



Impact du diabète de type 2 sur la fonctionnalité et le potentiel angiogénique des cellules souches mésenchymateuses

Jonathan Ribot

► To cite this version:

Jonathan Ribot. Impact du diabète de type 2 sur la fonctionnalité et le potentiel angiogénique des cellules souches mésenchymateuses. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2015. Français. NNT : 2015PESC0045 . tel-01337237

HAL Id: tel-01337237

<https://theses.hal.science/tel-01337237>

Submitted on 24 Jun 2016

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

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

MENTION BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

Impact du diabète de type 2 sur la fonctionnalité et le potentiel angiogénique des cellules souches mésenchymateuses

Présentée par Jonathan Ribot

Dirigée par le Dr. Fani Anagnostou

Soutenue le 15 décembre 2015 devant le jury composé de

Dr. Graciela Pavon-Djavid
Dr. Jean-Jacques Lataillade
Dr. Catherine Boisson-Vidal
Dr. Hervé Petite
Dr. Fani Anagnostou

Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examineur/Président du jury
Directrice de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur Fani Anagnostou qui a dirigé mon travail de thèse. Sa rigueur scientifique, sa détermination et sa franchise ont été une vraie leçon pour moi. Je la remercie également pour la confiance qu'elle a su me témoigner et pour l'intérêt qu'elle porte à ses collaborateurs.

Je remercie également le docteur Hervé Petite qui m'a accueilli dans son équipe et qui m'a aidé à me sentir à l'aise dans ce nouvel environnement. Je le remercie également pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

J'adresse également mes remerciements aux docteurs Graciela Pavon-Djavid et Jean-Jacques Lataillade ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail. J'associe à ces remerciements le docteur Catherine Boisson-Vidal qui a accepté d'en être examinatrice également.

Je remercie également tous les membres de l'équipe diabète et cellules souches : Céline, Cyprien, Guavri, Guilhem pour les bons moments passés ensemble dans le bureau, dans le labo ou au LI. Je garderai en mémoire quelques discussions très intéressantes ainsi que l'esprit de solidarité qui règne au sein de l'équipe.

Je remercie également les autres membres du B2OA : Adeline, Adrien, Delphine, Esther, Joseph, Karim, Marianne, Mickael, Morad, Nathanael, Pierre et tous les autres que j'oublie ou qui sont arrivés et reparties durant mon séjour au B2OA. Merci de m'avoir accueilli et intégré au sein de l'équipe.

Je suis également reconnaissant envers ma famille et mes amis. Je remercie tout particulièrement mes parents qui m'ont encouragé à continuer quand les choses n'étaient pas forcément faciles et mon frère qui a su être là au moment où j'en avais besoin.

LISTE DES ABREVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES.....	4
TABLE DES ILLUSTRATIONS	6
Introduction générale	7
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	10
Le diabète sucré.....	11
Histoire	11
Epidémiologie.....	13
Le diabète insulino-dépendant (type 1)	14
Le diabète non insulino-dépendant (type 2)	15
Physiopathologie	16
Traitements	22
Les complications chroniques du diabète sucré	24
Complications macrovasculaires	24
Complications microvasculaires	27
Rétinopathie diabétique.....	27
Néphropathie diabétique	29
Neuropathie diabétique	30
L'angiogenèse « paradoxale » dans la maladie diabétique.....	32
La mémoire métabolique	34
Les mécanismes de la mémoire métabolique.	35
Le stress oxydatif	35
L'épigénétique.....	36
Modèle de diabète de type 2:.....	39
Les différents modèles de diabète de type 2	39
Le rat ZDF	41
Lésions pancréatiques	41
Lésions oculaires.....	42
Lésions rénales	43
Lésions neurales	43
Troubles musculo-squelettiques	44
Les cellules souches	45
Les cellules souches embryonnaires humaines (hES).....	46
Les cellules souche pluripotentes induites (IPS)	47
Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)	48
Histoire.....	49
Potentiel de différenciation	51
Modulation immunitaire.....	52

Capacité paracrine des CSMs	53
Thérapie cellulaire	60
Le choix des cellules.....	60
Le potentiel thérapeutique des CSMs	60
Thérapie cellulaire et angiogenèse.....	61
Impact du diabète sur les CSMs	64
Impact de diabète sur le potentiel de différenciation des CSMs	64
Impact du diabète sur la viabilité des CSMs.....	66
Impact du diabète sur l'effet paracrine des CSMs.....	66
Objectif de l'étude.....	69
 Introduction de l'article 1.....	 70
Article 1: Experimental Type 2 Diabetes impairs differently functional properties of Bone Marrow mesenchymal stromal cells pertinent to tissue engineering.	74
ABSTRACT	76
INTRODUCTION	77
MATERIALS AND METHODS	80
RESULTS.....	87
DISCUSSION.....	90
REFERENCES	95
FIGURES LEGENDS	98
 Introduction de l'article 2.....	 697
Article 2: Type 2 diabetes impairs the mesenchymal stem cell secretome composition and angiogenic properties.	110
ABSTRACT	112
INTRODUCTION	113
MATERIALS AND METHODS	115
RESULTS.....	121
DISCUSSION.....	127
REFERENCES	132
FIGURES	135
Discussion et perspectives.....	151
References.....	155
Annexes	172
Abstract.....	173

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

α MEM: Alpha modified Eagle's medium

AND: acide désoxyribonucléique

AGE: advanced glycation end-product (produits avancés de glycation)

ARNm: Acide ribonucléique messenger

bFGF: Basic fibroblast growth factor

BSA : bovine serum albumin (albumine sérique de boeuf)

cellules ES: Cellules souches embryonnaires

CFUs-F: Colony forming units-fibroblastic

CSA: Cellules souches adultes

CSM: Cellules souches mésenchymateuses

DMSO : Diméthylsulfoxyde

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène

HGF: Hepatocyte growth factor

HIF-1 α : Hypoxia iducible factor-1 alpha

HUVEC: Human umbilical vein endothelial cells

IGF-1: Insulin growth factor-1

IL-6 :Interleukine-6

IL-8: Interleukine-8

iPS: Induced pluripotent stem cells

MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1

MTT : Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tetrazolium

NO : Monoxyde d'azote

PBS: Phosphate buffer saline

PFA: Paraformaldéhyde

PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

qRT-PCR : Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel

RAGE: Receptor for Advanced Glycation end product

ROS : reactive oxygen species (dérivés actifs de l'oxygène)

SDF-1: Stromal-derived factor-1

VEGF: Vascular endothelial growth factor

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Carte du monde des individus diabétiques en 2014	14
Figure 2: Physiopathologie du diabète de type 2	17
Figure 3: Schéma illustratif d'une plaque d'athérosclérose.....	26
Figure 4: La rétinopathie diabétique.....	29
Figure 5: L'angiogenèse paradoxale dans la maladie diabétique	34
Figure 6: Illustration des processus épigénétique de méthylation de l'ADN et d'acétylation des histones et leur relation réciproque avec les ARNs non codants.	38
Figure 7: Illustration des différents modèles de rat de diabète de type 2 et les complications associés en fonction de leur âges.	40
Figure 8: Ilots pancréatiques de rat ZDF.....	42
Figure 9: Différentes sortes de cellules souches.....	45
Figure 10: Isolement de cellules souches embryonnaires	46
Figure 11: Méthodes de reprogrammation de cellules somatiques adultes.	48
Figure 12: cellules souches mésenchymateuses en culture	50
Figure 13: Capacité de différenciation des CSMs	52
Figure 14: Capacité paracrine des CSMs	54

Introduction générale

Le diabète de type 2 est un problème de santé publique mondial et croissant. Le nombre de patients est important depuis ces dernières décennies et ne cesse d'augmenter. **En France, le nombre des patients atteints d'un diabète de type 2 s'élève à 3 millions.**

Le diabète de type 2 peut engendrer de graves complications, avec une mortalité élevée, mais aussi une prise en charge longue et coûteuse pour la société. **Les complications les plus courantes sont macro- et micro- vasculaires** et affectent le cœur, le rein, les nerfs, les yeux. Chez le diabétique, l'angiogenèse est défectueuse et le développement de néovaisseaux est considérablement réduit. Le tissu osseux n'est pas épargné. La microangiopathie induit un défaut d'angiogenèse induit des microangiopathie qui modifient le microenvironnement de la moelle osseuse ce qui peut modifier les fonctionnalités des cellules qui la compose, Ce défaut de fonctionnement des cellules peut avoir un effet sur les pathologies notamment vasculaire lié au diabète, car les cellules stromales mésenchymateuses de la moelle (BMMSCs) participent activement au processus d'angiogenèse. Ainsi, **une angiogenèse exacerbée chez le diabétique** est responsable de pathologie telle que la rétinopathie ou la néphropathie diabétique alors qu'un défaut d'angiogenèse entraîne des problèmes de cicatrisation de nombreux organes notamment les os. Chez le diabétique, l'angiogenèse est paradoxale et **dans les différents tissus coexiste** à la fois un milieu anti et proangiogénique. Ceci indique que le microenvironnement local de chaque organe joue un rôle important dans ce processus d'angiogénèse. **De façon étonnante, les données permettant d'expliquer les modifications des BMMSCs dans le cadre du diabète que ce soit du point de vue de leur fonctionnalité ou de leur potentiel angiogénique restent très limitées.**

Les cellules souches adultes ont pour vocation de participer au renouvellement physiologique des tissus matures ou à leur réparation après une lésion ; ceci afin d'assurer la pérennité de la fonction de l'organe pendant la vie de l'individu. Les cellules souches adultes existent, en particulier, dans la moelle osseuse. Ces cellules sont appelées Cellules stromales mésenchymateuses ou **cellules souches mésenchymateuses** et sont connues pour leur potentiel de différenciation et de libération de facteurs paracrins, qui sont impliqués dans la régénération tissulaire. Les

mécanismes qui associent le microenvironnement, les fonctions des CSMs et les problèmes vasculaire et osseux dans un contexte diabétique restent actuellement méconnus. Le diabète peut modifier les caractéristiques des CSMs et le microenvironnement diabétique peut influencer la fonctionnalité de CSMs transplantée tout autant que leurs effets autocrins et/ou paracrins sur les cellules environnantes. L'étude du potentiel de CSMs diabétiques et du microenvironnement diabétique sur de CSMs pourrait alors avoir d'importantes implications cliniques.

Les travaux de cette thèse s'inscrivent donc dans cette quête d'une meilleure compréhension de la réparation osseuse et vasculaire chez l'individu diabétique. Il s'agit d'une thématique du laboratoire de Bioingénierie et Bioimagerie Ostéo-Articulaire (B2OA) qui est une unité mixte de recherche, sous tutelle de l'université Paris Diderot. Depuis sa création en 1977, le B2OA a développé une expertise en ingénierie tissulaire, imagerie afin de développer des approches multidisciplinaires innovantes ayant pour base l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses.

En effet, l'objectif premier de mes travaux de caractériser l'impact du diabète sur la fonctionnalité et le potentiel angiogénique de CSMs à l'aide du modèle de rat dit Zucker Diabetic Fatty (ZDF), et ce en deux temps :

On a d'abord cherché à comprendre l'impact du diabète sur les fonctionnalités des CSMs, puis on a cherché à caractériser l'impact de celui-ci sur les effets paracrins des CSMs et en particulier du secrétome et son potentiel pro-angiogénique.

L'ultime but étant de mieux comprendre l'impact du diabète sur des cellules souches mésenchymateuses afin de déterminer leurs spécificités d'utilisation dans le cadre de la thérapie cellulaire chez l'individu diabétique.

Ce manuscrit comporte trois parties distinctes.

On a tout d'abord une revue bibliographique sur diabète de type 2 et ses complications ainsi que les BMMSCs et la thérapie cellulaire y ayant recours. Ceci afin de mieux cerner le sujet et remettre celui-ci dans son contexte. Dans cette partie est décrit également notre modèle d'étude ainsi que les données bibliographiques sur les modifications des BMMSCs par le diabète ou dans un environnement se rapprochant (tel que l'hyperglycémie).

Dans la deuxième partie de ce manuscrit sont présentés les résultats obtenus sous forme de deux articles. Le premier, porte sur les modifications de fonctionnalité des CSMs issus d'animaux diabétiques et le second des modifications de leur secrétome et de ses propriétés angiogéniques dans cette pathologie. Ceci afin de mettre en évidence les modifications subies par les BMMSCs dans un contexte diabétique tant au niveau de leur fonctionnalité que de leur potentiel sécrétoire. Enfin, les résultats obtenus ont été mis en perspective avec la bibliographie, pour pouvoir amener les perspectives dans ce travail de thèse.

INTRODUCTION

BIBLIOGRAPHIQUE

Le diabète sucré

Les diabètes sucrés sont des maladies associées à une perturbation du métabolisme glucidique. Chez les diabétiques, le taux de glucose sanguin est élevé. Cela est dû à une production d'insuline trop faible voir absente ou à une action de celle-ci insuffisante. Les formes les plus communes de diabètes sont le diabète de type 1 (10%), qui est une maladie auto-immune et le diabète de type 2 (90%), souvent associé à l'obésité (Ghalandari et al., 2015). Il est à noter qu'il existe d'autres formes de diabète très rares (Prasad and Groop, 2015).

On constate de façon alarmante un accroissement des taux de prévalence de manière constante de ces maladies associées à un développement de l'obésité et de la sédentarité ainsi qu'au vieillissement de la population.

Histoire

Les médecins observent les conséquences des diabètes depuis des milliers d'années, mais peu de connaissances sur la maladie furent accumulées au cours de ces siècles (Ahmed, 2002). Ce ne fut d'ailleurs pas avant 1922 que le premier traitement à base d'insuline se vit couronné de succès sur un patient.

Un des effets du diabète est la présence de glucose dans les urines. Des anciens écrits hindous datant de plusieurs milliers d'années documentent comment des fourmis et des mouches étaient attirées spécifiquement par les urines de personnes atteintes de diabète. Le médecin indien Sushruta en 400 avant J.C décrivit le gout sucré des urines de diabétiques et ainsi pour les siècles à venir le gout sucré de l'urine devint le diagnostic clé du diabète sucré.

En 250 avant J.C le terme « diabète » fut utilisé pour la première fois. Il est attribué à Démétrios d'Apnée, médecin grec. C'est un mot grec « diabainen » signifiant « qui passe au travers », cela semble venir de la façon dont le diabète entraîne une évacuation rapide des fluides

corporels. Vivant trois siècles avant notre ère, il met en avant la polyurie des diabétiques, c'est-à-dire la fuite des urines caractéristique de cette maladie. Le terme complet « diabète mellitus » apparut en 1674 et fut rapporté par Thomas Willis, médecin personnel du roi Charles II. Mellitus est le terme latin pour miel, ce fut ainsi que Willis décrivit l'urine de diabétiques « comme infusée avec du miel ».

Une percée dans le puzzle que représente cette maladie est venue en 1889. Les médecins allemands, Joseph von Mering et Oskar Minkowski ont chirurgicalement enlevé le pancréas de chiens. Ces chiens ont immédiatement développé un diabète. Ce qui a permis de faire le lien entre pancréas et diabète et de diriger la recherche vers des traitements à base d'extrait de pancréas.

Plus tard, le Dr. Frederick Banting essaya d'isoler un extrait pancréatique, mais rencontra un certain scepticisme, car de nombreux médecins avant lui avaient tenté quelque chose de semblable. Pour concentrer ce que nous appelons maintenant insuline, Banting eut l'idée de lier le canal pancréatique de chiens. Après plusieurs, les pancréas dégénérèrent en résidus à partir desquels l'insuline a pu être extraite. En juillet 1921, un chien ayant eu son pancréas retiré chirurgicalement a été injecté avec de l'extrait pancréatique. Dans les deux heures suivantes, son taux de sucre sanguin baissa drastiquement. Peu après, un autre chien ayant subi le même sort fut maintenu en vie pendant 8 jours grâce à des injections régulières d'extrait jusqu'à épuisement du stock (Ahmed, 2002) .

Cet extrait permit de traiter un jeune patient qui vit son état global améliorer considérablement. Son taux de sucre sanguin diminua et il a gagné du poids. Ce traitement lui a permis de vivre 13 ans de plus. Il mourut tout de même d'une pneumonie à l'âge de 27 ans.

Certains cas ne répondant pas à cette forme de traitement, Harold Himsworth distingua deux types de diabètes dès 1936, qu'il qualifia de sensible à l'insuline et insensible à l'insuline. À l'heure actuelle, on se réfère à ceux-ci par diabète de type 1 et 2 respectivement.

Durant l'été 1922, la Clinique de Toronto mit en place une production d'insuline en routine et durant les 60 ans qui suivirent l'insuline fut purifiée, raffinée et de nombreux types à action lente ou intermédiaire furent développés pour apporter plus de flexibilité. Une révolution en la matière vint avec la production d'insuline humaine recombinante en 1978 (Ahmed, 2002) qui permit de

ne plus avoir à récolter l'insuline chez les animaux, mais de synthétiser directement de l'insuline humaine.

En 1923, le prix Nobel de médecine fut donné à Banting et Macloed pour la découverte de l'insuline. Puis, en 1958 à Frederick Sanger pour son travail sur la structure des protéines, particulièrement celle de l'insuline (Ahmed, 2002).

Épidémiologie

Le diabète sucré est actuellement un problème de santé publique majeur dans le monde où son taux prévalence augmente de manière constante. Ainsi, le diabète sucré touche actuellement 3,3 millions de personnes en France et environ 387 millions dans le monde (figure 1) (Guariguata, 2013). Les estimations de prévalence en 2035 sont de plus de 592 millions de personnes atteintes dans le monde. Une hyperglycémie chronique conduit bien souvent à de nombreuses complications qui auront une issue fatale dans un grand nombre de cas. De fait, en 2014, une personne meurt toutes les 7 secondes du diabète dans le monde, ce qui représente 4,9 millions de morts par an. Le coût de prise en charge des patients diabétiques est donc très élevé. Dans le monde, le coût des dépenses liées au diabète est estimé à 548 milliards d'USD en 2013 et 1 dollar sur 9 dépensé en soin de santé l'est pour le diabète. Le diabète et notamment ses complications représentent donc un enjeu de santé publique majeur. En effet, les dépenses liées à celui-ci pèsent un poids considérable dans l'industrie de santé et cette maladie pose un problème socio-économique non négligeable.

