurs des alpha-glucosidases, associés à un effet très modéré et une tolérance limitée, et les inhibiteurs de SGLT2, actuellement non disponibles en France.

En dernier recours, lorsque l'équilibre glycémique est non satisfaisant malgré une thérapie orale maximale, un traitement par insuline est introduit, souvent sous forme d'insuline basale dans un premier temps, puis associée à des injections d'insuline rapide à chaque repas.

Si l'arsenal thérapeutique semble donc fourni dans le diabète de type 2, un nombre important de patients ont un diabète déséquilibré : en premier lieu, la réponse à un traitement pour le diabète de type 2 varie entre les individus d'une population étudiée, en partie du fait de l'hétérogénéité de cette maladie, avec des présentations cliniques différentes entre les patients (Cantrell et al., 2010). De plus, l'évolution naturelle du diabète de type 2 est une dégradation progressive de l'équilibre glycémique, et 50% des patients ont besoin de plus d'une classe d'anti-diabétiques pour maintenir un équilibre glycémique correct 3 ans après le diagnostic, et 75% à 9 ans (Turner et al., 1999). De cette manière, 12% des patients diabétiques de type 2 sont traités par insuline en France (Guelfucci et al., 2013).

Devant cet échec relatif des traitements propres au diabète de type 2, il est nécessaire de mieux en préciser la physiopathologie afin de pouvoir définir de nouveaux axes de recherche thérapeutique.

D. Mécanismes physiopathologiques du diabète de type 2

L'hétérogénéité des patients diabétiques de type 2 complique son étude physiopathologique. Le diabète de type 2 est globalement caractérisé par une résistance à l'insuline d'une part, et une insuffisance relative dans la sécrétion d'insuline d'autre part. Ces deux facteurs sont combinés à différents degrés entre les patients, et il est probable que les deux contribuent au diabète de type 2 (Beck-Nielsen and Groop, 1994; Kahn, 1994; Stumvoll et al., 2005).

1) Insulino-résistance

L'insulino-résistance est caractérisée par une diminution de la réponse cellulaire à l'insuline. Cette résistance à l'insuline est caractérisée principalement dans trois organes : le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux (DeFronzo, 1988; Reaven, 1988). L'insulino-résistance hépatique induit une production hépatique de glucose inadaptée (DeFronzo et al., 1989; Kim et al., 2003), tandis que l'insulino-résistance musculaire et adipeuse induit une diminution de la captation du glucose circulant (Cline et al., 1999; Groop et al., 1989).

2) Insuffisance relative en insuline

Si l'insulinorésistance est fréquente et précoce dans l'intolérance au glucose, une dysfonction de la cellule bêta avec diminution de l'insuline sécrétée est toujours retrouvée au cours du diabète de type 2 (Kahn et al., 2014; Mitrakou et al., 1992; Prentki and Nolan, 2006; Weir, 1995; Weyer et al., 1999). Lorsque l'insulino-résistance apparaît, les cellules bêta maintiennent une glycémie normale en augmentant leur sécrétion d'insuline. En revanche,

lorsque celle-ci se révèle insuffisante, la glycémie augmente et devient pathologique. Plusieurs études longitudinales rapportent une relation en U inversé entre la glycémie à jeun et l'insulinémie (Saad et al., 1989) : 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 5). Plusieurs études ont également démontré qu'une faible insulinémie en réponse à une charge en glucose chez des sujets normoglycémiques ou intolérants au glucose était un très bon facteur prédictif d'apparition ultérieure de diabète (Efendic et al., 1988; Kadowaki et al., 1984).

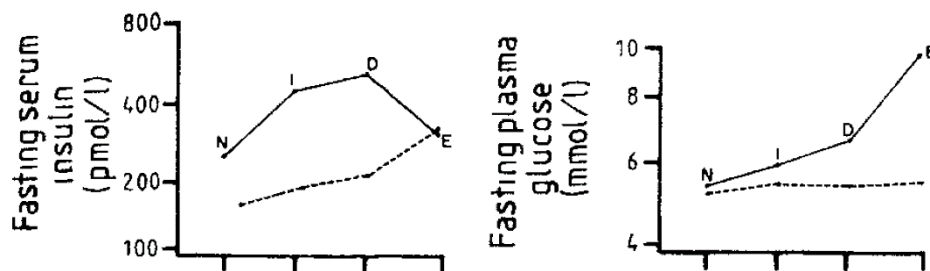


Figure 5- Evolution des glycémies et insulinémies à jeun chez des sujets développant un diabète de type 2. N = stade normoglycémique ; I = stade d'intolérance au glucose ; D = diagnostic du diabète de type 2 ; E = dernière évaluation. Tiré de (Saad et al., 1989)

Un autre argument en faveur de ce déclin de la fonction bêta au cours du diabète de type 2 est la diminution de l'efficacité des médicaments avec le temps (Turner et al., 1999; U.K. Prospective Diabetes Study, 1995), possiblement en rapport à une aggravation du déficit en cellules bêta fonctionnelles. Cette diminution en cellules bêta fonctionnelles a longtemps été expliquée par deux phénomènes : la diminution de la sécrétion en insuline en réponse au glucose, et la diminution du nombre de cellules bêta.

3) Diminution de la sécrétion d'insuline

Une caractéristique de la déficience des cellules bêta est la diminution voire la perte de la phase précoce de sécrétion d'insuline induite par le glucose (durant les 10 premières minutes suivant l'injection de glucose intra-veineux, ou 30 minutes suivant la prise orale de glucose). La sécrétion tardive d'insuline est en revanche conservée voire augmentée chez les sujets intolérants au glucose, avant d'être également diminuée chez les individus diabétiques de type 2 avec une hyperglycémie à jeun plus sévère (Gerich, 1998). En plus de ce trouble de sécrétion en réponse au glucose, les cellules bêta présentent également un trouble de la pulsativité de la sécrétion d'insuline, qui est diminuée voire abolie chez les individus diabétiques de type 2 (Lang et al., 1981; O'Rahilly et al., 1988; Satin et al., 2015). L'ensemble de ces données confirment donc que les cellules bêta présentent une dysrégulation de leur sécrétion en insuline, qui est ciblée par plusieurs médicaments anti-diabétiques (les sulfamides hypoglycémiant, indépendamment du glucose, et les analogues du GLP-1 et inhibiteurs de la dpp4, de manière dépendante du glucose).

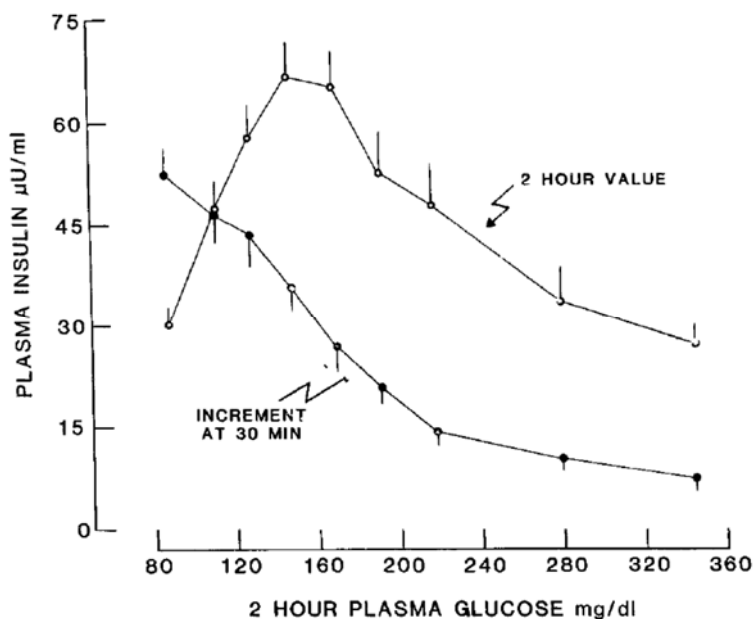


Figure 6 - Insulinémie précoce (30 minutes) et tardive (2 heures) en fonction de la glycémie 2 heures après une charge orale en glucose. Tiré de (Gerich, 1998)

4) Diminution du nombre de cellules bêta

La question du nombre de cellules bêta au cours du diabète de type 2 est plus difficile à évaluer, principalement en raison de l'absence d'évaluation fiable de la masse bêta *in-vivo* chez l'homme, et de la difficulté à accéder à des échantillons pancréatiques humains. Les études plus récentes utilisant des techniques immuno-histochimiques aboutissent à des conclusions variables, de l'absence de différence significative (Clark et al., 2001; Guiot et al., 2001) à une baisse modérée (25-40%) (Clark et al., 1988; Rahier et al., 2008; Sakuraba et al., 2002; Yoon et al., 2003) ou plus importante (40-60%) (Butler et al., 2003; Kloppel et al., 1985) de la masse cellulaire bêta chez des individus diabétiques de type 2 par rapport aux individus contrôles. Ces résultats, contradictoires au premier abord, peuvent être dus en partie à l'hétérogénéité des échantillons recueillis (pancréas post-mortem le plus souvent, biopsies per-opératoires plus rarement), aux méthodes d'analyse morphométrique variant d'une équipe à l'autre, mais surtout à l'hétérogénéité des caractéristiques cliniques des individus « donneurs » concernant l'âge, l'indice de masse corporelle, la durée du diabète, et liés à l'hétérogénéité du diabète de type 2 lui-même.

Une diminution de la masse bêta 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 (Butler et al., 2003; Kloppel et al., 1985; Rahier et al., 2008; Sakuraba et al., 2002; Yoon et al., 2003), la masse bêta étant augmentée chez les individus obèses non diabétiques comparés à des individus normo-pondéraux (Saisho et al., 2013). 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 (Kosaka et al., 1980; Vague and Moulin, 1982) 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 (Turner et al., 1999; U.K. Prospective Diabetes Study, 1995) 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 (24 et 54% plus faible que les contrôles chez les sujets avec moins de 5 ans et plus de 15 ans d'évolution de diabète respectivement (Rahier et al., 2008)). 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 (Aguayo-Mazzucato and Bonner-Weir, 2017; Benthuisen et al., 2016).

Un point commun à toutes les études sus-citées est la caractérisation de la cellule bêta, définie par la production d'insuline. Concrètement, une cellule dont une partie du cytoplasme est immuno-marquée à l'insuline 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 insulinomarquée. Or une nouvelle hypothèse pour expliquer la diminution de la masse bêta fonctionnelle serait la dédifférenciation cellulaire : les cellules bêta resteraient présentes, mais perdraient leurs propriétés de cellule bêta, dont la production d'insuline. 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 en cellules bêta productrices d'insuline, voire de prévenir cette dédifférenciation.

Dans la suite de cette introduction, nous allons voir comment est défini ce concept de dédifférenciation cellulaire, d'une manière générale dans un premier temps puis dans la cellule bêta dans un second temps.

II. La dédifférenciation cellulaire

A. 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 progressivement se différencier en passant par plusieurs états intermédiaires, chaque stade étant irréversiblement acquis. Ainsi, le paysage épigénétique de Waddington (Waddington, 1940) présente une analogie entre le mécanisme de différenciation cellulaire et la trajectoire d'une bille posée au sommet d'un paysage composé de collines et de vallées (Figure 7) : la cellule, représentée par une bille lâchée au sommet de ce paysage, va inéluctablement rouler vers le bas, en faisant un choix irréversible à chaque bifurcation de vallées en fonction des conditions physico-chimiques qui s'appliquent au moment de son passage. Chaque nouvelle vallée représente un nouvel état cellulaire, plus spécialisé que le précédent, et les collines entre les vallées maintiennent cet état cellulaire une fois qu'il a été choisi. On retrouve un point de vue identique dans l'expression « différenciation terminale » souvent utilisé (Rice and Green, 1977), qui représente l'étape finale et ultime d'une différenciation progressive, la cellule étant désormais dans un état définitif et irréversible.

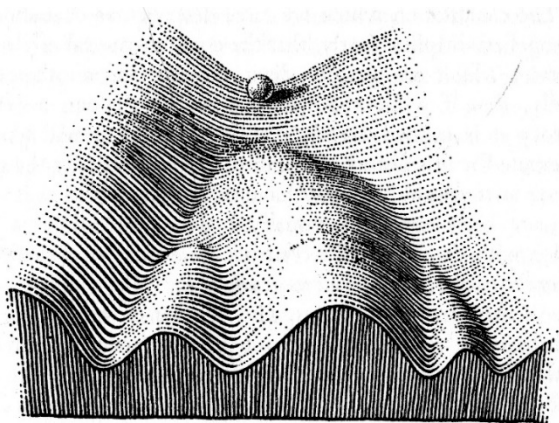


Figure 7 – Paysage épigénétique de Waddington : la bille, représentant une cellule en cours de différenciation, va inéluctablement rouler vers le bas en s'engageant dans des vallées, chaque vallée représentant un nouvel état cellulaire, séparé des autres états cellulaires par des collines. Tiré de (Waddington, 1957)

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 (Blau and Baltimore, 1991). 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 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 (Szabat et al., 2012).

B. Dédifférenciation : exemple de l'amphibien

Cette plasticité cellulaire est par exemple observée après des lésions tissulaires chez certains amphibiens. Ainsi, après ablation chirurgicale du cristallin chez le triton, les cellules épithéliales de l'iris, spécialisées dans la production de mélanine, se transdifférencient en cellules du cristallin, spécialisées dans la production de cristalline (Borst and McDevitt, 1987) : 4 jours après l'ablation du cristallin, les cellules épithéliales de l'iris se dédifférencient avec un arrêt de la production de mélanine, retournent en mitose et prolifèrent, puis se différencient en cellules du cristallin avec arrêt de la prolifération et synthèse de cristalline (McDevitt, 1989).

Un autre modèle de dédifférenciation concerne la régénération d'un membre après amputation, là encore 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 squelettique, tissu conjonctif, peau, ...). Plusieurs études de traçages cellulaires ont

démonstrées qu'une partie des cellules du blastème proviennent de cellules habituellement considérées dans un état de « différenciation terminale » (Brockes, 1997). Ainsi, les chondrocytes se dédifférencient afin de proliférer au sein du blastème, mais ne donneront que des chondrocytes au sein du membre régénéré (Namenwirth, 1974). En revanche, les cellules dérivant du muscle, incluant des cellules pluripotentes telles que des fibroblastes, donnent naissance, après dédifférenciation au sein du blastème, à l'ensemble des cellules mésenchymateuses du membre, incluant les myoblastes et chondrocytes (Namenwirth, 1974).

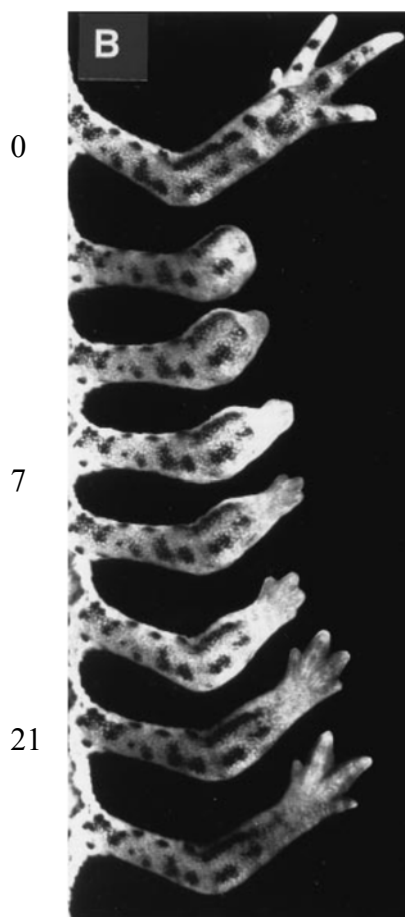


Figure 8. Régénération d'un membre antérieur chez le triton. Tiré de (Brockes, 1997)

C. Dédifférenciation : exemples chez le mammifère

Chez les mammifères, il n'existe pas d'argument pour un mécanisme aussi impressionnant qu'une régénération d'un membre amputé. En revanche, il existe plusieurs modèles où le dogme d'un état de « différenciation terminale » a été battu en brèche. Un premier exemple concerne le myocyte, cellule plurinucléée spécialisée dans la contraction musculaire et non proliférative. McGann et al. ont démontré, *in vitro* puis *in vivo*, que la présence de facteurs de croissance et de nutriments particuliers induisait une dédifférenciation du myocyte, avec d'une part une diminution voire arrêt d'expression de la myogénine et de la troponine T, deux protéines spécifiquement exprimées dans les myocytes, et d'autre part une induction de la prolifération (McGann et al., 2001).

Plus récemment, plusieurs études ont démontré qu'une dédifférenciation pouvait survenir dans plusieurs cellules spécialisées chez l'humain sans introduction de gènes, mais uniquement par modulation du milieu de culture, par exemple dans des thyrocytes (Suzuki et al., 2011), des adipocytes (Jumabay et al., 2014) ou des kératinocytes (Sun et al., 2011). Ces études n'ont pas la splendeur d'un membre régénéré à partir de cellules différenciées, mais soulignent la possibilité de diminuer l'état de différenciation de cellules différenciées, diminution caractérisée par une perte d'expression de gènes propres à la différenciation et à la fonction spécialisée, et une réexpression de gènes normalement exprimés dans leurs progéniteurs respectifs.

III. Dédifférenciation et cellule bêta pancréatique

A. La cellule bêta, une cellule différenciée par excellence

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 (Nica et al., 2013).

Corrélé à cet état avancé de différenciation, la cellule bêta humaine ne prolifère pas ou très peu. La prolifération des cellules bêta pancréatiques ne pouvant être observée *in vivo* chez l'Humain, la majorité des études utilisent des marqueurs indirects de prolifération sur des coupes de pancréas. Ainsi, le marqueur de prolifération Ki67 peut être observé dans une très faible proportion de cellules bêta humaines : il faut analyser en moyenne entre 25 et 100 ilots pour repérer une cellule bêta avec un marquage nucléaire Ki67 (Butler et al., 2003, 2010). Or le marquage Ki67, initialement développé pour son intérêt histo-pronostique dans plusieurs cancers humains, est surtout un bon indicateur de la fraction en croissance au sein d'une population cellulaire ; cette corrélation est en revanche plus compliquée à l'échelle cellulaire, une cellule pouvant entrer en quiescence, en plus des limites d'un immuno-marquage jamais 100% spécifique (Scholzen and Gerdes, 2000). Devant un marquage aussi faible des cellules bêta humaines, la réalité d'une division cellulaire même rare est incertaine. En ce sens, une autre étude ne retrouve aucun marquage nucléaire KI67 après avoir observé 37.845 cellules bêta humaines (Mezza et al., 2014). De même, Parnaud et al. n'ont observé aucune incorporation de BrdU dans des cellules bêta humaines adultes, triées et mises en culture avec plusieurs combinaisons de facteur de croissance (Parnaud et al., 2008). A l'inverse, l'immuno-marquage Ki67 pourrait être faussement diminué, de manière proportionnelle au délai entre le

décès et la fixation du pancréas : ainsi, l'immunomarquage Ki67 d'ilots pancréatiques murins est retrouvé dans 6,9% des cellules bêta lorsque la fixation est réalisée immédiatement mais seulement 2,9% lorsque le pancréas a été laissé 3 heures à température ambiante puis 21 heures à 4°, conditions pouvant mimer le transport d'un pancréas humain avant fixation (Sullivan et al., 2015).

Afin de s'affranchir des limites de ces marqueurs indirects de prolifération, deux équipes ont utilisé des méthodes originales pour estimer la durée de vie d'une cellule bêta humaine, et donc la prolifération associée au cours d'une vie humaine. La première est liée à la lipofuscine, un organe du système lysosomal et dont l'accumulation cellulaire est liée au vieillissement des cellules post-mitotiques (Schmucker and Sachs, 2002). En tirant profit de cette caractéristique, Cnop et al. ont démontré une longue durée de vie de la cellule bêta humaine, dont la population est quasi établie avant 20 ans, tant chez des individus diabétiques de type 2 ou obèses (Cnop et al., 2010), en faveur d'une très faible prolifération de la cellule bêta humaine adulte.

La seconde méthode repose sur l'augmentation importante en carbone 14 suite aux essais nucléaires atmosphériques entre 1950 et 1963, suivie d'une diminution jusqu'à nos jours selon un diagramme bien défini (Spalding et al., 2005). En appliquant cette méthode sur des cellules bêta de deux donneurs (triées sur un marquage pro-insuline), Perl et al. concluent que les cellules bêta sont formées avant le 30^e anniversaire de chaque individu, donc sans prolifération par la suite (Perl et al., 2010). Dans cette même étude, les auteurs ont également pu obtenir des échantillons de pancréas d'individus ayant reçu avant leur décès un analogue de la thymidine comme agent marquant ou radio-sensibilisateur (iododeoxyuridine (IdU) ou bromodeoxyuridine (BrdU)), réalisant ainsi un véritable marquage *in vivo* des cellules en cours de prolifération : si 1 à 2% des cellules bêta présentent un marquage nucléaire au IdU ou BrdU chez les deux individus de moins de 20 ans, aucun marquage n'est retrouvé chez les 8 individus

de plus de 30 ans (Perl et al., 2010), en faveur d'une absence de prolifération de la cellule bêta humaine adulte.

B. Du progéniteur pancréatique à la cellule bêta

Avant d'aborder les arguments pour une dédifférenciation de la cellule bêta, il est important d'avoir en mémoire le modèle de différenciation de la cellule bêta à partir d'un progéniteur pancréatique.

Le pancréas est un organe amphicrine, assurant deux fonctions étroitement associées à la digestion, une fonction exocrine et une fonction endocrine, portées par des populations cellulaires distinctes. La population cellulaire exocrine constitue la majorité du tissu pancréatique, et sécrète les enzymes pancréatiques dans le duodénum via le canal de Wirsung. Cette population exocrine est constituée des cellules acinaires, productrice du zymogène qui aide à la digestion des nutriments, et des cellules canalaire, productrices de bicarbonates et déversant le zymogène dans le duodénum. La population cellulaire endocrine est beaucoup moins importante en nombre, environ 1% du pancréas (Bonner-Weir, 2005), et est répartie à travers l'ensemble de la glande pancréatique sous forme d'ilots, les ilots de Langerhans.

De nombreux modèles murins, avec traçage cellulaire, activation ou inactivation de gènes dans des cellules spécifiques, ont permis de préciser des facteurs de transcriptions clés impliqués dans les étapes successives de différenciation entre une cellule progéniteur et l'ensemble des cellules pancréatiques sus-citées (Gittes, 2009; Puri and Hebrok, 2010). Une

partie de ces facteurs de transcription est résumée dans la Figure 9. Parmi ces facteurs de transcription, trois sont particulièrement décrits : PDX1, SOX9 et NEUROG3.

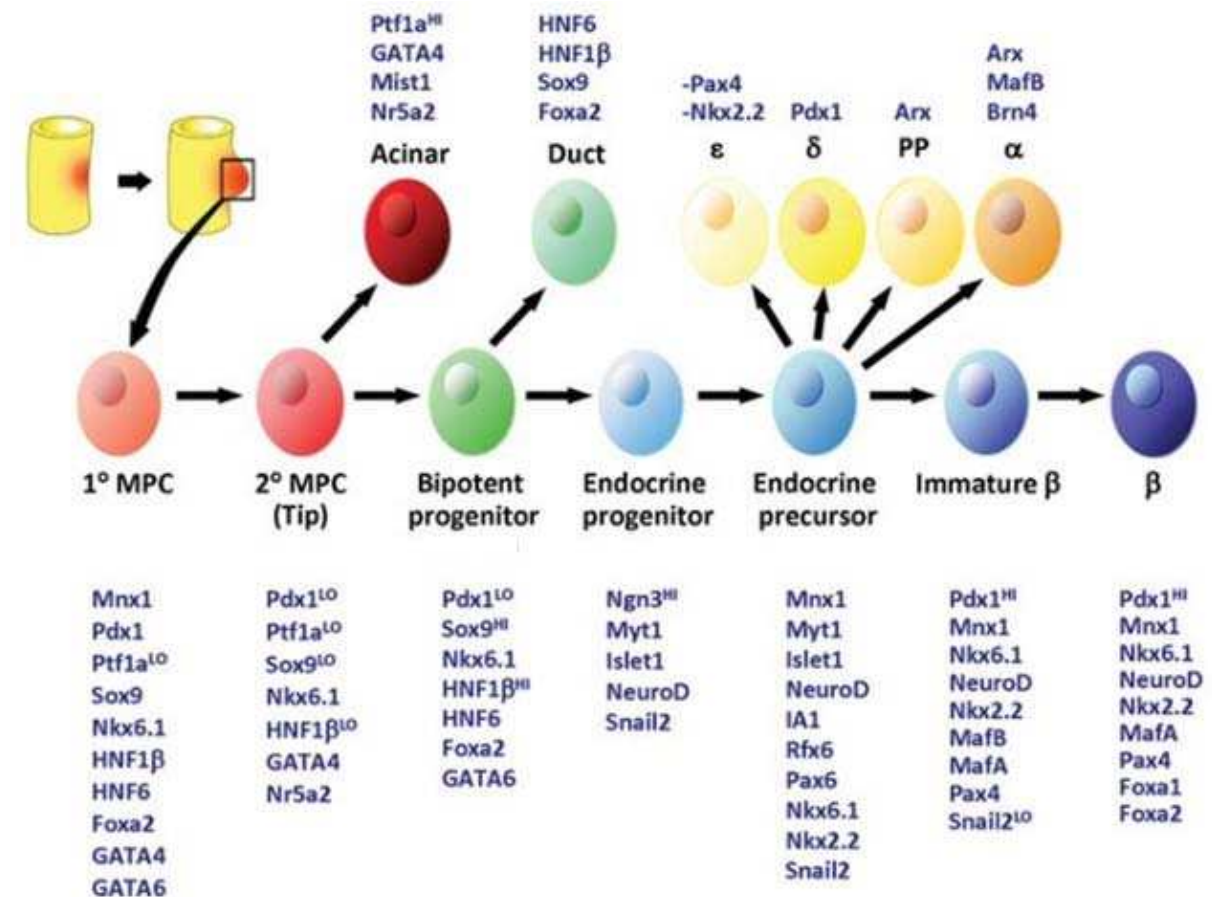


Figure 9 - Facteurs de transcriptions importants exprimés à chaque étape du développement pancréatique. Tiré de (Pan and Wright, 2011). MPC : pancreatic multipotent progenitor cells.

L'activation du gène pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX1) lors de l'embryogenèse permet de définir l'apparition de cellules progéniteurs pancréatiques : tout le tissu épithélial pancréatique (ilots, acini et canaux) dérive de ces progéniteurs pancréatiques. Ainsi, les souris présentant une mutation homozygotes présentent une agénésie du pancréas (Jonsson et al., 1994; Offield et al., 1996). Une même dépendance a été rapporté chez l'Homme,

avec un phénotype similaire d'agénésie pancréatique observé chez un enfant présentant une mutation homozygote de PDX1 (Stoffers et al., 1997).

Le facteur de transcription Sex-determining region on Y (SRY)-box 9 (SOX9) est tout aussi important dans le développement du pancréas. Il est exprimé dans le pancréas en développement dans les cellules PDX1-positives, et est nécessaire pour maintenir la prolifération des progéniteurs pancréatiques (Seymour et al., 2007) : sa délétion est associée à une hypoplasie pancréatique, due à une déplétion du pool de progéniteurs. Il existe un lien étroit entre l'expression du facteur de transcription SOX9 et du fibroblast growth factor receptor (FGFR) 2b, indispensable à l'action de FGF10 (Seymour et al., 2012). Enfin, il est intéressant de noter que l'action de SOX9 semble dépendante de son dosage. Ainsi, la délétion d'un seul allèle de SOX9 est associée à une diminution du nombre de progéniteurs endocrines chez l'embryon, et une diminution du nombre de cellules endocrines chez les nouveau-nés murins, alors que le tissu exocrine est d'apparence normale (Seymour et al., 2008).

Neurogenin3 (NEUROG3) va définir les progéniteurs endocrines. Sa délétion est associée à une absence totale de cellules endocrines, sans affecter les cellules acinaires et canalaire (Gradwohl et al., 2000). Dans le même sens, toutes les cellules endocrines chez la souris adulte dérivent de cellules ayant exprimées NEUROG3 durant l'embryogenèse (Gu et al., 2002). Afin d'étudier l'influence des gènes co-exprimés lors de l'induction de NEUROG3, Johansson et al. ont développé un système inductible par tamoxifène de ce facteur de transcription chez des souris *Ngn3^{-/-}* (Johansson et al., 2007) : en fonction du stade d'induction de l'expression de NEUROG3, la proportion de chaque sous-type cellulaire endocrine variait. Les cellules progéniteurs endocrines passent donc par des états de compétence permettant la différenciation d'un sous-type de cellule endocrine variant dans le temps.

L'expression d'un facteur de transcription seul ne suffit donc pas à définir un sous-type cellulaire, mais dépend d'autres facteurs intrinsèques à la cellule mais également extrinsèques. Il est, en ce sens, important de noter que plusieurs de facteurs de transcription définis sur la Figure 9 sont exprimés à plusieurs étapes de la différenciation. Par exemple, le facteur de transcription pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX1) est exprimé aussi bien à l'extrême gauche, dans la cellule progénitrice multipotente pancréatique, qu'à l'extrême droite, dans les cellules matures bêta et delta, ainsi que dans les cellules canalaire chez l'Humain. Ainsi, si on a vu qu'une mutation homozygote est associée à une agénésie du pancréas (Jonsson et al., 1994; Offield et al., 1996), une délétion plus tardive au cours de l'embryogenèse de PDX1 dans les cellules exprimant l'insuline est associée, chez les nouveaux-nés murins, à une diminution très importante de la masse bêta et une élévation de la glycémie (Gannon et al., 2008).

L'expression d'un facteur de transcription par une cellule n'est donc pas suffisante pour définir un stade de différenciation ; c'est son interaction avec les autres facteurs de transcription exprimés et avec des signaux extra-cellulaires qui va définir l'action spécifique de ce facteur de transcription au cours de l'organogenèse pancréatique.

C. Dédifférenciation d'une cellule bêta : définitions

Une première difficulté à étudier la dédifférenciation de la cellule bêta pancréatique est liée à la définition du mot dédifférenciation lui-même. Un premier aspect est bien sûr une diminution d'expression de gènes bêta-spécifique. En revanche, cette caractéristique, rencontrant celle de l'hétérogénéité de la cellule bêta clairement démontrée (Dorrell et al.,

2016), est insuffisante si elle n'est démontrée que sur un faible nombre de gènes spécifiques de la cellule bêta.

Un second aspect est la persistance d'anciennes cellules bêta, non identifiables comme telles puisque n'exprimant plus les gènes la définissant (insuline, facteurs de transcription spécifiques, etc). Cette démonstration est donc compliquée, et nous verrons que les arguments entre des modèles murins et l'Humain convainquent de manière différente.

Enfin un troisième aspect est la reconversion d'une ancienne cellule bêta vers un état de cellule progéniteur, capable de redonner plusieurs types cellulaires en fonction du stade dudit progéniteur. Si cet aspect va être abordé dans quelques modèles murins voire humains, il faut garder à l'esprit 1/ que ce phénomène est exceptionnel chez le mammifère, 2/ qu'il est très difficile de définir l'état de progéniteur d'une cellule par l'expression d'un facteur de transcription en particulier, celui-ci pouvant être exprimé à plusieurs stades du développement, et son expression « ectopique » ne signe pas forcément la présence de toutes les autres caractéristiques permettant de définir une cellule progéniteur.

D. Modèles murins de dédifférenciation

Dès 1999, Jonas et al. apportent des arguments pour une dédifférenciation de la cellule bêta in-vivo (Jonas et al., 1999). Dans cette étude, le diabète est induit par une pancréatectomie partielle de 90%. Après deux semaines, les ilots endocrines dans la partie pancréatique restante ont un contenu effondré en ARNm spécifiques de la cellule bêta (insuline, PDX-1, NKX6.1). En plus de ces diminutions, est associée une augmentation d'ARNm habituellement non

exprimés dans les cellules bêta : augmentation des ARNm 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 de la glycémie permet une restauration de l'expression de ces ARNm. L'injection de phlorizine (inhibiteur de SGLT2) chez les souris pancréatectomisées à 90% permet une diminution des glycémies sans action sur la cellule bêta, en majorant la glycosurie. Après deux semaines de traitement, les souris pancréatectomisées ont une glycémie normale, et les expressions des gènes bêta et non bêta redeviennent comparables aux niveaux exprimés dans les îlots de souris contrôles (Figure 10).