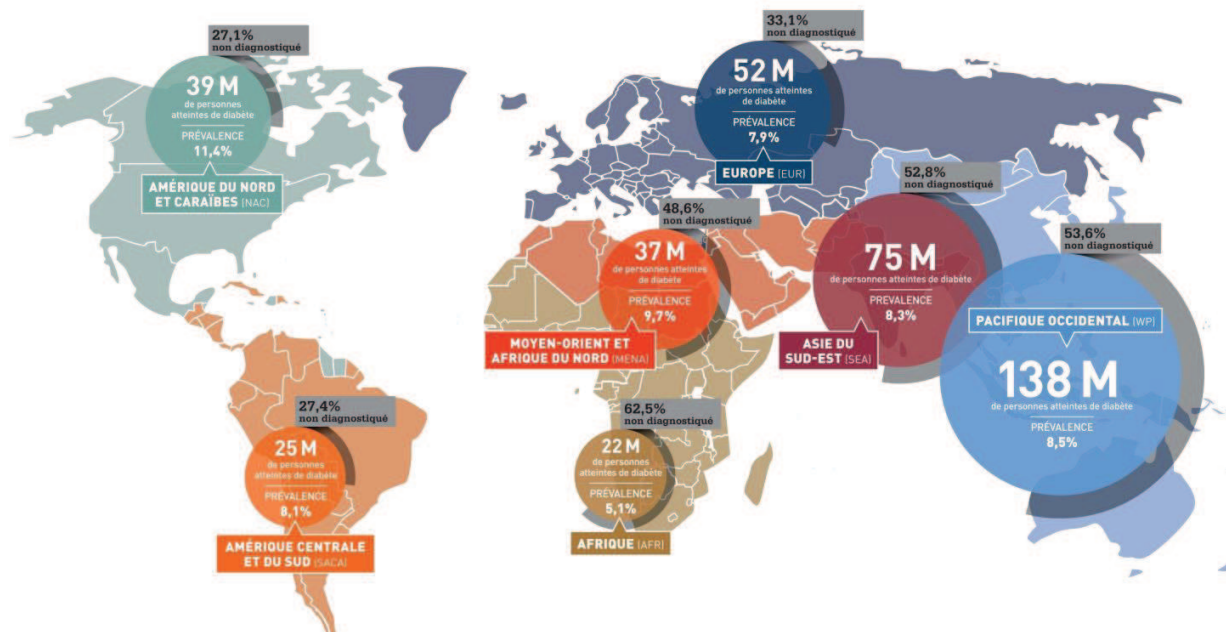


Figure 1 : Carte du monde des individus diabétiques en 2014 (D'après Atlas du diabète de la FID 6e édition)

Le diabète insulino-dépendant (type 1)

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune caractérisée par la destruction des cellules bêta pancréatiques sécrétrices d'insuline. La destruction de ces cellules a pour conséquence une insulino-pénie (production insuffisante d'insuline) ce qui entraîne une hyperglycémie chronique. L'hyperglycémie apparaît après disparition de plus de 80% des cellules bêta fonctionnelles. Ce type de diabète est dit juvénile, car la maladie apparaît bien souvent avant 30 ans chez des sujets donc relativement jeunes. Le diabète de type 1 survient sur un terrain génétique de prédisposition et plus d'une dizaine de gènes ont dore et déjà été liés à l'apparition de celui-ci (Bluestone et al., 2010). Comme il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement définitif du diabète de type 1 (Bluestone et al., 2010), cette maladie nécessite l'injection quotidienne d'insuline à vie.

Le diabète de type 1 représente environ 10 % des cas de diabète observés dans le monde, bien loin derrière le diabète de type 2. L'OMS estime à 15 millions le nombre de diabétiques de type 1 dans le monde. De plus, pour des raisons par encore très bien comprises, mais probablement liées

aux modifications du mode de vie, l'incidence du diabète de type 1 augmente chaque année de 3 à 4% par an (Patterson et al., 2012).

Le diabète non insulino dépendant (type 2)

Le diabète de type 2 est une maladie complexe qui se caractérise par deux points essentiels. Le premier est l'insulinorésistance des tissus, en effet différents tissus développent une insulino résistance ce qui entraîne des besoins accrus en insuline pour maintenir une glycémie normale. L'insulinorésistance entraîne à son tour l'insulinopénie qui est un trouble de l'insulinosécrétion ; celle-ci ne permettant plus à l'organisme de compenser l'augmentation des besoins en insuline. L'organisme est donc incapable d'adapter sa production d'insuline aux besoins des tissus cibles.

Malgré une production d'insuline par le pancréas, son action n'est plus suffisante et il en résulte des dysfonctionnements cellulaires.

L'insulinorésistance est un mécanisme complexe. Elle résulte de l'interaction entre une susceptibilité génétique et des facteurs environnementaux (nutrition, activité sportive...). Ces différents facteurs environnementaux sont responsables de divers effets délétères tels que phénomènes de l'inflammation, du stress oxydant et d'accumulation de lipides dans différents tissus.

Ces phénomènes entraînent une diminution de l'action de l'insuline au niveau des organes cibles tels que le foie, les muscles ou encore le tissu adipeux et une toxicité sur les cellules bêta pancréatiques. La façon dont les cellules bêta pancréatiques vont répondre à ce « stress métabolique » dépend grandement de facteurs génétiques (Prasad and Groop, 2015) et c'est l'ensemble de ces phénomènes qui conduit progressivement à l'apparition d'un diabète de type 2.

Le diabète de type 2 représente 90% des diabètes dans le monde, on parle véritablement d'épidémie, tant son incidence est grande avec 372 millions de personnes touchées, et des prévisions pour les prochaines années très alarmantes. Cette augmentation de la prévalence du diabète tous les ans est due à plusieurs causes, notamment le mode de vie avec une alimentation plus riche et un risque d'obésité élevé. Ainsi certains fonds génétiques qui n'auraient pas

développé cette pathologie avec une alimentation ou un mode de vie autre, développe le diabète de type 2 de façon quasi épidémique (Prasad and Groop, 2015). Il est à noter que l'allongement de l'espérance de vie ainsi qu'un meilleur dépistage de la maladie sont aussi à évoquer dans les prévisions toujours plus alarmantes concernant cette maladie.

Les causes sous-jacentes du diabète de type 2 sont alors plus complexes encore que celles derrière le diabète de type 1, et impliquent de nombreux tissus, de nombreux mécanismes physiopathologiques et de très nombreux gènes (Prasad and Groop, 2015).

Physiopathologie

La physiopathologie du diabète de type 2 implique de nombreux tissus et organes dont le pancréas, le foie, le muscle squelettique, le tissu adipeux, le cerveau, le tractus gastro-intestinal et le rein (Figure 2). La sensibilité réduite à l'insuline (ou résistance à l'insuline) de cellules que ce soit dans le foie, le muscle et le tissu adipeux couplé à un déclin à terme des fonctions des cellules β -pancréatiques entraîne une production d'insuline perturbée, ce qui résulte à terme en hyperglycémie, ce qui marque un diabète de type 2.

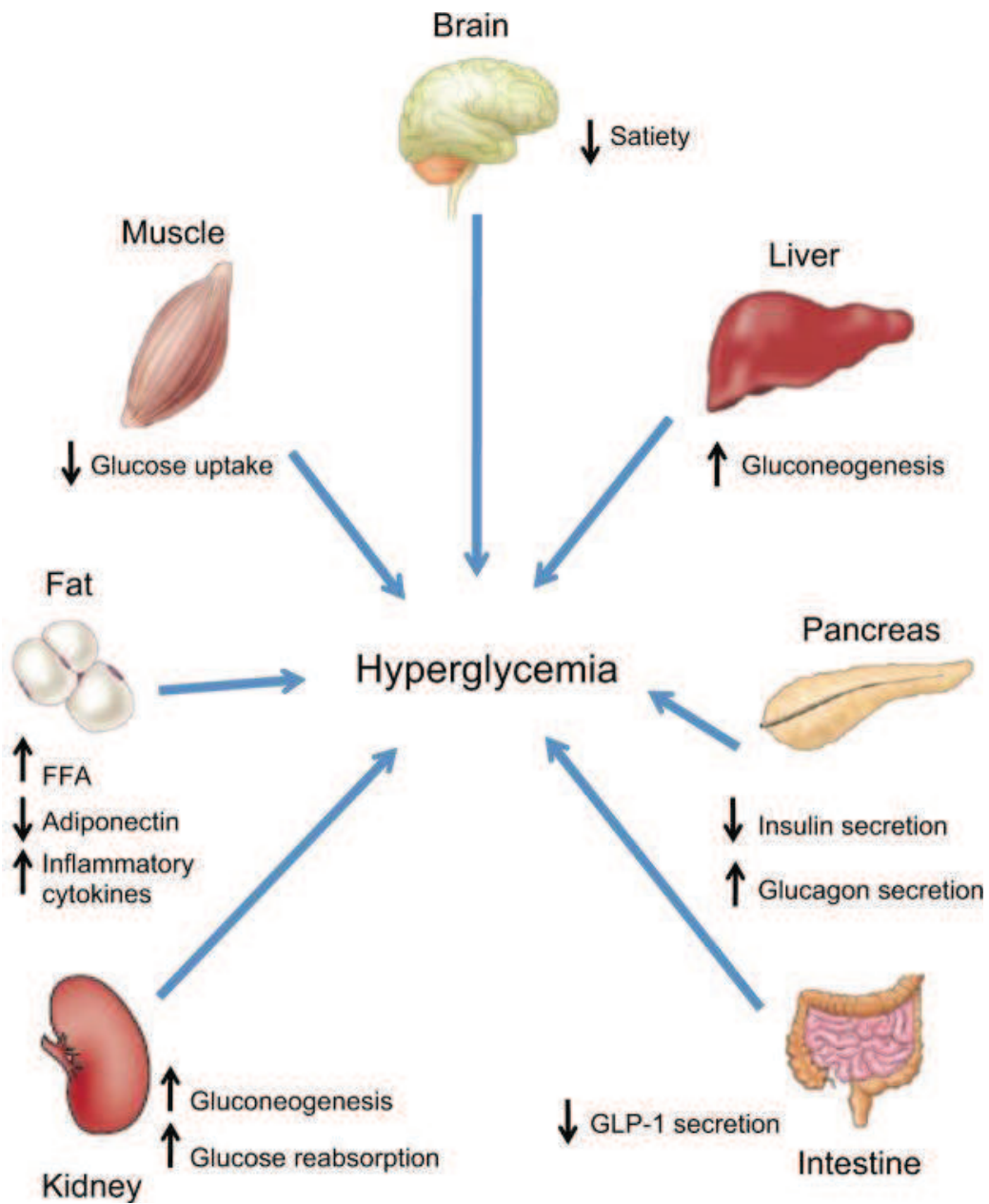


Figure 2: Phvsioopathologie du diabète de tvpe 2 (d'après Cornell S.)

Le pancréas

La modification de l'action de l'insuline et des fonctions des cellules β -pancréatiques apparaît relativement tôt dans le diabète de type 2 (Fonseca, 2009). La résistance à l'insuline peut même être détectée jusqu'à 10 ou 20 ans avant l'apparition d'un diabète de type 2 (Warram et al., 1990). Le passage d'une intolérance au glucose à un diabète de type 2 peut s'associer à une perte de jusqu'à 80% des cellules β -pancréatiques (Abdul-Ghani and DeFronzo, 2009).

Les différents mécanismes qui entrent en jeu dans la diminution des fonctions des cellules β -pancréatiques incluent tout d'abord la génétique. Un nombre de gènes associés avec l'insuline et la perte de fonction des cellules β a été identifié chez les patients atteints de diabète de type 2. Parmi eux, des variants génétiques associés au développement du pancréas ainsi qu'au stockage et au relargage de l'insuline (Grant et al., 2009). Avec la résistance à l'insuline vient une augmentation du besoin de biosynthèse et de relargage de celle-ci. Il a été proposé alors qu'un polymorphisme génétique, chez les patients prédisposés au diabète de type 2, conduit à un échec de l'adaptation des cellules β à la demande, toujours plus grande, en insuline de l'organisme (Kahn et al., 2001).

De nombreuses études montrent aussi une perte de fonction des cellules β et de la sécrétion d'insuline avec l'âge (Chang and Halter, 2003). Ce qui semble consistant avec une prévalence plus élevée du diabète de type 2 chez les personnes vieillissantes.

L'obésité et le manque d'activités physiques sont également des facteurs de risque majeurs impliqués dans l'augmentation de la prévalence du diabète de type 2 dans le monde (Hu, 2011) et sont associés avec la résistance à l'insuline. Un régime riche en sucres rapides induit une augmentation de l'insuline et du taux de glucose sanguin (Hu, 2011) et l'accumulation de graisse dans le foie et les muscles ce qui augmente la résistance à l'insuline de ces tissus (DeFronzo and Tripathy, 2009). La demande en insuline est augmentée et à long terme peut amener à la perte des fonctions des cellules β .

L'exposition chronique des cellules β à des taux élevés de glucose altère alors leur fonction et la sécrétion d'insuline. Les mécanismes impliqués dans la « glucotoxicité » restent encore

méconnus, mais comprennent une altération certaine de l'expression du gène de l'insuline, du stress oxydatif et une apoptose massive des cellules β (Poitout and Robertson, 2002).

Enfin, des concentrations élevées d'acides gras libres dans le sang altèrent également la sécrétion d'insuline chez les patients à risque de développer un diabète de type 2 (Carpentier et al., 2000).

Le foie

Le foie est l'organe principal de la production de glucose dans le corps. La production et le relargage de glucose hépatique dans la circulation viennent à la foi de la gluconéogenèse et de la glycogénolyse (Gerich et al., 2001). Chez les patients atteints de diabète de type 2, il y a surproduction de glucose dans le foie, car il devient résistant aux effets de l'insuline. D'autres facteurs tels que l'augmentation du glucagon circulant et une augmentation de la sensibilité au glucagon du foie participent à la production accrue de glucose par cet organe (Warram et al., 1990).

Le muscle

Le transport stimulé par l'insuline de glucose dans le muscle squelettique est le principal mécanisme pour disposer du glucose exogène (da-Silva et al., 2007). Le transporter majeur dans l'assimilation du glucose par le muscle squelettique est le « glucose transporter 4 » (GLUT4) (da-Silva et al., 2007) il est également exprimé dans les adipocytes et le muscle cardiaque et est responsable de l'assimilation du glucose dans ces différents tissus (Herman and Kahn, 2006). L'insuline et l'exercice stimulent la translocation de GLUT4 à la surface de la membrane des cellules musculaires ce qui entraîne une augmentation de l'assimilation du glucose. Chez les patients atteints de diabète de type 2, le muscle squelettique est résistant à l'action de l'insuline à cause de défauts dans la signalisation de l'insuline elle-même et une faible activité physique en général (Cusi et al., 2000). Cela entraîne une diminution de l'assimilation du glucose qui cause à terme une hyperglycémie.

Le tissu adipeux

Chez les patients atteints de diabète de type 2, les adipocytes sont résistants aux effets antilipolytiques de l'insuline, ce qui résulte en une élévation des acides gras libres. L'augmentation de la gluconéogenèse, une résistance à l'insuline du foie et des muscles et l'altération de la sécrétion de l'insuline elle-même (Bays et al., 2004).

Un tissu adipeux non fonctionnel produit aussi de nombreuses cytokines inflammatoires et en même temps ne permet pas de libérer les adipocytokines sensibles à l'insuline (Bays et al., 2004).

En contraste avec le tissu adipeux blanc qui stocke l'excès d'énergie sous forme de triglycérides, le tissu adipeux brun présent aussi chez les humains adultes (Cypess et al., 2009) utilise des triglycérides intracellulaires dans des vacuoles comme principale source d'énergie pour produire de la chaleur (Ouellet et al., 2012). La graisse brune joue un rôle important dans le contrôle de poids et le métabolisme énergétique. Néanmoins, le rôle de cette graisse brune dans la pathologie du diabète de type 2 reste à élucider.

Le cerveau

L'insuline peut traverser la barrière hématoencéphalique et moduler l'expression de divers neuropeptides impliqués dans la prise de nourriture et la suppression de l'appétit (Pagotto, 2009). Chez les patients atteints de diabète de type 2, le cerveau peut devenir résistant à l'insuline, à tel point que l'effet inhibiteur d'appétit de l'insuline est perdu (Pagotto, 2009). Chez les patients atteints de diabète de type 2, comme les fonctions des cellules β diminuent sans cesse, la sécrétion d'amylin qui est un peptide synthétisé et co-sécrété avec l'insuline par les cellules β , est réduite et ses effets de satiété s'évanouissent (Roth et al., 2009). De même pour la leptine et la ghreline qui sont deux autres hormones qui agissent sur la prise alimentaire et plus généralement sur l'homéostasie du poids. La leptine est principalement produite et sécrétée par les adipocytes (Friedman, 2009), et sa concentration dans le sang est proportionnelle au pourcentage de masse grasseuse corporelle (Considine and Caro, 1996). L'effet principal de la leptine est de diminuer la prise alimentaire et le poids en agissant sur des zones de l'hypothalamus impliquées dans le comportement alimentaire et l'équilibre énergétique (Morton and Schwartz, 2011). De nombreux individus atteints de diabète de type 2 sont obèses, ont de hauts niveaux de leptine circulante, et sont résistants à la leptine exogène (Friedman, 2009). Néanmoins, une sous-catégorie d'individus

obèse a un faible taux de leptine circulant et chez ces individus la leptine exogène améliore l'obésité (Farooqi and O'Rahilly, 2009). Mais même si les traitements à la leptine exogène améliorent le diabète chez l'animal (German et al., 2010) le traitement des diabétiques obèses avec cette hormone n'augmente pas leur sensibilité à l'insuline (Mittendorfer et al., 2011).

La ghreline est principalement sécrétée par l'estomac lors des périodes de restriction calorique et agit sur le système nerveux central pour augmenter la prise alimentaire (Heppner and Tong, 2014). La ghreline et son récepteur sont aussi présents dans les ilots pancréatiques (Date et al., 2002). Chez les individus en bonne santé, la ghreline exogène réduit la sécrétion d'insuline et cause une hyperglycémie (Broglia et al., 2001). De faibles taux de ghreline dans le plasma sont associés avec une augmentation de la résistance à l'insuline et de la prévalence de diabète de type 2 (Poykko et al., 2003).

L'intestin

Le "Glucagon-like peptide-1" (GLP-1) et le " glucose-dependent insulintropic polypeptide" (GIP) sont des hormones relarguées par l'intestin en réponse à l'ingestion de nutriments (Freeman, 2009). Le GLP-1 et le GIP agissent sur les cellules β pour stimuler la sécrétion d'insuline et sont responsables à 60% de la sécrétion d'insuline qui suit un repas (Nauck et al., 2004). Le GLP-1 apporte aussi la satiété et inhibe la sécrétion de glucagon, ce qui réduit la production de glucose hépatique. Les patients atteints de diabète de type 2 ont une altération de la sécrétion de GLP-1 et une réponse réduite au GIP.

Le rein

Dans des conditions normales, plus de 99% du glucose est filtré par les reins et réabsorbé dans les tubules proximaux. Une fois que la concentration en glucose dépasse le niveau maximum assimilable par le rein pour la réabsorption (approximativement 180 mg/dL), du glucose commence à apparaître dans les urines. Une étude récente a montré que la capacité du rein à réabsorber le glucose est augmentée chez les patients atteints de diabète de type 2 comparés aux individus sains (DeFronzo et al., 2013). Ceci entraîne chez les patients atteints de

diabète de type 2, une réabsorption du glucose en excès et son renvoi vers la circulation ce qui potentiellement empire l'hyperglycémie.

Le foie et les reins sont les seuls organes qui possèdent les enzymes requises pour la gluconéogenèse et qui relarguent le glucose nouvellement formé dans la circulation. La gluconéogenèse rénale représente approximativement 20% du glucose total relargué dans la circulation, le foie contribuant au reste (Stumvoll et al., 1995). Il a été suggéré que la synthèse du glucose rénal était augmentée chez les patients atteints de diabète de type 2 (Meyer et al., 1998). Du coup, chez les patients atteints de diabète de type 2, les reins pourraient exacerber l'hyperglycémie par une réabsorption continue du glucose et une augmentation de sa production.

Traitements

Le diabète de type 2 est étroitement lié aux maladies cardiovasculaires (Fox et al., 2007). Outre les complications macrovasculaires, le diabète est à l'origine des complications microvasculaires qui affectent le rein, et l'œil (néphropathie et rétinopathie diabétiques) (Coresh et al., 2007). L'hyperglycémie est la « clef » de ces complications microvasculaires qui accompagnent le diabète. De nombreux essais cliniques montrent qu'un bon contrôle de la glycémie réduit les risques de complications microvasculaires chez les patients atteints de diabète de type 2. L'objectif thérapeutique à l'heure actuelle est alors de contrôler la glycémie. Un changement de style de vie avec régime et exercice couplé à une pharmacothérapie permet de réduire sensiblement à la fois le décès lié au diabète, mais aussi le risque d'accidents cardiovasculaires et/ou encore la progression des néphropathies et rétinopathies associées au diabète de type 2 (Gaede, 2008).

Les changements de style de vie qui incluent un régime sain, une perte de poids, du sport, et un contrôle régulier du taux de glucose sanguin, apportent de larges bénéfices dans le contrôle de la glycémie dans le diabète de type 2. Néanmoins, ces changements ne sont pas suffisants sur le long terme, et pour de nombreux patients un traitement est nécessaire.

Malgré l'existence de nombreux médicaments destinés à diminuer le taux de glucose sanguin, des travaux récents, réalisés sur des patients diabétiques entre 1999 et 2006 indiquent que seuls 12% d'entre eux ont atteint le contrôle glycémique recommandé (Cheung et al., 2009).

La modification du style de vie après un diagnostic de diabète de type 2 est généralement suivie d'une monothérapie à la metformine comme première ligne de traitement pharmacologique. La metformine est un normoglycémiant, mais elle n'agit pas sur la sécrétion d'insuline et son mode d'action reste grandement méconnu même si plusieurs mécanismes semblent entrer en jeu, impliquant la mitochondrie. Néanmoins, en cas de contre-indication de la metformine, les sulfonylurées peuvent être utilisés comme alternative. Ils permettent la baisse du glucose en stimulant la sécrétion d'insuline et sont capables de réduire le taux d'hémoglobine glyquée dans le sang (Nathan et al., 2009).

Néanmoins, la nature progressive du diabète de type 2 rend le contrôle de la glycémie difficile. Les différents traitements autorisés en combinaison avec les sulfonylurées en U.E sont: les « dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors », les « glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogues », les « thiazolidinediones (TZDs) » et une nouvelle classe d'agents thérapeutiques, les « sodium glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitors ». La sélection des combinaisons de traitement est complexe dû à de nombreux facteurs dont les conséquences du traitement telles que l'hypoglycémie et le gain de poids qui peuvent agir de façon certaine sur la qualité de vie du patient.

Les complications chroniques du diabète sucré

À long terme l'hyperglycémie est délétère pour de nombreux types cellulaires, ce qui entraîne de nombreuses pathologies sur plusieurs organes (Figures 3 et 4). Une des principales cibles des complications liées à l'hyperglycémie chronique est l'endothélium vasculaire. On distingue les complications vasculaires du diabète en fonction du diamètre des vaisseaux atteints en macro- et micro- vasculaires. Les complications macrovasculaires concernent la détérioration des vaisseaux par des mécanismes tels que l'athérosclérose et l'hypertension. Elles touchent principalement les artères coronaires et les artères des membres inférieurs. Les complications microvasculaires affectent la rétine (rétinopathie), le rein (néphropathie) et agissent sur la cicatrisation. L'hyperglycémie affecte également les nerfs conduisant à la neuropathie diabétique.

Complications macrovasculaires

L'hyperglycémie est un facteur de risque des maladies cardiovasculaires majeur. Les complications cardiovasculaires sont les plus communes et les plus dévastatrices conséquences du diabète, et sont la cause principale d'admission à l'hôpital et par la suite de décès chez les patients diabétiques (Riddle, 2011). Un attribut principal des complications cardiovasculaires diabétiques est une athérosclérose accélérée associée à un stress oxydatif, une résistance à l'insuline, et un syndrome métabolique (Martin-Timon et al., 2014).

L'athérosclérose se caractérise par le dépôt d'une plaque essentiellement composée de lipides (on parle d'athérome) sur la paroi des artères. À terme, ces plaques peuvent entraîner la lésion de la paroi artérielle (sclérose), conduire à l'obstruction du vaisseau, ou encore se rompre, avec des conséquences souvent dramatiques. La première cause de mortalité chez le diabétique est d'ailleurs d'origine cardiovasculaire (infarctus du myocarde et accident ischémique vasculaire cérébral). Les connaissances actuelles suggèrent que l'évènement initial dans la pathogenèse de

L'athérosclérose est une atteinte endothéliale, suivi par une adhésion et agrégation plaquettaire (Polovina and Potpara, 2014). Des cytokines et d'autres médiateurs de l'inflammation sont produits en excès et stimulent la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses dans l'intima vasculaire ainsi que le dépôt des constituants de la matrice extracellulaire tels que le collagène et l'élastine, conduisant à une formation fibreuse et à l'extension de la plaque d'athérome. Ces formations fibreuses peuvent s'affaiblir et céder, exposant ainsi des tissus extrêmement thrombogéniques. La rupture de plaque induit une formation de thrombus encore plus importante et le relargage de médiateurs inflammatoires encore plus poussé. Ceci cause la progression de la plaque athérosclérotique, ce qui finalement résulte en une occlusion luminale (figure 3). Des événements dramatiques tels qu'un infarctus du myocarde ou des accidents ischémiques peuvent apparaître (Bentzon et al., 2014). L'athérosclérose est donc associée avec des dommages endothéliaux, un nombre réduit de progéniteurs endothéliaux circulant, un déficit dans la réparation vasculaire ainsi qu'une altération de la contraction ventriculaire (Polovina and Potpara, 2014).

Le diabète altère les fonctions de la paroi artérielle et est ainsi à l'origine d'une dysfonction endothéliale par diminution de la production de NO (Besler et al., 2008). Il induit des phénomènes inflammatoires qui initient l'athérosclérose. De plus, les anomalies lipidiques qui accompagnent le diabète de type 2 participent majoritairement à tous les phénomènes d'athérogénèse.

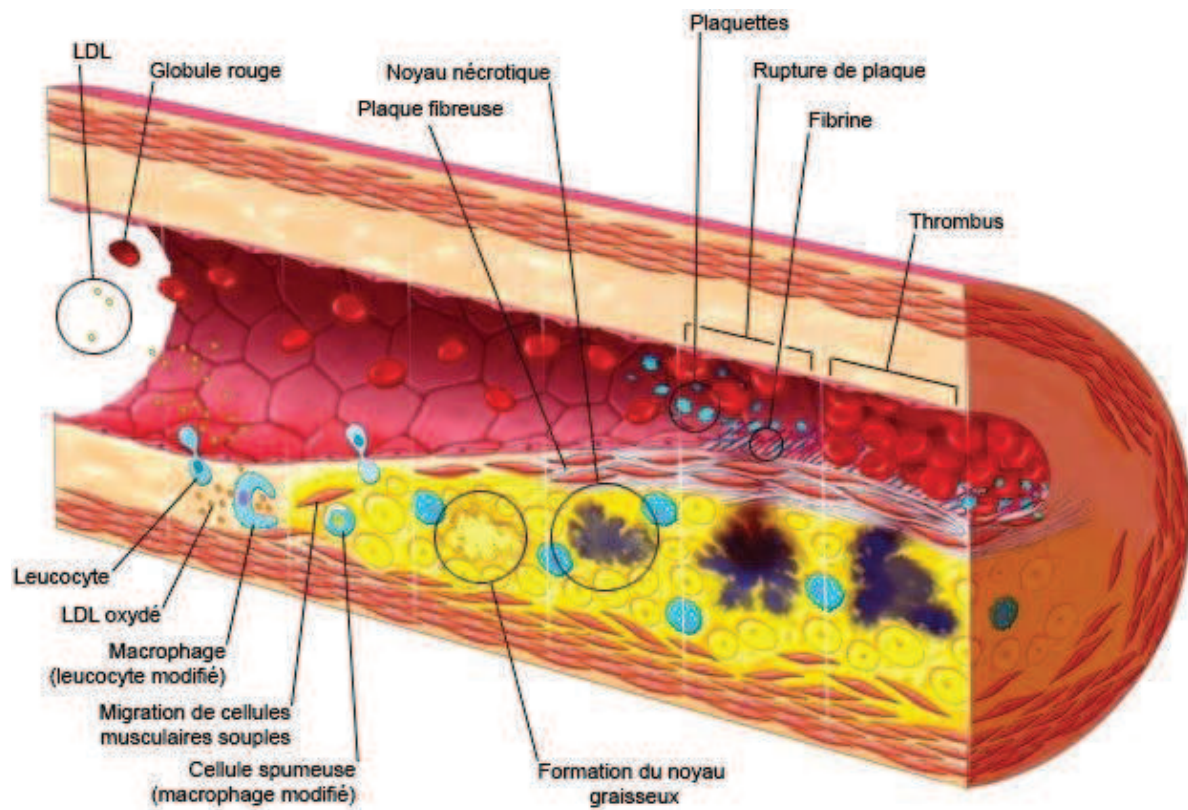


Figure 3: Schéma illustratif d'une plaque d'athérosclérose (D'après J. DIEBOLD Anatomie pathologique générale)

Complications microvasculaires

Outre les complications macro-vasculaires, le diabète peut engendrer de graves complications qui affectent plusieurs organes tels que le rein, l'œil, ou les nerfs (Golden, 2011; Jeerakathil et al., 2007). C'est l'angiogenèse, entre autres, qui est fortement perturbée dans cette pathologie. L'angiogenèse est définie comme la génération de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants ; ils amènent des nutriments et de l'oxygène et permettent aux tissus de croître et/ou de se régénérer. D'une part, une angiogenèse « excessive » est impliquée dans la pathogenèse des rétinopathies (Abu El-Asrar et al., 2013a). D'autre part, une forte inhibition de l'angiogenèse, chez les patients diabétiques, peut entraîner le rejet des transplants (Martin et al., 2003). La prévention et la prise en charge précoce de complications chroniques du diabète nécessitent leur dépistage systématique. Néanmoins, la principale mesure de prévention reste l'amélioration de l'équilibre glycémique.

Rétinopathie diabétique

Le diabète est associé avec le développement de nombreuses complications oculaires et parmi celles-ci la rétinopathie diabétique est la plus sévère (Frank, 2004). C'est la cause de cécité la plus fréquente parmi les adultes de 20 à 74 ans (Fong et al., 2003). Les patients atteints de diabète de type 2 ont moins de risque de complications sévère que ceux atteints de diabète de type 1. Néanmoins, comme ces derniers ne représentent que 10% des diabétiques, les diabétiques de type 2 représentent une tranche de la population bien plus élevée. D'un point de vue clinique, il ne semble pas y avoir de différence entre les symptômes des patients atteints des deux formes de diabète et tous les patients avec un diabète d'une longue durée (20 ans) présentent des lésions rétinienne (Roy et al., 2004). En France, la rétinopathie diabétique est la première cause de cécité avant 65 ans.

La rétinopathie diabétique est cliniquement classifiée en non-proliférative et proliférative (figure 4). Dans la rétinopathie non proliférative, il y a seulement des modifications microvasculaires au sein de la rétine. Ces anomalies incluent des micros anévrysmes, une perméabilité des capillaires altérée, une fragilisation et éventuellement une obstruction des vaisseaux (Chew et al., 2004).

La rétinopathie diabétique proliférative se caractérise par la formation de nouveaux vaisseaux sur la rétine et/ou le disque optique. Des capillaires prolifèrent dans la cavité vitreuse et peuvent subir des hémorragies dans le vitré, ce qui résulte en une certaine perte visuelle. Plus tard dans la maladie de nouveaux vaisseaux peuvent se former dans le stroma de l'iris et s'étendre (Frank, 2004). L'hyperglycémie et l'hypertension sont considérées comme des facteurs de risque majeurs pour la rétinopathie diabétique (Yau et al., 2012). Un contrôle glycémique intensif et un maintien de la pression sanguine réduisent de beaucoup le risque de cécité lié à la maladie.

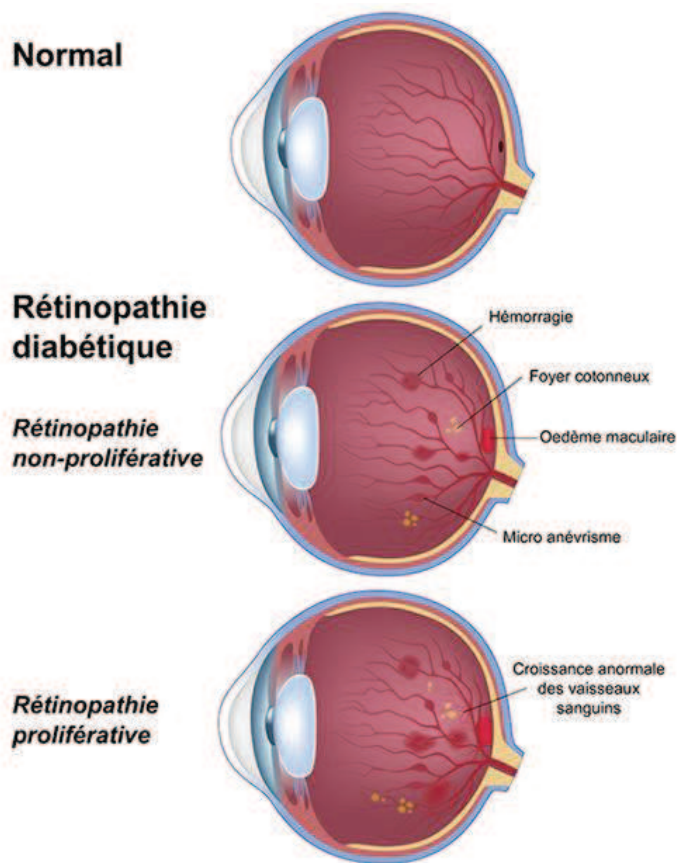


Figure 4: La rétinopathie diabétique

Néphropathie diabétique

La néphropathie diabétique est la principale cause d'insuffisance rénale en occident. C'est la première cause de mortalité chez les patients atteints de diabète de type 1 et c'est en train de devenir un problème clinique majeur pour les patients atteints de diabète de type 2 (Cooper et al., 1998). Augmentation de l'afflux sanguin, hypertrophie, hyperfiltration glomérulaire et une hyperperfusion sont les premières modifications dans le rein. Il s'agit de modifications réversibles et elles ne sont pas considérées comme un indicateur fiable de la néphropathie diabétique (Mauer et al., 1984). Une hyperglycémie persistante pendant plusieurs années affecte

la structure du rein, y compris au niveau cellulaire. Un épaissement de la membrane glomérulaire, une hypertrophie glomérulaire et une accumulation extracellulaire de matrice (fibrose tubulo-interstitiel) (Cooper et al., 1998) sont observés. Des taux élevés de glucose sanguin induisent des modifications cellulaires dans différents types de cellules présents dans le rein. L'anomalie cellulaire majeure se développe dans les cellules épithéliales glomérulaires, ce qui se traduit par une diminution du nombre et de la densité de podocytes par glomérule (Giunti et al., 2006).

D'un point de vue clinique, il y a une diminution du taux de filtration glomérulaire, avec une augmentation progressive de l'excrétion d'albumine dans les urines couplée à une augmentation du flux sanguin ce qui entraîne à terme une insuffisance rénale de stade terminale. La manifestation la plus précoce de la néphropathie diabétique est la micro-albuminurie, ou il est possible de retrouver la présence d'un faible taux d'albumine dans les urines (30-300 mg/jour). Cette phase représente un état potentiellement réversible de la néphropathie diabétique. Néanmoins après cette étape, il y a une augmentation continue de l'excrétion de protéines dans les urines avec un déclin dans le taux de filtration glomérulaire. Cette étape est connue comme la macro-protéinurie. Sans traitement, l'urémie s'aggrave et entraîne le besoin d'être dialysé ou transplanté.

La stratégie majeure dans la prise en charge de la néphropathie diabétique est un contrôle systématique de la glycémie couplé aussi à une prise en charge de l'hypertension. (Bohlen et al., 1994; Lewis et al., 1993).