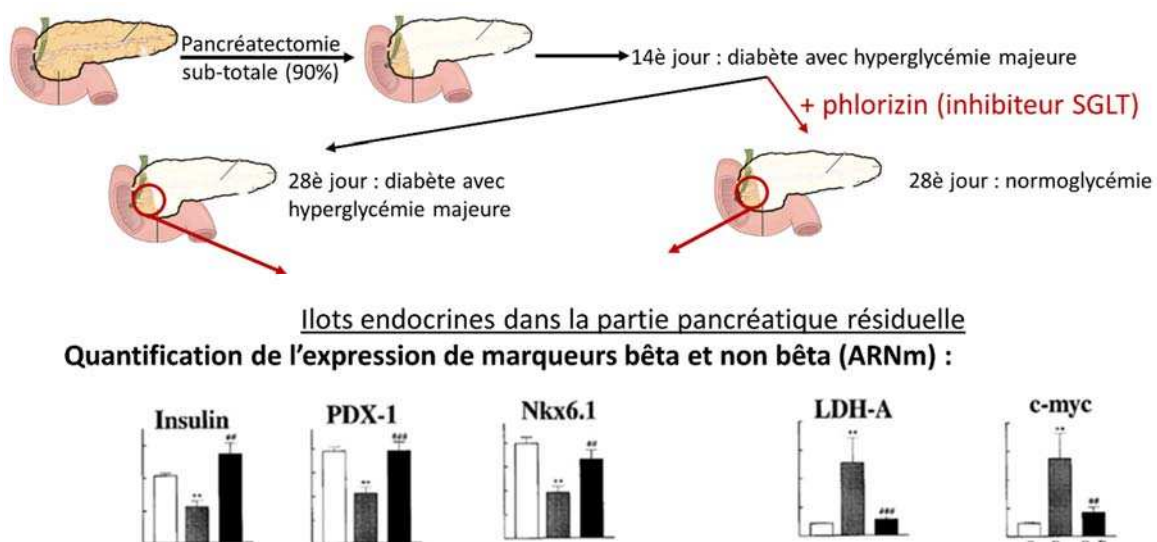


Figure 10 - Première démonstration d'une possible dédifférenciation de la cellule bêta suite à une hyperglycémie chronique. Expression d'ARNm chez des souris contrôles (histogrammes blancs), pancréatectomisées diabétiques (histogrammes gris) ou pancréatectomisées diabétiques puis normoglycémiques sous phlorizine (histogrammes noirs). Tiré de (Jonas et al., 1999)

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 spécifique par les

cellules bêta, mais ces cellules restent présentes dans les îlots, caractérisant la dédifférenciation avec une induction de gènes non bêta (LDH-a, c-MYC). 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. La *Figure 11* présente un système CRE-LOX associant un transgène « promoteur insuline – CRE » et un transgène « promoteur β -actine CMV – loxP – Stop – loxP – YFP » (Weinberg et al., 2007). Après recombinaison, l'expression du fluorochrome est sous contrôle d'un promoteur constitutionnellement actif. De cette manière, les cellules dont le promoteur insuline est actif (donc par définition des cellules bêta) vont exprimer de manière définitive le fluorochrome YFP ou Rosa, même si le promoteur insuline devient secondaire inactif. L'hypothèse de la persistance de cellules bêta n'exprimant plus l'insuline peut alors être testée.

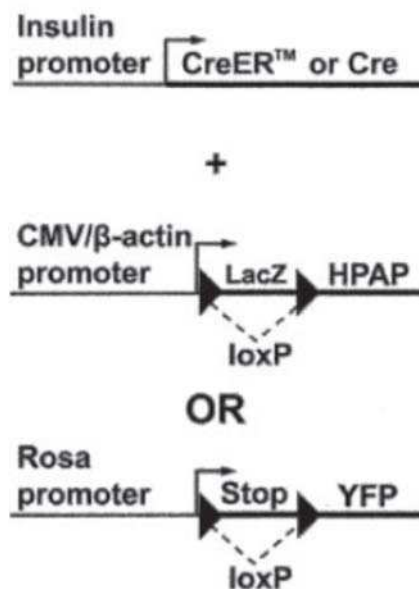


Figure 11 - Traçage cellulaire par système CRE-Lox. Tiré de (Weinberg et al., 2007)

Dans le cadre de l'étude de Weinberg et al., l'hypothèse d'une prolifération des cellules bêta lors de la culture *in vitro* d'ilots 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'ilots murins : si toutes les cellules exprimant le fluorochrome sont insuline-positives à J1, une partie importante des cellules fluorochrome-positives n'expriment plus l'insuline après 14 jours de culture, ni PDX1 ou le transporteur de glucose GLUT2 (Figure 12).

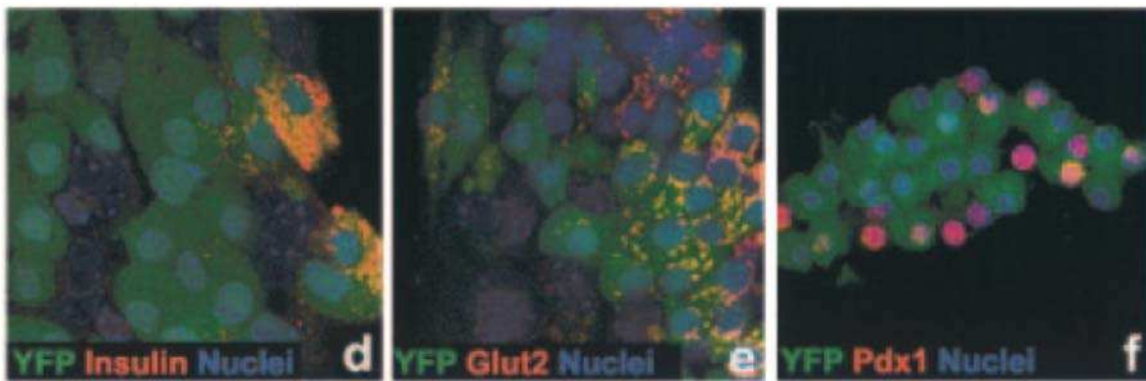


Figure 12 - Dédifférenciation de cellules bêta à J14 de la culture d'ilots murins *in vitro* : nombreuses cellules YFP-positives (dont le promoteur de l'insuline a été actif) mais n'exprimant plus l'insuline, le transporteur GLUT2 et PDX1. Tiré de (Weinberg et al., 2007).

Dans une autre étude, Elghazi et al. apportent également des argument pour une plasticité de la cellule bêta murine, avec une possible transdifférenciation de la cellule bêta en cellule acinaire après induction de la voie Akt dans les cellules bêta (Elghazi et al., 2009). Leur étude est basée sur l'utilisation de souris double-transgéniques : transgènes Akt et marqueur fluorescent eGFP floxés d'une part, et RIP-Cre ou Pdx1^{PB}-CreERTM d'autre part, permettant l'induction de la voie Akt dans des cellules bêta matures de 4 semaines. Dans ce modèle murin, les immunofluorescences à 12 semaines de vie révèlent la présence d'ex cellules bêta (EGFP-positives mais insulines-négative) exprimant l'amylase, suggérant donc une

transdifférenciation de cellules bêta en cellule acinaire suite à l'activation forcée de la voie Akt (Figure 13).

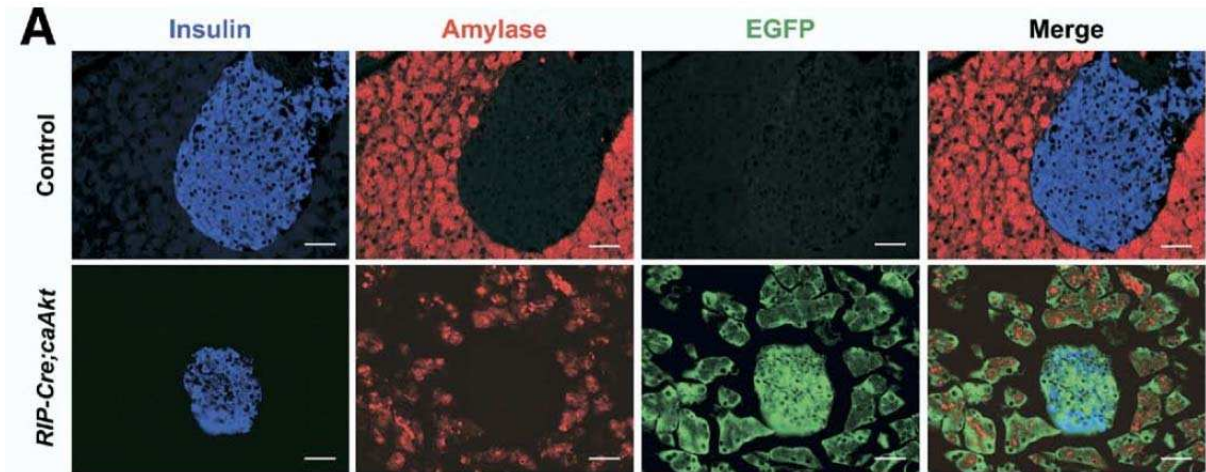
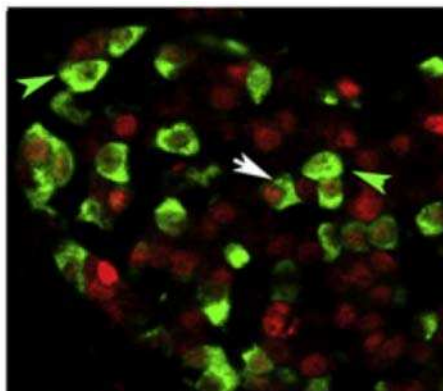


Figure 13 – L'activation de la voie Akt (souris RIP-Cre;caAkt, deuxième ligne) est associée à l'apparition de cellules ayant exprimées l'insuline (EGFP positives mais insuline négatives) et exprimant l'amylase (rouge), suggérant une transdifférenciation de la cellule bêta en cellule acinaire. Tiré de (Elghazi et al., 2009)

Les études de Weinberg et al. et de Elghazi et al. démontrent donc la plasticité des cellules bêta murines, lorsqu'elles sont soumises à un stress in vitro ou à l'induction transgénique d'Akt. Dans la même optique, une transdifférenciation de la cellule bêta en cellule alpha par délétion spécifique de *Dnmt1* dans les cellules bêta est également rapportée (Dhawan et al., 2011) (Figure 14).



Glu beta-gal

Figure 14 - Transdifférenciation de cellule bêta en cellule alpha. Les cellules dont le promoteur insuline a été actif expriment la b-galactosidase (rouge). Les cellules avec un double marquage nucléaire rouge et cytoplasmique vert sont donc des cellules dont le promoteur insuline a été actif et exprimant désormais du glucagon, suggérant une transdifférenciation de cellule β en cellule α . Tiré de (Dhawan et al., 2011)

Talchai et al. démontrent plus clairement l'implication d'une dédifférenciation dans le développement d'un diabète chez la souris dans des situations de stress (Talchai et al., 2012). La délétion de FoxO1 a peu de conséquence dans des conditions physiologiques. En revanche, ils constatent l'apparition d'un état diabétique lorsque la souris est soumise à un stress tel que des grossesses répétées (associées à des besoins en insuline majorés) ; cet état diabétique est associé à une diminution très importante du nombre de cellules productrices d'insuline. Grâce à un système de traçage cellulaire, ils démontrent que l'effondrement de la masse bêta n'est pas dû à une mortalité cellulaire, mais à une dédifférenciation de la cellule bêta : ces cellules sont toujours présentes dans l'îlot, mais n'expriment plus d'insuline (d'où l'impression de la diminution de la masse « bêta »), ainsi que plusieurs facteurs de transcription clés (MAFA, PDX1).

De plus, lors de cet état diabétique, ces cellules bêta dédifférenciées expriment des gènes habituellement exprimés 1/ dans les progéniteurs pancréatiques (Neurog3, Oct4, Nanog et L-Myc, 3 gènes exprimés dans les cellules Neurogenin3-positives à 14,5 jours d'embryogenèse chez la souris, pouvant faire évoquer un retour vers un stade de progéniteur), ou 2/ 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 diabètes sans insertion de transgènes : souris *db/db* ou GIRKO. Dans les îlots de ces souris, les auteurs rapportent la présence de nombreuses cellules chromogranine A positives sans autre marquage hormonal, et une augmentation du marquage Neurog3, Oct4 et L-Myc, parallèlement à une diminution d'expression de FoxO1 (Talchai et al., 2012).

En revanche, on ne peut caractériser ces cellules dédifférenciées de cellules progéniteurs, l'expression de trois facteurs de transcriptions ne permettant pas de définir à eux-seuls un tel état, mais uniquement un état évocateur de progéniteur (Puri and Hebrok, 2012).

Puri et al. démontrent également qu'une délétion du gène von Hippel-Lindau (Vhlh) dans les cellules bêta murines conduit à un état diabétique associé à une division par 3 de la masse bêta estimée sur un marquage insuline, mais avec persistance de nombreuses cellules insulaires ayant activé le promoteur de l'insuline. Ces cellules sont caractérisées par une diminution drastique de plusieurs facteurs de transcription propres à la cellule bêta (par exemple le facteur de transcription de l'insuline MAFA), et une induction de gènes non bêta dont SOX9 (Puri et al., 2013).

De la même manière, une délétion chez la souris du facteur de transcription Mafa, sans conséquence morphologique insulaire ni glucidique chez les nouveau-nés, est associée à l'âge adulte à l'apparition d'un diabète et à l'effondrement de la masse bêta (Nishimura et al., 2014). En revanche, un système de traçage cellulaire révèle une densité similaire de cellules insulaires ayant activé le promoteur de l'insuline (Figure 15). Là encore, ces données sont un très bel exemple de la persistance de cellules bêta dans un état dédifférencié après apparition de l'état diabétique, contrairement à ce qu'un marquage insuline pouvait laisser suggérer. Dans cette même étude est également suggérée une transdifférenciation des cellules bêta en cellules alpha, plusieurs cellules bêta dédifférenciées semblant exprimer du glucagon (Nishimura et al., 2014).

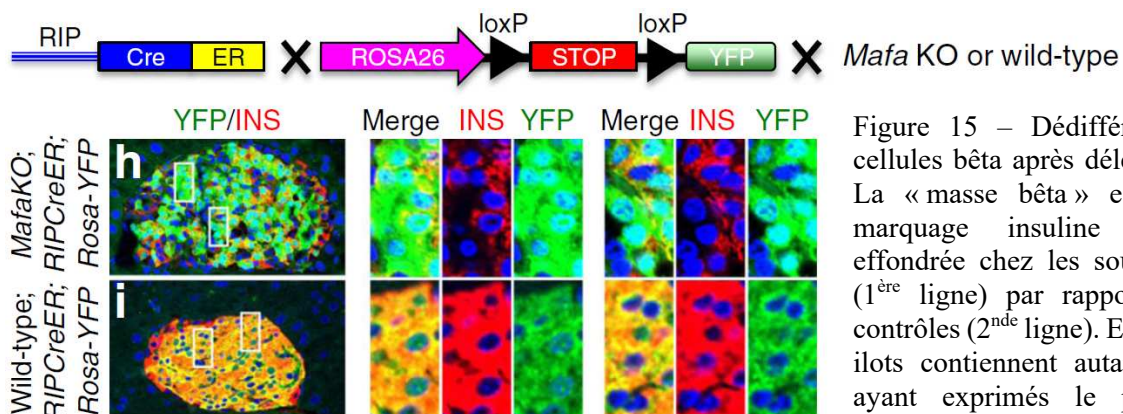


Figure 15 – Dédifférenciation des cellules bêta après délétion de Mafa. La « masse bêta » estimée sur le marquage insuline (rouge) est effondrée chez les souris Mafa KO (1^{ère} ligne) par rapport aux souris contrôles (2nde ligne). En revanche, les îlots contiennent autant de cellules ayant exprimés le promoteur de l'insuline (vert) dans les deux cas. Tiré de (Nishimura et al., 2014)

Les travaux de Jonas et al. suggéraient une réversibilité de la dédifférenciation de la cellule bêta après normalisation de la glycémie (Jonas et al., 1999). Cette réversibilité est plus clairement démontrée avec un système de traçage cellulaire dans un modèle de souris rendues diabétiques par inactivation du la sous-unité Kir6.2 du canal potassique (Wang et al., 2014). Dans cette étude, un couplage du système de recombinaison CRE/Lox à un élément de réponse au tamoxifène permet 1/ de faire exprimer la protéine fluorescentes GFP uniquement dans les cellules dont le promoteur de Pdx1 est actif à deux mois de vie (donc dans les cellules bêta) et 2/ de rendre les souris diabétiques par inactivation du canal potassique. Comme dans les études précédentes, les souris devenues diabétiques présentent un effondrement du contenu en insuline par pancréas, mais il persiste des cellules bêta dédifférenciées au sein des îlots, dont une majorité, dans ce modèle, exprime la protéine Neurogenin-3. En revanche, chez les souris dont les glycémies sont secondairement diminuées par insulinothérapie, on constate une redifférenciation des cellules bêta dédifférenciées en cellules bêta matures produisant de l'insuline : les cellules bêta exprimant l'insuline expriment également la GFP (*Figure 16*). Ces cellules étaient donc présentes avant l'induction du diabète (lors de l'induction du système de recombinaison) et ne peuvent venir d'une prolifération de précurseurs ou de transdifférenciation secondaire à l'insulinothérapie (ces cellules n'exprimeraient pas la GFP).

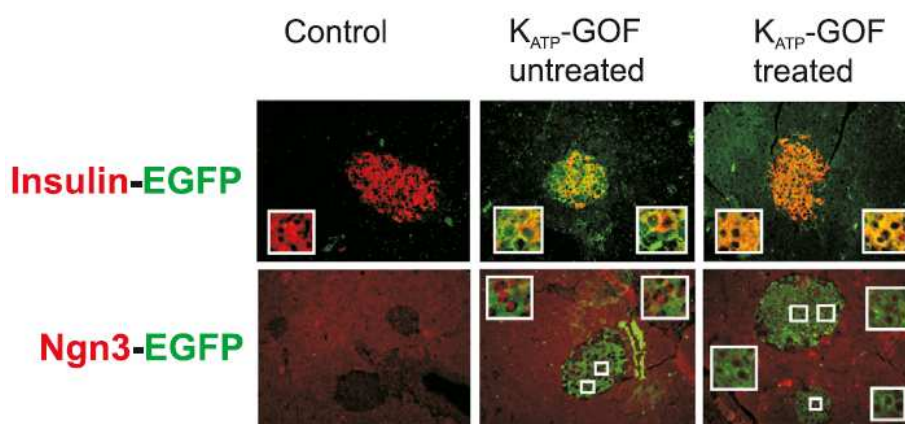


Figure 16 - Dédifférenciation et redifférenciation de cellules bêta murines. La GFP est exprimées par les cellules dont le promoteur de Pdx1 était actif avant l'induction du diabète. Tiré de (Wang et al., 2014)

IV. Cellule bêta humaine

A. Différences entre l'humain et les modèles murins

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. Par exemple, il existe des différences d'expression géniques importantes : les transporteurs du glucose ne sont pas les mêmes (GLUT1 vs GLUT2 chez la souris) (De Vos et al., 1995), ou le facteur de transcription MAFB, exprimé uniquement dans les cellules alpha chez la souris adulte (Artner et al., 2006), est exprimé de manière équivalente dans les cellules bêta et alpha humaines (Dorrell et al., 2011).

D'une manière plus globale, l'architecture, la proportion et la répartition des différents types de cellules endocrines au sein de l'îlot diffèrent de manière importante (Brissova et al., 2005) : chez la souris, les cellules alpha et delta sont en périphérie et les cellules bêta au centre, tandis que les trois types cellulaires sont répartis sur l'ensemble de l'îlot chez l'humain (Figure 17).

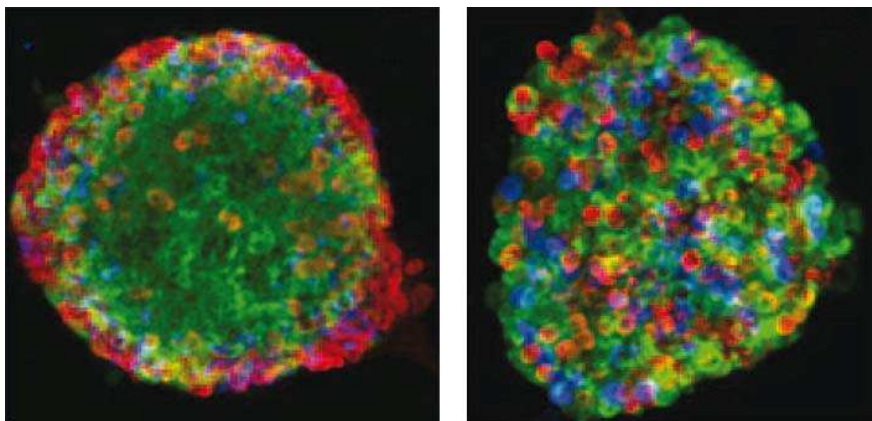


Figure 17 - Reconstruction 3D d'îlots endocrines par superposition de coupes en immunofluorescence (vert insuline, rouge glucagon, bleu somatostatine) ; à gauche un îlot de souris, à droite un îlot humain. Tiré de (Brissova et al., 2005)

D'autres différences peuvent être citées de manière non exhaustive : persistance d'expression de PDX1 dans les cellules canalaire adultes humaines alors qu'elle est restreinte aux cellules bêta chez la souris, taux de prolifération plus important des cellules bêta dans plusieurs modèles murins par rapport à l'humain, présence de deux gènes codant pour l'insuline chez la souris.

B. Arguments pour une dédifférenciation de la cellule bêta humaine

Devant ces différences, la réalité d'une dédifférenciation chez l'Homme ne peut être considérée comme acquise. Les arguments chez l'humain pour ce phénomène sont plus rares, et surtout beaucoup plus indirects. Le principe général repose sur l'identification de cellules endocrine (chromogranine A ou synaptophysine positives), mais n'exprimant plus aucune hormone insulaire connue. Chaque équipe cherche ensuite de manière spécifique des marqueurs « positifs » de dédifférenciation suggérant que ces cellules endocrines hormones-négatives dérivent d'anciennes cellules bêta.

Une des premières études posant la question de cellules bêta dédifférenciées chez des individus diabétiques de type 2 est celle de Marselli et al. (Marselli et al., 2014) : la moyenne de la fraction insulaire insulino-marquée diminue de 72,1 % à 54,9 % chez 10 individus non diabétiques et 10 individus diabétiques de type 2 respectivement (Figure 18). A l'inverse, la surface chromogranine-A marquée ne varie pas entre les individus sains et diabétiques (89,0 vs

86,4 % respectivement), et la surface glucagon est globalement stable (20,2 vs 23,3 %). Ces résultats peuvent donc suggérer la présence de cellules endocrines mais ne produisant ni insuline ni glucagon, pouvant correspondre à d'anciennes cellules bêta en partie différenciées et ne produisant plus d'insuline, mais restant chromogranine-A positives.

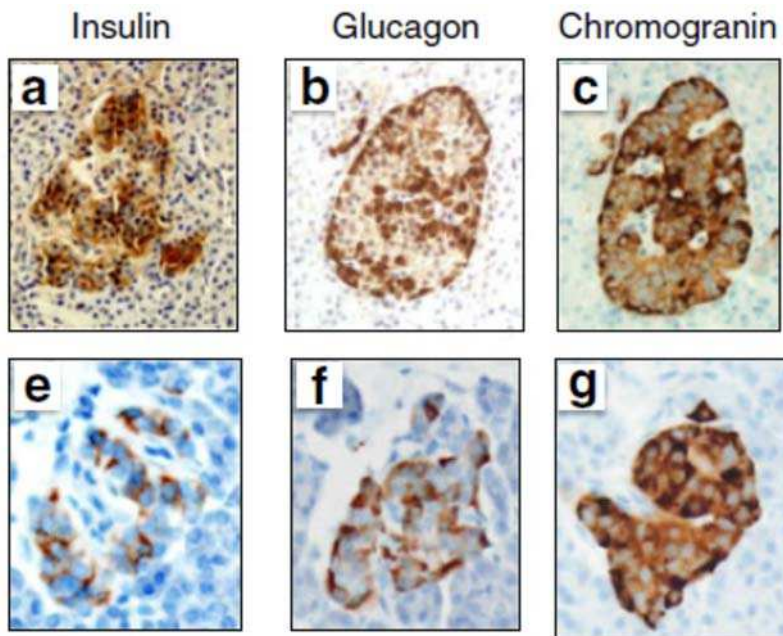


Figure 18 – Coupes pancréatiques issues d'individus non diabétiques (ligne supérieure) et diabétiques de type 2 (ligne inférieure), révélant, malgré une diminution de la surface insuline-positives et une stabilité de la surface glucagon-positives, une stabilité de la surface chromogranine A positives, compatibles avec des cellules bêta différenciées. Tiré de (Marselli et al., 2014).

Cette hypothèse est renforcée par la moindre diminution de la fraction insulaire bêta lorsqu'elle est estimée par microscopie électronique : 70,1 % vs 63,0 % chez les individus non diabétiques et les individus diabétiques de type 2 respectivement. A noter que si la microscopie électronique s'émancipe de la production d'insuline pour définir une cellule bêta, elle reste dépendante de la présence de granules de sécrétions particulière, l'identité d'une cellule pancréatique étant définie au microscope électronique par le type de granules de sécrétions présentes dans le cytoplasme (Pisania et al., 2010).

Devant ces résultats, une estimation plus fine des cellules endocrine hormono-négatives a été publiée deux ans plus tard (Cinti et al., 2016). La proportion de cellules endocrines (synaptophysine positive, gris) n'exprimant aucune hormone insulaire (%4h-/Syn+) augmente de 6,5 % à 16,8 % chez les patients diabétiques de type 2 (Figure 19). Ces cellules représentent 8,4% et 31,7% du nombre de cellules bêta chez les individus contrôles et diabétiques de type 2 respectivement (Figure 19).

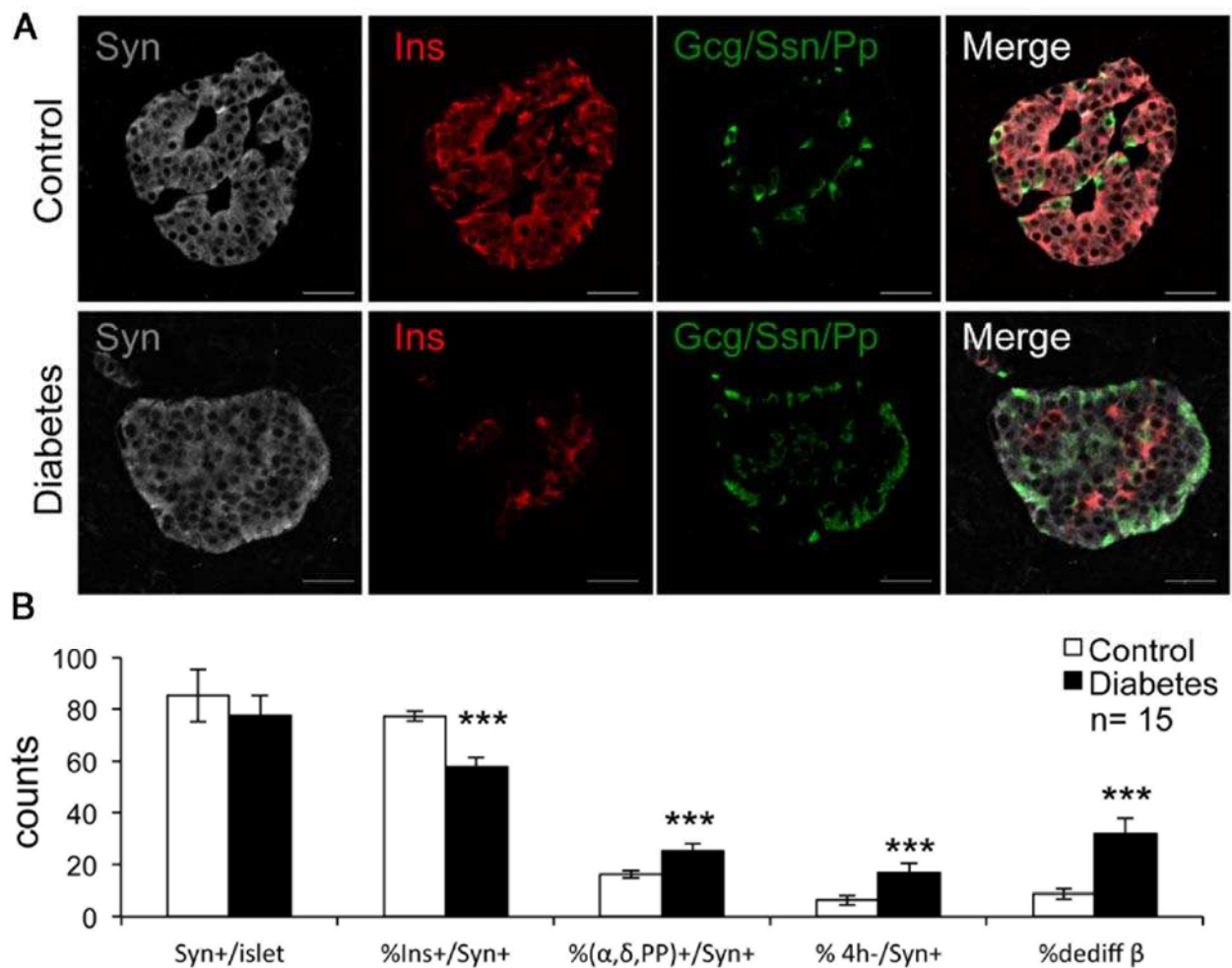


Figure 19 - Dédifférenciation de la cellule bêta humaine au cours du diabète de type 2 : la proportion de cellules endocrines (synaptophysine positive, gris) n'exprimant aucune hormone insulaire (%4h-/Syn+) augmente de 6,5 % à 16,8 % chez les patients diabétiques de type 2. Ces cellules représentent 8,4% et 31,7% du nombre de cellules bêta chez les individus contrôles et diabétiques de type 2 respectivement. Tiré de (Cinti et al., 2016)

Par ailleurs, par une série d'immunomarquages, les auteurs suggèrent la séquence suivant : diminution d'expression de FOXO1, translocations cytoplasmiques de NKX6.1 et MAFA puis diminution puis extinction de l'expression de l'insuline. Parallèlement, les auteurs rapportent chez les individus diabétiques un triplement du nombre de cellules insulaires exprimant ALDH1A3, un marqueur de cellules progéniteurs (Marcato et al., 2011). Cet immunomarquage est retrouvé pour 60% dans des cellules exprimant du glucagon, et 40% dans des cellules n'exprimant aucune hormone. Enfin, Cinti et al. décrivent une expression cytoplasmique de FOXO1 dans 12% des cellules à glucagon dans les îlots d'individus diabétiques (versus <1% chez les individus sains), et une expression cytoplasmique de NKX6.1 dans 7,5% des cellules à somatostatine (versus 1% dans les contrôles). Pris ensemble, ces résultats peuvent suggérer une dédifférenciation des cellules bêta avec translocation cytoplasmique de facteurs de transcription tels que MAFA et NKX6.1, une diminution de l'expression de l'insuline, une induction d'expression de LDH1A3 puis une transdifférenciation en cellule alpha ou delta.

En revanche, une étude publiée un an plus tard rapporte des résultats très contradictoires (Butler et al., 2016) : si le nombre de cellules endocrines (chromogranine A positives) n'exprimant aucune hormone insulaire est multiplié par 3,6 chez des individus obèses diabétiques de type 2 comparés à des individus obèses non diabétiques, le nombre absolu de ces cellules chromogranine A positives et hormones négatives est en moyenne de 0,11 cellule par îlot, soit seulement une cellule pour 10 îlots, très loin des 17% de Cinti et al. (*Figure 20*). L'étude de Cinti et al. n'est pas discutée par l'équipe de Butler, mais il est possible que des différences de techniques d'immunohistochimies et de quantification morphométrique avec le choix de seuillage puissent être à l'origine de cette différence. Par ailleurs, si les pancréas sont issus d'individus uniquement obèses dans l'étude de Butler et al. (IMC moyen 44 kg/m² pour le

groupe diabétique), l'IMC moyen est de 28,9 kg/m² chez les individus diabétiques dans l'étude de Cinti et al., pouvant suggérer des « diabètes de type 2 » différents.

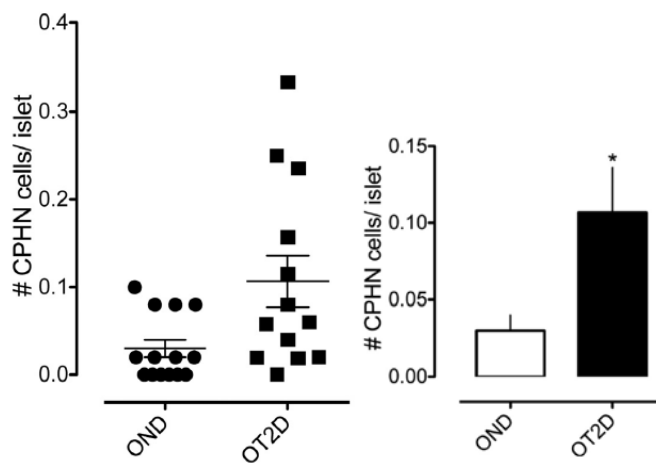


Figure 20 – Nombre de cellules par îlot Chromogranine-Positive et Hormones-Négatives (CPHN) chez des individus obèses non diabétiques (OND) et des individus obèses diabétiques de type 2 (OT2D). Tiré de (Butler et al., 2016)

Ces études chez l'Humain ont donc plusieurs limites importantes. La première est liée à la difficulté de recueil d'îlots ou de coupes de pancréas de qualité, surtout chez des individus « diabétiques de type 2 » ; un biais de sélection important est intrinsèquement lié au recueil des pancréas post-mortem liés à un processus de dons d'organes, donc excluant des patients trop malades. Par exemple, dans l'étude de Cinti et al., seule la moitié des patients étiquetés diabétiques de type 2 sont en surpoids ou obèses, proportion bien inférieure aux 80% de la population diabétique de type 2 française (Druet et al., 2012). Une autre limite concernant la différenciation est l'étude statique, à un instant donné, d'un phénomène à priori dynamique, posant la question de la définition d'une cellule bêta ne produisant plus d'insuline. Marchetti et al. proposent l'utilisation de la microscopie électronique, mais celle-ci est conditionnée par la production de granules de sécrétions d'insuline, ne faisant que déplacer le problème. Les trois études partent du postulat qu'une cellule bêta différenciée va continuer à exprimer des marqueurs pan-endocrines, tels que la synaptophysine ou la chromogranine A, permettant de

poser l'hypothèse qu'une cellule endocrine ainsi définie ne produisant plus d'hormone endocrine puisse être une cellule bêta dédifférenciée.