Neuropathie diabétique

La neuropathie périphérique est une des complications des plus courantes du diabète. Elle atteint 26% à 47% des patients atteints de diabète (King et al., 2015). La pathophysiologie de la neuropathie diabétique reste complexe et elle n'est pas totalement élucidée. Ses conséquences incluent de la douleur, une difformité des pieds, des ulcérations neuropathiques, et des amputations. Alors que l'hypothèse dominante est que la neuropathie diabétique apparaît comme une conséquence de l'hyperglycémie, des recherches récentes ont impliqué d'autres causes dans la pathogenèse de cette maladie (Farmer et al., 2012). L'hyperglycémie entraîne de nombreux

produits de glycation (Advanced Glycation End product (AGE)), un stress oxydatif et une production de reactive oxygen species (ROS). Ces AGEs et ces ROS entraînent une dysfonction nerveuse. Dans le développement et la progression de la neuropathie diabétique, sont impliqués l'insuffisance vasculaire, l'ischémie, l'hypoxie, le syndrome métabolique et la résistance à l'insuline (Farmer et al., 2012). Des cytokines pro-inflammatoires (telles que le TNF α ou l'IL6) participent également à la pathogenèse de la neuropathie et des douleurs neuropathiques. Les blessures des nerfs périphériques entraînent la production de cytokines qui ont pour origine des lymphocytes, des macrophages ou les neurones. Les patients atteints de diabète ont des taux sanguins élevés de TNF α et les médicaments liant le TNF α améliorent la conductivité et la vélocité des nerfs chez les rongeurs (Farmer et al., 2012). Les cytokines inflammatoires IL-2 et IL-6 sont aussi augmentées chez les patients souffrant de neuropathie douloureuse (Waterman et al., 2012).

La neuropathie diabétique est caractérisée par une perte neuronale progressive, une démyélination et une régénération nerveuse altérées avec, à terme, une altération des fibres nerveuses, affectant à la fois le système nerveux autonome et somatique. Des ulcérations neuropathiques et une douleur constante sont les conséquences de la neuropathie diabétique. La polyneuropathie symétrique distale est la principale cause d'ulcération plantaire. Les dommages au niveau des nerfs périphériques impliquent la sensibilité, la motricité et les nerfs autonomes altérant la capacité des patients à sentir la douleur, la pression, le toucher ou même la température (O'Loughlin et al., 2010). Les neuropathies motrices affectent les petits muscles du pied et sont la cause de faiblesse, atrophie et difformité alors que les neuropathies autonomes réduisent la transpiration du pied et augmente ainsi sa température, prédisposant aux infections et aux ulcérations. La neuroarthropathie de Charcot est le résultat d'une dislocation osseuse alors que la dysfonction autonome est impliquée avec une perfusion anormale des os du pied (O'Loughlin et al., 2010).

Le point clef dans le traitement de la neuropathie et le contrôle glycémique qui réduit les symptômes et empêche la progression de la maladie. Les thérapies pharmacologiques disponibles à l'heure actuelle sont bien souvent inefficaces et associées à de nombreux effets secondaires.

La neuropathie diabétique entraîne un risque accru d'ulcération du pied. Quand les patients présentent un ulcère diabétique au pied, l'évaluation de la vascularisation est primordiale. Si la

vascularisation est intacte, ces ulcères représentent des ulcères neuropathiques ; à l'inverse si la vascularisation est atteinte, il convient de restaurer le flux sanguin ou une amputation peut être inévitable.

L'angiogenèse « paradoxale » dans la maladie diabétique.

L'angiogenèse joue un rôle ambigu en ce qui concerne la pathogenèse des maladies vasculaires du diabète. D'une part, une angiogenèse exacerbée a lieu dans les rétinopathies diabétiques, les néphropathies et l'athérosclérose diabétique. Cet excès d'angiogenèse conduit à un risque accru d'évènement cardiovasculaire, la croissance des *vasa-vasorum* (petits vaisseaux de l'adventice des artères et des veines) à l'intérieur du mur vasculaire est stimulée, ce qui conduit à des saignements, une instabilité des plaques et par conséquent des ruptures (Rubinat et al., 2015).

D'un autre côté, dans les maladies diabétiques du pied il y a clairement un déficit d'angiogenèse. Ce déficit est responsable d'une croissance des artéioles altérée qui conduit à un déficit de perfusion myocardique souvent observé chez les patients diabétiques (Khazaei et al., 2011). On observe aussi un recrutement réduit des progeniteurs endothéliaux ainsi qu'une altération de leur fonction (Kim et al., 2012). Il existe donc chez le diabète deux types de conditions angiogéniques à la fois anti et proangiogénique qui coexistent dans différents tissus (figure 5). Ce « paradoxe » indique que le microenvironnement local de chaque organe joue un rôle très important dans le processus angiogénique.

Diverses cytokines jouent un rôle primordial dans l'équilibre angiogénique dans les différents organes. Par exemple, le VEGF qui est un stimulateur angiogénique bien connu, promeut la prolifération et la migration des cellules endothéliales et augmente la perméabilité des vaisseaux sanguins en se liant à ses récepteurs, et activant ERK1/2, Src et la voie des phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) (Hoeben et al., 2004). Le VEGF promeut aussi la guérison des blessures cutanées dans les modèles expérimentaux de diabète en permettant la mobilisation de cellules progénitrices de la moelle osseuse (Galiano et al., 2004). Des thérapies anti-VEGF ont montré un bénéfice notable dans le cadre des rétinopathies prolifératives, ce qui suggère un rôle central du VEGF dans la rétinopathie diabétique (Rosberger, 2013; Schmidinger et al., 2011). Une augmentation du VEGF dans le vitré des patients atteints de rétinopathie diabétique a été

aussi décrite (Chiarelli et al., 2000). Différents groupes ont avancé que le taux de VEGF dans le sérum de patients diabétiques était plus élevé que chez les patients contrôles et était corrélé avec la gravité des complications diabétiques (Mahdy et al., 2010).

De nombreuses cytokines entrent donc en jeu dans ce « paradoxe » angiogénique du diabète, incluant par exemple l'insulin-like growth factor (IGF), qui semble bien être impliqué dans la progression de la rétinopathie diabétique (Iannetti et al., 2011). La famille des IGFs comprend des ligands tels que l'IGF1, l'IGF2; six protéines de liaison (IGFBP1 à -6); des récepteurs de surfaces incluant l'IGF1R, l'IGF2R, et les récepteurs à l'insuline (Simo et al., 2006). Des études récentes ont suggéré que l'IGF1 et l'IGF2 pouvaient être impliqués dans la pathogenèse des rétinopathies prolifératives diabétiques; néanmoins leur rôle exact n'est pas encore très bien compris (Spraul et al., 2000). Divers travaux suggèrent que l'augmentation de l'activité de l'IGF1 permet une néovascularisation rétinienne plus importante ce qui est caractéristique de la rétinopathie proliférative (Haurigot et al., 2009; Spraul et al., 2000; Takagi et al., 1994). Une équipe a d'ailleurs montré que l'IGF1 et l'IGF2 pouvaient influencer la prolifération et la migration des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien. Parallèlement, Ruberte et al (Ruberte et al., 2004) ont montré que la néovascularisation était consistante avec l'augmentation du VEGF par l'IGF1 dans les cellules de la rétine.

De très nombreuses cytokines jouent donc un rôle dans l'équilibre angiogénique des organes, lors de la pathologie diabétique. Les mécanismes derrière ce paradoxe angiogénique dans le diabète sont encore mal connus et de très nombreux gènes et protéines semblent entrer en jeu dans ce processus.

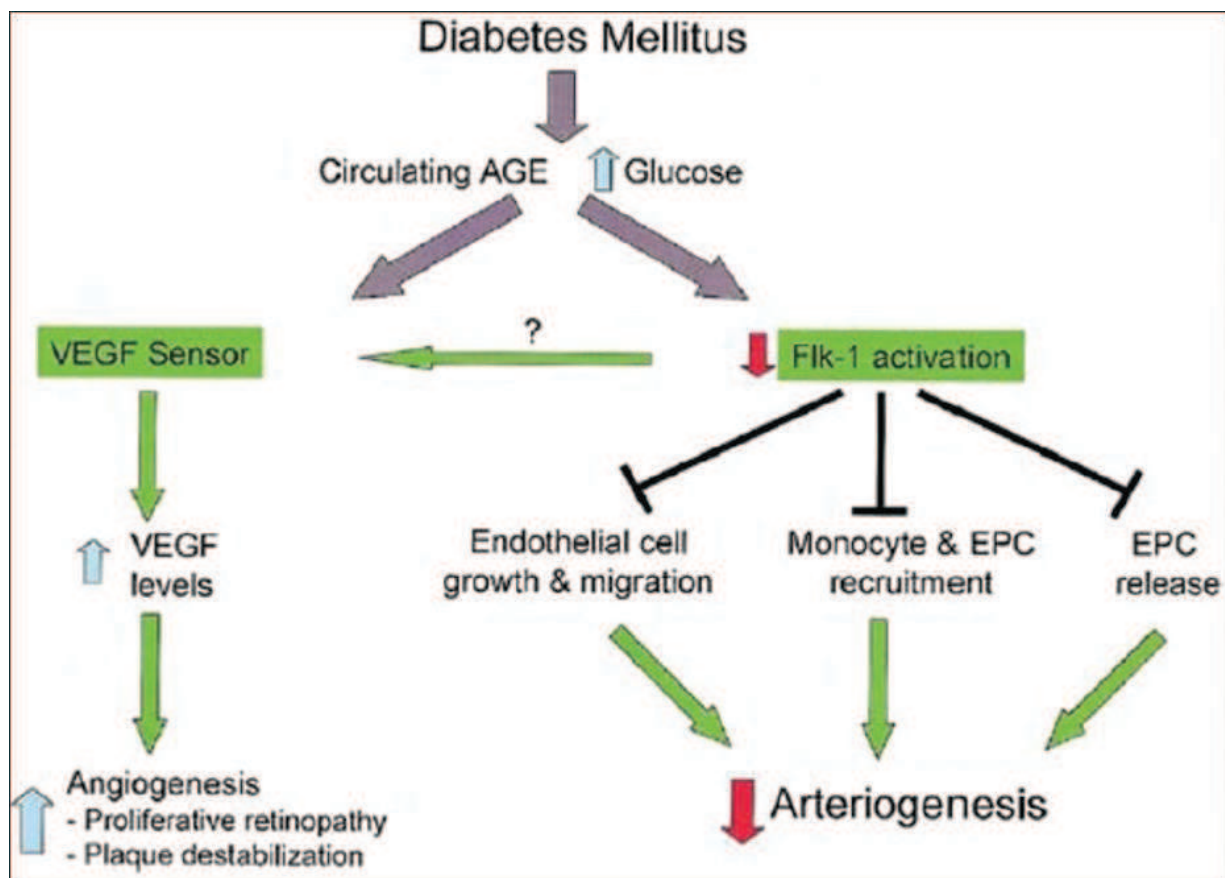


Figure 5: L'angiogenèse paradoxale dans la maladie diabétique (d'après Sruti J. et al)

La mémoire métabolique

Aussi tôt que dans les années 1980 des phénomènes qui consistaient à conserver certaines caractéristiques de la pathologie diabétique même après un retour à la normale de la glycémie et de la production d'insuline ont été décrits à la fois dans des cellules, mais aussi dans des modèles animaux. Ainsi, une équipe décrivit que des chiens soumis à un mauvais contrôle glycémique pendant 2,5 ans puis à des injections d'insuline pour la même période développaient quand même des rétinopathies diabétiques, au contraire de chiens traités moins de deux mois après l'apparition d'un diabète avec de l'insuline qui montraient des signes moindres de rétinopathies (Engerman and Kern, 1987). Peu après, une équipe montrait qu'une stimulation hyperglycémique transitoire modifiait de façon durable l'expression de certains gènes tels que la fibronectine et le collagène

IV dans des cellules endothéliales (Roy et al., 1990). De la même façon, des chercheurs ont montré que transplanter des ilots pancréatiques dans les 6 semaines suivant le développement d'un diabète réduisait le développement de la rétinopathie diabétique, à l'inverse, une transplantation après 12 semaines de diabète ne réduisait que très partiellement la progression vers une rétinopathie diabétique (Hammes et al., 1993). Hélas, peu d'importance fut portée à ces travaux jusqu'à ce que des essais cliniques de grande ampleur en viennent aux mêmes conclusions. Ainsi naissait le concept de mémoire métabolique qui consiste à voir certaines conséquences du diabète être transmises de cellule mère à cellule fille, malgré le retour à la normale du taux de glucose et de la production d'insuline.

Les mécanismes de la mémoire métabolique.

Le stress oxydatif

De nombreuses études semblent indiquer que les différents mécanismes de dommage tissulaire dus à l'hyperglycémie ont pour cause un phénomène commun, qui est la surproduction de reactive oxygen species (ROS) par les mitochondries (Giacco and Brownlee, 2010). Une grande attention a donc été portée au rôle du stress oxydatif dans la mémoire métabolique.

En 2007, une équipe démontrait le rôle du stress oxydatif dans la mémoire cellulaire de l'hyperglycémie (Ihnat et al., 2007). Cette équipe a montré qu'aussi bien dans des cellules rétinienne en culture que dans la rétine de rats diabétiques, des marqueurs de stress oxydatif restaient surexprimés pendant 1 semaine de normoglycémie qui suivait 2 semaines d'hyperglycémie. De façon surprenante, bloquer les sources extramitochondriales de ROS ne réduisit que peu l'induction des marqueurs de stress indiquant que la persistance du stress oxydatif, et plus spécifiquement la surproduction par les mitochondries, pourrait jouer un rôle dans ce phénomène de mémoire métabolique.

Une étude récente (Zheng et al., 2012) a poussé plus loin la compréhension de la mémoire métabolique induite par le stress oxydant dans la rétinopathie diabétique. Dans des cellules endothéliales des capillaires rétiens, qui ont subi 2 semaines d'hyperglycémie et une semaine de normoglycémie, l'induction par l'hyperglycémie de Bax et de NF- κ B restait élevée, même

après un retour à la normale de la glycémie. Le « knockdown » de SIRT1 avec des petits ARN interférents a augmenté la sensibilité au stress hyperglycémique alors que la surexpression de SIRT1 par la metformine a inhibé l'augmentation de la production de ROS par la mitochondrie, et a supprimé l'expression de Bax et NF- κ B. De plus, l'hyperglycémie semble induire l'activation de PARP, qui à son tour inhibe SIRT1, ce qui implique un potentiel d'autofeedback qui amplifierait la production de ROS et le stress oxydatif. D'autres études existent et il est sûr que ce phénomène de stress oxydatif entraînant une mémoire métabolique est complexe et encore mal compris.

L'hyperglycémie induit donc des altérations héritables des gènes dans de nombreux types cellulaires tels que les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les cellules rétinienne et certaines cellules cardiaques (Reddy et al., 2014). Ces altérations sont d'origine épigénétique et se transmettent d'une cellule mère à une cellule fille.

L'épigénétique

Les modifications épigénétiques représentent une variété de modifications, stables et héritables, qui régulent l'expression génique sans pour autant altérer la séquence d'ADN (figure 6). En général, les modifications épigénétiques consistent en trois types de régulations (i) une inhibition transcriptionnelle par hyperméthylation des îlots CpG au niveau des promoteurs des gènes. (ii) Une activation ou une inhibition à travers l'acétylation ou la méthylation des histones. (iii) Une inhibition post-transcriptionnelle, via des micro ARN. Ces mécanismes sont un complément primordial au contrôle classique des gènes et modulent les interactions entre gènes et environnement au cours du développement du diabète et de ses complications vasculaires (Pirola et al., 2010).

Ces dernières années, de nombreuses découvertes de modifications épigénétiques induites par des variations de la glycémie ont été mises à jour. Il a été alors démontré que la mémoire métabolique induite par le stress oxydant était médiée par des mécanismes épigénétiques. Par exemple, dans le contexte des rétinopathies diabétiques, les trois types de mécanismes décrits précédemment semblent tous associés à la mémoire métabolique (Tewari et al., 2012; Zhong and Kowluru, 2010, 2011, 2013). Dans une de ces études, Zhong et al., ont montré que des rats

diabétiques, maintenus en hyperglycémie pour 2 mois puis en normoglycémie pour 2 mois supplémentaires, voyaient une surexpression de différentes histones acétylases au niveau des régions promotrices de Sod2, le gène qui encode MnSOD (Manganese superoxide dismutase, une enzyme de défense contre les ROS), dans les cellules rétinienne. Le retour à la normale de la glycémie a été incapable de modifier ces augmentations, le tout résultant en une sous-expression de MnSOD.

Malgré de nombreuses études, nous sommes encore loin de connaître et comprendre tous les mécanismes sous-jacents à la mémoire métabolique, particulièrement dans d'autres pathologies microvasculaires du diabète telles que la néphropathie ou la neuropathie diabétique.