Dans le chapitre suivant, nous allons voir quel matériel est disponible pour étudier la cellule bêta humaine, en plus de ces coupes de pancréas humains fixés.

C. Cellules bêta humaines : matériel disponible pour la recherche

L'étude de cellules bêta humaines peut avoir trois sources : cellule bêta primaires d'ilots humains, cellule bêta dérivant de cellules souches humaines, ou lignées de cellules bêta humaines.

Les ilots humains sont une source privilégiée puisqu'ils contiennent de « vraies » cellules bêta. En revanche, il y a plusieurs limites à leur utilisation. La première est la faible disponibilité liée au faible nombre de donneurs d'organes, source de ces ilots. De plus, il s'agit souvent d'ilots récusés pour une transplantation en raison d'une pureté et d'une qualité limites, avec une contamination par des cellules non endocrines variable d'une préparation à l'autre. Enfin, les cellules bêta ne proliférant pas, leur durée d'étude est limitée.

La production de cellules bêta à partir de cellules souches humaines a progressé de manière très importante depuis 15 ans. La première publication remonte à 2001 (Assady et al., 2001), mais une production efficace de cellules bêta en quantité de manière reproductible reste

compliquée (Quiskamp et al., 2015). De plus, certaines caractéristiques majeures de la cellule bêta ne sont pas toujours reproduites, telle la sécrétion d'insuline, qui, si dans les protocoles les plus récents se déclenche en réponse au glucose, ne revient pas à son niveau basal après arrêt de la stimulation (Rezania et al., 2014). Cette source de cellule bêta est donc une voie très prometteuse, permettant d'obtenir des cellules non transgéniques, mais doit encore être améliorée avant de pouvoir être utilisée en routine.

Une troisième source est l'utilisation de lignées cellulaires. Si la première lignée murine a été développée il y a 40 ans (Gazdar et al., 1980), il a fallu attendre plus longtemps pour obtenir des lignées humaines fonctionnelles. Une lignée cellulaire humaine intéressante, PANC-1, a été développée en 2011, et a été plusieurs fois utilisée dans des publications ces dernières années, soulignant son intérêt. En revanche, leur contenu en insuline est très faible (4ng par millions de cellules, soit un millième du contenu mesuré dans une cellule bêta primaire). De même, la sécrétion en réponse aux sulfamides est très faible, bien qu'elle réponde de manière adéquate au glucose et au GLP-1 (McCluskey et al., 2011). D'autres lignées ont été publiées, mais finalement quasiment non utilisées depuis, possiblement en rapport à une faible stabilité de ces lignées (lignée NAKT-15 (Narushima et al., 2005) et TRM-1 (Wang et al., 1997)).

Plus récemment, le laboratoire d'accueil a développé une lignée de cellules bêta humaines, les EndoC- β H1 (Ravassard et al., 2011). Le matériel de départ était des bourgeons pancréatiques fœtaux, dont l'intérêt est de contenir des cellules exprimant le promoteur de l'insuline proliférant, donc plus accessible à une transduction. La première transduction a consisté à introduire un vecteur lentiviral exprimant SV40LT sous contrôle du promoteur de l'insuline. Ces bourgeons pancréatiques transduits sont alors greffés chez des souris SCID afin

qu'ils puissent se développer en tissu pancréatique mature. Au cours de cette différenciation, les cellules bêta exprimant SV40LT prolifèrent et forment des insulinomes. Après explantation, ces insulinomes sont à leur tour transduits par la sous-unité TERT (Telomerase reverse transcriptase) de la télomerase humaine, à nouveau greffés chez d'autres souris SCID, puis finalement mis en culture in-vitro pour générer des lignées cellulaires (Figure 21).

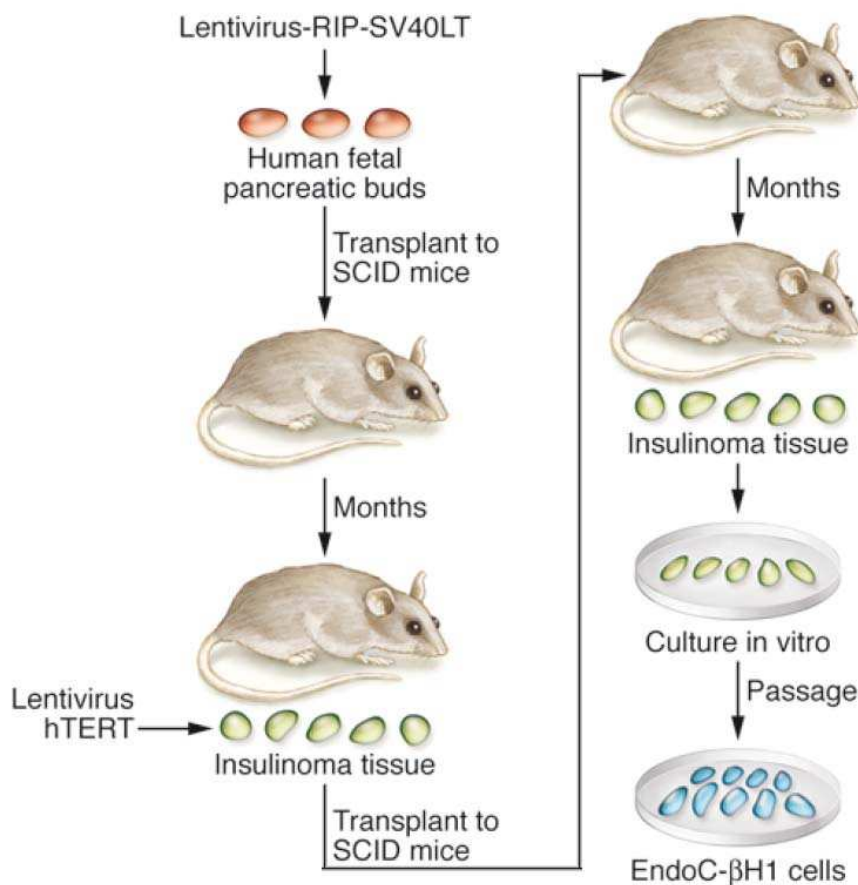


Figure 21 - Protocole utilisé pour générer la lignée cellulaire EndoC-βH1. Tiré de (Weir and Bonner-Weir, 2011)

Cette lignée cellulaire exprime plusieurs marqueurs spécifiques de la cellule bêta (insuline, PDX1, NKX6-1), sans exprimer les gènes réprimés dans des cellules bêta primaires (glucagon, amylase, etc.) (Figure 22). De plus, ces cellules sécrètent de l'insuline lors de la

stimulation par des sécrétagogues classiques : glucose, sulfamide, GLP-1. De par leur construction transgénique, et pour assurer leur utilité, ces cellules prolifèrent et expriment ainsi KI-67 et incorpore du BrdU, et expriment donc les deux transgènes SV40LT et hTERT.

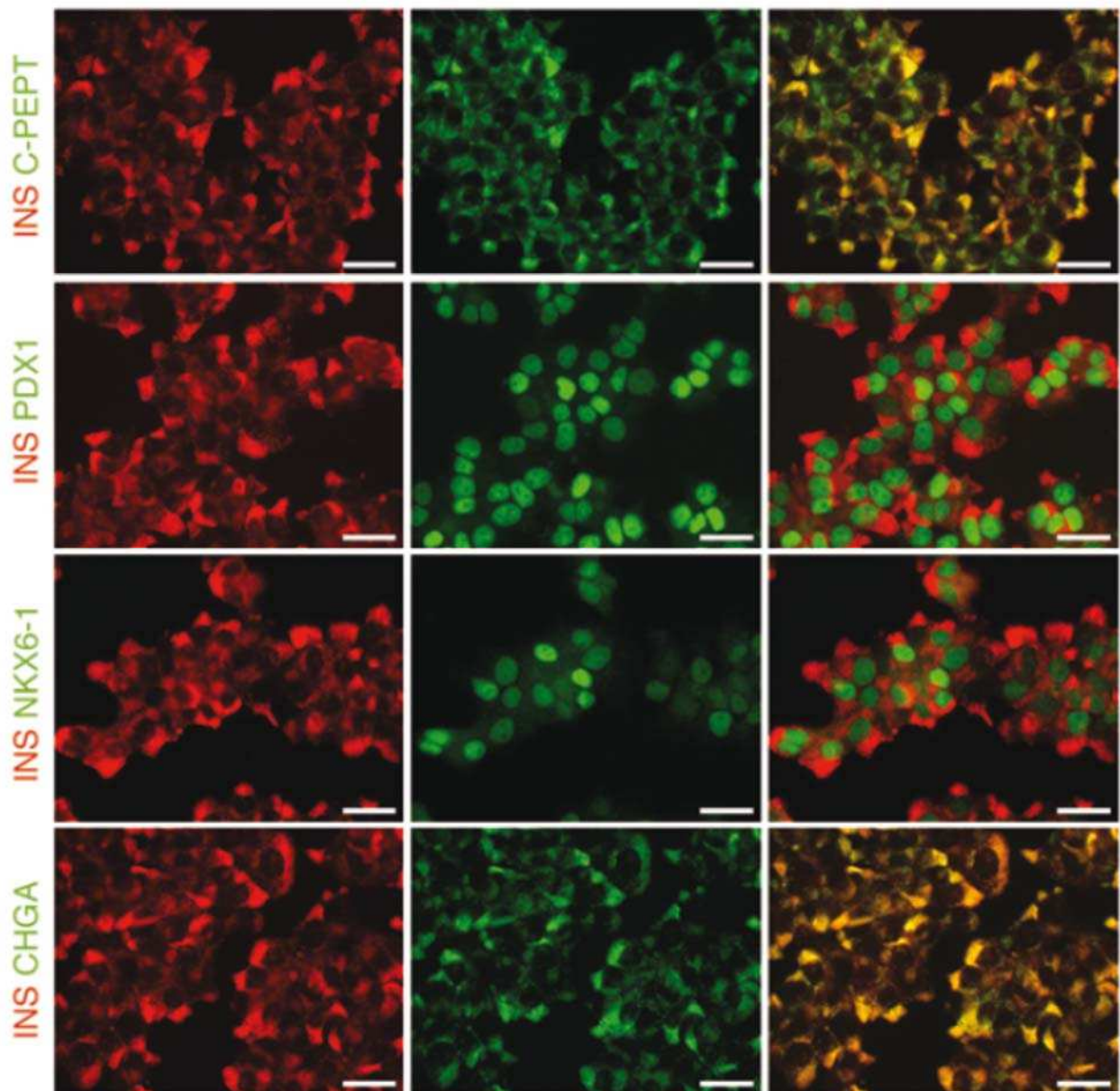


Figure 22 - Analyse par immunofluorescence des cellules EndoC-bH1. Tiré de (Ravassard et al., 2011).

Rationnel du projet

On l'a vu, le diabète de type 2 est, aujourd'hui et pour les années à venir, un problème de santé publique majeur. Les traitements actuels, dont plusieurs sont de découvertes fortuites, sont efficaces au moins un premier temps mais sont associés à une dégradation de l'équilibre glycémique avec le temps. Il est aujourd'hui clair qu'une maladie pancréatique est toujours associée à une insulino-résistance périphérique lors de l'apparition de l'hyperglycémie. Si plusieurs équipes cherchent à induire une prolifération des cellules bêta, aucune n'a conduit au développement de molécules utilisables en clinique. Les molécules à action pancréatiques développées ces dernières années, tels les analogues du GLP-1 et les inhibiteurs de l'enzyme DPP4, tendent à augmenter la sécrétion d'insuline dans les cellules bêta encore présentes. La dédifférenciation de la cellule bêta pancréatique au cours du diabète de type 2, si elle était confirmée, ouvrirait le champ à de nouvelles voies thérapeutiques, afin de redifférencier ces cellules bêta encore présentes, voire de prévenir cette dédifférenciation.

Si cette possibilité de moduler l'état de différenciation d'une cellule bêta par une molécule circulante est donc très attractive, le principe même de dédifférenciation reste une hypothèse dans la cellule bêta humaine. Démontrée dans quelques modèles murins, les arguments chez l'humain sont très indirects et ne permettent actuellement pas de conclure à une dédifférenciation de la cellule bêta humaine.

Nos objectifs sont donc : établir si des molécules peuvent induire une réelle dédifférenciation de la cellule bêta humaine ; définir de nouveaux marqueurs positifs de dédifférenciation de la cellule bêta humaine ; étudier si cette dédifférenciation est un processus réversible ; identifier dans des îlots pancréatiques d'individus diabétiques de type 2 des marqueurs positifs de dédifférenciation.

Afin de faire progresser ce champ de connaissance, nous avons utilisé la lignée cellulaire bêta humaine EndoC-bH1 afin de pouvoir réaliser des premières expériences sans

être limités par la disponibilité du matériel, et sans être gênés par le mélange d'autres types cellulaires propres aux îlots primaires : screen de molécules sans à priori sur leur fonction pour identifier un processus de dédifférenciation, phénotypage des cellules après traitement avec les molécules sélectionnées, étude temporelle et recherche d'une éventuelle réversibilité. Après avoir pu modéliser ce processus de dédifférenciation dans cette lignée bêta humaine avec les fibroblast growth factor 1 et 2 (FGF1 et FGF2), nous avons étudié la reproductibilité de ce processus à partir d'îlots pancréatiques humains. Enfin, nous avons étudié si la production de FGF2, utilisé initialement pour modéliser cette dédifférenciation, était augmentée au sein de pancréas d'individus diabétiques de type 2, et si l'expression de marqueurs de dédifférenciation identifiés à partir de notre modèle cellulaire étaient induits au sein d'îlots pancréatiques d'individus diabétiques de type 2.

Le projet de recherche

Mise en page selon les exigences de la revue scientifique *Cell Metabolism*.

Modeling human pancreatic beta cell dedifferentiation

Marc Diedisheim¹, Masaya Oshima¹, Olivier Albagli¹, Charlotte Wennberg Huldt², Ingela Ahlstedt², Maryam Clausen³, Suraj Menon⁴, Alexander Aivazidis², Anne-Christine Andreasson², William G. Haynes², Piero Marchetti⁵, Lorella Marselli⁵, Mathieu Armanet⁶, Fabrice Chimienti², Raphael Scharfmann^{1*}

¹ INSERM U1016, Institut Cochin, Université Paris Descartes, Paris, France

² Cardiovascular and Metabolic Diseases, Innovative Medicines and Early Development Biotech Unit, AstraZeneca, Mölndal, Sweden

³ Discovery Sciences, Innovative Medicines and Early Development Biotech unit, AstraZeneca, Mölndal Sweden.

⁴ RDI Operations, Granta Park, AstraZeneca, Cambridge, UK

⁵ Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Pisa, Pisa, Italy.

⁶ Cell Therapy Unit, Hôpital Saint Louis, AP-HP, and University Paris-Diderot, Paris, 75010, France.

* Author for correspondence

Institut Cochin, INSERM U1016

123 bd du Port-Royal, 75014 Paris, France

e-mail : raphael.scharfmann@inserm.fr

ABSTRACT

Dedifferentiation could explain reduced functional pancreatic β -cell mass in type 2 diabetes (T2D). Here we model human β -cell dedifferentiation using growth factor stimulation in the human β -cell line, EndoC- β H1, and human pancreatic islets. Fibroblast growth factor 2 (FGF2) treatment reduced expression of β -cell markers, (*INS*, *MAFB*, *SLC2A2*, *SLC30A8* and *GCK*) and activated expression of β -cell disallowed genes (*MYC*, *HES1*, *SOX9* and *NEUROG3*). FGF2-induced dedifferentiation was time- and dose-dependent, and reversible upon wash-out. Furthermore, FGF2 treatment induced expression of *TNFRSF11B*, a decoy receptor for RANKL and protected β -cells against RANKL signaling. Finally, analyses of transcriptomic data revealed increased FGF2 expression in ductal, endothelial and stellate cells in pancreases from T2D patients, whereas FGFR1, SOX9 and HES1 expression increased in islets from T2D patients. We thus developed a FGF2-induced model of human β -cell dedifferentiation, identified new markers of dedifferentiation and found evidence for increased pancreatic FGF2, FGFR1 and β -cell dedifferentiation in T2D.

Key Words: beta-cell, dedifferentiation, type 2 diabetes, human

INTRODUCTION

Type 2 diabetes develops as a consequence of a combination of insulin resistance and insufficient functional β cell mass. The decline in functional β cell mass has been attributed to a decrease in both β cell number and function (Prentki et al., 2013). It has been suggested that decreased β cell mass is the result of premature programmed cell death and research efforts focused on increasing β cell survival (Wajchenberg, 2007). However, recent data challenge the β cell death hypothesis. They suggest that β cell dedifferentiation represents an alternative mechanism to explain loss of functioning β cells (Talchai et al., 2012). During dedifferentiation, β cells do not go into apoptosis but rather loose identity and function with a decrease in expression of key β cell markers such as genes coding for major transcription factors, e.g. MafA, and proteins implicated in glucose-stimulated insulin secretion, e.g. Slc2a2 (Glut2) (Accili et al., 2016).

This concept of β cell dedifferentiation is now strongly supported by experiments performed in several murine models with experiments based on lineage-tracing of β cells (Talchai et al., 2012; Wang et al., 2014). On the other hand, data on human β cell dedifferentiation remain scarce and mainly based on experiments performed on static models such as human pancreatic tissue sections. For example, studies at the electron microscopy level showed that pancreases from type 2 diabetic donors contain degranulated β cells, that have lost their insulin content (Marselli et al., 2014). Pancreatic sections of type 2 diabetic patients demonstrated a 3-fold increase in the number of endocrine cells (ChromograninA-positive) that stain negative for insulin, glucagon, somatostatin and pancreatic polypeptide (Cinti et al., 2016). The endocrine progenitor cell marker aldehyde dehydrogenase1A3 (ALDH1A3) is expressed by such dedifferentiated human β cells (Cinti et al., 2016).

Our study aimed at developing a dynamic model of human β cell dedifferentiation. Access to preparations of primary human β cells is limited and human-translatable models to study their

dedifferentiation are lacking. We used here EndoC- β H1 the recently developed functional human β cell line generated by lentiviral transduction of human fetal pancreas with oncogenes under the control of the insulin promoter (Ravassard et al., 2011). This line represents an efficient tool to study human β cells in pathophysiological conditions (Ravassard et al., 2011; Scharfmann et al., 2016; Weir and Bonner-Weir, 2011).

Our work specifically aimed at: i). Discovering molecules and pathways that induce human β cell dedifferentiation ii). Discovering new positive markers of human β cell dedifferentiation iii). Defining whether human β cell dedifferentiation is a reversible process and iv). Identifying new evidences of dedifferentiation in human islets from type 2 diabetic individuals. Here, we discovered that two members of the fibroblast growth factor family, fibroblast growth factor 1 (FGF1) and fibroblast growth factor 2 (FGF2), induce human β cell dedifferentiation, in a reversible manner. We also identified several transcription factors, SOX9, HES1, MYC and TNFRSF11B, as new positive markers of human β cell dedifferentiation and showed that type 2 diabetic patients contain both increased FGF2 / FGFR1 and our novel markers of dedifferentiation.

RESULTS

FGF2 treatment decreases *INS* and *MAFA* expression in EndoC- β H1.

We first tested whether EndoC- β H1 could be used to discover compounds that modulate β cell differentiation status. For this purpose, we treated EndoC- β H1 with molecules acting through different pathways: ligands of receptor tyrosine kinases (FGF1, FGF10, IGF1, EGF), a G-protein coupled receptor ligand (Exendin-4), a ROCK-1 inhibitor (Y-27632), an activator of the WNT/ β catenin pathway (R-Spondin) and a modulator of the TGF-beta signaling (Noggin). We measured the expression of *INS* and of *MAFA*, a β cell specific transcriptional activator. We observed that following 72h treatment, FGF1 induced a 2-fold decrease in *INS* mRNA levels while *MAFA* mRNA levels dropped down by more than 10 fold (Fig. 1A, B).

FGF1 is a member of the Fibroblast Growth Factor family that signals through all 7 FGF receptors (FGFR) (Ornitz et al., 1996). Interestingly, the effect of FGF1 on *INS* and *MAFA* mRNA levels was reproduced by FGF2 (Fig. 1C), which belongs to the same subfamily of FGFs, but not FGF10 (Fig. 1A, B), which belongs to the FGF3, 7 and 22 subfamily (Beenken and Mohammadi, 2009). Both FGF1- and FGF2-treated cells showed a reduction in the activity of the human insulin promoter as compared to control cells, supporting a role for both factors as negative regulators of *INS* gene transcription (Fig. 1D). RT-qPCR analyses indicated that EndoC- β H1 mainly express *FGFR1c*, *FGFR3b* and *FGFR4* (Fig. 1E). As FGF2 signals preferentially through the c-forms of FGFRs (Ornitz et al., 1996), it can be postulated that in EndoC- β H1, FGF1 and FGF2 act through FGFR1c to modulate *INS* and *MAFA* gene expression. Finally, FGF treatment did not significantly modify cellular growth and survival during the 3-days culture period (Fig. 1F-H).

Decreased expression of several master β cell genes following FGF1 and FGF2 treatments.

We treated EndoC- β H1 with FGF2 and performed global transcriptomic analyses by RNA-Seq at different time points (24h-144h treatments). We first searched for genes implicated in β cell function, with decreased expression following treatment with FGF2. As expected, *INS* and *MAFA* mRNA levels decreased. This was also the case for transcription factors expressed in β cells such as *MAFB*, *PAX6*, *NEUROD1*, *RFX6*, *INSM1*, but also for factors implicated in insulin processing and secretion such as *PCSK2*, *SLC2A2* *GCK* and *SLC30A8* (*ZNT8*) (Fig. 2A and Table S1). These data were confirmed by RT-qPCR using either FGF2 or FGF1 (Fig. 2B). Both FGF1 and FGF2 repress the expression of β cell specific genes in a time- and concentration-dependent manner (Figures S1 and S2). Following treatment with either FGF1 or FGF2, we also observed a sharp decrease in total cellular insulin content measured by ELISA (Fig. 2C), while Western blot analyses indicated a decrease in the levels of both the transcription factor *MAFA* and the β cell enriched zinc transporter *ZNT8* (Fig. 2D). Interestingly we could also measure the functional consequences of decreased *ZNT8* expression, as shown by a significant reduction in granular zinc content in EndoC- β H1 (Fig. 2E). Of note, while the expression of several β specific markers collapsed, other β or endocrine markers remained expressed following FGF treatment. This is for example the case for the transcription factor *PDX1* that shows limited decrease at the RNA and protein level (Fig. 2F, G). This is also the case for β cell-specific marker such as *IAPP* and endocrine markers such as *CHROMOGRANIN A* and *ABCC8* (Fig. 2F and Table S1). Taken together, while keeping their global endocrine feature, EndoC- β H1 lose a number of β cell-specific markers following FGF treatment.

FGFs treatment induces the expression of disallowed genes in EndoC- β H1.

Our global transcriptomic analysis indicated that in parallel to the extinction of a number of β cell specific genes, treatment of EndoC- β H1 with FGF2 sharply induced the expression of β cell disallowed genes. This was the case for three transcription factors: *SOX9*, *HES1* and *MYC* (Fig. 3A). We confirmed these transcriptomic data using FGF1 and FGF2 by RT-qPCR (Fig. 3B) and at the protein level by Western Blot and immunostaining (Fig. 3C, D). Both FGF1 and FGF2 induced the expression of β cell disallowed genes in a time- and concentration-dependent manner (Figures S1 and S2). FGF2 treatment also increased the expression of other disallowed genes such as *GAST* (*gastrin*), which encodes a peptide hormone found in islets during fetal life, but absent during adult life (Larsson et al., 1976) and *PYY*, an anorexigenic hormone usually not found in human β cells but rather produced by intestinal L cells (Batterham et al., 2006) (Fig. 3E, F). Interestingly, FGF treatment also induced the expression of the pancreatic endocrine progenitor marker *NEUROG3* also usually absent from mature human β cells (Segerstolpe et al., 2016) (Fig. 3F). Induction of endocrine progenitor markers was also observed by comparison with a published list of pancreatic endoderm enriched genes (Table S2) (Xie et al., 2013) (Fig. 3G, horizontal axis). Moreover, temporal analysis revealed that loss of β cell specific genes (Table S3) preceded the induction of progenitor cell genes: β cell genes expression decreased as early as 24 hours, while progenitor genes are induced from 72h and more intensely at 144h in parallel with a collapse of β cell genes (Fig. 3G).

On the other hand, the expression of acinar (*AMY2B*, *CPA1*) and duct (*CFTR*, *SPP1*) markers was very low in control condition and not induced by FGF treatment (Figure S3). A lack of induction was also observed for endocrine markers such as *GCG*, *NPY* and *GHRL* with the exception of *SST*, whose expression was induced by FGF1 and FGF2 (Fig. 3H).

Dedifferentiation is a reversible state.

We treated EndoC- β H1 for 3 days with FGF2 to induce dedifferentiation. We next performed a chase culture period of 11 days in the absence of FGF2 asking whether dedifferentiation represents an irreversible new state or can be reverted. As expected, *INS* and *MAFA* mRNA levels dramatically decreased while *SOX9* and *HES1* mRNA were strongly induced following 72h or 14 days of treatment with FGF2 (Fig. 4). Importantly, when FGF2 was removed at day 3 and EndoC- β H1 further cultured for 11 days in the absence of FGF2, *INS*, *MAFA*, *SOX9* and *HES1* mRNA levels returned to control values, demonstrating that dedifferentiation represents a reversible state.

Dedifferentiated β cells express *TNFRSF11B* (OPG).

By mining our transcriptomic data, we discovered that FGF2 treatment induced the expression of *TNFRSF11B* mRNA levels (Fig. 5A). Such an induction of *TNFRSF11B* by FGF2 was confirmed by RT-qPCR in EndoC- β H1 (Fig. 5B). *TNFRSF11B*/Osteoprotegerin (OPG) is a secreted decoy receptor that competes for the binding of RANKL (*TNFSF11*) to its receptor RANK (*TNFRSF11A*). Transcriptomic and qPCR data indicated that EndoC- β H1 expressed RANK, but not RANKL (Fig. 5C, D). RANK expressed in EndoC- β H1 was functional as exogenous RANKL phosphorylated P38 in a dose-dependent manner (Fig. 5E). Moreover, exogenous OPG blocked the phosphorylation of P38 by RANKL (Fig. 5F). Remarkably, FGF2 that induces OPG expression also prevented the P38 phosphorylation by RANKL (Fig. 5G).

Human pancreatic islets respond to FGF2 in a similar manner as EndoC- β H1

We next tested the effect of FGF2 on primary human islet cell differentiation status. We treated human islets with FGF2 for 72 hours. As observed with EndoC- β H1, following FGF2

treatment, *MAFA* and *PAX6* mRNA levels significantly decreased, while the expression of β cell markers such as *PDX1* and *ABCC8* was notably stable (Fig. 6A). The decrease in *MAFA* and stability of *PDX1* mRNA levels was also observed at the protein level (Fig. 6B). We next tested whether FGF2 treatment induced SOX9 expression in human islet cells. First, RT-PCR confirmed increase of *SOX9* and *HES1* mRNA in pancreatic islets after FGF2 treatment, although to lower extents than in EndoC- β H1 (Fig. 6A). Double immunostainings for Chromogranin A and SOX9 indicated mutually exclusive expression in control pancreatic islets: chromogranin A was observed in endocrine pancreatic islets cells, whereas almost no SOX9 staining was detected (Fig. 6C). By contrast, FGF2 treated islets displayed an increase in SOX9 staining and displayed cells double positive for Chromogranin A and SOX9 stainings (Fig. 6C), thus confirming SOX9 induction in primary human islet cells, similar to observations in EndoC- β H1 cells. Furthermore, human islets both expressed mRNA for RANK and RANKL (Figure S4), and showed FGF2 induction of TNFRSF11B (Fig. 6D).

Upregulation of the FGF2 pathway and dedifferentiation markers in human type 2 diabetes

Finally, we reanalyzed previously published transcriptome data asking whether the pancreatic FGF pathway and dedifferentiation markers were activated in patients with type 2 diabetes. Remarkably, single cells RNA-Seq data (Segerstolpe et al., 2016) revealed an increase of *FGF2* expression in pancreatic ductal, endothelial and pancreatic stellate cells from type 2 diabetic patients (Fig. 7A). Moreover, analysis of microarray islets data (Dominguez et al., 2011), revealed increased of *FGFR1* mRNA levels in human islets from type 2 diabetic compared with non-diabetic individuals, and also *SOX9* and *HES1* expression (Fig. 7B-D).

DISCUSSION

Here, we validated the recently developed human β cell line EndoC- β H1 as a model system to analyze human pancreatic β cell dedifferentiation and then confirmed these data using human islets. We discovered that following FGF1 and FGF2 treatment, the expression of many β cell specific markers decreased. We also discovered new positive biomarkers of human β cell dedifferentiation, which translated to primary human islets. Importantly, the dedifferentiation process observed following FGF treatment was reversible. Our data also indicated that human β cell dedifferentiation was paralleled by an increased expression of *TNFRSF11B*, coding a decoy receptor that blocks the RANK-RANKL interaction. Finally, we observed an increase of FGF2 pathway and positive dedifferentiation markers in transcriptomes from type 2 diabetic islets.

By comparing a number of culture conditions, we discovered that treatment with either FGF1 or FGF2 decreased the expression of a large set of β cell specific markers in a time- and concentration-dependent manner. These markers included the transcription factor MAFA whose loss of expression in murine models leads to a decreased β cell identity (Hang et al., 2014; Nishimura et al., 2014), and PAX6, recently identified as a key factor that maintains β cell identity by repressing genes of other islet cell types in rodents (Swisa et al., 2017).

We propose that FGF1 and FGF2 act through FGFR1c to induce dedifferentiation. Indeed, while FGF1 can signal through all 7 FGFR, FGF2 specifically binds the c forms of FGFR, namely FGFR1c, FGFR2c and FGFR3c (Ornitz et al., 1996). As our data indicate that EndoC- β H1 cells mainly express FGFR1c among the FGF2 receptors, we can propose that FGF2 binds FGFR1c to induce dedifferentiation. Interestingly, we have evidence that the FGF2 actions required the activation of the MAPK signaling because dedifferentiation is inhibited by a pretreatment with a MAPK inhibitor (data not shown).

Dedifferentiated rodent β cells express a number of β cell disallowed genes (Nishimura et al., 2014; Puri et al., 2013; Talchai et al., 2012). On the other hand, the number of markers with increased expression in dedifferentiated human β cells, and that could thus be used as positive markers of dedifferentiation is extremely limited. A recent study reported ALDH1A3 as a first positive marker of dedifferentiated human beta cells from type 2 diabetic patients (Cinti et al., 2016). Our global transcriptomic analysis of EndoC- β H1 cells treated with FGF2 allowed us to discover additional positive markers of dedifferentiation. We found SOX9, HES1, MYC, GAST, PYY and NEUROG3 as potential new positive markers of dedifferentiation. SOX9 and HES1 are transcription factors absent from human pancreatic endocrine cells but expressed by exocrine cells in the adult pancreas (Segerstolpe et al., 2016). Here, we demonstrate that treatment with FGFs induces SOX9 expression in both human β cell lines and in primary endocrine cells (Chromogranin A-positive) from human islets. This induction was not paralleled by an activation of pancreatic exocrine markers such as AMY2B, CPA1, CFTR or SPP1, suggesting that FGF treatment does not trans-differentiate β cells towards an exocrine phenotype. SOX9 is expressed by pancreatic progenitor cells during prenatal life (Kawaguchi, 2013), Interestingly, we observed that FGF treatment induces the expression in β cells of a set of markers that are normally expressed either in pancreatic endocrine progenitors, or in β cells during early life. This is for example the case for NEUROG3, a marker of endocrine progenitor cells. While induction of Neurog3 expression has been described in dedifferentiated β cells in rodent (Ediger et al., 2017; Talchai et al., 2012), determining whether NEUROG3 levels increase when human β cells dedifferentiate had been technically challenging (Accili et al., 2016). Here, we observed that NEUROG3 expression is induced in a model of FGF-mediated human β cell dedifferentiation. In parallel to NEUROG3 induction, we also observed an activation of gastrin expression following FGF treatment. Gastrin is a stomach hormone known for a long time to be transiently expressed during fetal

and perinatal life in the rat pancreas, its expression decreasing thereafter (Larsson et al., 1976). Interestingly, it was recently demonstrated that gastrin is re-expressed in β cells in rodent and human with type 2 diabetes (Dahan et al., 2017). Therefore, gastrin may represent a novel biomarker of dedifferentiated human β cells. Taken together, we propose that upon dedifferentiation, human β cells express markers of pancreatic progenitors, such as SOX9 and HES1, of endocrine progenitors such as NEUROG3 and of perinatal β cells such as gastrin.

The vast majority of data related to β cell dedifferentiation has been derived from *in vivo* models using mice and thus the process of dedifferentiation has been analyzed at a limited number of time points (Nishimura et al., 2014; Puri et al., 2013). While it has been proposed that loss of differentiation markers precedes the expression of markers of progenitor cells, this hypothesis has not been fully validated (Talchai et al., 2012). Here, by constructing and validating an *in vitro* model of human β cell dedifferentiation, we were able to efficiently study dedifferentiation at different time points. Using our model we demonstrated that loss of expression of β cell specific markers such as MAFA, ZNT8, GCK or SLC2A2, clearly preceded the induction of β cell disallowed genes such as neurogenin3 or gastrin. Whether loss of expression of β cell specific genes is necessary for the induction of disallowed genes remains to be determined. Of interest, we also observed that when EndoC- β H1 cells were first treated with FGFs that was followed by a washout treatment, the dedifferentiation state was reverted. This fits well with rodent data indicating that dedifferentiated β cells can redifferentiate to mature insulin-positive β cells following insulin therapy (Wang et al., 2014) or diet (Ishida et al., 2017; Sheng et al., 2016). Human data also support the concept of reversibility of dedifferentiated β cells (Ferrannini, 2010; White et al., 2016). The mechanisms that allow rodent cells to redifferentiate into β cells remain partly unexplored and human data are even scarcer. Our FGF-dependent model of human β cells dedifferentiation-

redifferentiation should permit to progress on this topic and to specify additional ways to efficiently reverse dedifferentiation in human β cells.