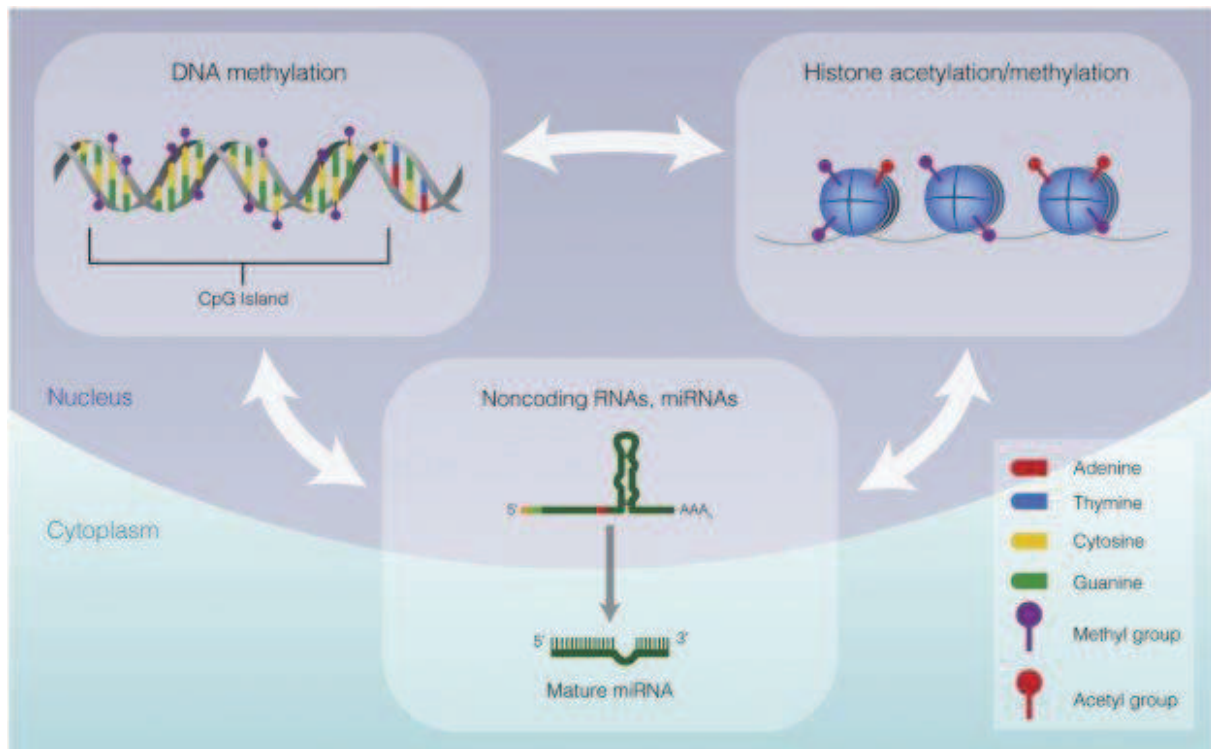


Figure 6: Illustration des processus épigénétiques de méthylation de l'ADN et d'acétylation des histones et leur relation réciproque avec les ARNs non codants. (d'après Syamantak M. et al)

Modèle de diabète de type 2:

Les différents modèles de diabète de type 2

Différents modèles animaux de diabète de type 2 existent et permettent d'améliorer la compréhension de la pathophysiologie du diabète et de ses complications (figure 7). La plupart de ces modèles ont des anomalies sur un ou plusieurs gènes liés à l'obésité, l'intolérance au glucose, ou la résistance à l'insuline ce qui conduit à terme à des hauts niveaux de glucose dans le sang. Le développement et la progression des complications chroniques du diabète sont modifiés par de nombreux facteurs, incluant l'obésité, la résistance à l'insuline, l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie (Calcutt et al., 2009). Il existe donc des modèles de souris et de rats de diabète de type 2. Chez la souris, des souches telles que la *ob/ob*, la *db/db*, la KK, la NZO ou la TSOD représentent des modèles bien caractérisés de la maladie. Néanmoins, travailler sur un modèle murin présente bien des désavantages, notamment la taille du modèle qui limite le champ des interventions chirurgicales possibles. En ce qui concerne les modèles de rats diabétiques de type 2, il existe le Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF), le Wistar fatty rats, le Zucker diabetic fatty (ZDF) rats, et le Spontaneously Diabetic Torii (SDT) fatty rats (relativement nouveau), qui a été établi en introduisant l'allèle *fa* du Zucker fatty rat dans le génome d'un rat SDT normal. Ces différents modèles présentent tous des complications liées au diabète de type 2 avec des différences de sévérité ou d'âge (figure 7).

	rats OLETF	rats mistar fatty	rats ZDF	rats SDT fatty
Manifestation du diabète	18 semaines	8 semaines	8 semaines	6 semaines
Lesions pancréatiques				
Ilots	Hypertrophie	Hypertrophie	Hypertrophie puis dégénération	Hypertrophie puis dégénération
masse des cellules beta	Augmentation puis diminution	Augmentation	Augmentation puis diminution	Augmentation puis diminution
Lesions renales				
manifestations de l'albuminurie	10 semaines	20 semaines	6 semaines	4 semaines
decouvertes pathologiques	sclérose glomérulaire diffuse lésions nodulaire	sclérose glomérulaire diffuse	sclérose glomérulaire diffuse	sclérose glomérulaire diffuse lésions nodulaire
	lésions tubulaires	lésions tubulaires	lésions tubulaires	lésions tubulaires
	lésions tubulo-interstitiel	lésions tubulo-interstitiel	lésions tubulo-interstitiel	lésions tubulo-interstitiel
Lesions oculaires				
manifestation de la cataracte	40 semaine		20 semaines	8 semaines
ERG	délais de latence			délais de latence
decouvertes pathologiques	lésions des capillaires réiniens	lésions des capillaires réiniens	lésions des capillaires réiniens	lésions des capillaires réiniens
Lesions neurales				
Diminution de la viesses de conduction nerveuse	40 semaines		12 semaines	12 semaines
decouvertes pathologiques	atrophie neuro-axonale			atrophie neuro-axonale
Osteoporose	diminution de la densité osseuse (21s)			diminution de la densité osseuse (24s)

Figure 7 : Illustration des différents modèles de rat de diabète de type 2 et les complications associées en fonction de leurs âges. (D'après Yoshiaki K. et al)

Le rat ZDF

On a décidé d'utiliser un modèle de rat qui présente un diabète de type 2, nommé Zucker Diabetic Fatty rat (ZDF). Ce modèle a une mutation sur un récepteur de la leptine. Il présente toutes les caractéristiques d'un diabète de type 2 à un âge prévisible (Etgen and Oldham, 2000).

Lésions pancréatiques

Les lésions pancréatiques ne font pas partie des complications diabétiques telles qu'on les définit, mais une compréhension des modifications pancréatiques est très importante pour mieux cerner le développement de la pathologie diabétique. L'hyperglycémie va de pair avec deux altérations majeures, la résistance à l'insuline et la diminution de la sécrétion d'insuline par le pancréas (Pfeifer et al., 1981). Les cellules β pancréatiques sont les régulateurs clés de l'homéostasie du glucose et dans le diabète de type 2 elles dégénèrent à cause de l'incapacité des îlots à adapter la masse cellulaire à la demande toujours plus grande en insuline (Bonner-Weir et al., 2010). Il est décrit que des changements pathologiques au niveau des îlots tels que l'hypertrophie, l'atrophie, et la fibrose sont observés dans les rats diabétiques de type 2. Les lésions pancréatiques dans les modèles d'animaux diabétiques sont largement liées à l'incidence et au développement du diabète

D'ailleurs, le rat ZDF développe une résistance à l'insuline et une intolérance au glucose entre 3 et 8 semaines et devient complètement diabétique entre 8 et 10 semaines. La morphologie des îlots diffère entre le rat ZDF et le rat lean (contrôle) à partir de 7 semaines (prédiabétiques), et ces différences sont plus prononcées à 12 semaines (diabétiques). Les îlots du rat ZDF sont plus larges et ont des frontières irrégulières (Figure 8) (Hayek and Woodside, 1979; Tokuyama et al., 1995). Il existe d'ailleurs une bonne correspondance entre l'augmentation en ADN des îlots et le taux d'insuline dans le sérum, ce qui suggère que l'hyperplasie des îlots est impliquée dans l'hyperinsulinémie chez le rat ZDF (Tokuyama et al., 1995).

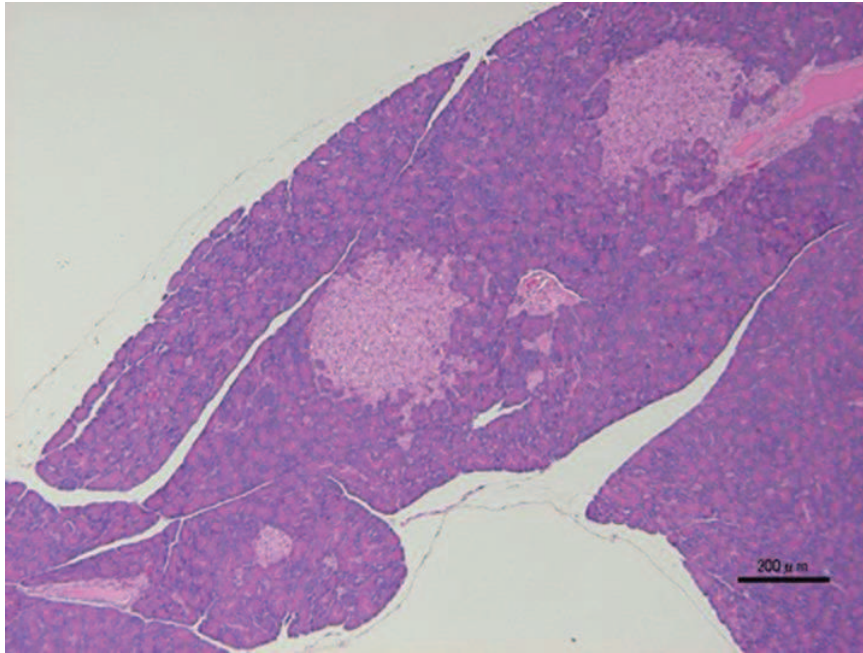


Figure 8: Ilots pancréatiques de rat ZDF

Lésions oculaires

La rétinopathie diabétique est la principale cause de cécité parmi les adultes (Klein, 2007). On distingue la rétinopathie non proliférative, qui est caractérisée par des microanévrismes intrarétiniens, des hémorragies, et des anomalies microvasculaires; et la rétinopathie proliférative, qui est caractérisée par une néovascularisation provenant du disque ou des vaisseaux rétiniens (Rand et al., 1985).

Chez le rat ZDF, les capillaires rétiniens démontrent une hypercellularité et la membrane basale des capillaires rétiniens est plus épaisse comparée à celle des rats contrôles (Danis and Yang, 1993). Chez les rats ZDF âgés de 20 semaines, on peut observer une formation de cataracte et le nombre de cellules apoptotiques de la cornée est augmenté par rapport aux rats contrôles (Kim et al., 2011). Ce modèle du diabète expérimental contribue alors à la compréhension de la physiopathologie de la rétinopathie et à l'établissement de nouvelles thérapeutiques pour prévenir l'apparition de cécité due au diabète.

Lésions rénales

Avec la hausse de la prévalence de diabète de type 2, on a vu augmenter également le nombre de personnes atteintes de ses complications chroniques. Parmi elles, les néphropathies qui, en stade terminal, nécessitent le support d'une dialyse pour permettre la survie du patient (Ritz and Stefanski, 1996). Malgré de nombreux efforts pour stopper la maladie, le pronostic pour des patients avec une néphropathie établie reste mauvais (Petersen et al., 1988). Dans ce contexte une meilleure compréhension de la physiopathologie des atteintes rénales dans des modèles animaux de diabète de type 2 serait bénéfique dans le développement de futures thérapies.

En ce qui concerne le rat ZDF, l'excrétion d'albumine urinaire est légèrement plus haute que celle des rats contrôle à 6 semaines et elle monte progressivement avec l'âge (Vora et al., 1996). Le taux de filtration glomérulaire est élevé jusqu'à 12 semaines, mais diminue à 28 semaines. De plus, la protéinurie augmente durant la période où le taux de filtration glomérulaire est élevé, et plus encore quand celui-ci est faible (Hoshi et al., 2002). Enfin, une hypertrophie rénale est observée à 12 semaines, mais est plus prononcée à 16 semaines (Vora et al., 1996).

Lésions neurales

La neuropathie diabétique est une complication commune chez les diabétiques de type 2. Néanmoins, les mécanismes exacts par lesquels se développe une neuropathie n'ont pas encore été totalement élucidés (Nakamura et al., 2001). Les thérapies actuelles s'attaquent soit à la pathogenèse de la maladie soit aux symptômes de celle-ci (Varkonyi and Kempler, 2008). Quant à la pathogenèse de cette maladie, différentes hypothèses existent et elles impliquent le métabolisme glucidique ou la vascularisation (Nakamura et al., 2001). Dans le premier cas, l'hypothèse de l'augmentation de la voie de polyol qui induirait une diminution dans l'activité Na⁺/K⁺-ATP-ase a reçu un intérêt particulier (Thomas et al., 1993; Tomlinson et al., 1992). Néanmoins, d'autres études ont montré une relation entre l'augmentation de la voie des polyols et des facteurs vasculaires dans la neuropathie diabétique (Stevens et al., 1994; Tesfamariam et al., 1993). La plupart des études sur la pathogenèse de la neuropathie diabétique ont été conduites avec des modèles de diabète de type 1. La majorité des diabétiques étant atteints d'un diabète de

type 2, il est crucial d'établir des modèles de diabète de type 2 pour étudier et comprendre la pathophysiologie de la neuropathie diabétique.

Chez le rat ZDF, la vitesse de la conduction nerveuse motrice est diminuée après 12 semaines, la relaxation vasculaire des artérioles épineurales du nerf sciatique est altérée après 8 semaines (Oltman et al., 2005).

Troubles musculo-squelettiques

L'ostéoporose est une maladie silencieuse avec un impact certain sur la morbidité et la mortalité (Abdulameer et al., 2012). L'ostéoporose conduit à une augmentation de la fragilité du squelette, une détérioration de la microarchitecture osseuse, une diminution de la densité osseuse et de la qualité de l'os (Cooper, 1999). Dans le diabète de type 1 de nombreuses études tendent à montrer une diminution de la densité osseuse ce qui, à terme, entraîne une ostéoporose (Melton et al., 1993). Néanmoins le lien entre diabète de type 2 et ostéoporose est bien moins clair. L'obésité est au contraire associée avec une plus forte densité osseuse, (Felson et al., 1993) mais les AGEs sont au contraire associés avec une diminution de la force de l'os entraînant, à terme, une ostéoporose (Yamagishi et al., 2005).

Chez le rat ZDF à 21 semaines, la densité osseuse était inférieure au niveau du fémur et de la colonne vertébrale comparée au rat LEAN (contrôle) et une évaluation histomorphométrique a montré une minéralisation plus basse du tissu osseux (Hamann et al., 2011).

En conclusion ce modèle (le rat ZDF) présente toutes les caractéristiques et pathologies associées avec un diabète de type 2 et nous est apparu comme un modèle robuste à utiliser au cours de nos travaux sur l'impact du diabète de type 2 sur les cellules souches mésenchymateuses.

Les cellules souches

Actuellement, on distingue 3 types de cellules souches (Figure 9), les cellules souches totipotentes qui peuvent donner naissance à tout type des cellules de l'organisme, les cellules souches pluripotentes, qui sont capables de générer les cellules de plupart des tissus du corps adulte, mais ne sont pas capable de former les annexes embryonnaires, et les cellules souches multipotentes, qui elles sont capables de générer plusieurs types de cellules.

Dès les années 60, Friedenstein et al., découvrait les cellules souches mésenchymateuses (CSM) (Friedenstein et al., 1970), des cellules multipotentes au potentiel toujours exploité de nos jours. C'est en 1981 que, pour la première fois, des chercheurs sont parvenus à cultiver des cellules souches extraites d'embryons de souris et il aura fallu attendre 1998 pour pouvoir isoler et cultiver les premières cellules souches embryonnaires humaines (Thomson et al., 1998).

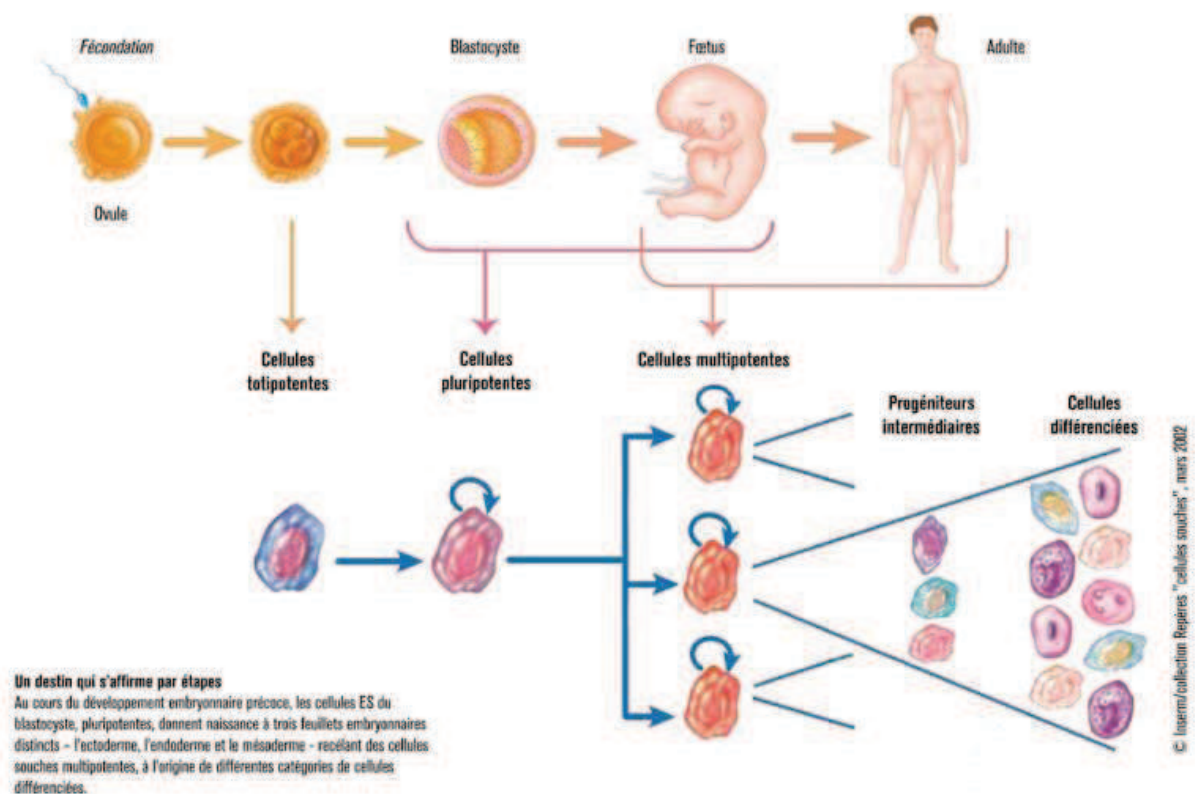


Figure 9: différentes sortes de cellules souches

Les cellules souches embryonnaires humaines (hES)

Les cellules souches embryonnaires sont des cellules pluripotentes, elles sont dérivées *in vitro* à partir de cellules présentes dans la masse cellulaire interne du blastocyste, aussi appelée bouton embryonnaire (Semb, 2005) (Figure 10).

Obtenir des cellules souches embryonnaires implique soit la production d'embryon humain (interdit en France), soit l'utilisation d'embryons surnuméraires issus de la fécondation *in vitro*.

Une fois le blastocyste dissocié, les cellules souches embryonnaires qui en sont extraites ont perdu la possibilité de se développer en un embryon (Semb, 2005).