Dedifferentiation could also represent a mechanism to protect β cells against the deleterious effects of extracellular signals. OPG is a soluble decoy receptor that binds RANKL and inhibits its interaction with its receptor, RANK (Kearns et al., 2008). OPG is expressed by pancreatic islet cells, and up-regulated in models of β cell proliferation (Rieck et al., 2009; Schrader et al., 2007). OPG has also recently been described as a target of lactogens in β cells and is required for lactogen-induced β cell proliferation (Kondegowda et al., 2015). Here, we demonstrate that human β cells express a functional RANK signaling pathway. Interestingly, FGF2 induces the expression of OPG in EndoC- β H1 and in human islets and blunts the RANK-RANKL signaling pathway. Taken together, induction of OPG during dedifferentiation could have a protective effect against deleterious signaling through the RANK-signaling pathway.

In this work, to model dedifferentiation and to discover positive markers of human β cell dedifferentiation, we have used FGF treatment. The FGF pathway has previously been demonstrated as involved in maintaining β cell mass in mice (Hart et al., 2000). Interestingly, FGF1 is selectively induced in visceral fat in response to a high-fat diet in mice (Jonker et al., 2012), and peri- and intra-pancreatic visceral fat correlates with age and body mass index, 2 major risk factors for type 2 diabetes (Olsen, 1978). Moreover, our analysis of available transcriptomic data (Segerstolpe et al., 2016) indicates that FGF2 expression is increased in several non-islets cell types in T2D pancreata, including ductal, endothelial and pancreatic stellate cells, while FGFR1 is increased in islets from T2D patients. We thus hypothesize that an excess pancreatic FGF can contribute to β cell dedifferentiation, worsening type 2 diabetes. Intriguingly, FGF1 levels are elevated in newly diagnosed type 2 diabetes compared to normal glucose tolerance controls (Wang et al., 2016).

In conclusion, this work models β cell dedifferentiation in a human context. It implicates FGF signaling in this process. Our model, characterization of dedifferentiation markers, and identification on FGF2 as a modulator could lead to new interventions to protect human β cells against dedifferentiation.

METHODS

Culture of human β cell lines and treatments

EndoC- β H1 cells were cultured in low-glucose (5.6 mM) Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich) containing, 2% BSA fraction V (Roche), 50 μ M 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich), 10 mM nicotinamide (Calbiochem), 5.5 μ g/ml human transferrin (Sigma-Aldrich), 6.7 ng/ml sodium selenite (Sigma-Aldrich), and 100 units/mL Penicillin and 100 μ g/mL Streptomycin (ThermoFischer Scientific) as previously described (Ravassard et al., 2011). Cells were seeded at a density of 9.10^4 cells/cm² on Matrigel (1.2%; Sigma-Aldrich) and Fibronectin (3 μ g/ml; Sigma-Aldrich) -coated plates and cultured at 37°C in 5% CO₂. Twenty four hours after seeding, EndoC- β H1 cells were treated with either recombinant human FGF1 plus heparin sodium salt (2 μ g/mL) (both from Sigma-Aldrich), recombinant human FGF2 (Peprotech), recombinant human Soluble RANK Ligand Protein (Merck Millipore) or recombinant Human Osteoprotegerin/TNFRSF11B Protein (R&D Systems).

Human islets

Human islets were obtained from 8 donors (from M.A., Paris; LM and PM, Pisa; and commercially from Prodo Laboratories Inc.). They were cultured during three days in medium supplemented with either FGF2 or with the FGF2 carrier (PBS-BSA 0,2%).

RNA isolation, reverse transcription and Real-Time PCR

RNeasy Micro kit (Qiagen) was used to extract total RNA from EndoC- β H1 cells and from human islets. Maxima First Strand cDNA synthesis (ThermoFischer) was used to synthesize cDNA. Quantitative RT-qPCR was performed using Power SYBR Green mix (Applied Biosystems) with a QuantStudio analyzer (Applied Biosystems). Custom primers were designed with NCBI Primer-BLAST (Ye et al., 2012) and their efficiency was determined following serial dilutions of cDNA samples from EndoC- β H1-cells or human islets. Cyclophilin-A transcript levels were used for normalization. The list of primers is presented in Table S4.

Transcriptome analysis

Total RNA was isolated using RNeasy Micro kit (Qiagen). The quality of the RNA was assessed by a Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies). One microgram of total RNA was used for each library. The RNA samples were processed with Illumina TruSeq Stranded mRNA Library prep kit following the manufacturer's recommendations. Libraries were quantified with Qubit HS (ThermoFisher) and Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies). Indexed libraries were pooled and sequenced on an Illumina NextSeq 500 high-output run using paired-end chemistry with 75 bp read length.

Processing of RNA-Seq Data and Differential Expression Analysis

Paired-end reads were generated using an Illumina NextSeq 500 and processed using the RNA-seq pipeline implemented in the bcbio-nextgen project [<https://bcbio-nextgen.readthedocs.org/en/latest/>]. Reads were aligned to the human genome version hg38 using the Hisat2 aligner (Kim et al., 2015).

Counts of reads aligning to known genes are generated by featureCounts (Liao et al., 2014). Differential expression analysis was performed using DESeq2 (Love et al., 2014). All data are MIAME compliant, and the raw data have been deposited in a MIAME compliant database (GEO, accession number GSE103383).

Analysis of published transcriptomes

Raw data from GSE25724 microarray study was downloaded from the GEO database. Differential gene expression was assessed as previously described (Hubbell et al., 2002; Kauffmann et al., 2009). The moderated t-statistics within the limma package were used to obtain p-values for differential expression of genes under investigation (Ritchie et al., 2015). If multiple probes mapped to the same gene, only the probe with smallest p-value was retained. Given the small number of individual hypothesis tests we did not further adjust p-values for multiple testing.

For the single-cell RNA sequencing studies (E-MTAB-5061) we downloaded fastq files from the GEO database and aligned them to human genome version hg38 using the hisat2 aligner (Kim et al., 2015), followed by quantitation using the Salmon algorithm (Patro et al., 2015) and cpm (counts per million) normalization. Differential expression analysis was carried out using the MAST (model-based analysis of single-cell transcriptomics) R-package (Finak et al., 2015). In addition to the number of detected genes per cell and disease condition, we included ethnicity and gender as covariates in the model to prevent erroneous differential expression calls due to different ethnicity or gender distributions in the control and case group. P-values were then derived from a likelihood ratio test carried out with the generalized linear model parameters of the case and control group.

Immunostaining of EndoC- β H1 cells and primary pancreatic islets.

EndoC- β H1 cells were cultured on 12-mm Matrigel/fibronectin-coated glass coverslips. They were treated with FGF2 for 3 days, fixed for 1 hour with 4% paraformaldehyde, permeabilized and stained with a rabbit anti-SOX9 antibody (1/500; Millipore) that was revealed with a Goat anti-Rabbit IgG Alexa Fluor® 488 conjugate (Life Technologie). Human pancreatic islets were treated for 72 hours with FGF2, fixed in 3.7% formaldehyde prior to embedding in paraffin. Sections (4- μ m thick) were prepared and processed, as described (Duvill   et al., 2003). The sections were stained with the following antibodies: mouse anti-chromogranin A (1/50; Dako Cytomation); rabbit anti-SOX9 antibody (1/500; Millipore). The secondary antibodies were Goat anti-Rabbit IgG Alexa Fluor® 488 conjugate (Life technologie) and Goat anti-mouse IgG Alexa Fluor® 594 conjugate (Jackson immunoresearch). Digital images of EndoC- β H1 cells were captured using a cooled 3-chip charge-coupled device camera (Hamamatsu C5810; Hamamatsu) that was attached to a fluorescent microscope (Leica; Leitz).

Western blot analyses

Protein lysates prepared in RIPA buffer were subjected to immunoblotting. The following antibodies were used: MAFA (1/500; a gift from Dr. Rezanian, BetaLogics Venture, New Jersey, USA), SOX9 (1/500; Millipore), HES1 (1/1,000, Cell-Signaling), ZNT8 (1/1,200, clone 17H2.4 generously provided by Dr. Davidson, Barbara Davis Center, Denver, Colorado), PDX1 (1/2,000; (Duvill   et al., 2003)), phospho-P38 MAPK (1/1,000; Cell Signaling), P38 MAPK (1/1,000, Cell Signaling), and TUBULIN (1/2,000; Sigma-Aldrich). Species-specific HRP-linked secondary antibodies (Cell Signaling) were added on the

membrane and visualization was performed on an ImageQuant LAS 4000 following ECL exposure (GE Healthcare). Quantification were normalized by TUBULIN expression.

Luciferase reporter assays.

EndoC- β H1 cells were transfected with 950ng insulin promoter driven reporter and 50ng pGL4.72-TK[hRlucCP] (Renilla luciferase, Promega) per well of 12 well plate using 3 μ l of Lipofectamin2000 (Life Technologies) (Chandra et al., 2014). Three hours later, the transfection medium was changed for culture medium containing either the carrier (PBS-BSA 2%), or FGF1 (100ng/mL) or FGF2 (100ng/mL). Luciferase activities were measured 72 h later using the Dual-Luciferase reporter assay system (Promega) following manufacturer's instructions. Firefly luciferase activities were normalized to Renilla luciferase activities to correct for variation in transfection efficiency.

Insulin content

EndoC- β H1 cells were lysed by overnight incubation at -20°C in ethanol (75%)/HCl (1.5%), centrifuged at 2,000rpm for 15 minutes at 4°C and stored at -20°C. Insulin contents were measured in triplicate by ELISA according to the manufacturer's instructions using the human insulin kit (Merckodia).

Zinc staining

EndoC- β H1 cells were seeded in 96 wells plates and allowed to attach for 24 hours before treatment with 100ng/mL FGF2. After 72 hours, cells were treated with 30mM KCl for 15 min to induce acute degranulation. They were rinsed and fresh media containing 100ng/mL

FGF2 was added for another 72h. Following treatment, cells were rinsed in PBS and stained with the zinc-specific fluorescent probe Zinpyr-1 (5 μ M, Cayman Chemical), which stains primarily zinc-enriched secretory granules in beta cells (Slepchenko et al., 2015). Cells were then observed using confocal microscopy using a 488nm laser line for excitation and 525/50nm emission wavelength. Image analysis was performed using the Columbus software (PerkinElmer).

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SD. Analyses were carried out using SigmaStat® 3.5 (Systat Software, San Jose, CA, 8 USA). Differences between groups were evaluated using non-parametric tests, namely Mann-Whitney U test for non-paired analyses and Wilcoxon test for analysis of paired data. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

BIBLIOGRAPHY

Accili, D., Talchai, S.C., Kim-Muller, J.Y., Cinti, F., Ishida, E., Ordelheide, A.M., Kuo, T., Fan, J., and Son, J. (2016). When β -cells fail: lessons from dedifferentiation. *Diabetes, Obes. Metab.* *18*, 117–122.

Batterham, R.L., Heffron, H., Kapoor, S., Chivers, J.E., Chandarana, K., Herzog, H., Le Roux, C.W., Thomas, E.L., Bell, J.D., and Withers, D.J. (2006). Critical role for peptide YY in protein-mediated satiation and body-weight regulation. *Cell Metab* *4*, 223–233.

Beenken, A., and Mohammadi, M. (2009). The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* *8*, 235–253.

Chandra, V., Albagli-Curiel, O., Hastoy, B., Piccand, J., Randriamampita, C., Vaillant, E., Cavé, H., Busiah, K., Froguel, P., Vaxillaire, M., et al. (2014). RFX6 Regulates Insulin Secretion by Modulating Ca²⁺ Homeostasis in Human β Cells. *Cell Reports* *9*, 2206–2218.

Cinti, F., Bouchi, R., Kim-Muller, J.Y., Ohmura, Y., Sandoval, P.R., Masini, M., Marselli, L., Suleiman, M., Ratner, L.E., Marchetti, P., et al. (2016). Evidence of β -cell dedifferentiation in human type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* *101*, 1044–1054.

Dahan, T., Ziv, O., Horwitz, E., Zemmour, H., Lavi, J., Swisa, A., Leibowitz, G., Ashcroft, F.M., Veld, P.I. t, Glaser, B., et al. (2017). Pancreatic β -Cells express the fetal islet hormone gastrin in rodent and human diabetes. *Diabetes* *66*, 426–436.

Dominguez, V., Raimondi, C., Somanath, S., Bugliani, M., Loder, M.K., Edling, C.E., Divecha, N., Silva-Xavier, G. Da, Marselli, L., Persaud, S.J., et al. (2011). Class II phosphoinositide 3-kinase regulates exocytosis of insulin granules in pancreatic β cells. *J Biol Chem* *286*, 4216–4225.

Duvillié, B., Attali, M., Aiello, V., Quemeneur, E., and Scharfmann, R. (2003). Label-retaining cells in the rat pancreas: Location and differentiation potential in vitro. *Diabetes* *52*, 2035–2042.

Ediger, B.N., Lim, H.W., Juliana, C., Groff, D.N., Williams, L.Q.T., Dominguez, G., Liu, J.H., Taylor, B.L., Walp, E.R., Kameswaran, V., et al. (2017). LIM domain-binding 1 maintains the terminally differentiated state of pancreatic β cells. *J Clin Invest* *127*, 215–229.

Ferrannini, E. (2010). The stunned β cell: A brief history. *Cell Metab* *11*, 349–352.

Finak, G., McDavid, A., Yajima, M., Deng, J., Gersuk, V., Shalek, A.K., Slichter, C.K., Miller, H.W., McElrath, M.J., Prlic, M., et al. (2015). MAST: a flexible statistical framework for assessing transcriptional changes and characterizing heterogeneity in single-cell RNA sequencing data. *Genome Biol* *16*, 278.

Hang, Y., Yamamoto, T., Benninger, R.K.P., Brissova, M., Guo, M., Bush, W., Piston, D.W., Powers, A.C., Magnuson, M., Thurmond, D.C., et al. (2014). The MafA transcription factor becomes essential to islet b-cells soon after birth. *Diabetes* *63*, 1994–2005.

Hart, A.W., Baeza, N., Apelqvist, A., and Edlund, H. (2000). Attenuation of FGF signalling in mouse beta-cells leads to diabetes. *Nature* *408*, 864–868.

Hubbell, E., Liu, W.-M., and Mei, R. (2002). Robust estimators for expression analysis. *Bioinformatics* *18*, 1585–1592.

Ishida, E., Kim-Muller, J.Y., and Accili, D. (2017). Pair-Feeding, but not Insulin, Phloridzin, or Rosiglitazone Treatment Curtails Markers of β -cell Dedifferentiation in db/db Mice. *Diabetes* *66*, db161213.

Jonas, J.C., Sharma, A., Hasenkamp, W., Ilkova, H., Patanè, G., Laybutt, R., Bonner-Weir, S., and Weir, G.C. (1999). Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic β cell

differentiation in an animal model of diabetes. *J Biol Chem* 274, 14112–14121.

Jonker, J.W., Suh, J.M., Atkins, A.R., Ahmadian, M., Li, P., Whyte, J., He, M., Juguilon, H., Yin, Y.-Q., Phillips, C.T., et al. (2012). A PPAR γ -FGF1 axis is required for adaptive adipose remodelling and metabolic homeostasis. *Nature* 485, 391–394.

Kauffmann, A., Gentleman, R., and Huber, W. (2009). arrayQualityMetrics - A bioconductor package for quality assessment of microarray data. *Bioinformatics* 25, 415–416.

Kawaguchi, Y. (2013). Sox9 and programming of liver and pancreatic progenitors. *J Clin Invest* 123, 1881–1886.

Kearns, A.E., Khosla, S., and Kostenuik, P.J. (2008). Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev* 29, 155–192.

Kim, D., Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2015). HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods* 12, 357–360.

Kondegowda, N.G., Fenutria, R., Pollack, I.R., Orthofer, M., Garcia-Ocaña, A., Penninger, J.M., and Vasavada, R.C. (2015). Osteoprotegerin and Denosumab Stimulate Human Beta Cell Proliferation through Inhibition of the Receptor Activator of NF- κ B Ligand Pathway. *Cell Metab* 22, 77–85.

Larsson, L.I., Rehfeld, J.F., Sundler, F., and Hakanson, R. (1976). Pancreatic gastrin in foetal and neonatal rats. *Nature* 262, 609–610.

Liao, Y., Smyth, G.K., and Shi, W. (2014). FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30, 923–930.

Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550.

Marselli, L., Suleiman, M., Masini, M., Campani, D., Bugliani, M., Syed, F., Martino, L., Focosi, D., Scatena, F., Olimpico, F., et al. (2014). Are we overestimating the loss of beta cells in type 2 diabetes? *Diabetologia* 57, 362–365.

Nishimura, W., Takahashi, S., and Yasuda, K. (2014). MafA is critical for maintenance of the mature beta cell phenotype in mice. *Diabetologia* 58, 566–574.

Olsen, T.S. (1978). Lipomatosis of the pancreas in autopsy material and its relation to age and overweight. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Ser. A* 86A, 367–373.

Ornitz, D.M., Xu, J., Colvin, J.S., McEwen, D.G., MacArthur, C.A., Coulier, F., Gao, G., and Goldfarb, M. (1996). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 271, 15292–15297.

Patro, R., Duggal, G., and Kingsford, C. (2015). Salmon: Accurate, Versatile and Ultrafast Quantification from RNA-seq Data using Lightweight-Alignment. *bioRxiv* 21592.

Prentki, M., Matschinsky, F.F.M., and Madiraju, S.R.M. (2013). Metabolic signaling in fuel-induced insulin secretion. *Cell Metab* 18, 162–185.

Puri, S., Akiyama, H., and Hebrok, M. (2013). VHL-mediated disruption of Sox9 activity compromises β -cell identity and results in diabetes mellitus. *Genes Dev* 27, 2563–2575.

Ravassard, P., Hazhouz, Y., Pechberty, S., Bricout-Neveu, E., Armanet, M., Czernichow, P., and Scharfmann, R. (2011). A genetically engineered human pancreatic β cell line exhibiting glucose-inducible insulin secretion. *J Clin Invest* 121, 3589–3597.

Rieck, S., White, P., Schug, J., Fox, A.J., Smirnova, O., Gao, N., Gupta, R.K., Wang, Z. V., Scherer, P.E., Keller, M.P., et al. (2009). The transcriptional response of the islet to pregnancy in mice. *Mol. Endocrinol.* 23, 1702–1712.

Ritchie, M.E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C.W., Shi, W., and Smyth, G.K. (2015).

limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 43, e47.

Scharfmann, R., Didiesheim, M., Richards, P., Chandra, V., Oshima, M., and Albagli, O. (2016). Mass production of functional human pancreatic β -cells: why and how? *Diabetes, Obes. Metab.* 18, 128–136.

Schrader, J., Rennekamp, W., Niebergall, U., Schoppet, M., Jahr, H., Brendel, M.D., Hörsch, D., and Hofbauer, L.C. (2007). Cytokine-induced osteoprotegerin expression protects pancreatic beta cells through p38 mitogen-activated protein kinase signalling against cell death. *Diabetologia* 50, 1243–1247.

Segerstolpe, A., Palasantza, A., Eliasson, P., Andersson, E.-M., Andreasson, A.-C., Sun, X., Picelli, S., Sabirsh, A., Clausen, M., Bjursell, M.K., et al. (2016). Single-Cell Transcriptome Profiling of Human Pancreatic Islets in Health and Type 2 Diabetes. *Cell Metab* 24, 593–607.

Sheng, C., Li, F., Lin, Z., Zhang, M., Yang, P., Bu, L., Sheng, H., Li, H., and Qu, S. (2016). Reversibility of β -Cell-Specific Transcript Factors Expression by Long-Term Caloric Restriction in db/db Mouse. *J. Diabetes Res.* 2016, 1–11.

Slepchenko, K.G., Daniels, N.A., Guo, A., and Li, Y. V (2015). Autocrine effect of Zn²⁺ on the glucose-stimulated insulin secretion. *Endocrine* 50, 110–122.

Swisa, A., Avrahami, D., Eden, N., Zhang, J., Feleke, E., Dahan, T., Cohen-Tayar, Y., Stolovich-Rain, M., Kaestner, K.H., Glaser, B., et al. (2017). PAX6 maintains β cell identity by repressing genes of alternative islet cell types. *J Clin Invest* 127, 230–243.

Talchai, C., Xuan, S., Lin, H. V, Sussel, L., and Accili, D. (2012). Pancreatic beta cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic beta cell failure. *Cell* 150, 1223–1234.

Wajchenberg, B.L. (2007). β -cell failure in diabetes and preservation by clinical treatment.

Endocr Rev 28, 187–218.

Wang, S., Yang, Q., Yu, S., Pan, R., Jiang, D., Liu, Y., Hu, H., Sun, W., Hong, X., Xue, H., et al. (2016). Fibroblast growth factor 1 levels are elevated in newly diagnosed type 2 diabetes compared to normal glucose tolerance controls. *Endocr J* 63, 359–365.

Wang, Z., York, N.W., Nichols, C.G., and Remedi, M.S. (2014). Pancreatic β cell dedifferentiation in diabetes and redifferentiation following insulin therapy. *Cell Metab* 19, 872–882.

Weir, G.C., and Bonner-Weir, S. (2011). Finally! A human pancreatic β cell line. *J Clin Invest* 121, 3395–3397.

Weir, G.C., Aguayo-Mazzucato, C., and Bonner-Weir, S. (2013). B-Cell Dedifferentiation in Diabetes Is Important, But What Is It? *Islets* 5, 233–237.

White, M.G., Shaw, J.A.M., and Taylor, R. (2016). Type 2 Diabetes: The Pathologic Basis of Reversible β -Cell Dysfunction. *Diabetes Care* 39, 2080–2088.

Xie, R., Everett, L.J., Lim, H.W., Patel, N.A., Schug, J., Kroon, E., Kelly, O.G., Wang, A., D'Amour, K.A., Robins, A.J., et al. (2013). Dynamic chromatin remodeling mediated by polycomb proteins orchestrates pancreatic differentiation of human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 12, 224–237.

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., and Madden, T.L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13, 134.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. FGF1 and FGF2 treatments decrease *INS* and *MAFA* expression in EndoC- β H1

(A, B) EndoC- β H1 cells were exposed to the indicated treatments for 3 days. *INSULIN* and *MAFA* mRNA were measured by RT-qPCR. (C) Both FGF1 and FGF2 decrease *INS* and *MAFA* mRNA levels. (D) Human insulin promoter (HIP) activity was determined after transient transfection of EndoC- β H1 cells with the reporter vector HIP-Luc2CP followed by 3 days treatment with FGF1 or FGF2. (E) Expression by qPCR of human *FGFR* isoforms in EndoC- β H1 cells. (F, G, H) A 72h treatment of EndoC- β H1 cells with FGF2 does not modify cell survival, growth or morphology (scale bar: 100 μ m).

Data are represented as mean \pm SD. n=5 biological replicates. ** p<0.01, *** p<0.001

Figure 2: FGF1 and FGF2 treatments decreased the expression of several master β cell genes.

(A) mRNA levels of β cell markers in EndoC- β H1 are decreased by FGF2 in a time-dependent manner as assessed by RNA-Seq. (B) Similar results were obtained using either FGF1 or FGF2, as measured by RT-qPCR. (C) Insulin content (ng per 10^6 cells) after 6 days of treatment with FGF1 or FGF2 determined by ELISA. (D) Western-Blot analyses of *MAFA* and *ZNT8* levels after 3 days of treatment with FGF1 or FGF2. (E) Quantification of granular zinc staining using the zinc-specific fluorescent probe Zinpyr-1. (F) FGF1 and FGF2 treatments do not decrease *PDX1*, *ABCC8* and *CHGA* mRNA levels as assessed by RT-qPCR. (G) Western-Blot analyses of *PDX1* levels after three days of treatment with FGF1 or FGF2.

Data are represented as mean \pm SD. n=5 biological replicates. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 3: FGFs treatments induce the expression of β cells disallowed genes in EndoC- β H1.

(A) mRNA levels of *SOX9*, *HES1* and *MYC* in EndoC- β H1 are induced by FGF2 in a time-dependent manner as assessed by RNA-Seq. (B) Similar results were obtained by RT-qPCR using either FGF1 or FGF2 (72 hours treatment). (C) Western-Blot analyses of SOX9 and HES1 levels after three days of treatment with FGF1 or FGF2. (D) Immunofluorescence analysis of SOX9 expression EndoC- β H1 cells. Nuclear expression of SOX9 (in green) is observed following 72 hours treatment with FGF2. Nuclei are stained with Hoechst 33342 stain (blue). Scale bars, 15 μ m. (E) mRNA levels of *GAST*, *PYY* and *NEUROG3* in EndoC- β H1 are induced by FGF2 in a time-dependent manner as assessed by RNA-Seq. (F) *GAST* and *NEUROG3* data were confirmed by RT-qPCR using either FGF1 or FGF2 (72 hours treatment). (G) Average expression (TPM) of β cell specific genes vs. progenitor genes (genes lists in Tables S2 and S3) assessed by RNA-Seq after treatment of EndoC- β H1 with FGF2. (H) The expression pancreatic hormones (*GCG*, *NPY*, *GHRL*) are not induced by a 72 hour treatment with either FGF1 or FGF2, with the exception of SST.

Data are represented as mean \pm SD. n=5 biological replicates ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 4: Dedifferentiation is a reversible state.

EndoC- β H1 cells were cultured for 3 or 14 days in control conditions (white columns), with FGF2 (gray columns) or for 3 days with FGF2 followed by 11 days without FGF2 (dashed

columns). *INS*, *MAFA*, *SOX9* and *MAFA* levels were analyzed by RT-qPCR at day 3 and day 14.

Data are represented as mean \pm SD. n=5 biological replicates. ** p<0.01, *** p<0.001

Figure 5: FGF2-induced OPG (TNFRSF11B) blunts RANKL (TNFSF11) signaling.

(A) Time dependent induction of *OPG* mRNA by FGF2 assessed by RNA-Seq in EndoC- β H1. Closed circles: control; open circles: FGF2. (B) RT-qPCR analysis of *OPG* expression following 72 hours treatment with FGF2 of EndoC- β H1. (C, D) *RANK* and *RANKL* expression in EndoC- β H1 assessed by RNA-Seq (C) and RT-qPCR (D). (E) RANKL phosphorylates P38 in EndoC- β H1 in a concentration-dependent manner (15min treatment). (F) Exogenous OPG blocks the phosphorylation of P38 by RANKL in EndoC- β H1. (G) Western-Blot and quantification of phospho-P38 after 15min RANKL (100 ng/mL) incubation, in control EndoC- β H1 or EndoC- β H1 pre-treated by FGF2 during three days.

Data are represented as mean \pm SD. n=5 biological replicates. ** p<0.01, *** p<0.001. For Western Blot, representative blot of n=5 experiments.

Figure 6: Human pancreatic islets respond to FGF2 in a similar manner than EndoC- β H1

Human islets were exposed to FGF2 for 3 days. (A) *MAFA*, *PAX6*, *PDX1* and *ABCC8* mRNA levels were measured by RT-qPCR. (B) *MAFA* and *PDX1* levels were analyzed by Western Blot. (C) *SOX9* (green) and *CHGA* (red) were analyzed by immunohistochemistry. Scale bar: 60 μ m. (D) RT-qPCR analysis of *OPG* expression following 72 hours treatment of human islets with FGF2.

Data are represented as mean \pm SD. n=5 biological replicates. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Figure 7: FGF pathway and dedifferentiation markers in type 2 diabetic islets

(A) *FGF2* expression levels across pancreatic cell types from healthy and type 2 diabetic individuals (Segerstolpe et al., 2016). (B) *FGFR1*, (C) *SOX9* and (D) *HES1* mRNA expression in type 2 diabetic and non-diabetic isolated human islets assessed by microarray analysis (Dominguez et al., 2011).