Les cellules souches embryonnaires isolées sont donc cultivées en laboratoire, via un protocole étudié pour éviter leur différenciation spontanée (Liew et al., 2005).

Elles peuvent par la suite, à condition de mettre en place un protocole de différenciation adéquat, servir à construire des modèles de maladies, via la récupération d'embryon porteur de mutations qui sont écartées lors d'un diagnostic préimplantatoire. Ces modèles permettront le test de nouveaux médicaments. Les cellules non porteuses de mutation et issues d'embryons surnuméraires pourront quant à elle servir à remplacer les cellules malades ou disparues par des cellules saines produites en laboratoire.

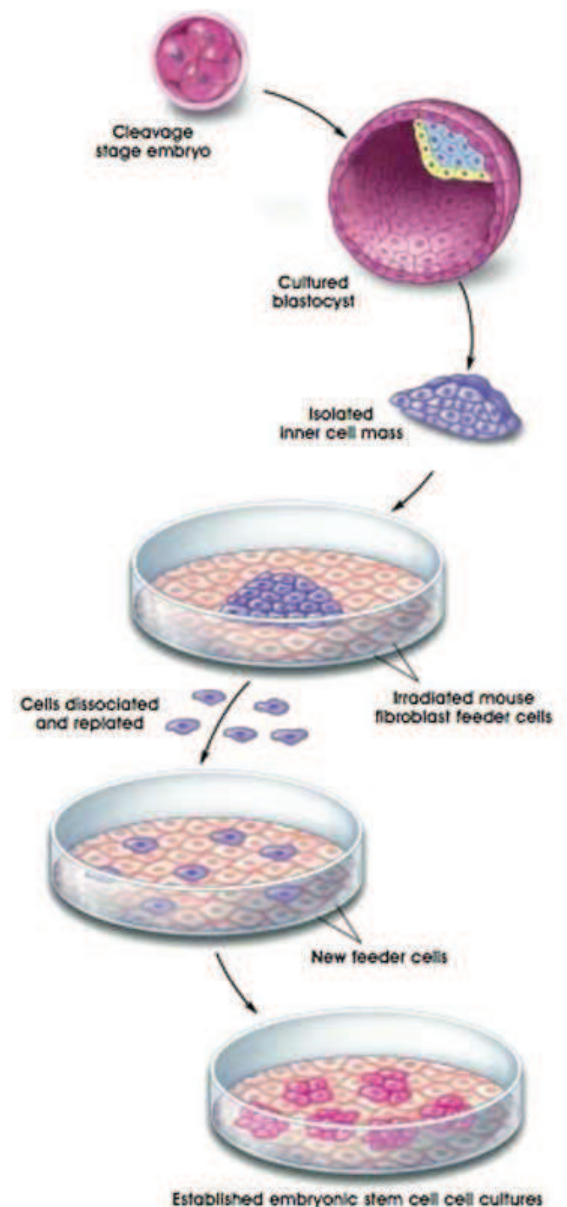


Figure 10: Isolement de cellules souches embryonnaires

Malgré toutes les promesses qu'apportent les cellules souches embryonnaires, il existe certains problèmes liés à leur utilisation. Implantées dans un autre organisme que celui dont elles sont originaires, elles peuvent induire une réponse immunitaire (Boyd and Wood, 2010). Et des études sur la souris ont montré que la transplantation de ces cellules, quand elles sont non différenciées, engendre l'apparition de tératomes (masse de cellules issues d'une prolifération incontrôlable présentant les 3 feuillets embryonnaires) (Gudjonsson and Magnusson, 2005).

Les cellules souches pluripotentes induites (IPS)

Les cellules souches induites à la pluripotence (IPS, Induced Pluripotent Stem cells) sont un type de cellules pluripotentes créées artificiellement à partir de cellules somatiques, via l'expression forcée de certains gènes (Figure 11).

Les IPS ont été produites pour la première fois par l'équipe de Yamanaka en 2006 à partir de cellules de souris (Takahashi and Yamanaka, 2006), puis en 2007 à partir de cellules humaines (Takahashi et al., 2007).

Ces cellules sont obtenues grâce à la transfection d'un cocktail de gènes associés à la pluripotence dans une cellule somatique, telles que les fibroblastes adultes.

Cette transfection est actuellement faite via l'utilisation de vecteurs viraux (figure 11), tels les rétrovirus ou les lentivirus, ce qui limite l'utilisation de ces cellules chez l'homme. Ces vecteurs intégratifs peuvent induire une altération génomique des cellules ou l'expression d'oncogènes ce qui mène à terme au développement de cancers. Afin de rendre possible l'utilisation de ces cellules chez l'homme, il a été proposé de retirer les oncogènes des cellules après reprogrammation P (Sommer et al., 2010). Plus récemment, il a été décrit que des IPS pouvaient être générées sans utilisation de vecteurs viraux, à partir d'un traitement des cellules avec certaines protéines liées à des peptides de pénétration cellulaire (Zhou et al., 2009). Et même, si le rendement pour la production de ces nouvelles IPS reste très faible, elles sont assurément un outil d'étude bien plus adapté à la thérapie humaine que les IPS produites à partir de vecteurs intégratifs.

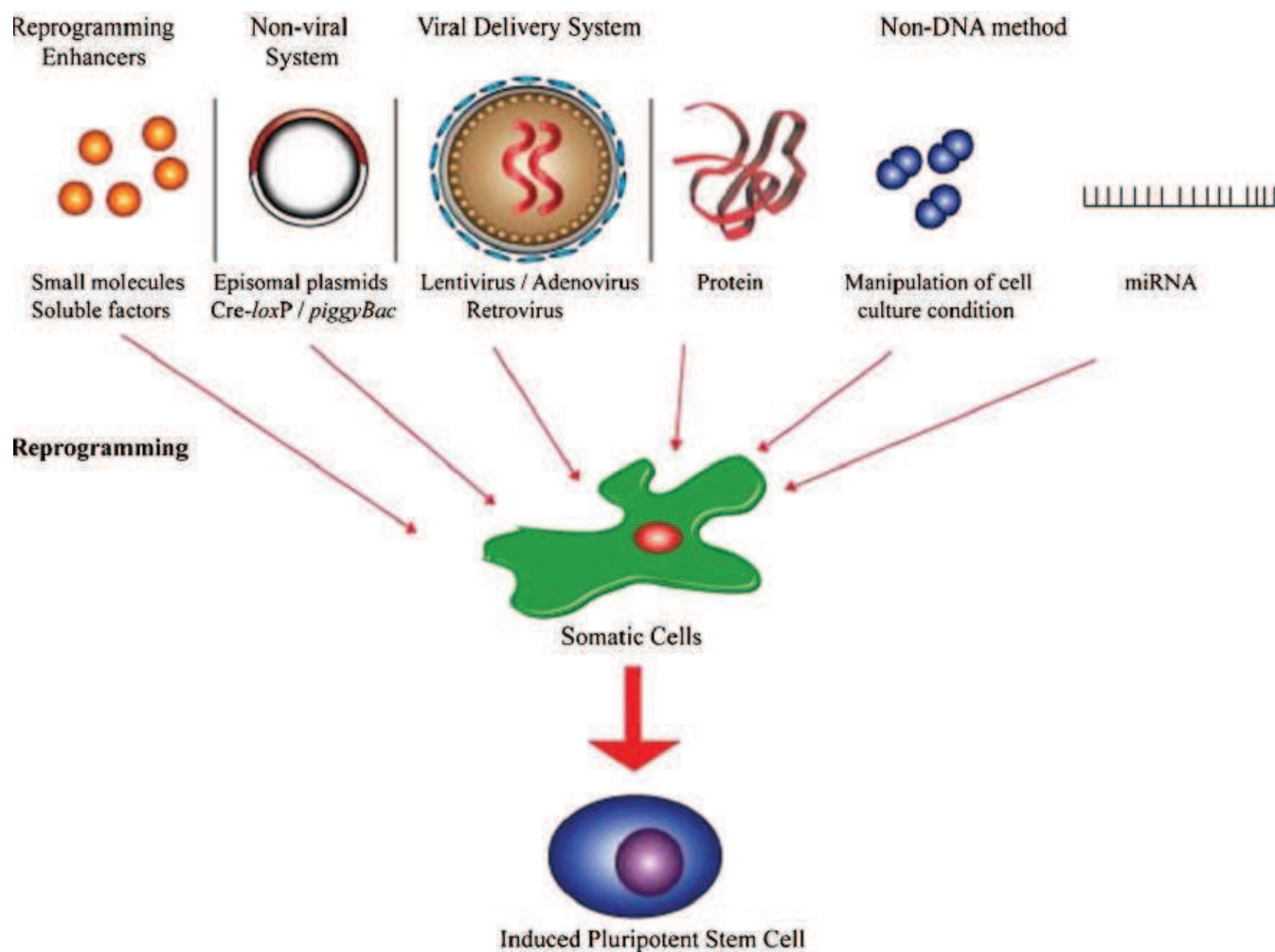


Figure 11: Methodes de reprogrammation de cellules somatiques adultes. (d'après Lai et al. 2011)

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)

Les cellules souches mésenchymateuses font partie des cellules souches adultes, il existe de nombreux types de cellules souches adultes, identifiés dans une grande variété de tissus. Parmi les différents tissus, on compte notamment l'endothélium, la peau, le tissu adipeux, le tractus gastro-intestinal, le foie, le poumon, le système nerveux central (SNC), le coeur ou encore le

muscle squelettique (Barrilleaux et al., 2006; Mimeault and Batra, 2006). Les plus étudiées et les mieux caractérisées ce sont les cellules souches mésenchymateuses de moelle osseuse (BMMSCs). Elles sont multipotentes et peuvent se différencier en plusieurs types de tissus. Au sein d'un organisme, elles permettent un équilibre entre prolifération, différenciation et mort cellulaire ce qui assure le maintien d'une bonne fonction tissulaire. Elles sont largement connues pour leur capacité de différenciation et de libération de facteurs paracrins, qui sont impliqués dans la régénération tissulaire (Tang et al., 2005). Ces cellules ont d'ailleurs démontré leur potentiel à sécréter des cytokines et des facteurs de croissance qui peuvent inhiber l'apoptose des cellules endothéliales et favoriser l'angiogenèse (Hung et al., 2007). De plus, la prolifération et la différenciation de ces cellules dépendent du microenvironnement, des cytokines inflammatoires, des facteurs de croissance et/ou d'autres molécules de signalisation (Conboy et al., 2005; Lacey et al., 2009). Ces cellules sont alors continuellement exposées aux différents facteurs systémiques et locaux et en présence du diabète les fluctuations de ces facteurs, notamment des hormones, AGEs, cytokines inflammatoires et des molécules du stress oxydatif, sont susceptibles d'influer sur leurs différentes fonctions (Cramer et al., 2010; Kume et al., 2005).

Histoire

Les premières études qui montrent que la moelle osseuse contient des cellules avec un potentiel de différenciation viennent d'Alexander Friedenstein (Friedenstein et al., 1970). Dans les années 1960, ce scientifique a fait de nombreuses expériences sur des précurseurs d'ostéoblastes dans la moelle osseuse. Il s'est rendu compte que deux semaines après avoirensemencé des cellules de moelle osseuse a une faible densité dans du milieu contenant du sérum de veau fœtal apparaissaient des colonies de cellules adhérentes au plastique, d'apparence fibroblastique (Figure 12). La cellule a l'origine de chaque colonie observée fut appelée « colony-forming unit-fibroblasts » (CFU-f). Chaque colonie implantée sous la capsule rénale de divers animaux à donner naissance, après quelques semaines de transplantation, a un tissu osseux. À l'aide d'animaux chimériques, il a pu montrer aussi que les cellules hématopoïétiques de la moelle dans les espaces osseux venaient de l'hôte alors que les cellules osseuses venaient du donneur.

Dans les années 1980-1990, d'autres travaux ont montré que les cellules identifiées par Friedenstein étaient multipotentes et pouvaient donner naissance à des ostéoblastes,

chondrocytes, et des adipocytes (Prockop, 1997). Depuis leur découverte ces cellules ont eu différents noms, de *cellules souches ostéogéniques* à *cellules souches stromales* de la moelle, pour un terme un peu plus général de *cellules souches mésenchymateuses*, qui est vite devenu populaire dans la littérature. La société internationale de thérapie cellulaire a proposé le terme de *cellules stromales mésenchymateuses multipotentes* (Horwitz et al., 2005).

Tous ces résultats indiquent bien qu'il existe dans la moelle osseuse de nombreuses espèces des précurseurs mésenchymateux qui peuvent être cultivés et ont un intérêt certain en thérapie cellulaire (Charbord, 2010).

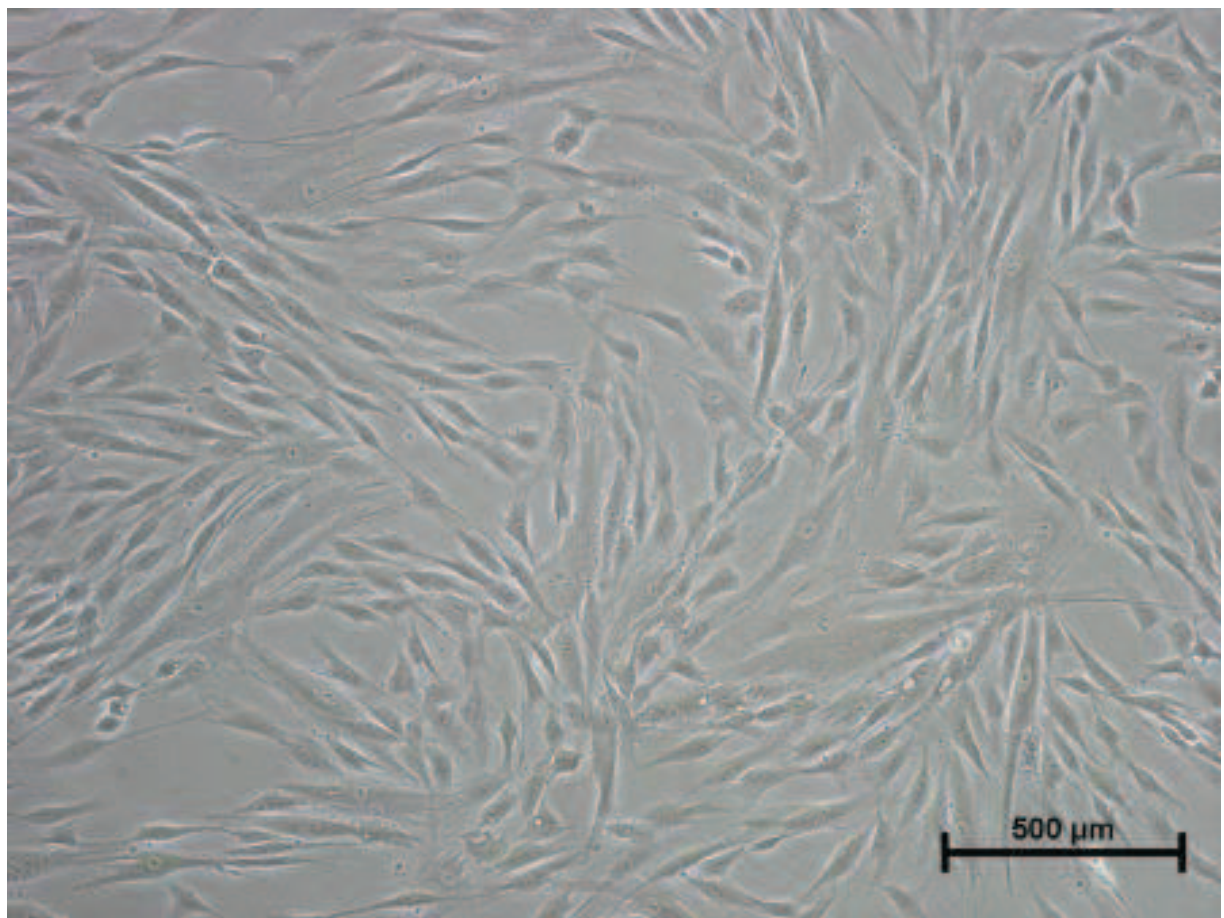


Figure 12: cellules souches mésenchymateuses en culture

Potentiel de différenciation

Les CSMs sont caractérisés par leur capacité à s'autorenouveler et à se différencier en cellule de la lignée mésodermale, ce qui inclus les adipocytes, les ostéoblastes, les chondrocytes, les cellules de tendons, les myocytes, et les cellules du mésoderme viscérales (figure 13) (Jiang et al., 2002; Pittenger et al., 1999; Tremain et al., 2001). De plus, de nombreuses études montrent que le potentiel de différenciation des CSMs s'étend au-delà de la lignée mésodermale et elles pourraient aussi se différencier en cellules d'origine endodermale ou ectodermale, tel que les hépatocytes (Schwartz et al., 2002), les neurones (Tropel et al., 2006), ou encore des cardiomyocytes (Rose et al., 2008). Le potentiel de différenciation des CSMs est majoritairement examiné par des études *in vitro* avec des milieux qui contiennent des facteurs de différenciation spécifiques. Ce sont ces études qui ont encouragé l'idée que les CSMs pourraient jouer un rôle dans la réparation tissulaire. Néanmoins, il existe des nombreuses d'études sur la différenciation de ces cellules *in vivo* et le peu d'études qui existent ont suggérées la greffe et la transdifférenciation des CSMs *in vivo* dans de nombreux modèles tels que les os, le cartilage (Fernandez-Moure et al., 2015; Pereira et al., 1995), le myocarde (Dai et al., 2005), les neurones (Bae et al., 2007), et les tissus hépatiques (Schwartz et al., 2002), mais savoir si les effets thérapeutiques sont dus à un effet paracrin ou a une vraie différenciation reste un challenge. Par exemple dans une étude, des CSMs marquées avec de la GFP (green fluorescent protein) ont été injectées en intraveineuse et on a étudié leur potentiel de greffe et de différenciation (Anjos-Afonso et al., 2004). Les cellules ont été principalement retrouvées dans les poumons et très faiblement dans d'autres organes, mais il n'y avait pas trace d'expansion clonale et le mécanisme de différenciation n'était pas vraiment étudié ce qui laisse à penser que les CSMs observés dans les différents tissus pourraient n'être que le résultat de rares fusions cellulaires. **Pour finir, le potentiel de régénération des CSMs a été étudié dans de nombreux modèles, mais il reste la question importante de savoir si ces cellules sont plus intéressantes pour leur potentiel de différenciation ou de relargage de facteur paracrins.**