** p<0.01, *** p<0.001

Figure 1

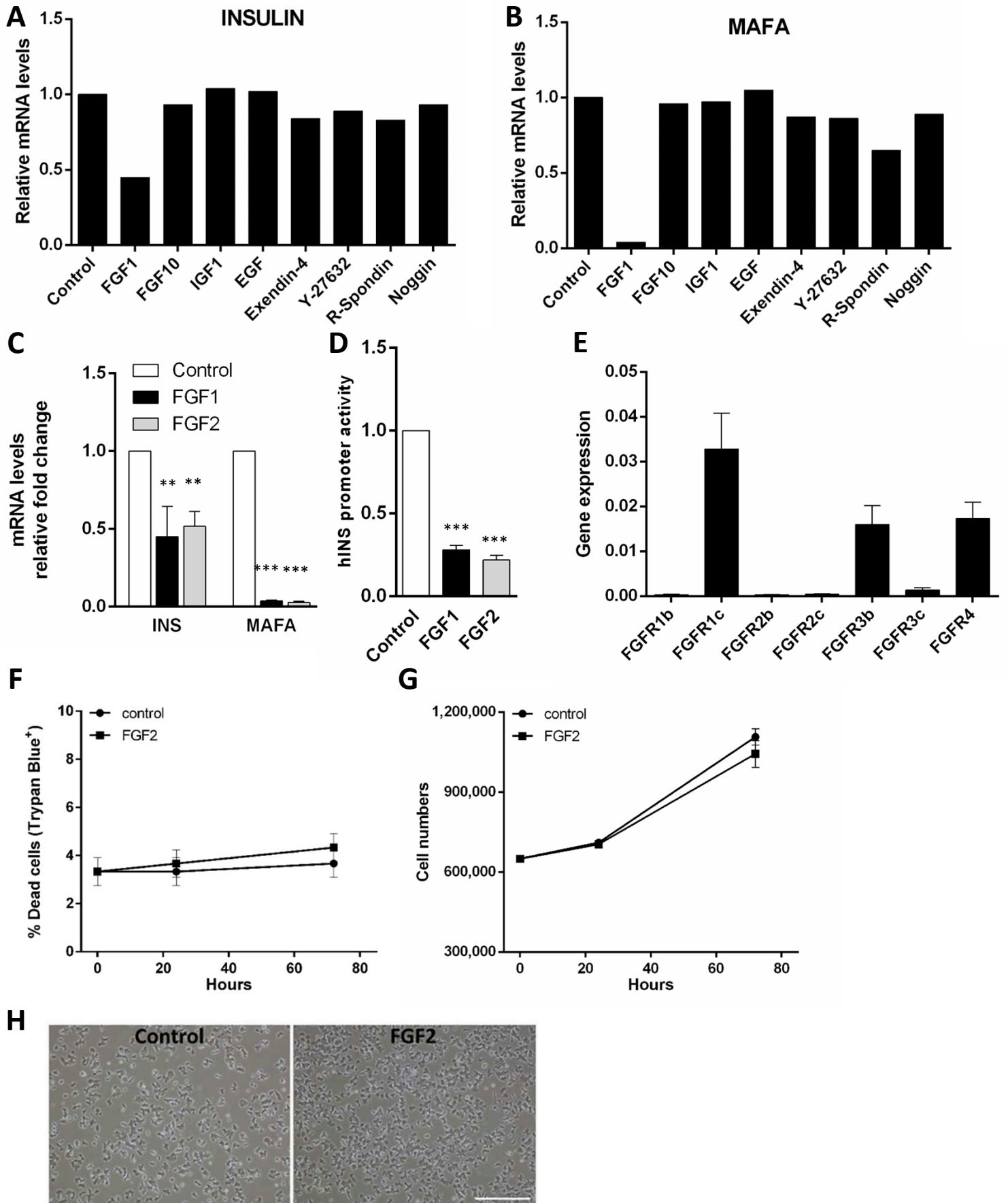


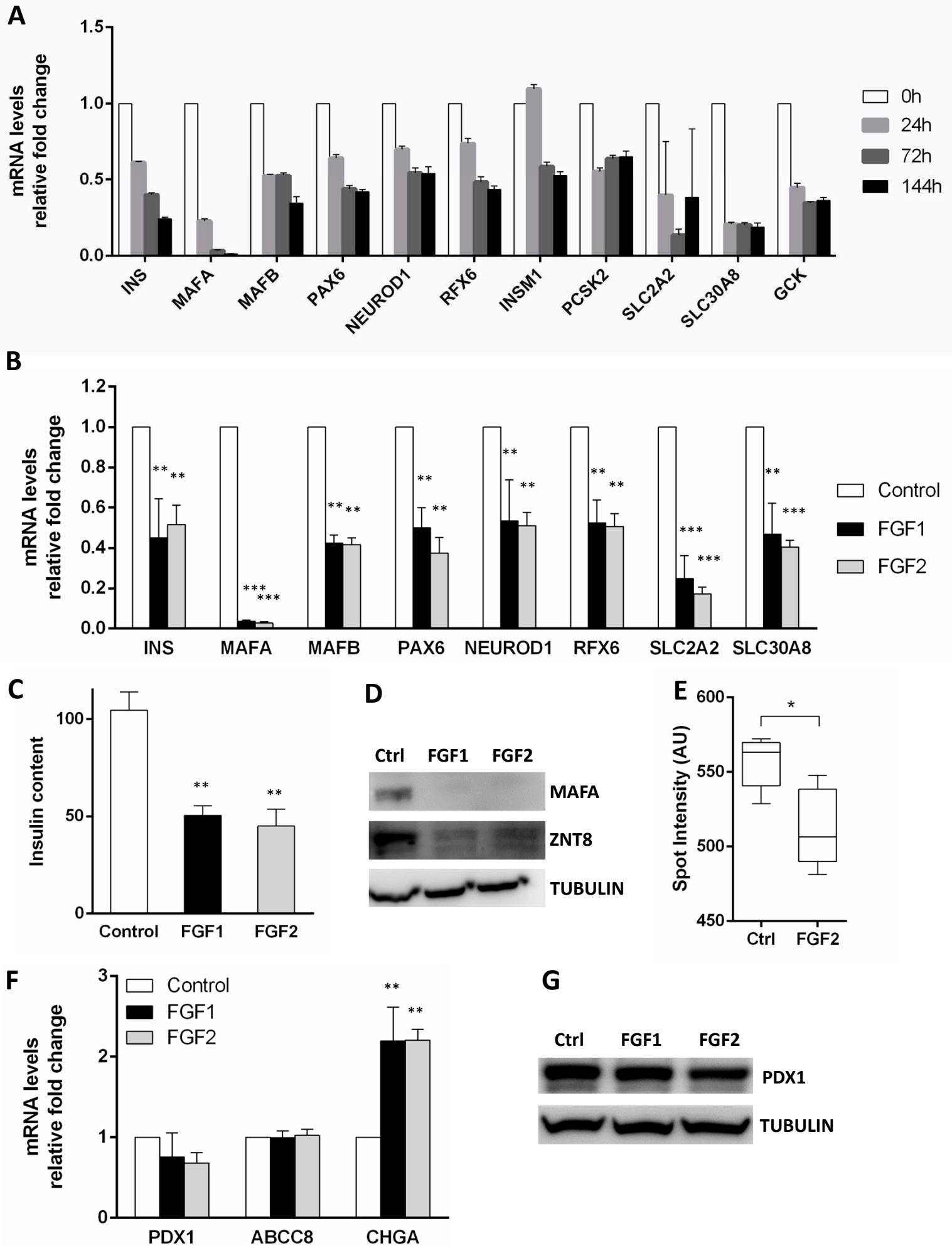
Figure 2

Figure 3

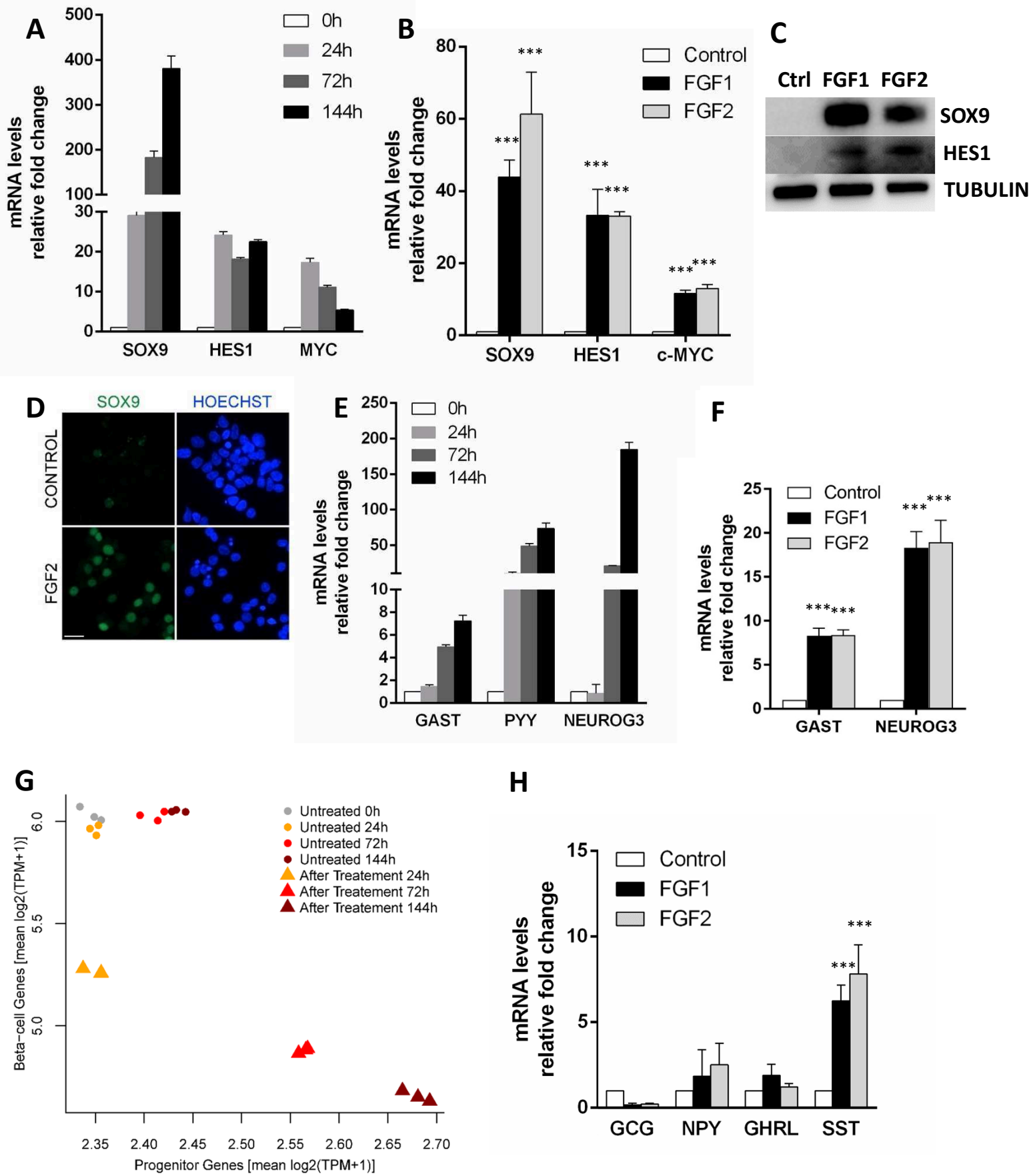
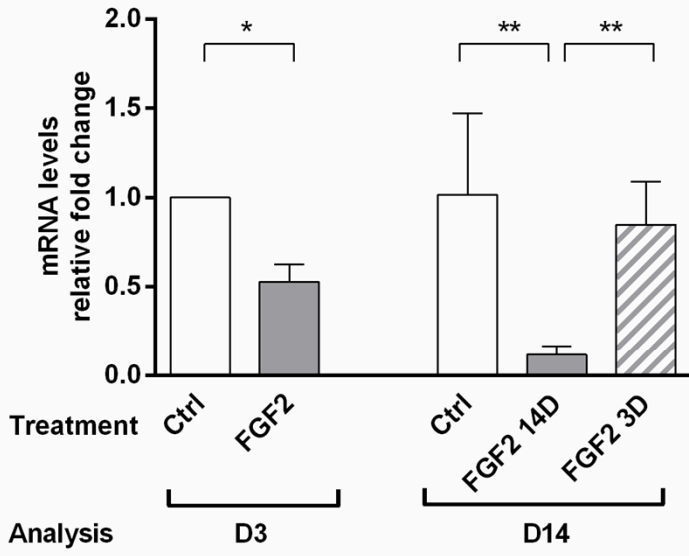
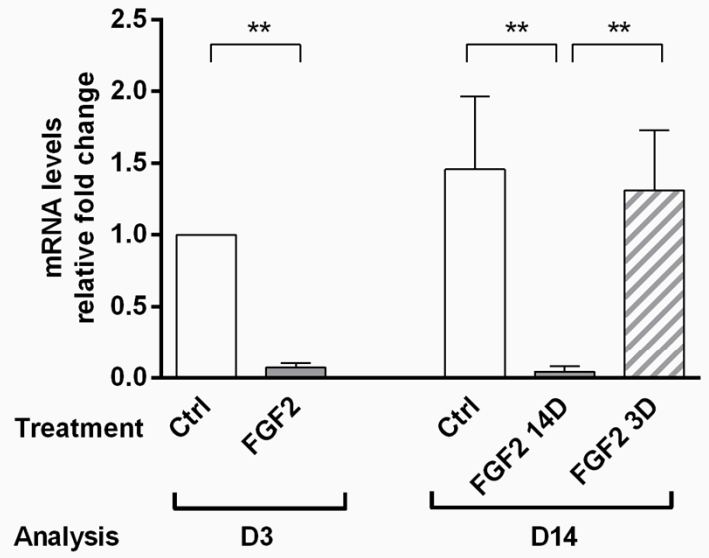


Figure 4

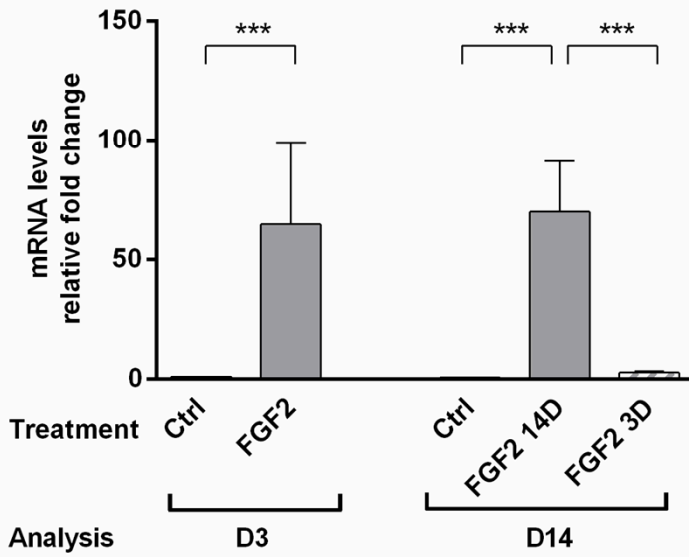
INS



MAFA



SOX9



HES1

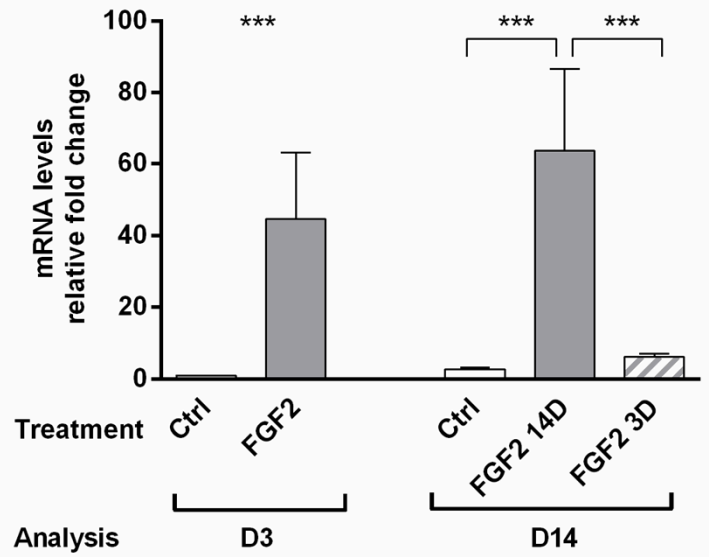
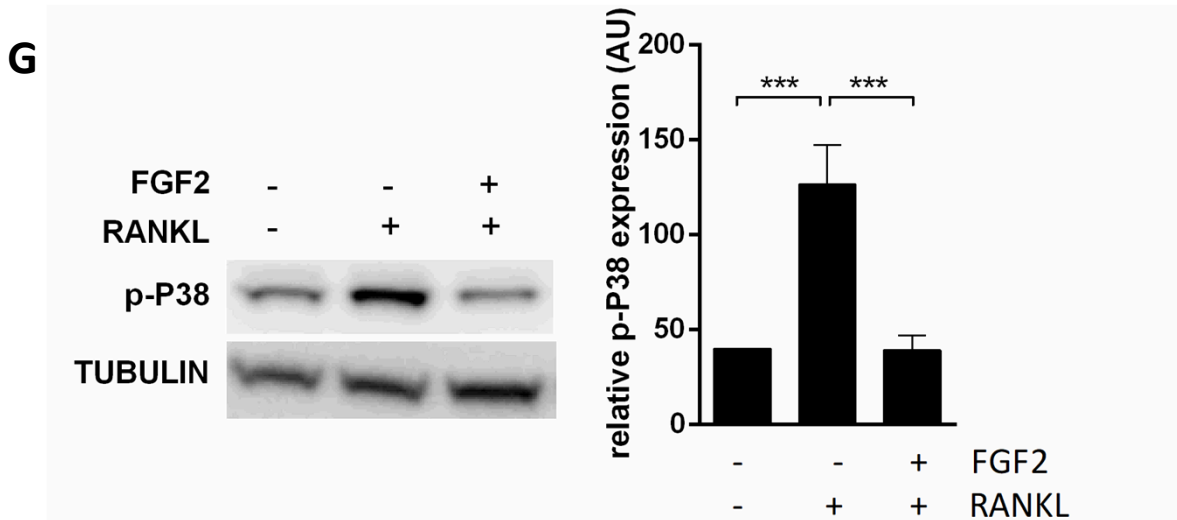
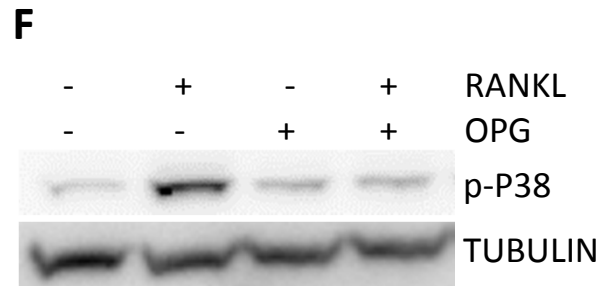
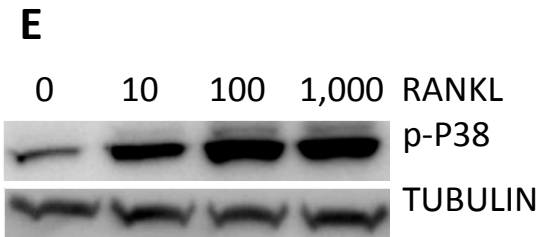
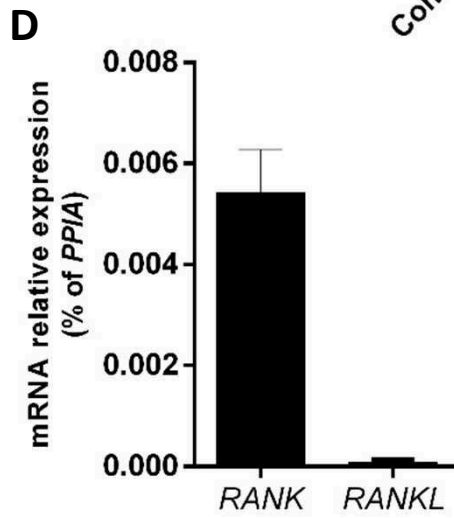
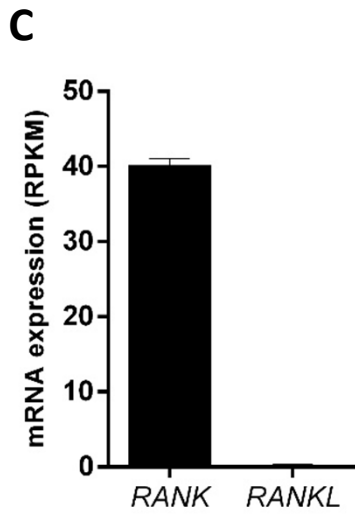
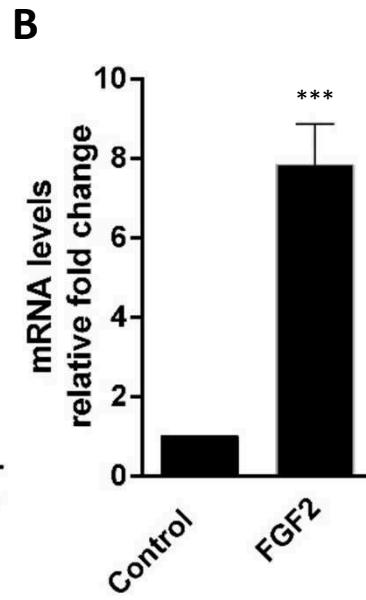
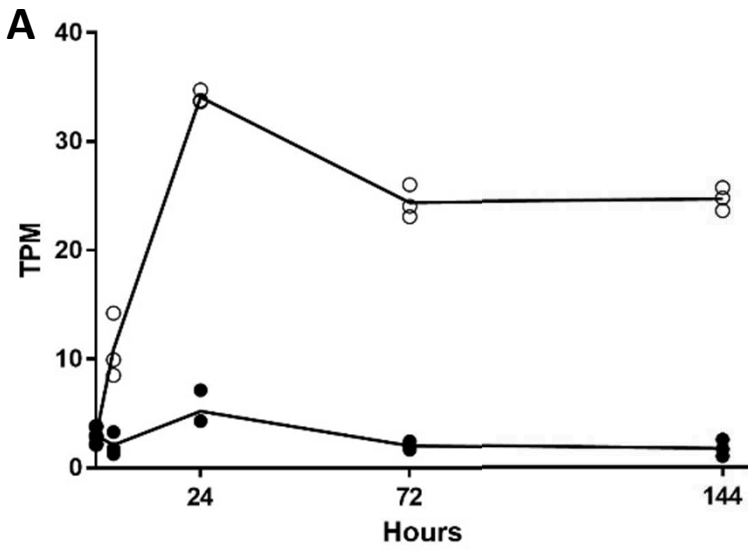


Figure 5



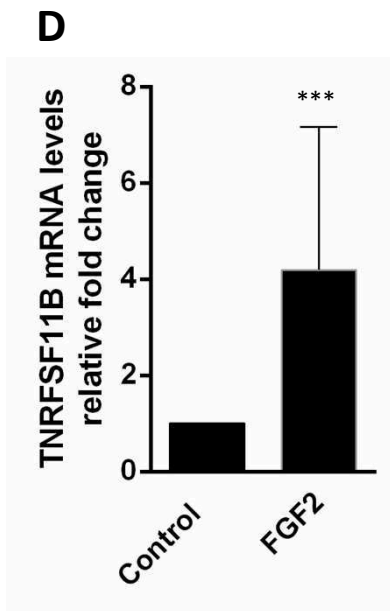
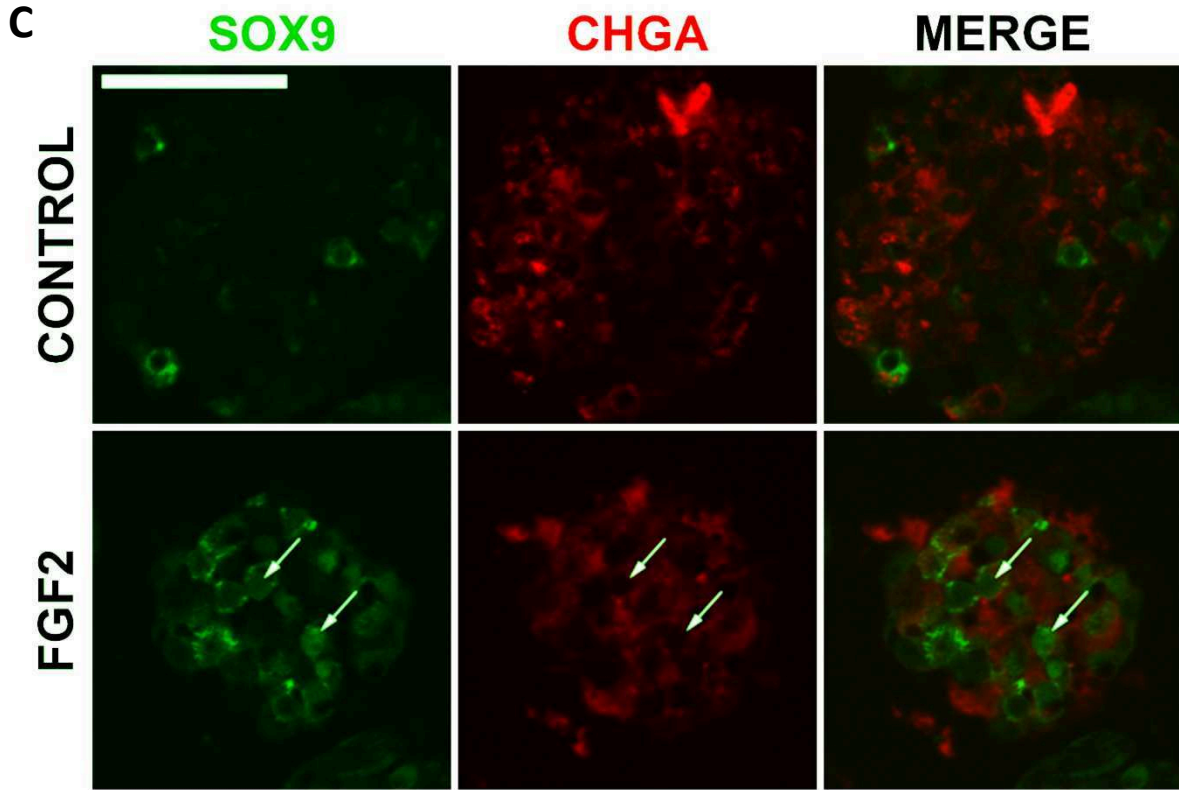
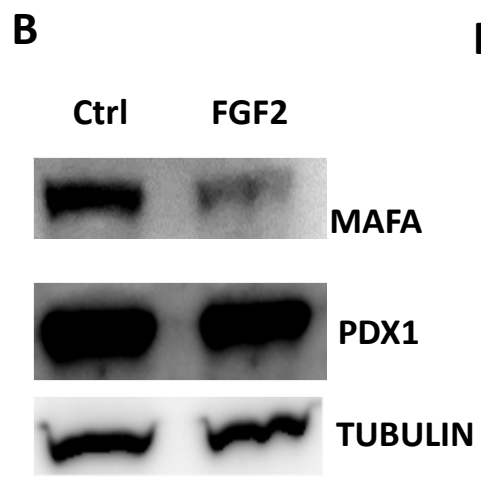
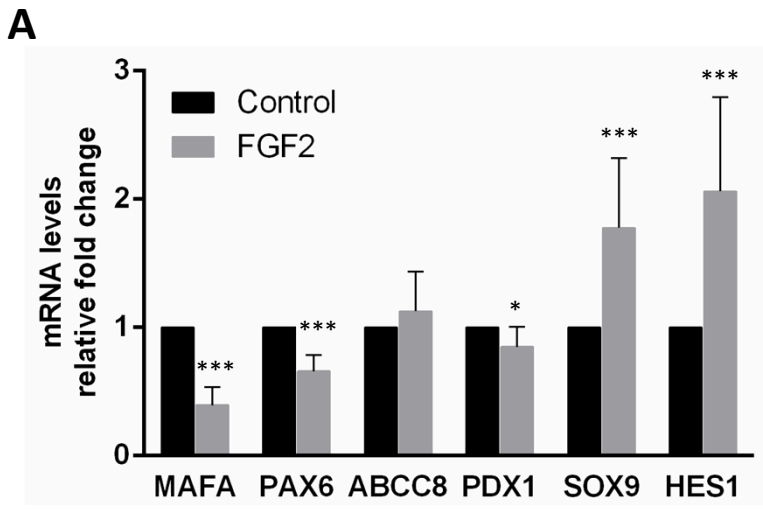
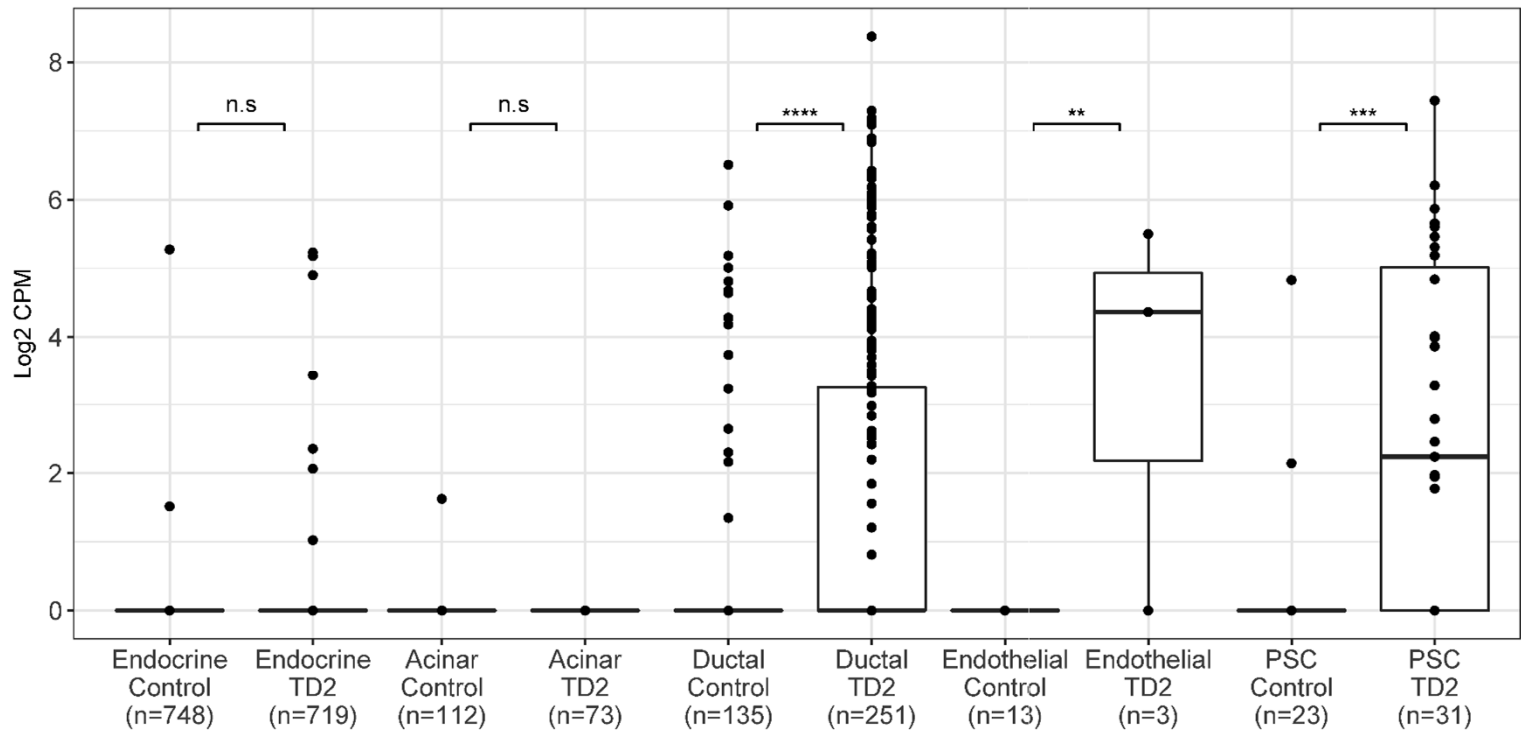
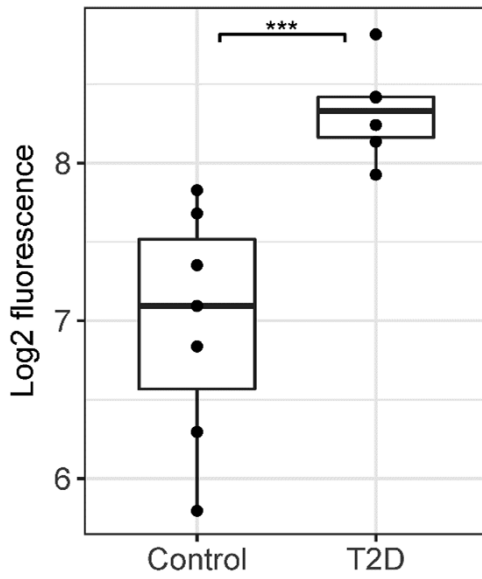


Figure 7

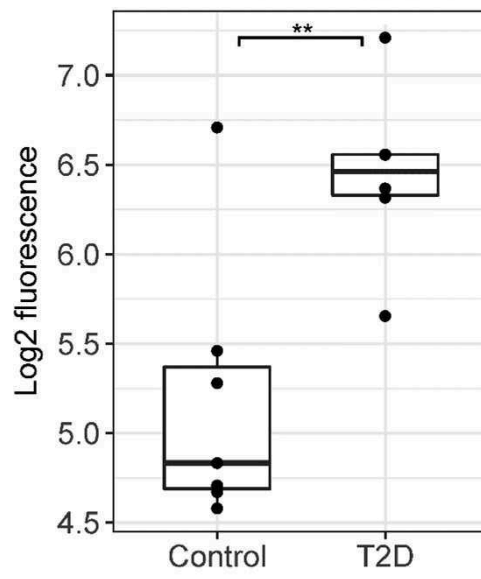
A



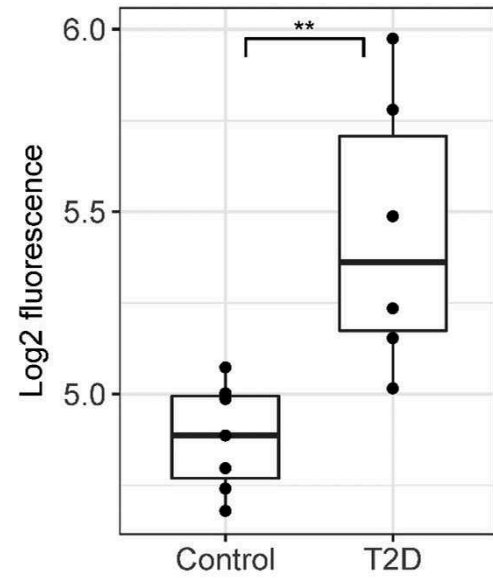
B **FGFR1 (215404_x_at)**



C **SOX9 (202935_s_at)**



D **HES1 (203393_at)**



SUPPLEMENTARY FIGURES

Figure S1 related to Figure 2 and Figure 3. FGF1 and FGF2 modulate gene expression in EndoC- β H1 in a time-dependent manner.

(A) FGF1 (100 ng/mL) and (B) FGF2 (100 ng/mL) treatments decrease INS and MAFA mRNA levels, and induce SOX9 and HES1 mRNA levels, in a time-dependent manner as assessed by RT-qPCR.

Data are represented as mean \pm SD. n=5 biological replicates.

Figure S2 related to Figure 2 and Figure 3. FGF1 and FGF2 modulate gene expression in EndoC- β H1 in a concentration-dependent manner.

(A) A 72h treatment of EndoC- β H1 cells with FGF1 and (B) FGF2 decreases INS and MAFA mRNA levels, and induce SOX9 and HES1 mRNA levels, in a concentration-dependent manner as assessed by RT-qPCR.

Data are represented as mean \pm SD. n=5 biological replicates.

Figure S3 related to Figure 3. The expression of exocrine markers is not induced by FGF1 and FGF2 treatment in EndoC- β H1.

The expression of acinar (AMY2B and CPA1) and ductal markers (CFTR and SPP1) is not induced by a 72 hour treatment with either FGF1 or FGF2.

Data are represented as mean \pm SD. n=5 biological replicates.

Figure S4 related to Figure 6. RT-qPCR analysis of RANK and RANKL expression in human islets.

Data are represented as mean \pm SD. n = 4 biological replicates.

Figure S1 related to Figure 2 and Figure 3

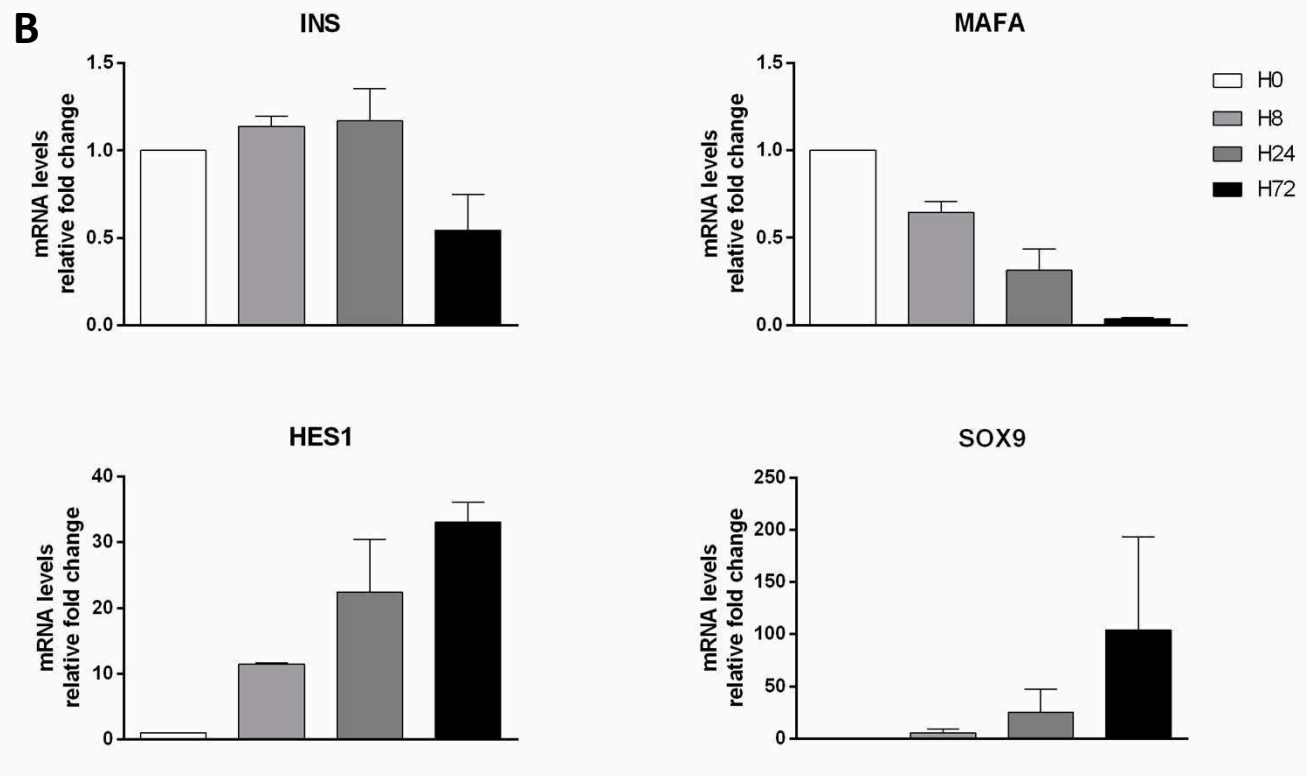
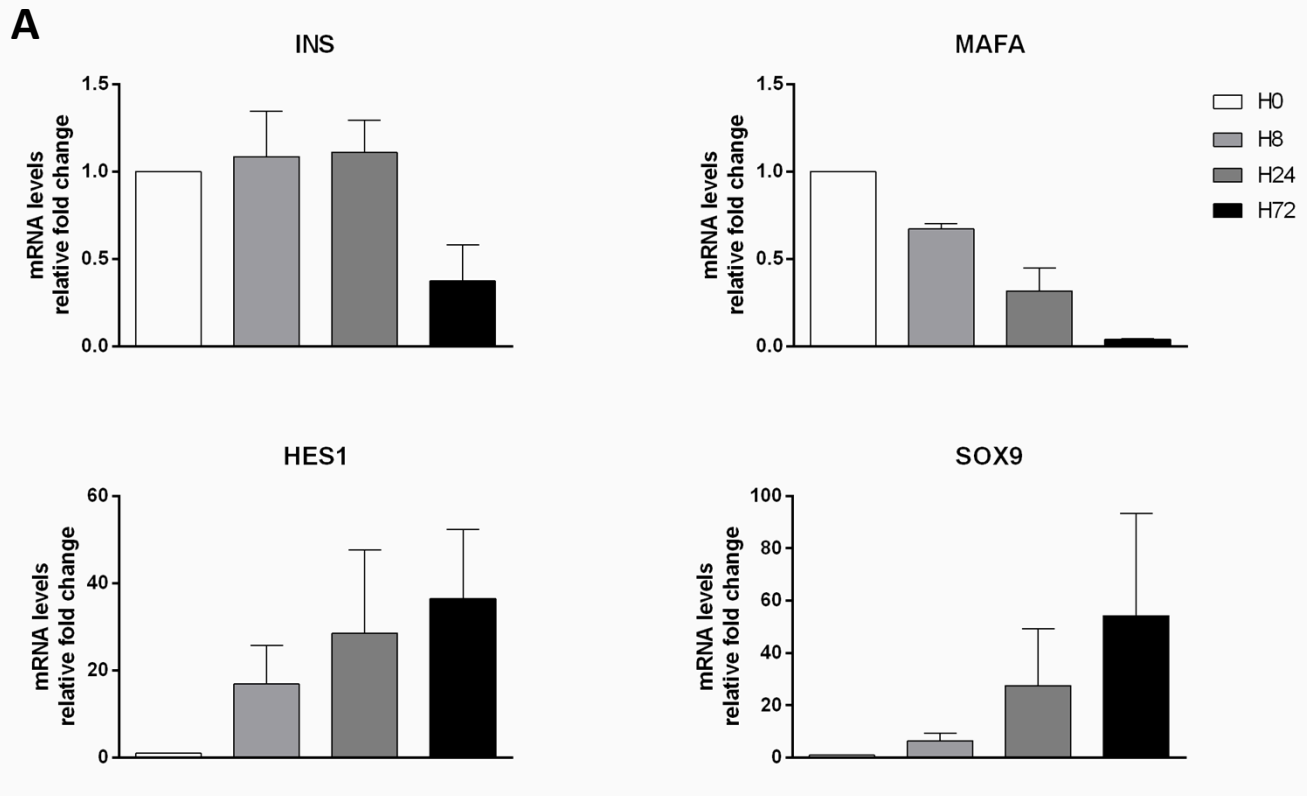


Figure S2 related to Figure 2 and Figure 3

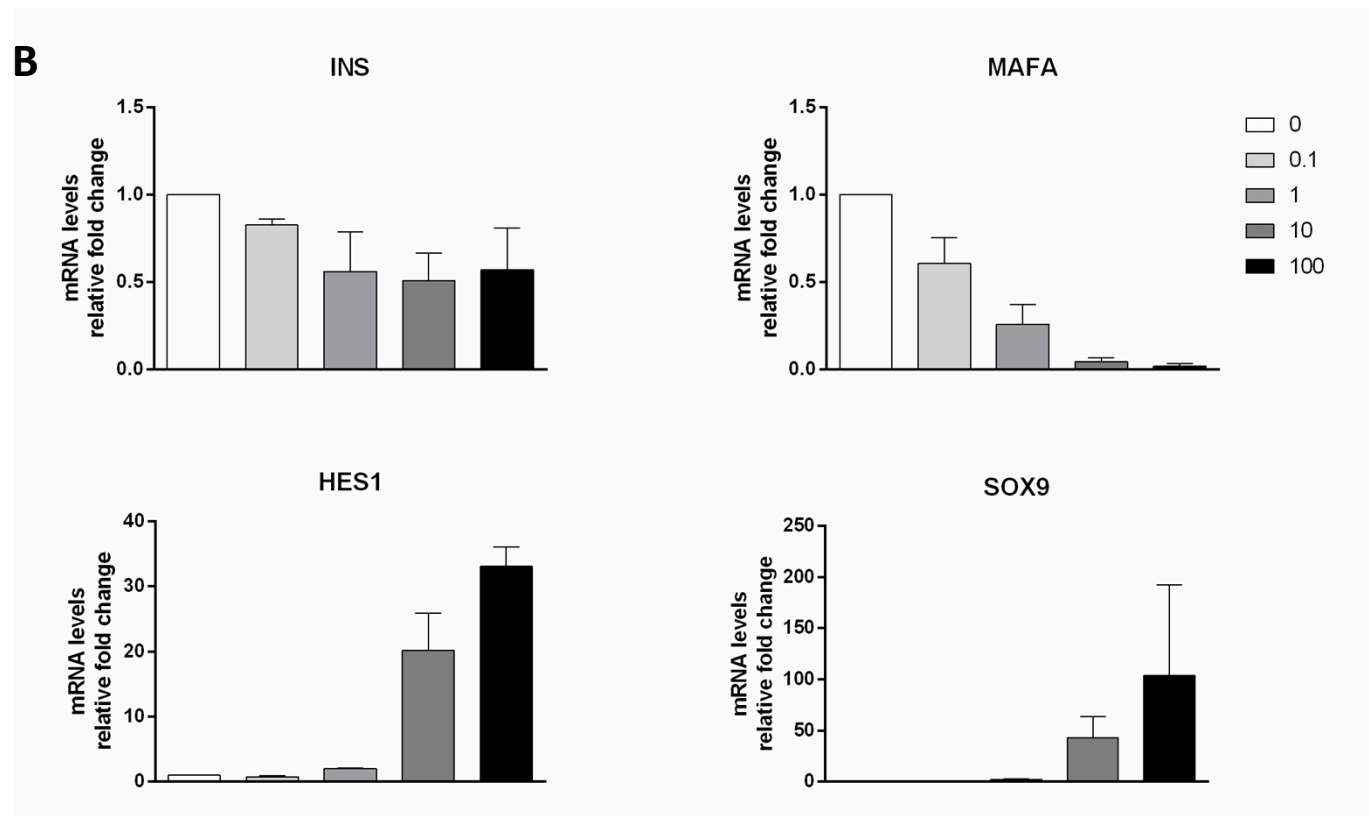
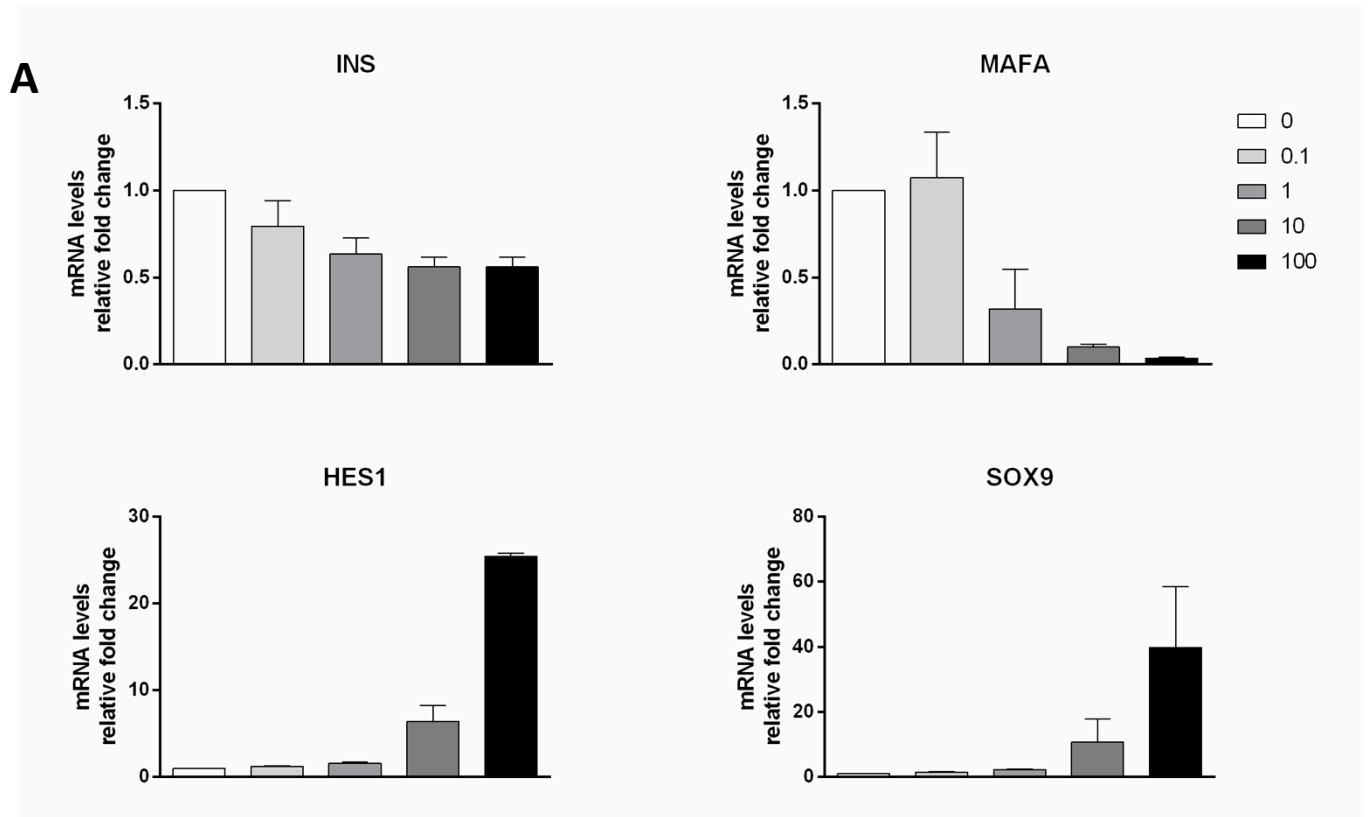


Figure S3 related to Figure 3

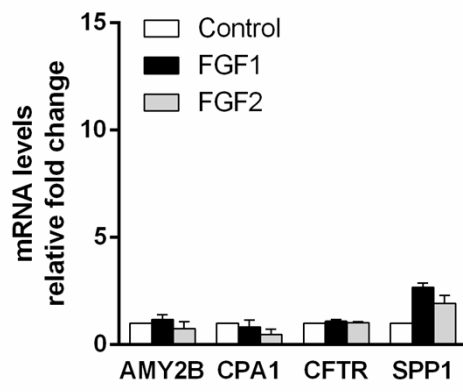


Figure S4 related to Figure 6

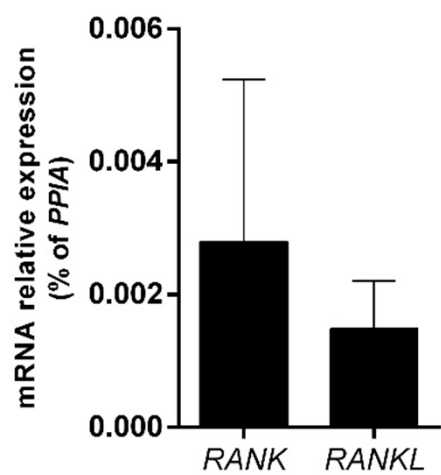


Table S1 related to Figure 2: RNA-Seq data (TPM and FC values) of genes with relevant β cell functions after a 72h treatment with FGF2

	FC	CTRL I	CTRL II	CTRL III	FGF2 I	FGF2 II	FGF2 III
MAFA	0,0	74	83	88	3	3	2
ADRA2A	0,1	10	11	12	2	1	1
SLC30A8	0,2	181	195	180	40	39	34
GCK	0,3	303	308	293	107	102	104
INS	0,4	30 090	31 697	28 666	12 002	12 454	11 743
PAX6	0,4	469	493	523	229	213	209
DACH2	0,5	17	19	19	8	9	9
RFX6	0,5	55	59	55	29	27	25
NCAM1	0,5	53	60	59	31	31	24
MAFB	0,5	183	192	197	105	101	97
CDH4	0,5	23	22	20	13	11	11
NEUROD1	0,5	130	144	137	79	76	70
DACH1	0,6	16	17	19	11	10	8
INSM1	0,6	431	460	485	285	264	264
RAB26	0,6	49	51	48	29	29	30
KCNMB2	0,6	33	39	35	23	23	21
PCSK2	0,6	549	536	508	352	341	331
PDX1	0,7	236	244	250	165	161	158
SSTR2	0,7	37	39	39	27	26	23
MLXIPL	0,7	198	204	246	154	143	143
NKX2-2	0,7	83	91	104	63	63	63
STX1A	0,7	284	276	279	190	201	182
RAB36	0,7	14	15	15	10	12	9
CADPS	0,7	138	138	141	97	102	96
PCSK1N	0,7	1 938	2 135	2 263	1 540	1 455	1 539
MNX1	0,7	74	77	113	64	66	59
CACNB2	0,7	7	6	6	4	6	3
CACNA2D2	0,7	31	34	33	25	25	22
PTPRN2	0,7	191	203	191	148	143	139
CASR	0,8	101	105	99	85	75	74
ABCC8	0,8	116	127	124	103	104	92
SYP	0,8	473	482	481	407	400	383
TTR	0,8	2 680	2 586	2 559	2 150	2 255	2 139
KCNH2	0,9	154	155	154	136	135	130
CACNA2D1	0,9	201	204	225	194	189	162
GLIS3	0,9	30	34	31	28	30	27
HOPX	0,9	20	22	20	19	19	19
CACNA1B	0,9	6	7	9	7	7	6
SCN3B	0,9	18	21	21	20	19	17
CPE	0,9	1 460	1 444	1 374	1 379	1 336	1 311
RIMS2	1,0	18	20	20	19	20	19
RAB3A	1,0	9	11	9	9	11	10
SCGN	1,0	177	183	179	185	186	175
FFAR1	1,0	219	236	238	243	232	231
SYT4	1,0	41	46	45	50	46	43
PCSK1	1,1	156	153	142	170	162	162
SNAP25	1,2	102	106	106	122	122	119
CHGB	1,2	363	371	347	429	435	429
CDH17	1,2	164	166	158	206	193	195
FOXA2	1,2	82	87	96	114	104	106
KCNMA1	1,3	18	21	21	29	24	27
CACNA1D	1,4	11	12	12	17	14	15
RAB3b	1,4	55	59	62	90	81	82
NKX6-1	1,5	27	32	35	48	45	47
ADCY2	1,5	1	1	2	2	4	2
SCN3A	1,5	2	1	1	3	2	2
SYT5	1,5	20	22	27	39	31	33
GABRB3	1,5	47	47	43	69	71	70
SCG5	1,6	261	272	266	420	433	430
CACNA1A	1,7	20	17	28	38	38	36
SCG3	1,8	220	243	225	411	404	401
PTPRN	2,0	238	243	227	491	498	455
SYT13	2,4	55	60	59	142	134	136
CHGA	3,1	9 095	9 549	9 128	29 256	28 760	26 946
IL6R	3,3	5	3	3	11	16	10
IAPP	4,0	28	21	25	85	113	97
SCG2	5,3	165	178	168	938	906	884

Genes are ranked by fold change. Gene list has been generated using published transcriptomics data (Bramswig et al., 2013), literature data, and manual curation.

Table S2: List of endocrine progenitor cell genes used to draw figure 3G. The list of progenitor genes has been generated using a published dataset of pancreatic endoderm enriched genes (Xie et al., 2013).

A4GNT	CXCL3	HIST1H3H	OVOL1	SEZ6L
ADAMTS15	CXCL5	HIST2H2AC	PAK7	SFRP5
ADAMTS16	DACH1	HMGA2	PALMD	SGCD
ADH1A	DCC	HMSD	PCDH9	SIX2
AFF3	DCX	HNMT	PCDP1	SLC12A2
AGTR1	DKK2	HOXA2	PDE3A	SLC19A3
AMBP	DLK1	HS6ST2	PDGFC	SLC22A3
AMOT	DNAJC22	HSD17B11	PDK4	SLC25A18
ANGEL1	DPP10	ID1	PDX1	SLC38A11
ANKRD1	DSEL	ID2	PEG10	SLC38A3
ANKRD56	DUSP5	ID3	PFKFB3	SLC4A4
ANKS1B	DZIP1L	IGF2	PHLDA1	SLCO2A1
AQP3	ECE1	IL11	PIK3AP1	SLITRK6
ARG1	ELF5	IL8	PIK3C2G	SNCAIP
ARHGEF3	ELFN1	ITIH2	PKIA	SOX9
ARID3C	ERP27	JAG1	PLCL1	SPHK1
ATP10D	ESAM	KANK4	PLD1	STAT1
B3GALT2	ESRRG	KCNH3	PPP1R13B	STAT4
C12orf39	F5	KCNH7	PRDM16	STIM2
C1QL1	FAM181B	KCNIP4	PROX1	SULT1C4
C22orf43	FAM198B	KIAA1024	PRR15L	SVIL
C3orf52	FAM84A	KIRREL2	PRSS23	TACR1
C8orf34	FILIP1L	KLF5	PTCHD1	TAGLN3
C8orf4	FLRT2	LARGE	PTF1A	TANC1
CADM4	FOS	LRRN3	PTGER4	THSD7A
CALB1	FRMD6	LRRTM1	PTPRD	TJP2
CASZ1	GFRA3	LTB	QSOX1	TM4SF1
CBLN2	GHRH	LYPD6	RAMP1	TNFSF15
CCDC68	GIF	LYPD6B	RASSF9	TRIL
CDH11	GP2	MAOA	RELN	TTLL7
CDH18	GPC3	MAPK4	REM2	TTN
CDH6	GPRC5A	MEIS1	RFTN1	TTYH1
CDH7	GPRC5C	MEST	RGS1	UNC5C
CDX2	GRHL3	MGAT3	RGS3	VEPH1
CGA	GRIN3A	NANOS3	RGS6	VSIG1
CHL1	GRIP2	NCCRP1	RNF165	VTN
CHN2	GRM3	NETO1	RTL1	WNK2
CHSY3	GUCY1A2	NFE2	RUNX1	WNT11
CITED1	HABP2	NFKB1	S100A3	ZNF503
CNTN3	HAPLN1	NIPAL1	S100A9	ZNF536
COBLL1	HECW2	NKX6-1	SAMD13	
COL21A1	HES4	NKX6-2	SAMD5	
COL28A1	HEY1	NOTCH1	SCUBE2	
CPM	HIST1H2AD	NR4A3	SCUBE3	
CRTAC1	HIST1H2BD	NRG3	SDK1	
CTNND2	HIST1H2BG	NTRK2	SEMA3C	
CUX2	HIST1H2BJ	ONECUT1	SERPINB2	
CXCL1	HIST1H3D	ONECUT2	SERPINB8	
CXCL2	HIST1H3E	ONECUT3	SERPINF2	

Table S3: List of β cell specific genes used to draw figure 3G. β cell specific genes list has been generated using literature data and manual curation.

E2F1

FOXO1

FXYD2

G6PC2

GCK

INS

MAFA

MAFB

NEUROD1

NKX2-2

NKX6.1

PAX6

PDX1

PFKFB3

RFX6

SIX3

SLC30A8

SLCA2

Table S4: Primer sequences used in this study for qPCR

	Forward	Reverse
ABCC8	ACCACAGCACATGGCTTCATTTCC	TGTACAGGTGCAGATGGTGGGATT
AMY2B	TCCCGTGTCTTCAAGTGC	AGTTGAGTGATGTGCCAGGAA
CFTR	CAGAAGCGTCATCAAAGCATGCC	TTCTTGCTCGTTGACCTCCACTC
CHGA	CTGAACACAGGCAGCTTTCTA	CAGTCAGGAGTTCTCAGCTTTC
CPA1	TGGCAACACCTATGAAGGGC	AGATGGCTGGACGCTTACTG
FGFR1b	GCGGGGAGTATGTGTGTAAGGTTT	CGCAGACTGGTTAGCTTCACCAAT
FGFR1c	ACATCCAGTGGCTAAAGCACATCG	TGAAGCACCTCCATCTCTTTGTGCG
FGFR2b	AGTGCTGGCTCTGTTCAATGTGAC	GACTGGTTGGCCTGCCCTATATAA
FGFR2c	GGAATATACGTGCTTGGCGGGTAA	TGGCAGAAGTGTCAACCATGCAGA
FGFR3b	AGTCCTGGATCAGTGAGAGTGT	CTTCTCGGCCACGCCTATGAAAT
FGFR3c	TCCTTGACAACGTACCTTTGAG	CAGCCACGCAGAGTGATGAGAAAA
FGFR4	GGCCGTCAAGATGCTCAAAGACAA	TGCAGACACCAAGCAGGTTGAT
GAST	CCCAGCTCTGCAGACGAGA	ACCTAAGGGTGCATCTGGCT
GCG	TCTTGATAATCTTGGCCGAGGGA	CATGCAAAGCAATGTGGCCTCAGA
GHRL	CAACGCCCCCTTTGATGTTG	CTGCTGGTACTGAACCCCTG
HES1	GTCAACACGACACGGGATAAACC	TTCCAGAATGTCCGCCTTCTCC
INSULIN	AGAGGCCATCAAGCAGATCACTGT	ACAGGTGTTGGTTCACAAAGGCTG
MAFA	ATTCTGGAGAGCGAGAAGTGCCAA	CGCCAGCTTCTCGTATTTCTCCTT
MAFB	TTCTTTGGGTGAGAAGGGATCGCA	TCAGCTTGCTGCCACGTTCTCTAT
MYC	GTAGTGAAAACCAGCAGCC	AGAAATACGGCTGCACCGAG
NEUROD1	ATTGCACCAGCCCTTCTTTGATG	TCGCTGCAGGATAGTGCATGGTAA
NEUROG3	TAAGAGCGAGTTGGCACTGAGCAA	TTTGAGTCAGCGCCAGATGTAGT
NPY	TGTTCCAGAAGTCTGGCTTG	TGCATTGGTAGGATGGGTGG
PAX6	GCCCAGCTTACCATGGCAAATAA	ATCATAACTCCGCCATTCACCGA
PDX1	TACTGGATTGGCGTTGTTGTGGC	AGGGAGCCTTCCAATGTGTATGGT
PPIA	ATGGCAAATGCTGGACCCAACA	ACATGCTTGCCATCCAACCACT
RFX6	CATGTGAACTCCAGTCTAGCTT	AGTCCAGGGTTTCTTGAGCTGGAT
SLC2A2	AGCTGCATTAGCAATTGGACCTG	ATGTGAACAGGGTAAAGGCCAGGA
SLC30A8	ACAGCCAAGTGGTTCGGAGAGAAA	TTGGGAAACTGACGGTGTGACTGA
SOX9	ACCTATCCAAGCGCATTACCCAC	ATCATCCTCCACGCTTGCTCTGA
SPP1	AATTCTGGGAGGGCTTGTT	GTTTTCTTGGTCGGCGTTT
SST	TGAACCAACCAGACGGAGAATGA	GAAATTCTGCAGCCAGCTTTGCG
TNFRSF11A	ACCCGTGCTACTTCTCTGATG	AAGAACTGCAAACCGCATCG
TNFRSF11B	TCCTGGATTTGGAGTGGTGC	AGCAGGAGACCAAAGACACT
TNFSF11	CCTTTCAAGGAGCTGTGCAAAA	CCATCCACCATCGCTTTCTCT

Discussion générale

I. Principaux résultats

Nos résultats peuvent être classés en plusieurs catégories :

- nous apportons des arguments directs pour une dédifférenciation de la cellule bêta humaine à partir de la lignée EndoC-bH1 et d'îlots pancréatiques primaires après un traitement par FGF1 ou FGF2 ;
- en plus de caractériser d'une part l'effondrement de l'expression de plusieurs gènes spécifiques de la cellule bêta, et d'autre part la persistance d'autres gènes bêta ou endocrines, nous décrivons l'induction de plusieurs gènes habituellement non exprimés dans la cellule bêta pancréatique, tels que SOX9 ou HES1 ;
- nous démontrons que la dédifférenciation de la cellule bêta humaine peut modifier son interaction avec les signaux extra-cellulaires, en prenant l'exemple de la voie RANK/RANKL ;
- nous rapportons une augmentation de l'expression de FGF2 dans plusieurs types cellulaires de pancréas d'individus diabétiques de type 2, et une augmentation d'expression de plusieurs marqueurs positifs de dédifférenciations dans des îlots pancréatiques d'individus diabétiques de type 2.

II. La dédifférenciation de la cellule bêta humaine

A. Observation d'une dédifférenciation

L'hypothèse d'une dédifférenciation de la cellule bêta pancréatique reposait jusqu'à aujourd'hui sur l'observation de ce mécanisme dans plusieurs modèles murins. Si certaines équipes recherchent des arguments indirects par immunologie sur des coupes de pancréas humains (Butler et al., 2016; Cinti et al., 2016; Marselli et al., 2014), nous avons choisi de modéliser la dédifférenciation afin d'affirmer ce mécanisme dans des cellules bêta humaines. Ce processus est clairement démontré dans la lignée de cellule bêta humaine EndoC- β H1 : les cellules, après traitement par FGF1 ou FGF2, restent présentes mais effondrent l'expression de plusieurs gènes associés à la cellule bêta. Parmi ces gènes, MAFA a été décrit dans plusieurs modèles murins comme impliqué dans la maintenance de la différenciation de la cellule bêta : sa perte d'expression est associée à une diminution de l'état de différenciation de la cellule bêta (Hang et al., 2014; Nishimura et al., 2014). PAX6, dont l'expression est également diminuée, a récemment été identifiée comme un facteur de transcription maintenant l'identité bêta en réprimant l'expression de gènes « interdits » dans la cellule bêta (entra autres les gènes spécifiques aux autres cellules insulaires) (Swisa et al., 2017). En revanche, dans cet état de dédifférenciation, l'expression d'autres gènes endocrines non spécifiques de la cellule bêta n'est pas diminuée, à l'image de la chromogranine A ou ABCC8.

Concernant les cellules bêta primaires, nous n'avons pas pu réaliser de traçage cellulaire tel que réalisé dans plusieurs études murines (Nishimura et al., 2014; Talchai et al., 2012; Wang et al., 2014). La démonstration d'une dédifférenciation après traitement par FGF2 repose sur la combinaison de plusieurs arguments. Nous retrouvons tout d'abord la diminution d'expression

des gènes clés MAFA et PAX6 dans les ilots pancréatiques traités. En revanche, le pool de cellules endocrine, dont les cellules bêta représentent environ 60% (Brissova et al., 2005), ne paraît pas diminuée au vu de la stabilité d'expression de plusieurs marqueurs pan-endocrines tels que ABCC8 ou chromogranine A, gènes dont l'expression n'est pas modifiée dans les cellules EndoC- β H1. La présence de cellules endocrines Chromogranine A- (Marselli et al., 2014) ou Synaptophysine- (Cinti et al., 2016) positives mais hormones-négatives sur des coupes de pancréas d'individus diabétiques de type 2 pourrait donc être compatible avec la présence de cellules bêta dédifférenciées.

B. Devenir d'une cellule bêta dédifférenciée

Une question intimement liée à la dédifférenciation est le devenir d'une cellule dédifférenciée. Une dédifférenciation est strictement définie par une perte de différenciation, donc une diminution ou un arrêt d'expression de gènes spécifiques de cette différenciation. Dans l'exemple du batracien, des cellules différenciées retournent à l'état de progéniteur pour proliférer puis se redifférencier en plusieurs types cellulaires (Brockes, 1997). Concernant la cellule bêta, cet état n'a jamais été démontré avec certitude.

Dans les modèles murins avec traçage cellulaire, le devenir de la cellule dédifférenciée est suggéré par l'expression de gènes spécifiques dans d'anciennes cellules bêta. Ainsi, Talchai et al. démontrent l'expression de Neurogenin3 dans des cellules bêta dédifférenciées *in vivo* (Talchai et al., 2012). En revanche, si un progéniteur à une étape donnée exprime bien ce facteur de transcription, l'expression de ce gène par une cellule dédifférenciée ne suffit pas à définir

cet état de progéniteur. D'une part, l'expression isolée d'un gène ne suffit pas à définir l'état et la fonction d'une cellule, la fonction de ce gène dépendant des autres gènes co-exprimés. Par exemple, l'expression forcée de Neurogenin3 dans des progéniteurs pancréatiques entraîne un phénotype variable selon la période d'induction d'expression (Johansson et al., 2007) : les progéniteurs endocrines passent par divers « états de compétence » pouvant être définis par les gènes co-exprimés à chaque période, associés à un sous-type de cellules endocrines susceptibles de se développer.

D'autre part, l'expression d'un gène est rarement spécifique d'un état cellulaire en particulier. Ainsi, SOX9 est exprimé aussi bien dans les progéniteurs pancréatiques que dans les cellules canalaire et acinaires du matures (Seymour, 2014). Dans notre travail, l'analyse transcriptomique a permis d'analyser l'expression d'un groupe de gènes, plus représentatif de l'état de progéniteurs. Dans cet objectif, nous avons pris l'ensemble des gènes spécifiquement exprimés dans les cellules au stade d'endoderme pancréatique lors de la différenciation endocrine de cellules souches embryonnaires humaines (Xie et al., 2013). De cette manière, nous avons pu retrouver une induction globale du phénotype progéniteur (figure 3G de l'article), renforçant l'hypothèse de la réactivation de gènes spécifiques de l'état progéniteur.

En revanche, il s'agit principalement d'une démonstration d'induction d'ARNm. Concernant les protéines, nous avons souvent été limités par l'utilisation des anticorps. Ainsi, nous n'avons pas pu démontrer d'induction de Neurogenin3 par immunocytochimie ou Western-Blot avec plusieurs anticorps, mais sans contrôle positif confirmant l'adéquation des protocoles utilisés, confirmant des difficultés techniques rencontrées par d'autres équipes (Accili et al., 2016; Cinti et al., 2016).

L'utilisation d'expression de gènes isolés pour caractériser une éventuelle trans-différenciation pose la même limite. L'expression d'un gène ne suffit pas à résumer une cellule

spécialisée : Talchai et al. rapportent une expression de glucagon par des cellules bêta dédifférenciées sans expressions de certains facteurs de transcription habituellement retrouvés dans les cellules alpha (ARX, BRN4, PAX6) (Talchai et al., 2012) ; le statut de cellule alpha pourrait être confirmé par une analyse fonctionnelle de ces cellules, à la recherche d'une sécrétion de glucagon adéquate. Dans notre modèle, nous n'avons pas retrouvé d'argument pour une transdifférenciation endocrine ou exocrine, hormis la somatostatine qui est nettement induite en ARNm et pourrait faire l'objet d'études plus approfondies.

III. Diabète de type 2 et dédifférenciation

A. Limites d'utilisation d'îlots d'individus diabétiques de type 2

L'origine de ce travail est l'hypothèse d'une dédifférenciation de la cellule bêta au cours du diabète de type 2. La première partie de ce travail a consisté à étudier la capacité d'une cellule bêta humaine à se dédifférencier et à caractériser ce processus. En seconde partie, nous avons étudié si ce processus pouvait être détecté chez des individus diabétiques de type 2. Si la première partie repose sur un argumentaire scientifique, la seconde est plus discutable.

Une limite importante est liée au fait que le diabète de type 2 est un syndrome regroupant des patients de phénotype hétérogène, possiblement lié à une physiopathologie initiale variable, comme nous l'avons discuté dans l'introduction. Ainsi, dans les années 1970-80, l'obésité était considérée comme n'ayant pas de rôle majeur dans le développement du diabète de type 2 (Jarrett et al., 1979; Taylor, 1989), alors que diabète de type 2 et surpoids sont clairement liés

dans l' « épidémie » actuelle (Franco et al., 2013; The GBD 2015 Obesity Collaborators, 2017). Par exemple, presque 70% des individus nouvellement diagnostiqués diabétiques de type 2 dans l'étude UKPDS avaient un IMC supérieur à 25 kg/m² (UKPDS study, 1991). Or l'origine des ilots pancréatiques humains biaise de manière importante le « type » de diabète de type 2 étudié : les prélèvements d'ilots étant réalisés dans le cadre du don d'organes, le phénotype des individus donneurs est particulièrement sélectionné. Ainsi, l'état de santé requis pour être donneur d'organe est souvent associé à un âge plus jeune et un IMC plus faible que la moyenne des patients diabétiques dont la prévalence mondiale estimée à 300 millions motive en grande partie cette recherche sur la cellule bêta.