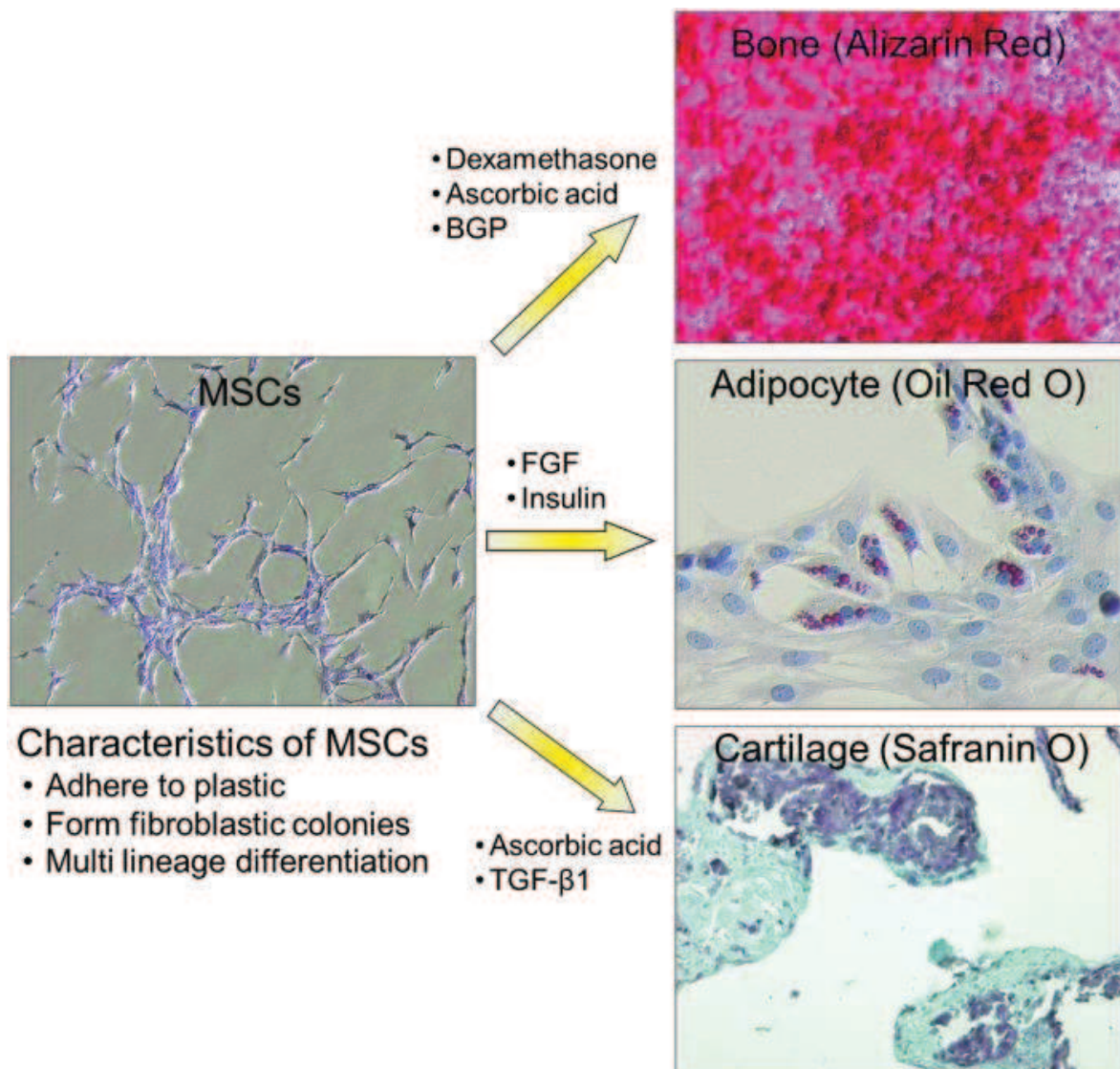


Figure 13: Capacité de différenciation des CSMs

Modulation immunitaire

Outre le potentiel de prolifération et de différenciation, les CSMs ont un potentiel immunosuppresseur et anti-inflammatoire avéré et de fait des implications cliniques majeures. Ce potentiel immunosuppresseur se retrouve à travers les interactions entre les lymphocytes associés à la fois au système immunitaire inné et adaptatif. Les CSMs suppriment la prolifération des

lymphocytes T (Glennie et al., 2005), la fonctionnalité des lymphocytes B (Augello et al., 2005), la prolifération des cellules natural killers et altèrent la production de cytokines inflammatoires (Spaggiari et al., 2008). Elles empêchent également la différenciation, la maturation et l'activation des cellules dendritiques (Jiang et al., 2005). Alors que les CSMs peuvent exercer leurs effets immunosuppresseurs par contact direct cellule-cellule, la production de facteurs solubles tels que le transforming growth factor- β (Keating, 2008), l'hépatocyte growth factor (HGF) (Di Nicola et al., 2002), le nitric oxide (Ren et al., 2008), et l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) (Meisel et al., 2004) implique aussi leurs effets paracrins. De plus, les CSMs peuvent créer un microenvironnement immunosuppresseur en générant des lymphocytes T régulateurs (Tregs). Leur capacité à induire des Tregs a été observée *in vitro* et *in vivo* dans différents modèles (Madec et al., 2009; Patel et al., 2010). Ces données suggèrent alors que les CSMs sont aussi des acteurs de la régulation de l'immunité via la suppression de cellules immunitaires actives, telles que les cellules dendritiques et le recrutement de Tregs.

Capacité paracrines des CSMs

De nombreuses études que ce soit *in vitro* ou *in vivo* ont montré que les CSMs permettaient la régénération des tissus sans pour autant que l'on constate un taux de cellules greffées élevé, une différenciation ou même une persistance de celles-ci dans l'organisme. Il a été décrit (Kinnaird et al., 2004a) que le milieu conditionné issu des cultures des CSMs peut stimuler la prolifération de cellules endothéliales d'une manière dose dépendante et cet effet a été expliqué en partie être par la présence dans le milieu conditionné de VEGF and bFGF. Néanmoins, la neutralisation en utilisant des anticorps anti-VEGF et anti-bFGF n'a pu que partiellement réduire cet effet ce qui laisserait à supposer, que bien d'autres cytokines entre en jeu. Ces constatations ont mené à la proposition d'un nouveau mécanisme qui consisterait à voir les CSMs relarguer des facteurs trophiques qui contribuent à la cicatrisation et la réparation tissulaires (figure 14). Cette hypothèse fut vérifiée par la suite dans différents modèles par injection du milieu conditionné de CSMs et l'obtention d'un effet identique voire supérieur à l'injection des cellules elles-mêmes. On a pu alors identifier de nombreux facteurs de croissance relargués par les CSMs, notamment des facteurs pro-angiogéniques tels que le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), le basic fibroblast growth factor (bFGF) ou encore l'hépatocyte growth factor (HGF). L'effet paracrin des

CSMs est donc avéré et a par la suite inspiré de nombreuses études sur plusieurs types cellulaires et de nombreuses pathologies. Il en ressort, qu'il existe de très nombreux facteurs de croissance relargués par les CSMs qui sont impliqués dans les mécanismes de réparations tissulaires intrinsèques à l'organisme.

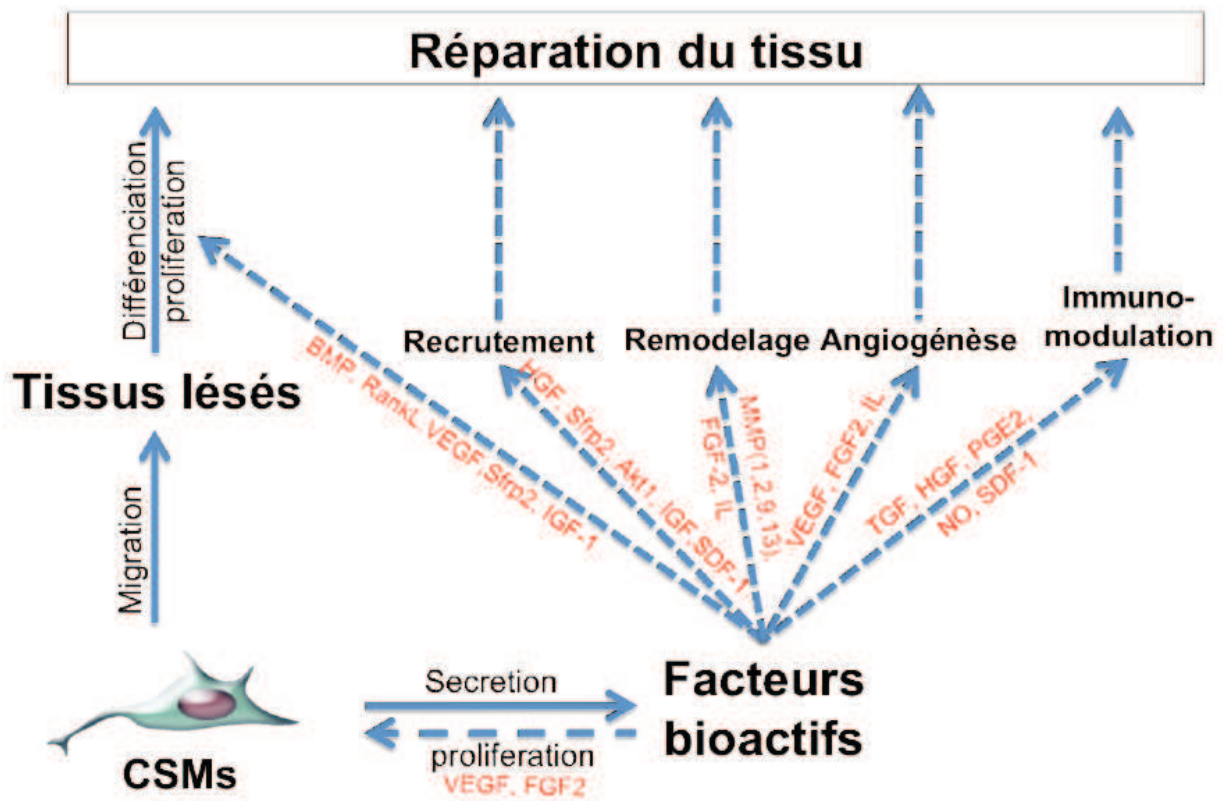


Figure 14: Capacité paracrine des CSMs (d'après Deschepper M.)

Médiateurs de l'immunomodulation

Bartholomew et al, ont été les premiers à observer les **fonctions immunomodulatrices** des MSCs, comme prouvés par l'effet inhibiteur dose-dépendant sur la prolifération cellulaire de lymphocytes dans des cultures mixtes (Bartholomew et al., 2002). Dans la continuité de ceci, l'équipe de Di Nicola's a démontré que l'effet immunosuppresseur observé est du a des facteurs solubles. Ainsi ; la prolifération de lymphocytes T était supprimé dans un système de transwell qui excluait le contact cellule- cellule (Di Nicola et al., 2002). La prolifération des lymphocytes T

a pu être partiellement restaurée grâce à l'addition d'anticorps anti transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) ou d'HGF, ce qui suggère que ces deux cytokines sont impliquées dans le processus d'immunomodulation des CSMs. Un autre article propose que l'IFN- γ joue un rôle crucial dans la communication entre CSMs et lymphocytes T en permettant la surexpression du programmed death ligand 1 (PD-L1) dans les CSMs, un co-inhibiteur connu de la réponse immunitaire (Sheng et al., 2008).

En plus de leur influence sur les lymphocytes, les médiateurs actifs des CSMs facilitent la transition des macrophages d'un phénotype pro-inflammatoire M1 à un phénotype anti-inflammatoire M2. Ce mécanisme a été proposé étant très précoce dans la détérioration tissulaire (Adutler-Lieber et al., 2013). Il y a deux étapes majeures de la réponse immunitaire: 1) reconnaissance et présentation de l'antigène; 2) activation, prolifération et différenciation des lymphocytes T. L'effet immunosuppresseur des CSMs n'implique pas seulement les lymphocytes T, mais aussi les cellules présentatrices d'antigène. Jiang et al ont démontré que les CSMs inhibaient la différenciation, la maturation et la fonction des cellules dendritiques (Jiang et al., 2005). Les cellules dendritiques matures placées en co-culture avec des CSMs ont montré une réduction de l'expression de CD83 et CD1a, deux marqueurs de la maturité des cellules. D'autres molécules telles que le CD80, le CD86, ainsi que l'IFN- γ , et l'interleukin 12 (IL-12) étaient aussi sous exprimés après traitement par les CSMs, rendant ainsi les lymphocytes T anergiques. Afin de distinguer les contacts cellulaires de la sécrétion de différents facteurs, les auteurs ont mis en place un système de transwell avec différents ratios de MSCs/monocytes. Les CSMs placées dans le compartiment du bas étaient capables d'empêcher la différenciation et la maturation des monocytes à un ratio de (1:10) MSCs/monocytes. On peut donc en conclure que les CSMs jouent un rôle dans la réponse immunitaire, incluant différentes étapes ainsi que différents types cellulaires et modes d'action. Avec au centre de ces phénomènes des acteurs paracrins.

Médiateurs antiapoptotiques

Pour empêcher la mort programmée des cellules, les CSMs synthétisent et sécrètent des protéines qui sont des inhibiteurs de l'apoptose, tel que le B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), la survivine, et Akt (Okazaki et al., 2008; Wang et al., 2012). Bcl-2 va principalement être exprimé ce qui va empêcher le relargage des activateurs de caspases et ainsi les cellules répondront moins aux

stimuli apoptotiques (Green and Reed, 1998). Il est important de souligner qu'en plus de la capacité de CSMs à synthétiser des protéines qui vont directement réprimer l'apoptose, elle secrète aussi des molécules qui vont neutraliser la voie de signalisation de l'apoptose et d'autre qui vont permettre la survie. Gerber et al ont montré que le VEGF pouvait prévenir l'apoptose induite par starvation de sérum en surexprimant Bcl-2 dans les cellules endothéliales (Gerber et al., 1998). Le VEGF participe également au processus antiapoptotique en activant la phosphorylation de la « focal adhésion kinase » (FAK), un signal pro-survie qui agit en supprimant l'apoptose induite par la p53 (Ilic et al., 1998; Liu et al., 1997; Lobo and Zachary, 2000). Les CSMs ont donc des capacités anti-apoptotiques avérées.

Médiateurs antioxydants

Le concept de stress oxydatif vient de la théorie des radicaux libres de Sohal et al et leur recherche sur l'âge (Orr and Sohal, 1994; Sohal et al., 1994). Le stress oxydatif est engendré par le déséquilibre entre oxydation et antioxydation en réponse à divers stimuli. Quand une réaction oxydative prend place, le processus suivant a lieu: infiltration de cellules inflammatoires, relargage de protéases, et accumulation de ROS (reactive oxygen species), ce qui inclut des ions d'oxygène, des radicaux libres et des peroxydes. Un « trop-plein » ou une insuffisance de ROS peut donner naissance à diverses maladies associées, tel qu'une carcinogenèse, des problèmes immunitaires, de l'inflammation, une neurodegeneration, ou des angiopathies (Fisher, 2004; Kahles et al., 2007; Kamata, 2009; Lull and Block, 2010).

Des recherches par Ohkouchi et al ont souligné la fonction protectrice de la stannocalcine 1 (STC1) dans les MSCs en réduisant l'apoptose liée au ROS (Ohkouchi et al., 2012). Une autre étude décrit comment la greffe de CSMs améliore l'environnement oxydatif dans un modèle de lésion du poumon induit par lipopolysaccharide (LPS) en augmentant l'expression de l'enzyme antioxydative hème oxygénase-1 (HO-1) et en réduisant l'expression de malondialdéhyde (MDA), qui est un indicateur de la peroxydation des lipides (Li et al., 2012). La concentration de cytokine pro-inflammatoire telle que le TNF- α , l'IL-1 β , et l'IL-6, des CSMs pourraient jouer un rôle dans cette modulation de l'activité observée. Une autre équipe qui a étudié la neurodegeneration a également identifié un facteur trophique antioxydant, le glial-derived

neurotrophic factor (GDNF) (Whone et al., 2012). Il reste néanmoins certain que la thérapie par CSMs a une influence sur l'environnement oxydatif, notamment grâce à divers facteurs antioxydants produits par ces cellules.

Médiateurs de la migration cellulaire

De nombreuses études, utilisant différents moyens de traquer les cellules injectées en intraveineuse, ont montré que les CSMs sont largement distribués dans les tissus notamment dans l'intestin, les reins, la peau, les poumons, le thymus et le foie. Ceci suggère que les CSMs « patrouillent » le corps jusqu'à ce qui peut être considéré comme une activation par une lésion ou autre pathologie (Deak et al., 2010; Devine et al., 2003). Des preuves indirectes de cette hypothèse ont été assez bien documentées dans divers modèles de maladie, dans lequel les CSMs ont montré une mobilisation plus rapide et une meilleure rétention sur les sites de lésions après une injection systémique ou locale (Assis et al., 2010; Jiang et al., 2006; Kawada et al., 2004).

Les études orientées vers le comportement migratoire des cellules ont donc proliféré, avec pour intention de maximiser le potentiel thérapeutique des CSMs via une meilleure migration des cellules. Les propriétés de migration des CSMs ont incité les chercheurs à employer ces cellules comme porteuses de médicament capables de délivrer une thérapie ciblée dans le cas de certaines tumeurs (Xiang et al., 2009). Différentes voies d'administration et différents chimio attractants ont été décrits notamment, par exemple, l'axe SDF1/CXCR4 dans la régénération médiée par les CSMs. Dans ce cas précis, l'expression de SDF1 dans le périoste d'une greffe osseuse semble nécessaire pour attirer les CSMs lors de la réparation osseuse (Kitaori et al., 2009). En neutralisant le SDF1 ou avec un antagoniste (TF14016), du CXCR4 la nouvelle formation osseuse induite par de CSMs injectés en intraveineuse était significativement réduite. Dans des conditions hypoxiques, les CSMs ont montré une meilleure mobilité vis-à-vis du SDF1 d'une manière dose-dépendante, le tout accompagné par des niveaux cellulaires élevés de CXCR4 (Yu et al., 2010).