Des erreurs de catégorisation du diabète peuvent être à l'origine de biais très importants : une étude étudiant la masse bêta entre patients diabétiques de type 2 traités ou non par analogue du GLP-1 a inclus, dans le groupe contrôle, plusieurs individus avec une masse bêta quasi indétectable étiquetés « diabétiques de type 2 », tirant vers le bas la masse bêta moyenne du groupe sans analogue du GLP-1 (Butler et al., 2013). Ces individus présentaient en fait des caractéristiques cliniques et biologiques permettant au mieux un diagnostic de diabète de type 2 atypique, ou plus simplement de type indéterminé (Bonner-Weir et al., 2014; Harja et al., 2013). Ces erreurs de catégorisation ont pu être soulignées car les pancréas utilisés étaient issus de la base de données nPOD (Network for Pancreatic Organ donors with Diabetes), mise en place par la *Juvenile Diabetes Research Foundation*, dont l'un des intérêts est de contenir des renseignements cliniques et biologiques précis pour chaque donneur (Campbell-Thompson et al., 2012). Si cette étude a pu être rectifiée grâce à ces renseignements, les données disponibles concernant les donneurs dans la grande majorité des études sont très rares, se limitant à l'âge, l'IMC et éventuellement la durée du diabète. Concernant les données transcriptomiques des ilots pancréatiques que nous avons pu récupérer, seule les moyennes de l'âge et de l'IMC étaient disponibles, rendant compliqués la caractérisation du diabète de type 2 (Dominguez et al.,

2011). Concernant les RNA-Seq sur cellules isolées, l'âge, l'IMC et l'HbA1c étaient précisés pour chaque patient (Segerstolpe et al., 2016) ; si ces données confirment l'état diabétique, il est là encore difficile de caractériser le diabète. Une meilleure catégorisation des individus donneurs, avec des informations cliniques et biologiques précises, à l'image de celle fournies par la base de données nPOD, permettrait de mieux préciser la portée réelle des résultats trouvés.

B. Diabète de type 2 et dédifférenciation

Dans notre travail, nous retrouvons dans les ilots pancréatiques d'individus dits diabétiques de type 2 une induction de deux marqueurs de dédifférenciation positifs définis par nos études *in vitro* : SOX9 et HES1. SOX9 est particulièrement intéressant car son rôle dans les progéniteurs pancréatiques est bien décrit (Seymour et al., 2008). Ces données peuvent donc évoquer une dédifférenciation des cellules bêta au cours du diabète de type 2, mais restent trop limitée pour réellement conclure. D'une part, les limites intrinsèques aux ilots pancréatiques d'individus diabétiques de type 2 que nous avons vues limitent la portée de ces résultats. De plus, une augmentation relative des ARNm SOX9 ou HES1 dans des préparations d'ilots peut être expliquée par une contamination plus importante par du tissu exocrine, dont les cellules canalaire et acinaires expriment SOX9 et HES1 (Segerstolpe et al., 2016). Il est toutefois intéressant de noter que l'induction de SOX9 est également retrouvée dans des ilots d'individus diabétiques de type 2 isolés par microdissection par laser (*Figure 23*), méthode permettant une moindre contamination par du tissu exocrine (Marselli et al., 2010). Il sera intéressant d'étudier des coupes de pancréas d'individus diabétiques en immunohistochimie afin d'identifier une éventuelle expression insulaire de SOX9, à l'image des ilots traités par FGF2 *in vitro*.

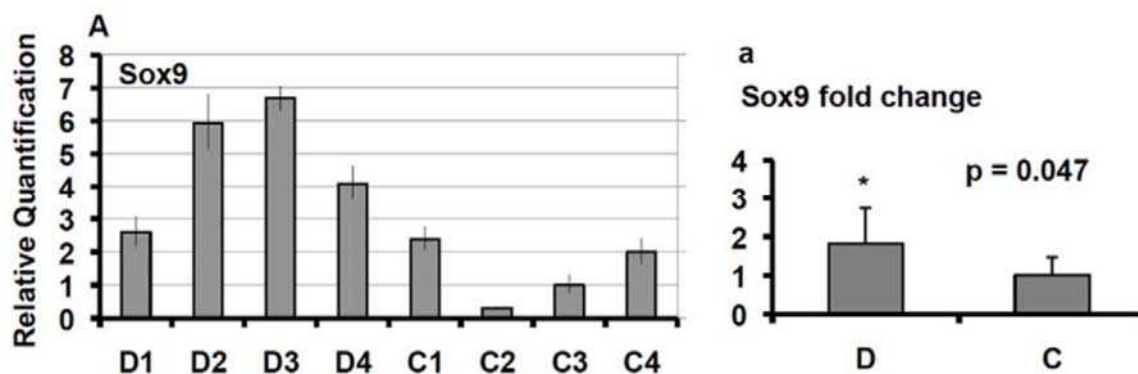


Figure 23 - Expression de SOX9 en qPCR dans des préparations d'îlots pancréatiques de 4 individus diabétiques (D) et 4 non diabétiques (C). A droite, moyenne \pm SEM. Tiré de (Marselli et al., 2010)

C. Liens entre FGF, cellule bêta et diabète

De manière intéressante, nous retrouvons une augmentation de la production d'ARNm FGF2 dans plusieurs types cellulaires chez les individus pancréatiques, posant la question d'une éventuelle implication dans la physiopathologie du diabète de type 2. Cette expression concerne entre autres les cellules endothéliales, dont plusieurs études rapportent qu'elles produisent des facteurs de croissance et autres molécules influant la fonction des cellules bêta, et pourraient être impliquées dans l'apparition du diabète de type 2 (Hogan and Hull, 2017). Par ailleurs, l'interaction entre FGF et cellule bêta pancréatique a déjà été décrite. Par exemple, la voie FGF est impliquée dans le maintien de la masse bêta chez l'adulte (Hart et al., 2000) : suite à une diminution de l'expression du récepteur FGFR1c chez la souris, le nombre de cellule bêta est normal chez le nouveau-né, puis décroît par rapport aux contrôles après quelques semaines de vie en raison d'une moindre expansion, avec augmentation progressive de la glycémie. A l'inverse, un inhibiteur du récepteur FGFR1 augmente la différenciation des progéniteurs

endocrines en cellules bêta lors de la différenciation de cellules iPS (*induced pluripotent stem cell*) (Yamashita-Sugahara et al., 2016).

Il est intéressant de noter que le FGF1 sérique est augmenté chez les individus diabétiques de type 2 nouvellement diagnostiqué (Wang et al., 2016). L'origine de ce FGF1 n'est pas claire. En revanche, il est démontré que la production de FGF1 est très augmentée dans le tissu adipeux viscéral comparé au tissu adipeux sous-cutané (Jonker et al., 2012). Or le tissu adipeux viscéral est augmenté chez les individus diabétiques de type 2, dont le tissu adipeux péri et intra-pancréatique, qui est associé à une diminution de la masse fonctionnelle bêta (Tushuizen et al., 2007). Il est d'ailleurs intéressant de noter que l'amélioration du diabète de type 2 après chirurgie bariatrique (by-pass gastrique) est associée à une diminution du gras intra-pancréatique (quantification du triacylglycerol intrapancréatique par IRM) (Steven et al., 2016). L'implication, dans la dédifférenciation de la cellule bêta au cours du diabète de type 2, du FGF1 ou du FGF2 synthétisés par le tissu adipeux intra-pancréatique ou par les cellules endothéliales constitue donc une voie intéressante de recherche ultérieure.

A l'inverse, une étude apporte un faisceau d'arguments reliant d'une part l'augmentation de la masse bêta en réponse à une suralimentation chez le poisson zèbre, et d'autre part une sécrétion de FGF1 par la cellule bêta elle-même (Li et al., 2016). Il n'existe aujourd'hui pas de résultats similaires chez le mammifère. Chez l'humain, des études transcriptomiques ne retrouvent pas d'augmentation d'ARNm FGF1 dans les cellules bêta ou les îlots pancréatiques chez les individus diabétiques (Marselli et al., 2010; Segerstolpe et al., 2016).

Une dernière étude rapporte une diminution des glycémies dans un modèle murin diabétique après traitement systémique par FGF1 (Suh et al., 2014). Dans cette étude, la structure du FGF1 a été modifiée afin de permettre une action endocrine et non paracrine ; la diminution des glycémies est très rapide (en 18 heures), et passe par une amélioration de l'insulino-sensibilité sans augmentation de la sécrétion d'insuline, semblant dans cette situation mimer l'action du FGF21.

IV. Dédifférenciation et modification de l'interaction avec l'environnement

A. Exemple de la voie RANK - RANKL

Une question soulevée par la dédifférenciation est le devenir de cette cellule. Au-delà d'une possible évolution vers un état de progéniteur ou transdifférenciation, nous avons posé la question si la dédifférenciation pouvait influencer l'interaction de la cellule avec son environnement. L'analyse transcriptomique ayant révélé une induction de l'ostéoprotégérine (OPG ou TNFRSF11B), nous nous sommes intéressés à la voie de signalisation RANK (receptor activator of nuclear factor kappa-B ou TNFRSF11A) / RANKL (RANK-ligand ou TNFSF11). OPG est un récepteur soluble liant RANKL, bloquant ainsi son interaction avec son récepteur RANK (Kearns et al., 2008). L'expression d'OPG a déjà été décrite comme induite dans des cellules bêta murines in vivo (Rieck et al., 2009). Elle a également été décrite comme un pivot central de l'augmentation de la prolifération des cellules bêta induite par la prolactine dans un modèle murin (Kondegowda et al., 2015). Dans notre travail, le traitement par FGF2

induit une expression d'OPG en ARNm, et diminue l'activation de la voie de signalisation MAPK-p38, voie canonique de RANK/RANKL. Ces résultats suggèrent donc que la dédifférenciation modifie l'interaction de la cellule bêta avec l'environnement, la sécrétion d'OPG protégeant la cellule bêta de l'activation de la voie RANK-RANKL. La sécrétion d'OPG a également été rapportée comme induite par des cytokines pro-inflammatoires, et décrite comme protégeant des cellules bêta murines in vitro de la mortalité cellulaire induite par ces cytokines, là aussi par inhibition de l'activation de la voie MAPK-p38 (Schrader et al., 2007).

B. Dédifférenciation et diabète de type 1

La dédifférenciation modifiant l'interaction de la cellule bêta avec son environnement, une question intéressante est de savoir si la dédifférenciation pourrait également représenter un mécanisme de protection pour les cellules β . Dans le diabète de type 1, les cellules bêta sont tuées par un mécanisme auto-immun (Coppieters and Von Herrath, 2009; Gepts, 1965). Pendant longtemps, on considérait qu'aucune cellule bêta n'échappait à cette destruction. Cependant, des preuves plus récentes indiquent que certaines cellules β échappent à la destruction auto-immune et restent présentes dans le pancréas des années après le diagnostic du diabète de type 1 (Davis et al., 2015; Keenan et al., 2010). Comment une sous-population de cellules β survit à l'attaque immunitaire représente un sujet majeur dans le domaine du diabète de type 1, et il a été récemment démontré chez des souris que les cellules bêta résistantes à cette destruction exprimait des taux réduits de gènes spécifiques de la cellule bêta (Rui et al., 2017). De même, une étude récente suggère que la machinerie moléculaire spécifique à la production d'insuline est diminuée dans ces cellules bêta encore présentes plusieurs années après le diagnostic de la

maladie (Wasserfall et al., 2017). Dans notre travail, nous avons observé que les expressions de l'insuline et du transporteur du zinc ZNT8 sont diminuées suite au traitement par FGF. Fait intéressant, les peptides dérivés de la dégradation de l'insuline et du ZNT8 ont été impliqués dans la destruction auto-immune des cellules β par les lymphocytes T CD8 +, un processus qui se déroule dans le diabète de type 1 (Brezar et al., 2011). En diminuant la présentation de ces antigènes, la dédifférenciation médiée par le FGF pourrait donc représenter un moyen pour les cellules β d'échapper à la destruction par le système immunitaire. Les expériences futures permettront de vérifier si c'est bien le cas.

Comme expérience préliminaire, nous avons utilisé un mix de cytokines pro-inflammatoires associant IFN γ (interféron gamma), IL-1 β (interleukine 1 bêta), TNF α (tumor necrosis factor alpha). Ces cytokines, seules ou en association, sont très souvent utilisées pour modéliser les événements inflammatoires pancréatiques survenant de manière précoce chez les individus diabétiques de type 1 (Eizirik et al., 1994). Confirmant ce modèle, les îlots pancréatiques d'individus avec diabète de type 1 débutant montrent une surexpression des gènes induits par l'IFN γ , avec un modèle d'expression similaire à celui observé dans les îlots infectés par virus ou exposés aux cytokines IFN γ / IL1 β ou IFN α (Lundberg et al., 2016). Nos premiers résultats de l'action de ces cytokines sur nos lignées retrouvent plusieurs similitudes avec le modèle développé avec le FGF2, tant sur la diminution de marqueurs bêta que sur l'induction de marqueurs non bêta : effondrement de MAFA et GLUT2, induction de SOX9 et HES1.

Par similarité à la recherche dans le diabète le type 2, des équipes sont parties du postulat qu'une cellule bêta dédifférenciée passe par un état de cellule endocrine (chromogranine A-positive) sans production d'hormone pancréatique. Si la prévalence de ces cellules est augmentée dans les îlots d'individus diabétiques de type 1 comparés à des individus contrôles ou avec anticorps positifs mais non diabétiques (Moin et al., 2016), elle reste faible (1,11 % vs

0,26 et 0,27% respectivement), et n'est pas retrouvée dans des pancréas d'enfants diabétiques de type 1 (Moin et al., 2017). L'identification de nos marqueurs positifs de dédifférenciation pourrait donc permettre de nouvelles études afin de confirmer ou non cette hypothèse de dédifférenciation au cours du diabète de type 1.

V. Conclusion

La confirmation d'une dédifférenciation de la cellule bêta pancréatique au cours du diabète de type 2 permettrait d'avancer dans la compréhension de sa physiopathogénie et éventuellement de définir des voies de recherche pour de nouvelles classes thérapeutiques antidiabétiques. Démontrée dans plusieurs modèles murins, nous apportons des preuves pour une dédifférenciation de la cellule bêta humaine en modélisant ce processus par traitement par FGF1 ou FGF2. Une meilleure caractérisation de ce processus permettra une orientation des recherches concernant une éventuelle dédifférenciation au cours du diabète. Ainsi, ce travail nous a permis de définir des marqueurs positifs de dédifférenciation, nous permettant d'apporter des arguments supplémentaires pour une dédifférenciation au cours du diabète de type 2. Toutefois, l'avancée des connaissances concernant le diabète de type 2 sera nécessairement lié à une meilleure caractérisation des individus dont sont issus les ilots ou coupes de pancréas.

Bibliographie

Accili, D., Talchai, S.C., Kim-Muller, J.Y., Cinti, F., Ishida, E., Ordelleide, A.M., Kuo, T., Fan, J., and Son, J. (2016). When β -cells fail: lessons from dedifferentiation. *Diabetes, Obes. Metab.* *18*, 117–122.

Aguayo-Mazzucato, C., and Bonner-Weir, S. (2017). Pancreatic β Cell Regeneration as a Possible Therapy for Diabetes. *Cell Metab.*

American Diabetes Association (2013). Economic Costs of Diabetes in the U.S. in 2012. *Diabetes Care* *36*, 1033–1046.

Artner, I., Le Lay, J., Hang, Y., Elghazi, L., Schisler, J.C., Henderson, E., Sosa-Pineda, B., and Stein, R. (2006). MafB: an activator of the glucagon gene expressed in developing islet alpha- and beta-cells. *Diabetes* *55*, 297–304.

Assady, S., Maor, G., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., Skorecki, K.L., and Tzukerman, M. (2001). Insulin Production by Human Embryonic Stem Cells. *Diabetes* *50*, 1691–1697.

Beck-Nielsen, H., and Groop, L.C. (1994). Metabolic and genetic characterization of prediabetic states. Sequence of events leading to non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* *94*, 1714–1721.

Benthuisen, J.R., Carrano, A.C., and Sander, M. (2016). Advances in β cell replacement and regeneration strategies for treating diabetes. *J Clin Invest* *126*, 3651–3660.

Blau, H.M., and Baltimore, D. (1991). Differentiation requires continuous regulation. *J Cell Biol* *112*, 781–783.

Bonner-Weir, S., In't Veld, P.A., and Weir, G.C. (2014). Reanalysis of study of pancreatic effects of incretin therapy: methodological deficiencies. *Diabetes Obes Metab.*

Borst, D.E., and McDevitt, D.S. (1987). Eye lens regeneration and the crystallins in the adult newt, *Notophthalmus viridescens*. *Exp Eye Res* *45*, 419–441.

Brezar, V., Carel, J.C., Boitard, C., and Mallone, R. (2011). Beyond the hormone: Insulin as an autoimmune target in type 1 diabetes. *Endocr Rev* *32*, 623–669.

Brissova, M., Fowler, M.J., Nicholson, W.E., Chu, A., Hirshberg, B., Harlan, D.M., and Powers, A.C. (2005). Assessment of Human Pancreatic Islet Architecture and Composition by Laser Scanning Confocal Microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* *53*, 1087–1097.

Brockes, J.P. (1997). Amphibian Limb Regeneration: Rebuilding a Complex Structure. *Science* (80-) *276*, 81–87.

Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A., and Butler, P.C. (2003). B-Cell Deficit and Increased B-Cell Apoptosis in Humans With Type 2 Diabetes. *Diabetes* *52*, 102–110.

Butler, A.E., Cao-Minh, L., Galasso, R., Rizza, R.A., Corradin, A., Cobelli, C., and Butler, P.C. (2010). Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy. *Diabetologia* *53*, 2167–2176.

Butler, A.E., Campbell-Thompson, M., Gurlo, T., Dawson, D.W., Atkinson, M., and Butler, P.C. (2013). Marked expansion of exocrine and endocrine pancreas with incretin therapy in humans with increased exocrine pancreas dysplasia and the potential for glucagon-producing

neuroendocrine tumors. *Diabetes* 62, 2595–2604.

Butler, A.E., Dhawan, S., Hoang, J., Cory, M., Zeng, K., Fritsch, H., Meier, J.J., Rizza, R.A., and Butler, P.C. (2016). β -Cell deficit in obese type 2 diabetes, a minor role of β -Cell dedifferentiation and degranulation. *J Clin Endocrinol Metab* 101, 523–532.

Campbell-Thompson, M., Wasserfall, C., Kaddis, J., Albanese-O'Neill, A., Staeva, T., Nierras, C., Moraski, J., Rowe, P., Gianani, R., Eisenbarth, G., et al. (2012). Network for Pancreatic Organ Donors with Diabetes (nPOD): developing a tissue biobank for type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 28, 608–617.

Cantrell, R.A., Alatorre, C.I., Davis, E.J., Zarotsky, V., Le Nestour, E., Carter, G.C., Goetz, I., Paczkowski, R., and Sierra-Johnson, J. (2010). A review of treatment response in type 2 diabetes: Assessing the role of patient heterogeneity. *Diabetes, Obes. Metab.* 12, 845–857.

Carpenter, S., Rigaud, M., Barile, M., Priest, T.J., Perez, L., and Ferguson, J.B. (1998). An Interlinear Transliteration and English Translation of Portions of The Ebers Papyrus Possibly Having to Do With Diabetes Mellitus (Annandale-on-Hudson, NY: Bard College).

Cinti, F., Bouchi, R., Kim-Muller, J.Y., Ohmura, Y., Sandoval, P.R., Masini, M., Marselli, L., Suleiman, M., Ratner, L.E., Marchetti, P., et al. (2016). Evidence of β -cell dedifferentiation in human type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 101, 1044–1054.

Clark, A., Wells, C., Buley, I., Cruickshank, J., Vanhegan, R., Matthews, D., Cooper, G., Holman, R., and Turner, R. (1988). Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. *Diabetes Res* 9, 151–159.

Clark, A., Jones, L.C., De Koning, E., Hansen, B.C., and Matthews, D.R. (2001). Decreased insulin secretion in type 2 diabetes: A problem of cellular mass or function? *Diabetes* 50, S169–71.

Cline, G.W., Petersen, K.F., Krssak, M., Shen, J., Hundal, R.S., Trajanoski, Z., Inzucchi, S., Dresner, A., Rothman, D.L., and Shulman, G.I. (1999). Impaired Glucose Transport as a Cause of Decreased Insulin-Stimulated Muscle Glycogen Synthesis in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 341, 240–246.

Cnop, M., Hughes, S.J., Igoillo-Esteve, M., Hoppa, M.B., Sayyed, F., Van De Laar, L., Gunter, J.H., De Koning, E.J.P., Walls, G. V., Gray, D.W.G., et al. (2010). The long lifespan and low turnover of human islet beta cells estimated by mathematical modeling of lipofuscin accumulation. *Diabetologia* 53, 321–330.

Coppieters, K.T., and Von Herrath, M.G. (2009). Histopathology of type 1 diabetes: Old paradigms and new insights. *Rev. Diabet. Stud.* 6, 85–96.

Davis, A.K., DuBose, S.N., Haller, M.J., Miller, K.M., DiMeglio, L.A., Bethin, K.E., Goland, R.S., Greenberg, E.M., Liljenquist, D.R., Ahmann, A.J., et al. (2015). Prevalence of detectable c-peptide according to age at diagnosis and duration of type 1 diabetes. *Diabetes Care* 38, 476–481.

DeFronzo, R.A. (1988). The triumvirate: b-cell, muscle, or liver—a collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 37, 667–687.

DeFronzo, R.A., and Goodman, A.M. (1995). Efficacy of metformin in patients with non-

insulin-dependent diabetes mellitus. The Multicenter Metformin Study Group. *N Engl J Med* 333, 541–549.

DeFronzo, R.A., Ferrannini, E., and Simonson, D.C. (1989). Fasting hyperglycemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus: Contributions of excessive hepatic glucose production and impaired tissue glucose uptake. *Metabolism* 38, 387–395.

Dhawan, S., Georgia, S., Tschen, S., Fan, G., and Bhushan, A. (2011). Pancreatic β Cell Identity Is Maintained by DNA Methylation-Mediated Repression of *Arx*. *Dev Cell* 20, 419–429.

Dominguez, V., Raimondi, C., Somanath, S., Bugliani, M., Loder, M.K., Edling, C.E., Divecha, N., Silva-Xavier, G. Da, Marselli, L., Persaud, S.J., et al. (2011). Class II phosphoinositide 3-kinase regulates exocytosis of insulin granules in pancreatic β cells. *J Biol Chem* 286, 4216–4225.

Dorrell, C., Schug, J., Lin, C.F., Canaday, P.S., Fox, A.J., Smirnova, O., Bonnah, R., Streeter, P.R., Stoeckert, C.J., Kaestner, K.H., et al. (2011). Transcriptomes of the major human pancreatic cell types. *Diabetologia* 54, 2832–2844.

Dorrell, C., Schug, J., Canaday, P.S., Russ, H.A., Tarlow, B.D., Grompe, M.T., Horton, T., Hebrok, M., Streeter, P.R., Kaestner, K.H., et al. (2016). Human islets contain four distinct subtypes of β cells. *Nat Commun* 7, 11756.

Druet, C., Roudier, C., Romon, I., Assogba, F., Bourdel-Marchasson, I., Eschwege, E., Risse-Fleury, M., Poutignat, N., Gautier, A., Chantray, M., et al. (2012). Échantillon national témoin représentatif des personnes diabétiques, Entred 2007-2010 (Institut de veille sanitaire).

Efendic, S., Grill, V., Luft, R., and Wajngot, A. (1988). Low insulin response: a marker of prediabetes. *Adv Exp Med Biol* 246, 167–174.

Eizirik, D.L., Sandler, S., Welsh, N., Cetkovic-Cvrlje, M., Nieman, A., Geller, D.A., Pipeleers, D.G., Bendtzen, K., and Hellerström, C. (1994). Cytokines suppress human islet function irrespective of their effects on nitric oxide generation. *J Clin Invest* 93, 1968–1974.

Elghazi, L., Weiss, A.J., Barker, D.J., Callaghan, J., Staloch, L., Sandgren, E.P., Gannon, M., Adsay, V.N., and Bernal-Mizrachi, E. (2009). Regulation of Pancreas Plasticity and Malignant Transformation by Akt Signaling. *Gastroenterology* 136, 1091–1103.

Eng, J., Kleinman, W.A., Singh, L., Singh, G., and Raufman, J.P. (1992). Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom: Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J Biol Chem* 267, 7402–7405.

Expert Committee (1997). Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 20, 1183–1197.

Franco, M., Bilal, U., Ordunez, P., Benet, M., Morejon, A., Caballero, B., Kennelly, J.F., and Cooper, R.S. (2013). Population-wide weight loss and regain in relation to diabetes burden and cardiovascular mortality in Cuba 1980-2010: repeated cross sectional surveys and ecological comparison of secular trends. *Br Med J* 346, f1515–f1515.

Gannon, M., Tweedie Ables, E., Crawford, L., Lowe, D., Offield, M.F., Magnuson, M.A., and Wright, C.V.E. (2008). *pdx-1* function is specifically required in embryonic beta cells to generate appropriate numbers of endocrine cell types and maintain glucose homeostasis. *Dev*

Biol 314, 406–417.

Gazdar, A.F., Chick, W.L., Oie, H.K., Sims, H.L., King, D.L., Weir, G.C., and Lauris, V. (1980). Continuous, clonal, insulin- and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable rat islet cell tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 3519–3523.

Gepts, W. (1965). Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes* 14, 619–633.

Gerich, J.E. (1998). The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: Impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocr Rev* 19, 491–503.

Gittes, G.K. (2009). Developmental biology of the pancreas: A comprehensive review. *Dev Biol* 326, 4–35.

Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M., and Guillemot, F. (2000). Neurogenin3 Is Required for the Development of the Four Endocrine Cell Lineages of the Pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1607–1611.

Groop, L.C., Bonadonna, R.C., DelPrato, S., Ratheiser, K., Zyck, K., Ferrannini, E., and DeFronzo, R.A. (1989). Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance. *J Clin Invest* 84, 205–213.

Gu, G., Dubauskaite, J., and Melton, D.A. (2002). Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 129, 2447–2457.

Guelfucci, F., Clay, E., Aballéa, S., Lassalle, R., Moore, N., and Toumi, M. (2013). Impact of therapy escalation on ambulatory care costs among patients with type 2 diabetes in France. *BMC Endocr Disord* 13, 15.

Guiot, Y., Sempoux, C., Moulin, P., and Rahier, J. (2001). No decrease of the beta-cell mass in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 50 Suppl 1, S188.

Hang, Y., Yamamoto, T., Benninger, R.K.P., Brissova, M., Guo, M., Bush, W., Piston, D.W., Powers, A.C., Magnuson, M., Thurmond, D.C., et al. (2014). The MafA transcription factor becomes essential to islet b-cells soon after birth. *Diabetes* 63, 1994–2005.

Harja, E., Lord, J., and Skyler, J.S. (2013). An analysis of characteristics of subjects examined for incretin effects on pancreatic pathology. *Diabetes Technol Ther* 15, 609–618.

Hart, A.W., Baeza, N., Apelqvist, A., and Edlund, H. (2000). Attenuation of FGF signalling in mouse beta-cells leads to diabetes. *Nature* 408, 864–868.

Hartwich, C. (1897). *Die neuen Arzneidrogen aus dem Pflanzenreiche* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg).

Hogan, M.F., and Hull, R.L. (2017). The islet endothelial cell: a novel contributor to beta cell secretory dysfunction in diabetes. *Diabetologia* 60, 952–959.

Jackson, R.A., Hawa, M.I., Jaspan, J. V, Sim, B.M., Disilvio, L., Featherbe, D., and Kurtz, A.B. (1987). Mechanisms of metformin action in non-insulin dependent diabetes. *Diabetes* 36, 632–640.

Janbon, M., Chaptal, J., Vedel, A., and Schaap, J. (1942). *Accidents hypoglycémiques graves*

par un sulfamidothiodiazol (le VK 57 ou 2254 RP). *Montpellier Med* 441, 21–22.

Jarrett, R.J., Keen, H., Fuller, J.H., and McCartney, M. (1979). Worsening to diabetes in men with impaired glucose tolerance (“borderline diabetes”). *Diabetologia* 16, 25–30.

Johansson, K.A., Dursun, U., Jordan, N., Gu, G., Beermann, F., Gradwohl, G., and Grapin-Botton, A. (2007). Temporal Control of Neurogenin3 Activity in Pancreas Progenitors Reveals Competence Windows for the Generation of Different Endocrine Cell Types. *Dev Cell* 12, 457–465.

Jonas, J.C., Sharma, A., Hasenkamp, W., Ilkova, H., Patanè, G., Laybutt, R., Bonner-Weir, S., and Weir, G.C. (1999). Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic β cell differentiation in an animal model of diabetes. *J Biol Chem* 274, 14112–14121.

Jonker, J.W., Suh, J.M., Atkins, A.R., Ahmadian, M., Li, P., Whyte, J., He, M., Juguilon, H., Yin, Y.-Q., Phillips, C.T., et al. (2012). A PPAR γ -FGF1 axis is required for adaptive adipose remodelling and metabolic homeostasis. *Nature* 485, 391–394.

Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T., and Edlund, H. (1994). Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371, 606–609.

Jumabay, M., Abdmaulen, R., Ly, A., Cubberly, M., and Shahmirian, L. (2014). Pluripotent Stem Cells Derived From Mouse and Human White Mature Adipocytes. *Stem Cells Transl. Med.* 3, 161–171.

Kadowaki, T., Miyake, Y., Hagura, R., Akanuma, Y., Kajinuma, H., Kuzuya, N., Takaku, F., and Kosaka, K. (1984). Risk factors for worsening to diabetes in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetologia* 26, 44–49.

Kahn, C.R. (1994). Banting lecture: Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes* 43, 1066–1084.

Kahn, S.E., Cooper, M.E., and Del Prato, S. (2014). Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: Perspectives on the past, present, and future. *Lancet* 383, 1068–1083.

Kearns, A.E., Khosla, S., and Kostenuik, P.J. (2008). Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev* 29, 155–192.

Keenan, H.A., Sun, J.K., Levine, J., Doria, A., Aiello, L.P., Eisenbarth, G., Bonner-Weir, S., and King, G.L. (2010). Residual insulin production and pancreatic β -cell turnover after 50 years of diabetes: Joslin medalist study. *Diabetes* 59, 2846–2853.

Kim, S.P., Ellmerer, M., Van Citters, G.W., and Bergman, R.N. (2003). Primacy of hepatic insulin resistance in the development of the metabolic syndrome induced by an isocaloric moderate-fat diet in the dog. *Diabetes* 52, 2453–2460.

King, H., Aubert, R.E., and Herman, W.H. (1998). Global Burden of Diabetes, 1995-2025 Prevalence, Estimates and Projections. *Diabetes Care* 21, 1414–1431.

Kloppel, G., Lohr, M., Habich, K., Oberholzer, M., Heitz, P.U., Klöppel, G., Löhr, M., Habich, K., Oberholzer, M., and Heitz, P.U. (1985). Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. *Surv Synth Pathol Res* 4, 110–125.

- Kondegowda, N.G., Fenutria, R., Pollack, I.R., Orthofer, M., Garcia-Ocaña, A., Penninger, J.M., and Vasavada, R.C. (2015). Osteoprotegerin and Denosumab Stimulate Human Beta Cell Proliferation through Inhibition of the Receptor Activator of NF- κ B Ligand Pathway. *Cell Metab* 22, 77–85.
- Kosaka, K., Kuzuya, T., Akanuma, Y., and Hagura, R. (1980). Increase in insulin response after treatment of overt maturity-onset diabetes is independent of the mode of treatment. *Diabetologia* 18, 23–28.
- Lang, D.A., Matthews, D.R., Burnett, M., and Turner, R.C. (1981). Brief, irregular oscillations of basal plasma insulin and glucose concentrations in diabetic man. *Diabetes* 30, 435–439.
- Li, M., Page-McCaw, P., and Chen, W. (2016). FGF1 mediates overnutrition-induced compensatory β -cell differentiation. *Diabetes* 65, 96–109.
- Loubatières-Mariani, M.-M. (2007). La découverte des sulfamides hypoglycémiantes. *J Soc Biol* 201, 121–125.
- Lundberg, M., Krogvold, L., Kuric, E., Dahl-Jørgensen, K., and Skog, O. (2016). Expression of interferon-stimulated genes in insulinitic pancreatic islets of patients recently diagnosed with type 1 diabetes. *Diabetes* 65, 3104–3110.
- Madiraju, A.K., Erion, D.M., Rahimi, Y., Zhang, X.-M., Braddock, D.T., Albright, R.A., Prigaro, B.J., Wood, J.L., Bhanot, S., MacDonald, M.J., et al. (2014). Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature* 510, 542–546.
- Marcato, P., Dean, C.A., Giacomantonio, C.A., and Lee, P.W.K. (2011). Aldehyde dehydrogenase its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle* 10, 1378–1384.
- Marselli, L., Thorne, J., Dahiya, S., Sgroi, D.C., Sharma, A., Bonner-Weir, S., Marchetti, P., and Weir, G.C. (2010). Gene expression profiles of beta-cell enriched tissue obtained by laser capture microdissection from subjects with type 2 diabetes. *PLoS One* 5, e11499.
- Marselli, L., Suleiman, M., Masini, M., Campani, D., Bugliani, M., Syed, F., Martino, L., Focosi, D., Scatena, F., Olimpico, F., et al. (2014). Are we overestimating the loss of beta cells in type 2 diabetes? *Diabetologia* 57, 362–365.
- McCluskey, J.T., Hamid, M., Guo-Parke, H., McClenaghan, N.H., Gomis, R., and Flatt, P.R. (2011). Development and functional characterization of insulin-releasing human pancreatic beta cell lines produced by electrofusion. *J Biol Chem* 286, 21982–21992.
- McCreight, L.J., Bailey, C.J., and Pearson, E.R. (2016). Metformin and the gastrointestinal tract. *Diabetologia* 59, 426–435.
- McDevitt, D.S. (1989). Transdifferentiation in Animals A Model for Differentiation Control. In *Genomic Adaptability in Somatic Cell Specialization*, (Boston, MA: Springer US), pp. 149–173.
- McGann, C.J., Odelberg, S.J., and Keating, M.T. (2001). Mammalian myotube dedifferentiation induced by newt regeneration extract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13699–13704.

- Mezza, T., Muscogiuri, G., Sorice, G.P., Clemente, G., Hu, J., Pontecorvi, A., Holst, J.J., Giaccari, A., and Kulkarni, R.N. (2014). Insulin Resistance Alters Islet Morphology in Nondiabetic Humans. *Diabetes* 63, 994–1007.
- Mitrakou, A., Kelley, D., Mokan, M., Veneman, T., Pangburn, T., Reilly, J., and Gerich, J. (1992). Role of reduced suppression of glucose production and diminished early insulin release in impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 326, 22–29.
- Moin, A.S.M., Dhawan, S., Shieh, C., Butler, P.C., Cory, M., and Butler, A.E. (2016). Increased hormone-negative endocrine cells in the pancreas in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 101, 3487–3496.
- Moin, A.S.M., Cory, M., Ong, A., Choi, J., Dhawan, S., Butler, P.C., and Butler, A.E. (2017). Pancreatic Nonhormone Expressing Endocrine Cells in Children With Type 1 Diabetes. *J. Endocr. Soc.* 1, 385–395.
- Namenwirth, M. (1974). The inheritance of cell differentiation during limb regeneration in the axolotl. *Dev Biol* 41, 42–56.
- Narushima, M., Kobayashi, N., Okitsu, T., Tanaka, Y., Li, S.-A.A., Chen, Y., Miki, A., Tanaka, K., Nakaji, S., Takei, K., et al. (2005). A human beta-cell line for transplantation therapy to control type 1 diabetes. *Nat Biotechnol* 23, 1274–1282.
- Nica, A.C., Ongen, H., Irminger, J.C., Bosco, D., Berney, T., Antonarakis, S.E., Halban, P.A., and Dermitzakis, E.T. (2013). Cell-type, allelic, and genetic signatures in the human pancreatic beta cell transcriptome. *Genome Res* 23, 1554–1562.
- Nishimura, W., Takahashi, S., and Yasuda, K. (2014). MafA is critical for maintenance of the mature beta cell phenotype in mice. *Diabetologia* 58, 566–574.
- O’Rahilly, S., Turner, R.C., and Matthews, D.R. (1988). Impaired pulsatile secretion of insulin in relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med* 318, 1225–1230.
- Offield, M.F., Jetton, T.L., Labosky, P.A., Ray, M., Stein, R.W., Magnuson, M.A., Hogan, B.L., and Wright, C. V (1996). PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 122, 983–995.
- Pan, F.C., and Wright, C. (2011). Pancreas organogenesis: From bud to plexus to gland. *Dev. Dyn.* 240, 530–565.
- Parnaud, G., Bosco, D., Berney, T., Pattou, F., Kerr-Conte, J., Donath, M.Y., Bruun, C., Mandrup-Poulsen, T., Billestrup, N., and Halban, P.A. (2008). Proliferation of sorted human and rat beta cells. *Diabetologia* 51, 91–100.
- Perl, S.Y., Kushner, J.A., Buchholz, B.A., Meeker, A.K., Stein, G.M., Hsieh, M., Kirby, M., Pechhold, S., Liu, E.H., Harlan, D.M., et al. (2010). 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 Metab* 95, E234–E239.
- Pisania, A., Weir, G.C., O’Neil, J.J., Omer, A., Tchipashvili, V., Lei, J., Colton, C.K., and Bonner-Weir, S. (2010). Quantitative analysis of cell composition and purity of human pancreatic islet preparations. *Lab Invest* 90, 1661–1675.
- Prentki, M., and Nolan, C.J. (2006). Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 116,

1802–1812.

- Puri, S., and Hebrok, M. (2010). Cellular plasticity within the pancreas--lessons learned from development. *Dev Cell* 18, 342–356.
- Puri, S., and Hebrok, M. (2012). Diabetic β Cells: To Be or Not To Be? *Cell* 150, 1103–1104.
- Puri, S., Akiyama, H., and Hebrok, M. (2013). VHL-mediated disruption of Sox9 activity compromises β -cell identity and results in diabetes mellitus. *Genes Dev* 27, 2563–2575.
- Quiskamp, N., Bruin, J.E., and Kieffer, T.J. (2015). Differentiation of human pluripotent stem cells into β -cells: Potential and challenges. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 29, 833–847.
- Rahier, J., Guiot, Y., Goebbels, R.M., Sempoux, C., and Henquin, J.C. (2008). Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 10 Suppl 4, 32–42.
- Ravassard, P., Hazhouz, Y., Pechberty, S., Bricout-Neveu, E., Armanet, M., Czernichow, P., and Scharfmann, R. (2011). A genetically engineered human pancreatic β cell line exhibiting glucose-inducible insulin secretion. *J Clin Invest* 121, 3589–3597.
- Reaven, G.M. (1988). Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37, 1595–1607.
- Rezania, A., Bruin, J.E., Arora, P., Rubin, A., Batushansky, I., Asadi, A., O'Dwyer, S., Quiskamp, N., Mojibian, M., Albrecht, T., et al. (2014). Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 32, 1121–1133.
- Rice, R.H., and Green, H. (1977). The cornified envelope of terminally differentiated human epidermal keratinocytes consists of cross-linked protein. *Cell* 11, 417–422.
- Rieck, S., White, P., Schug, J., Fox, A.J., Smirnova, O., Gao, N., Gupta, R.K., Wang, Z. V, Scherer, P.E., Keller, M.P., et al. (2009). The transcriptional response of the islet to pregnancy in mice. *Mol. Endocrinol.* 23, 1702–1712.
- Roy, C.K., Ojha, J.K., and Bajpai, H.S. (1993). A review of the history of prameha and diabetes mellitus. *Anc. Sci. Life* 12, 394–398.
- Rui, J., Deng, S., Arazi, A., Perdigoto, A.L., Liu, Z., and Herold, K.C. (2017). β Cells that Resist Immunological Attack Develop during Progression of Autoimmune Diabetes in NOD Mice. *Cell Metab* 25, 727–738.
- Saad, M.F., Knowler, W.C., Pettitt, D.J., Nelson, R.G., Mott, D.M., and Bennett, P.H. (1989). Sequential changes in serum insulin concentration during development of non-insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1, 1356–1359.
- Saisho, Y., Butler, A.E., Manesso, E., Elashoff, D., Rizza, R.A., and Butler, P.C. (2013). β -Cell mass and turnover in humans: Effects of obesity and aging. *Diabetes Care* 36, 111–117.
- Sakuraba, H., Mizukami, H., Yagihashi, N., Wada, R., Hanyu, C., and Yagihashi, N. (2002). Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. *Diabetologia* 45, 85–96.
- Satin, L.S., Butler, P.C., Ha, J., and Sherman, A.S. (2015). Pulsatile insulin secretion, impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Mol Aspects Med* 42, 61–77.

- Schatz, H., Katsilambros, N., Nierle, C., and Pfeiffer, E.E. (1972). The effect of biguanides on secretion and biosynthesis of insulin in isolated pancreatic islets of rats. *Diabetologia* 8, 402–407.
- Schmucker, D.L., and Sachs, H. (2002). Quantifying dense bodies and lipofuscin during aging: A morphologist's perspective. *Arch Gerontol Geriatr* 34, 249–261.
- Scholzen, T., and Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182, 311–322.
- Schrader, J., Rennekamp, W., Niebergall, U., Schoppet, M., Jahr, H., Brendel, M.D., Hörsch, D., and Hofbauer, L.C. (2007). Cytokine-induced osteoprotegerin expression protects pancreatic beta cells through p38 mitogen-activated protein kinase signalling against cell death. *Diabetologia* 50, 1243–1247.
- Segerstolpe, A., Palasantza, A., Eliasson, P., Andersson, E.-M., Andreasson, A.-C., Sun, X., Picelli, S., Sabirsh, A., Clausen, M., Bjursell, M.K., et al. (2016). Single-Cell Transcriptome Profiling of Human Pancreatic Islets in Health and Type 2 Diabetes. *Cell Metab* 24, 593–607.
- Seymour, P.A. (2014). Sox9: A master regulator of the pancreatic program. *Rev. Diabet. Stud.* 11, 51–83.
- Seymour, P.A., Freude, K.K., Dubois, C.L., Shih, H.P., Patel, N.A., and Sander, M. (2008). A dosage-dependent requirement for Sox9 in pancreatic endocrine cell formation. *Dev Biol* 323, 19–30.
- Seymour, P. a, Freude, K.K., Tran, M.N., Mayes, E.E., Jensen, J., Kist, R., Scherer, G., and Sander, M. (2007). SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1865–1870.
- Seymour, P. a, Shih, H.P., Patel, N. a, Freude, K.K., Xie, R., Lim, C.J., and Sander, M. (2012). A Sox9/Fgf feed-forward loop maintains pancreatic organ identity. *Development* 139, 3363–3372.
- Spalding, K.L., Bhardwaj, R.D., Buchholz, B.A., Druid, H., and Frisén, J. (2005). Retrospective birth dating of cells in humans. *Cell* 122, 133–143.
- Steven, S., Hollingsworth, K.G., Small, P.K., Woodcock, S.A., Pucci, A., Aribisala, B., Al-Mrabeh, A., Daly, A.K., Batterham, R.L., and Taylor, R. (2016). Weight Loss Decreases Excess Pancreatic Triacylglycerol Specifically in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 39, 158–165.
- Stoffers, D.A., Zinkin, N.T., Stanojevic, V., Clarke, W.L., and Habener, J.F. (1997). Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat Genet* 15, 106–110.
- Stumvoll, M., Goldstein, B.J., and Van Haefen, T.W. (2005). Type 2 diabetes: Principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365, 1333–1346.
- Suh, J.M., Jonker, J.W., Ahmadian, M., Goetz, R., Lackey, D., Osborn, O., Huang, Z., Liu, W., Yoshihara, E., van Dijk, T.H., et al. (2014). Endocrinization of FGF1 produces a neomorphic and potent insulin sensitizer. *Nature*.
- Sullivan, B.A., Hollister-Lock, J., Bonner-Weir, S., and Weir, G.C. (2015). Reduced Ki67 staining in the postmortem state calls into question past conclusions about the lack of turnover

of adult human β -Cells. *Diabetes* 64, 1698–1702.

Sun, X., Fu, X., Han, W., Zhao, Y., Liu, H., and Sheng, Z. (2011). Dedifferentiation of human terminally differentiating keratinocytes into their precursor cells induced by basic fibroblast growth factor. *Biol Pharm Bull* 34, 1037–1045.

Suzuki, K., Mitsutake, N., Saenko, V., Suzuki, M., Matsuse, M., Ohtsuru, A., Kumagai, A., Uga, T., Yano, H., Nagayama, Y., et al. (2011). Dedifferentiation of human primary thyrocytes into multilineage progenitor cells without gene introduction. *PLoS One* 6, e19354.

Swisa, A., Avrahami, D., Eden, N., Zhang, J., Feleke, E., Dahan, T., Cohen-Tayar, Y., Stolovich-Rain, M., Kaestner, K.H., Glaser, B., et al. (2017). PAX6 maintains β cell identity by repressing genes of alternative islet cell types. *J Clin Invest* 127, 230–243.

Szabat, M., Lynn, F.C., Hoffman, B.G., Kieffer, T.J., Allan, D.W., and Johnson, J.D. (2012). Maintenance of beta-cell maturity and plasticity in the adult pancreas: developmental biology concepts in adult physiology. *Diabetes* 61, 1365–1371.

Talchai, C., Xuan, S., Lin, H. V, Sussel, L., and Accili, D. (2012). Pancreatic beta cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic beta cell failure. *Cell* 150, 1223–1234.

Taylor, R. (1989). Aetiology of non-insulin dependent diabetes. *Br Med Bull* 45, 73–91.

The GBD 2015 Obesity Collaborators (2017). Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N Engl J Med* 377, 13–27.

Turner, R.C., Cull, C.A., Frighi, V., and Holman, R.R. (1999). Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *JAMA* 281, 2005–2012.

Tushuizen, M.E., Bunck, M.C., Pouwels, P.J., Bontemps, S., van Waesberghe, J.H., Schindhelm, R.K., Mari, A., Heine, R.J., and Diamant, M. (2007). Pancreatic fat content and beta-cell function in men with and without type 2 diabetes. *Diabetes Care* 30, 2916–2921.

U.K. Prospective Diabetes Study (1995). U.K. Prospective diabetes study 16: Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: A progressive disease. *Diabetes* 44, 1249–1258.

UKPDS study (1991). UK prospective diabetes study (UKPDS) - VIII. Study design, progress and performance. *Diabetologia* 34, 877–890.

Vague, P., and Moulin, J.P. (1982). The defective glucose sensitivity of the B cell in non insulin dependent diabetes. Improvement after twenty hours of normoglycaemia. *Metabolism* 31, 139–142.

De Vos, A., Heimberg, H., Quartier, E., Huypens, P., Bouwens, L., Pipeleers, D., and Schuit, F. (1995). Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *J Clin Invest* 96, 2489–2495.

Waddington, C.H. (1940). *Organisers & genes* (The University Press).

Waddington, C.H. (1957). *The strategy of the genes. A discussion of some aspects of theoretical biology.* (London: Allen & Unwin).

Wang, S., Beattie, G.M., Mally, M.I., Cirulli, V., Itkin-Ansari, P., Lopez, A.D., Hayek, A., and

- Levine, F. (1997). Isolation and characterization of a cell line from the epithelial cells of the human fetal pancreas. *Cell Transplant* 6, 59–67.
- Wang, S., Yang, Q., Yu, S., Pan, R., Jiang, D., Liu, Y., Hu, H., Sun, W., Hong, X., Xue, H., et al. (2016). Fibroblast growth factor 1 levels are elevated in newly diagnosed type 2 diabetes compared to normal glucose tolerance controls. *Endocr J* 63, 359–365.
- Wang, Z., York, N.W., Nichols, C.G., and Remedi, M.S. (2014). Pancreatic β cell dedifferentiation in diabetes and redifferentiation following insulin therapy. *Cell Metab* 19, 872–882.
- Wasserfall, C., Nick, H.S., Campbell-Thompson, M., Beachy, D., Haataja, L., Kusmartseva, I., Posgai, A., Beery, M., Rhodes, C., Bonifacio, E., et al. (2017). Persistence of Pancreatic Insulin mRNA Expression and Proinsulin Protein in Type 1 Diabetes Pancreata. *Cell Metab* 26, 568–575.e3.
- Weinberg, N., Ouziel-Yahalom, L., Knoller, S., Efrat, S., and Dor, Y. (2007). Lineage tracing evidence for in-vitro dedifferentiation, but rare proliferation, of mouse pancreatic β cells. *Diabetes* 56.
- Weir, G.C. (1995). Which comes first in non-insulin-dependent diabetes mellitus: insulin resistance or beta-cell failure? Both come first. *JAMA* 273, 1878–1879.
- Weir, G.C., and Bonner-Weir, S. (2011). Finally! A human pancreatic β cell line. *J Clin Invest* 121, 3395–3397.
- Weyer, C., Bogardus, C., Mott, D.M., and Pratley, R.E. (1999). The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 104, 787–794.
- World Health Organization (2016). *Global Report on Diabetes* (World Health Organization).
- Xie, R., Everett, L.J., Lim, H.W., Patel, N.A., Schug, J., Kroon, E., Kelly, O.G., Wang, A., D'Amour, K.A., Robins, A.J., et al. (2013). Dynamic chromatin remodeling mediated by polycomb proteins orchestrates pancreatic differentiation of human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 12, 224–237.
- Yamashita-Sugahara, Y., Matsumoto, M., Ohtaka, M., Nishimura, K., Nakanishi, M., Mitani, K., Okazaki, Y., Kakleas, K., Soldatou, A., Karachaliou, F., et al. (2016). An inhibitor of fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR1) promotes late-stage terminal differentiation from NGN3+ pancreatic endocrine progenitors. *Sci. Reports* 6, 35908.
- Yoon, K.H., Ko, S.H., Cho, J.H., Lee, J.M., Ahn, Y.B., Song, K.H., Yoo, S.J., Kang, M. Il, Cha, B.Y., Lee, K.W., et al. (2003). Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 2300–2308.
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., et al. (2001). Role of AMP-Activated Protein Kinase in Mechanism of Metformin Action. *J Clin Invest* 108, 1167–1174.

Annexes

Les pages suivantes présentent les articles auxquels j'ai contribué au cours de ma thèse. Tous sont en lien avec la cellule bêta pancréatique, point central de mon travail de thèse et des travaux « annexes » que j'ai pu réaliser.

β -cell Mass in Nondiabetic Autoantibody-Positive Subjects: An Analysis Based on the Network for Pancreatic Organ Donors Database

Marc Diedisheim, Roberto Mallone, Christian Boitard, and Etienne Larger

CNRS UMR8104, INSERM U1016, Institut Cochin, Faculté de Médecine (M.D., R.M., C.B., E.L.), Université Paris Descartes Sorbonne Paris Cité, 75014 Paris, France; Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Service de Diabétologie and Département Hospitalo-Universitaire "AUTHORS" (R.M., C.B., E.L.), Cochin Hospital, 75014 Paris, France

Context: Little information is available about β -cell mass in antibody-positive (Ab+) nondiabetic subjects.

Objective: We have investigated whether the publicly available virtual slides of the Network for Pancreatic Organ Donors with Diabetes (nPOD) project can be used to assess β -cell mass and distribution in nondiabetic antibody-negative (Ab-) and antibody-positive (Ab+) subjects and in patients with recent-onset type 1 diabetes (T1D).

Subjects and Methods: We developed a semi-automated quantification method and applied it to 415 insulin-stained slides from 69 Ab- subjects, 101 slides from 18 Ab+ subjects, and 46 slides from eight recent-onset (<3 y) T1D subjects. Among these subjects, 48, 17, and seven had an available pancreatic mass, respectively, and were used for the quantification of β -cell mass.

Results: In Ab- subjects, the β -cell and endocrine mass were 0.66 ± 0.42 and 1.0 ± 0.65 g, respectively. Nonexocrine tissue represented 29% of pancreatic area, a proportion that increased with age. Proportional β -cell area relative to total pancreatic area was higher in the tail compared with head (0.83 vs 0.71%; $P < .001$). In Ab+ subjects, β -cell mass and β -cell area were similar to those of Ab- individuals, whereas these parameters were dramatically decreased in recent-onset T1D patients.

Conclusion: The virtual slides of the nPOD project can be used for quantification projects. In Ab+ nondiabetic subjects, the β -cell mass was not decreased. However, as this cohort is largely composed of donors from the general population, with a single autoantibody, future studies with a larger number of donors with multiple autoantibodies and predisposing human leucocyte antigen genes are required to better define the dynamics of β -cell destruction in the preclinical phases of T1D. (*J Clin Endocrinol Metab* 101: 1390–1397, 2016)

Analysis of pancreatic pathology in diabetes has been limited by the rare availability of pancreatic specimens. Thus, most data have been obtained from autoptic material, with few rare exceptions (1–3). The Network for Pancreatic Organ Donors with Diabetes (nPOD) has been launched to provide access to high-quality pancreatic specimens for research purposes (4). Although initially

created to promote research on type 1 diabetes (T1D), nPOD also collects pancreata from type 2 diabetes (T2D) and nondiabetic subjects. To date, the nPOD repository contains more than 300 pancreatic specimens, and high-magnification digital images (virtual slides) stained with several antibodies (Abs) are available on the nPOD website (www.jdrfnpod.org).

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197

Printed in USA

Copyright © 2016 by the Endocrine Society

Received October 22, 2015. Accepted January 25, 2016.

First Published Online February 1, 2016

Abbreviations: Abs, antibodies; BMI, body mass index; HbA1c, glycated hemoglobin; nPOD, Network for Pancreatic Organ Donors with Diabetes; T1D, type 1 diabetes; T2D, type 2 diabetes.

Xenotropic retrovirus *Bxv1* in human pancreatic β cell lines

Jeannette S. Kirkegaard,^{1,2} Philippe Ravassard,³ Signe Ingvarsen,¹ Marc Diedisheim,⁴ Emilie Bricout-Neveu,⁵ Mads Grønberg,¹ Thomas Frogne,¹ Raphael Scharfmann,⁴ Ole D. Madsen,¹ Claude Rescan,¹ and Olivier Albagli⁴

¹Novo Nordisk A/S, Måløv, Denmark. ²Institute of Biomedicine, Copenhagen University, Copenhagen, Denmark. ³Institut du Cerveau et de la Moelle (ICM), Biotechnology and Biotherapy Team, CNRS UMR 7225; INSERM U1127, University Pierre et Marie Curie, Paris, France. ⁴INSERM U1016 UMR CNRS 8104, Institute Cochin, University Paris Descartes, Paris, France.

⁵Endocells, Pépinière d'Entreprises ICM, Paris, France.

It has been reported that endogenous retroviruses can contaminate human cell lines that have been passaged as xenotransplants in immunocompromised mice. We previously developed and described 2 human pancreatic β cell lines (EndoC- β H1 and EndoC- β H2) that were generated in this way. Here, we have shown that B10 xenotropic virus 1 (*Bxv1*), a xenotropic endogenous murine leukemia virus (MuLV), is present in these 2 recently described cell lines. We determined that *Bxv1* was also present in SCID mice that were used for in vivo propagation of EndoC- β H1/2 cells, suggesting that contamination occurred during xenotransplantation. EndoC- β H1/2 cells released *Bxv1* particles that propagated to human 293T and *Mus dunni* cells. Mobilization assays demonstrated that *Bxv1* transcomplements defective MuLV-based retrovectors. In contrast, common rodent β cell lines, rat INS-1E and RIN-5F cells and mouse MIN6 and β TC3 cells, displayed either no or extremely weak xenotropic helper activity toward MuLV-based retrovectors, although xenotropic retrovirus sequences and transcripts were detected in both mouse cell lines. *Bxv1* propagation from EndoC- β H1/2 to 293T cells occurred only under optimized conditions and was overall poorly efficient. Thus, although our data imply that MuLV-based retrovectors should be cautiously used in EndoC- β H1/2 cells, our results indicate that an involuntary propagation of *Bxv1* from these cells can be easily avoided with good laboratory practices.

Introduction

Diabetes is caused by deficiency or malfunction of pancreatic β cells. Our understanding of the mechanisms underlying β cell maintenance and failure in humans has been hampered by the scarcity of material available for research. It is hence a major breakthrough that 2 functional human β cell lines, termed EndoC- β H1 and EndoC- β H2, have recently become available (1, 2).

EndoC- β H1/2 cell lines were developed from human fetal pancreatic buds. Pancreatic cells were transduced with lentivectors encoding SV40 T antigen and human telomerase and amplified through several passages as xenotransplants in SCID mice (1, 2). Cell lines developed by this method are at risk of infection by endogenous xenotropic murine leukemia viruses (X-MuLVs) (3). X-MuLVs are gammaretroviruses that infect proliferating cells from most mammalian species, including human and wild mice, through a receptor encoded by the *Xpr1* gene (4, 5). Most mouse laboratory strains are refractory to infection by X-MuLVs because they express a restrictive allele of *Xpr1* (*Xpr1ⁿ*). They still harbor X-MuLVs as endogenous retroviruses, probably because the germ cells of their wild ancestors were infected before the acquisition

of *Xpr1ⁿ* (5). X-MuLVs were first isolated from NZB mice and then were found in most laboratory mouse strains (5). Production of infectious X-MuLV particles depends on the strain carrying the provirus. They are produced throughout life by NZB and F/St mice. In most other strains, viruses are barely (or not at all) detectable, although their production can be induced by immune stimuli such as xenotransplantation (5).

Contamination of xenografted human cells by endogenous X-MuLVs has been reported since the 1970s, but few studies have provided comprehensive data regarding origin, expression, titer, propagation, and transcomplementation properties of the invading virus. We report here that human EndoC- β H1/2 cells contain several copies of B10 xenotropic virus 1 (*Bxv1*), probably acquired during their expansion in SCID mice. Exposure of human cells to EndoC- β H1/2 cell-conditioned medium turns them into *Bxv1* infected and producing cells. However, this propagation is poorly efficient, possibly because *Bxv1* titers in EndoC- β H1/2-conditioned medium are relatively low. Finally, we show that *Bxv1* transcomplements MuLV-based retrovectors.

Results and Discussion

EndoC- β H1 cells express a xenotropic envelope protein. To generate new mAbs against human pancreatic β cell surface markers, we created a hybridoma library from mice immunized with cultured EndoC- β H1 cells (Kirkegaard et al., unpublished observations). One of these mAbs, termed 13F25, stained plasma membranes of EndoC- β H1, but not HepG2, cells, which are a human hepatoma-derived cell line (Figure 1A). The detected protein was concentrat-

Authorship note: J.S. Kirkegaard and P. Ravassard are co-first authors. C. Rescan and O. Albagli are co-senior authors.

Conflict of interest: P. Ravassard and R. Scharfmann are shareholders and consultants of Endocells. E. Bricout-Neveu is an employee of Endocells. J.S. Kirkegaard, T. Frogne, M. Grønberg, O.D. Madsen, and C. Rescan are employees of Novo Nordisk A/S.

Submitted: July 2, 2015; **Accepted:** January 14, 2016.

Reference information: *J Clin Invest*. 2016;126(3):1109–1113. doi:10.1172/JCI83573.

REVIEW ARTICLE

Mass production of functional human pancreatic β -cells: why and how?

R. Scharfmann PhD | M. Didiesheim MD | P. Richards PhD | V. Chandra PhD |
M. Oshima MSci | O. Albagli PhD

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

Conflict of interest: R. Scharfmann is
shareholder and consultant for Endocells

Corresponding Author: Raphael Scharfmann,
INSERM U1016 - Cochin Institute, Bâtiment
Cassini 123, Boulevard de Port-Royal, 75014
Paris, France (Raphael.scharfmann@inserm.fr).

Diabetes (either type 1 or type 2) is due to insufficient functional β -cell mass. Research has, therefore, aimed to discover new ways to maintain or increase either β -cell mass or function. For this purpose, rodents have mainly been used as model systems and a large number of discoveries have been made. Meanwhile, although we have learned that rodent models represent powerful systems to model β -cell development, function and destruction, we realize that there are limitations when attempting to transfer the data to what is occurring in humans. Indeed, while human β -cells share many similarities with rodent β -cells, they also differ on a number of important parameters. In this context, developing ways to study human β -cell development, function and death represents an important challenge. This review will describe recent data on the development and use of convenient sources of human β -cells that should be useful tools to discover new ways to modulate functional β -cell mass in humans.

KEYWORDS

β -cells, β -cell lines, GPR68, human, pancreatic, RFX6, stem cells

1 | INTRODUCTION

β -Cells are rare specialized cells devoted to produce large amounts of insulin that is stored within granules and secreted in a tightly regulated fashion.¹ In the pancreas, β -cells are clustered, forming micro-organs, named the islets of Langerhans. A human pancreas contains around 1 million islets and each islet contains hundreds of β -cells.² Due to their stochastic spatial distribution, imaging human pancreatic islets in vivo remains extremely challenging.³ Human islet purification from cadaveric donors is possible, but quantitatively limited, with major variation in terms of purity from one preparation to another.⁴ In the past, we have learned a lot about β -cells using animal models, primarily rat and mouse. In such species, islets can be prepared from which β -cells are purified and studied in great detail. By performing comparative analyses, however, we have learned that while rodent and human β -cells share many similarities, they also differ on a number of important parameters.^{5,6} In this context, developing ways to analyse human β -cells in great detail currently represents a major challenge.

In this review, we will summarize our knowledge on similarities and differences between rodent and human β -cells. We will next concentrate on the different human β -cell sources that can be used to study this specific cell type.

2 | SIMILARITIES AND DIFFERENCES BETWEEN RODENT AND HUMAN β -CELLS

Pancreatic β -cells can be considered as factories whose major task is to produce huge amounts of insulin (more than 20% of β -cell mRNA codes for insulin)⁷ that is stored and secreted upon specific stimulation. During the past years, we have learned that while rodent β -cells represent an extremely useful model to approximate human β -cells, more remains to be learned by directly working on human β -cells. Indeed, rodent and human β -cells share many similarities, but also a number of differences. As a first example, two genes encode insulin in rodents (both rats and mice), while there is only one insulin gene in humans. Noticeable differences also exist concerning the expression of β -cell-specific transcription factors. For example, in rodents, the transcription factor MAFB is expressed by α -cells (glucagon-producing cells) and absent from β -cells. On the other hand, both α - and β -cells express this transcription factor in human.⁸ Glucose transport is also not identical between rodent and human: in rodents, glucose transport in β -cells is mainly dependent of GLUT2 (SLC2A2), while GLUT1 (SLC2A1) plays a major role in human β -cells.^{9,10} Interspecies differences do also exist in terms of insulin secretion: human β -cells differ from rodent cells in several aspects of voltage-gated ion

Dual role of Mucosal-Associated Invariant T cells in type 1 diabetes

Ophélie Rouxel^{1,2,3*}, Jennifer DaSilva^{1,2,3§}, Lucie Beaudoin^{1,2,3§}, Isabelle Nel^{1,2,3}, Céline Tard^{1,2,3}, Lucie Cagninacci^{1,2,3}, Badr Kiaf^{1,2,3}, Masaya Oshima^{1,2}, Marc Diedisheim^{1,2}, Jamie Rossjohn^{4,5,6}, James McCluskey⁷, Raphael Scharfmann^{1,2}, Manuela Battaglia⁸, Michel Polak⁹⁻¹⁰, Olivier Lantz¹¹, Jacques Beltrand⁹⁻¹⁰, Agnès Lehuen^{1,2,3}.

Author Affiliations: ¹INSERM U1016, Institut Cochin, Paris, France and Université Paris Descartes; ²CNRS, UMR8104, Paris, France. ³Laboratoire d'Excellence INFLAMEX, Sorbonne Paris Cité, France; ⁴ARC Centre of Excellence in Advanced Molecular Imaging, ⁵Infection and Immunity Program and Department of Biochemistry and Molecular Biology, Biomedicine Discovery Institute, Monash University, Clayton, Victoria 3800, Australia; ⁶Institute of Infection and Immunity, Cardiff University, Cardiff, UK; ⁷Department of Microbiology and Immunology, Peter Doherty Institute for Infection and Immunity, University of Melbourne, Parkville, Australia. ⁸Diabetes Research Institute (DRI), IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy; TrialNet Clinical Center, San Raffaele Hospital Milan, Italy. ¹⁰Service Endocrinologie, Gynécologie et Diabétologie Pédiatrique, Hôpital Universitaire Necker Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France. ¹⁰Faculté de Médecine Paris Descartes, Université Sorbonne Paris Cité, Paris, France. ¹¹INSERM U932, Institut Curie, Paris, France.

Author Notes: *O. Rouxel, § J. DaSilva and L. Beaudoin contributed equally to this paper.

Corresponding Author: Agnès Lehuen, INSERM 1016, Institut Cochin, Paris, France. Phone: +331 76 53 55 90; Fax : +331 46 34 64 54; E-mail : agnes.lehuen@inserm.fr.

Abstract (150 words)

Type 1 diabetes is an autoimmune disease resulting from the destruction of pancreatic-beta cells by the immune system involving innate and adaptive immune cells. Mucosal-associated invariant T (MAIT) cells are innate-like T-cells recognizing bacterial riboflavin-precursor derivatives presented by the MHC-I related molecule, MR1. Since T1D is associated with gut microbiota modification, we investigated MAIT cells in this pathology. In T1D patients and non-obese (NOD) diabetic mice, we detected MAIT cell alterations, including increased granzyme B production, which occur before disease onset. Analysis of NOD mice deficient for MR1, and therefore lacking MAIT cells, revealed a loss of gut integrity, increased anti-islet responses associated with exacerbated diabetes. Altogether our data highlight the role of MAIT cells in the maintenance of gut integrity and the control of anti-islet autoimmune responses. MAIT cell monitoring could represent a new biomarker in T1D while their manipulation may open new therapeutic strategies.

Introduction

Type 1 Diabetes (T1D) is an auto-immune disease characterized by the selective destruction of pancreatic islet β cells producing insulin, in the context of an underlying multigenetic inheritance¹. When most of the β cells are destroyed or non-functional, the consecutive lack of insulin results in hyperglycemia and requires a life-long insulin replacement therapy¹. The pathophysiology of T1D involves both innate and adaptive immune systems that are inappropriately activated inducing a loss of self-tolerance and islet destruction²⁻⁵. T1D is characterized by the presence of anti-islet autoantibodies and autoreactive T cells. Innate immune cells are involved at various stages of the disease and are particularly important for the initiation of the local immune response in the pancreas and the pancreatic lymph nodes^{2,4}. Recent data have highlighted the role of the intestinal microbiota in T1D by transfer experiments in NOD mice⁶⁻⁹ and gut microbiota differences in children associated with T1D development¹⁰⁻¹². Several studies also described gut mucosa alterations in NOD mice and T1D patients¹³⁻¹⁷.