Dans une autre étude, Tang et al ont montré que le milieu conditionné de CSMs modifiés génétiquement pour exprimer plus de VEGF contenait également plus de SDF1 et permettait des meilleures performances sur la réparation cardiaque grâce à une meilleure mobilisation des CSMs

en provenance de la moelle osseuse (Tang et al., 2011). Alors que de nombreuses études ont montré que la surexpression de SDF1 est un signal important quoique loin d'être unique pour une meilleure migration des cellules souches, d'autres études se sont portées plus spécifiquement sur CXCR4 l'autre acteur de l'axe. Les CSMs vont donc à la fois migrer en suivant des signaux paracrin, mais également en émettre pour recruter les cellules faisant partie du système de régénération déjà en place au sein d'un organisme.

Capacité angiogénique des CSMs

L'angiogenèse se caractérise par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de capillaires préexistants, alors que *l'artériogenèse* par le grossissement collatéral et la muscularisation de petites artérioles pour former de plus larges artères. L'angiogenèse est régulée par un subtil équilibre entre les angiopoïétines et leur inhibiteur ; ce phénomène est connu sous le nom « d'angiogenic switch ». C'est seulement quand on constate l'augmentation des cytokines et récepteurs liés à la néovascularisation que commence le processus d'angiogenèse. Il a été décrit que différentes voies telles que celle de l'hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pouvaient démarrer l'angiogenèse dans une pathologie ischémique (Wang G. et al 1995). HIF-1 est une nucléoprotéine avec une activité de transcription qui régule l'expression de nombreux gènes proangiogéniques tels le VEGF, le FGF, le NO, et l'insulin-like growth factor (IGF) (Forsythe et al., 1996; Pugh et al., 1997). Tous ces mécanismes physiologiques ont conduit à utiliser les CSMs pour le traitement des pathologies ischémiques, en effet ces cellules expriment et produisent de nombreuses protéines proangiogéniques dont le VEGF, l'HGF, le monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1), et le stromal cell-derived factor 1 (SDF1) qui sont des facteurs critiques pour le remodelage vasculaire (Kinnaird et al., 2004a). De nombreuses études ont exploré le potentiel des CSMs pour la régénération vasculaire, elles ont toutes montré une augmentation de la densité capillaire et de la perfusion collatérale après utilisation de CSMs (Mirotsoy et al., 2011; Shintani et al., 2001). La sécrétion de facteurs angiogéniques par les CSMs peut être surrégulée par de nombreuses chimiokines et des conditions d'hypoxie. De Luca et al ont montré que le transforming growth factor α (TGF- α) induit la sécrétion de différents facteurs de croissance ayant un rapport avec l'angiogenèse tel que le VEGF, l'HGF, l'IL-6, l'IL-8, le PDGF-BB et l'Ang-2 dans les BMSCs. De fait, le milieu conditionné de MSCs traité au TGF- α a induit une

croissance de vaisseau plus importante comparée au milieu conditionné de cellules non traitées (De Luca et al., 2011). De plus, Crisostomo et al ont montré que l'hypoxie, le tumor necrosis factor α (TNF- α) et les LPS stimulaient la production de VEGF, FGF-2, HGF et d'insulin-like growth factor 1 (IGF-1) via l'induction du facteur de transcription NF- κ B. Dans une autre étude, les LPS ont augmenté la sécrétion de diverses cytokines incluant l'IL-6 et le TNF- α , alors que le FGF-2 et l'epidermal growth factor (EGF) ont augmenté la production de HGF (Kilroy et al., 2007). Dans les BMMSCs préconditionnées avec de l'interferon- β (IFN- β) il y a une production plus importante de MCP-1 et d'interferon gamma-induced protein 10 que dans les MSCs non traités (Croitoru-Lamoury et al., 2007). Il a aussi été montré que l'hypoxie élève la sécrétion de VEGF, mais pas d'FGF-2 due à une surexpression du facteur de transcription HIF-1 α (Aranha et al., 2010). De la même façon, l'hypoxie augmente les niveaux de VEGF, mais pas d'FGF-2, d'HGF ou de TGF- β dans les MSCs de tissu adipeux (Rehman et al., 2004). De façon intéressante, la déprivation en sérum durant 30 jours a élevé le niveau de VEGF, d'HGF, d'IGF-1 et d'Ang dans le secretome de BMMSCs humaine (Bianco et al., 2008). Le milieu conditionné de ces cellules a permis de générer des protubérances vasculaires plus importantes dans un test de cercle aortique comparé au milieu conditionné des BMMSCs contrôles (Bianco et al., 2008). Toutes ces études nous permettent de conclure que l'effet proangiogénique des CSMs est dû en grande partie à des facteurs eux-mêmes proangiogéniques relargués par les cellules sur le site de lésions ou de pathologies ischémiques.

Thérapie cellulaire

Le choix des cellules

La thérapie cellulaire propose un vaste choix de cellules parmi lesquelles des cellules déjà différenciées et fonctionnelles tel que des cardiomyocytes, des progéniteurs engagés dans une voie de différenciation tel que les progéniteurs endothéliaux et enfin des cellules souches multipotentes (cellules souches mésenchymateuses) ou pluripotentes (cellules souches embryonnaire ou induite à la pluripotence). Les cellules souche mésenchymateuses nous intéressent plus particulièrement, car en plus de ne pas présenter les problèmes éthiques et techniques liés aux cellules souches embryonnaires ou aux IPS, elles présentent une capacité à induire la régénération certaine, ceci due en grande partie au relargage de différents facteurs dans leur environnement immédiat.

Le potentiel thérapeutique des CSMs

Différentes stratégies ont été utilisées pour augmenter la cicatrisation des plaies avec l'utilisation de CSMs. La transplantation de CSMs résulte en un taux particulièrement bas de différenciation et de greffe dans la plupart des pathologies, ce qui a conduit à penser que le mécanisme d'action principal des CSMs était un mécanisme paracrin. Une théorie confirmée par l'utilisation de milieu conditionné de CSMs dans divers cas de brûlures et de blessure cutanée chez les rongeurs. Le milieu conditionné de CSMs augmente la cicatrisation des plaies, la revascularisation, et diminue l'infiltration de cellules immunitaires (Wu et al., 2007). L'injection intraveineuse de CSMs isolés à partir de souris transgéniques GFP a démontré que les CSMs facilitaient une cicatrisation rapide et sont capables de se différencier en kératinocytes, cellules endothéliales et péricytes (Sasaki et al., 2008). Plus récemment les interactions entre les CSMs et les progéniteurs endothéliaux ont été étudiées. Rouwkema et al. ont démontrés que leur coculture permettait la différenciation angiogénique et la tubulogénèse dans les cas où les progéniteurs endothéliaux sont assez matures, mais pas chez les progéniteurs précoces, ce qui a permis de conclure que l'état de maturation des progéniteurs endothéliaux était d'une importance capitale pour le résultat final de la coculture (Rouwkema et al., 2009). La co-transplantation de CSMs et de progéniteurs

endothéliaux a permis d'améliorer de façon significative la guérison des plaies diabétique (Sukpat et al., 2013).

Le passage en clinique de l'utilisation des CSMs pour la guérison des plaies est prometteur. Différentes méthodes pour délivrer les cellules sont actuellement explorées avec pour idée d'augmenter la guérison des plaies à la fois aiguës et chroniques. La transplantation autologue de CSMs en utilisant un spray de fibrine pour les blessures aiguës ou chroniques des extrémités a montré une accélération de la fermeture de la blessure en général de manière dose dépendante (Falanga et al., 2007). De la même façon l'utilisation de collagène ensemercer avec des CSMs allogéniques non diabétique sur des ulcères diabétiques persistants a permis d'augmenter l'angiogenèse et la fermeture de la plaie (O'Loughlin et al., 2013). Une autre méthode thérapeutique possible par lesquels les CSMs peuvent être utilisées pour promouvoir la néovascularisation est d'isoler les cellules chez un patient, de les cultivées et de les placées dans une banque pour de futures transplantations autologues. Ces CSMs peuvent même être modifiées génétiquement ou preconditionnées pour induire une meilleure angiogenèse.

Le potentiel thérapeutique des CSMs est donc incroyable avec comme avantage d'éviter les problèmes éthiques associés avec les cellules souches embryonnaires ainsi que le rejet immunitaire des cellules. De plus les CSMS peuvent être obtenues en grande quantité et cultivées relativement facilement, les méthodes d'obtentions sont peu invasives et les sources sont variées. Les CSMs sont récoltées à partir de diverses sources tissulaires et par divers moyen technique, des études plus poussées sont donc nécessaires pour déterminer réellement si ces cellules de différentes sources sont vraiment comparables, ou si une meilleure classification pour celles-ci est nécessaire. Bien que cet aspect reste une limitation certaine, un classement plus poussé des CSMs pourrait être bénéfique d'un point de vue thérapeutique permettant d'avoir des populations cellulaires plus homogènes.

Thérapie cellulaire et angiogenèse

L'idée d'utiliser des cellules souches pour améliorer l'angiogenèse n'est pas neuve. La néovascularisation est nécessaire durant toutes les phases de la cicatrisation. Elle permet l'acheminement de nutriment à toutes les cellules qui entre en jeu lors de ce processus. La preuve

de concept a été rapportée par plusieurs groupes au cours des dix dernières années. Des cellules mononuclées issues de moelle osseuse se retrouvent au niveau des sites d'ischémie et sont associées à une formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Badiavas and Falanga, 2003; Tateishi-Yuyama et al., 2002). Des études suggèrent donc qu'un type cellulaire issu de la moelle osseuse peut contribuer directement à la néovascularisation. Avec les progeniteurs endothéliaux, d'autres types de cellules ont été identifiés dans la moelle osseuse notamment les cellules souches mésenchymateuses ayant le potentiel d'améliorer l'angiogenèse.

Les processus moléculaires entraînant l'angiogenèse impliquent divers médiateurs tels que le nitric oxide, le VEGF, le bFGF, l'HGF, les angiopoïétines et plein d'autres médiateurs relargués par les CSMs. Ces molécules conduisent les progeniteurs endothéliaux et les cellules musculaires lisses à migrer, proliférer et synthétiser de la matrice extracellulaire. Le relargage de ces molécules par les CSMs joue donc un rôle primordial dans l'augmentation de la densité des capillaires observée dans les tissus ischémiques des animaux traités avec des CSMs. Par exemple il a été montré que l'injection de CSMs issue de la moelle osseuse dans une zone ischémique d'un cœur de porc, rendu ischémique après ligation des coronaires, a résulté en une augmentation significative du flux sanguin et de la densité capillaire après 3 semaines (Kamihata et al., 2001). Les auteurs ont d'ailleurs montré que les CSMs de moelle osseuse après injection exprimaient le bFGF, le VEGF, et l'angiopoïétine-1 et que le niveau de ces facteurs proangiogéniques dans le muscle cardiaque était augmenté trois semaines après l'injection des cellules souches. De plus, les niveaux cardiaques d'interleukin-1 β (IL-1 β) et de tumor necrosis factor- α (TNF- α) étaient augmentés après l'injection des CSMs. Ces médiateurs ayant une activité proangiogénique les auteurs ont conclu que le relargage de ces facteurs contribuait à stimuler l'angiogenèse après injection de CSMs de moelle osseuse. L'activité proangiogénique de ces cellules via des facteurs paracrins a d'ailleurs été démontrée par la néoformation des vaisseaux dans les cœurs ischémiques injectés seulement avec du milieu conditionné de CSMs (Takahashi et al., 2006).

De nombreuses équipes ont démontré que les CSMs représentaient une source de facteurs proangiogéniques (Gnecchi et al., 2006; Kinnaird et al., 2004a). Délivrer des CSMs de façon locale *in vivo* augmenterait la perfusion collatérale à travers des mécanismes paracrins (Kinnaird et al., 2004b). Pour démontrer cette hypothèse, les auteurs ont injecté 1×10^6 CSMs dans le muscle adducteur de souris 24 heures après une ligation de l'artère fémorale. La densité des

capillaires a été améliorée dans les zones injectées avec les cellules. De façon surprenante les CSMs marquées étaient dispersées entre les fibres musculaires, mais pas incorporées dans le muscle mature. De plus on a pu constater une colocalisation du VEGF et des CSMs transplantées dans les tissus musculaires. Les auteurs en concluent donc que les CSMs participent au remodelage musculaire par des facteurs paracrins.

L'expression génique des CSMs cultivées en condition normale ou hypoxique a permis de démontrer que ces cellules expriment un large panel de cytokines proangiogénique dont beaucoup sont surexprimés en hypoxie (Kinnaïrd et al., 2004a). Les données sur les gènes ont été confirmées en utilisant des ELISA et des immunoblotting sur le milieu conditionné des CSMs. De plus, il a été démontré que le milieu conditionné promouvait la migration et la prolifération des progeniteurs endothéliaux et des cellules musculaires lisses de manière dose- dépendante *in vitro* et augmentait le flux sanguin et plus généralement le remodelage angiogénique chez les modèles *in vivo*.

Impact du diabète sur les CSMs

Les fonctionnalités des CSMs, incluant leur relargage de facteurs paracrins sont influencées par différents microenvironnements, par exemple un haut taux de glucose, une inflammation, ou une hypoxie semble modifier de façon intrinsèque les caractéristiques des cellules (Favaro et al., 2014; Januszyk et al., 2014; Ko et al., 2015; Rennert et al., 2014; Yan et al., 2012; Zhang et al., 2015). L'effet du microenvironnement diabétique sur les caractéristiques de CSMs a fait l'objet d'un certain nombre d'études récentes. Différents modèles animaux avec un diabète expérimental de type 1 et 2 sont couramment utilisés pour évaluer l'impact du diabète sur différents tissus *in vivo* et pour étudier l'effet du diabète sur différents types cellulaires soit (i) les caractéristiques des cellules issues d'un micro environnement diabétique sont comparés aux celles des cellules issues d'un micro environnement non diabétique soit (ii) les cellules issues des d'un micro environnement non diabétiques exposées dans des conditions qui imitent le « milieu » diabétique notamment milieu de culture avec un taux de glucose élevé.

Impact de diabète sur le potentiel de différenciation des CSMs

Pour déterminer l'impact du diabète sur la différenciation des CSMs dans différentes lignées, les cellules ont été cultivées dans de milieu de culture contenant de facteurs spécifiques et caractérisés par l'expression des marqueurs spécifiques pour chacune d'entre elles.

En particulier le potentiel des CSMs à se différencier en ostéoblastes dans un environnement diabétique a été étudié par de nombreuses équipes. Dans le cas de diabète de type 1 chez la souris (animaux ayant subis un traitement a la streptozotocine) il a été décrit une modification des CSMs vers l'adipogénèse plutôt que l'ostéogénèse (Botolin and McCabe, 2007) le nombre d'ostéoblastes aussi bien que les niveaux de runx2 et d'ALP sont restés inchangés Le RT-qPCR sur des extraits de l'ARN au niveau de tibias a montré une augmentation de différents marqueurs adipogéniques (PPARG, resistin et l'aP2), associés avec une augmentation de l'adiposité de la moelle osseuse. En contraste, l'osteocalcine (un marqueur tardif de la différenciation

oseoblastique) était diminuée. Chez le rat diabétique de type 1 des CSMs non différenciés se caractérisent par une expression d'Alp, de Runx2, de Col1a1, d'ostéopontine, d'ostéocalcine et d'ostéoprotégérine réduite et une minéralisation de la matrice extracellulaire plus faible (Silva et al., 2015). Dans ce modèle de diabète de type 1 les gènes liés à la différenciation adipogénique (Pparg, Irs1 and Irs2) étaient surexprimés toujours chez les CSMs non différenciées.

Pour ce qui est du diabète de type 2, une densité et une formation osseuse réduite a été rapporté chez le rat Zucker diabetic fatty rats (ZDF) (Hamann et al., 2011). Ces équipes ont montré que les bases cellulaires de ces anomalies sont une ostéoblastogénèse imparfaite. Plus précisément Hamann et al, ont montré que chez les ZDF-CSMs cultivées dans un milieu contenant des facteurs de différenciation, l'activité de la phosphatase alcaline était réduite de 20% s après 14 jours et la minéralisation de la matrice était diminuait de 55% après 21 jours de culture. De plus, l'expression de gènes spécifiques aux ostéoblastes tel que Runx2, la bone morphogenic protein 2 (BMP-2), l'ostéopontine, et l'ostéocalcine était aussi réduite néanmoins dans cette étude le potentiel adipogénique des CSMs n'a pas été exploré.

Le potentiel adipogénique des CSMs a été étudié chez un autre modèle du diabète expérimental de type 2, les rats WNIN/GR-Ob (des mutants qui développent un diabète de type 2 avec une résistance à l'insuline). Les CSMs issues de rats WNIN/GR-Ob cultivées dans un milieu adipogénique développent de façon significative plus de gouttelettes lipidiques que les rats non diabétiques (Madhira et al., 2012). De plus, chez ces cellules des cytokines inflammatoires telles que l'IL6, le TNF- α ainsi que « l'endoplasmic reticulum stress protein RL-77 » sont surexprimés. Ces altérations indiquent que les CSMs modifiées par un diabète de type 2 s'engagent vers une voie adipogénique plutôt qu'ostéogénique. Peu des données existent sur d'autres types de CSMs. Une récente étude rapporte néanmoins que les CSMs issues du cordon ombilical des femmes enceintes diabétiques ont un potentiel de différenciation ostéogénique et adipogénique diminué comparé aux CSM diabétiques (Kim et al., 2015).

Ces données mettent en évidence un potentiel ostéogénique diminué pour les cellules d'origine diabétiques avec une capacité à la différenciation adipogénique supérieure dans bien des cas. Néanmoins les études restent éparpillées quant à multipotentialité et les voies de signalisations impliquées et ceci en particulier pour le diabète de type 2.

1. Impact du diabète sur la viabilité des CSMs

Dans le cas du diabète expérimental de type 1 chez le rat (modèle des animaux traité à la streptozotocine) les CSMs cultivées dans un milieu normoglycémique ont un potentiel de prolifération diminué (Stolzing et al., 2010). Leur nombre et elles montrent une augmentation de leurs tailles et une réduction de leur nombre comparé aux animaux non diabétiques. Ces altérations sont associées avec une augmentation de l'expression de p21 et p53, qui sont des marqueurs de sénescence impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. De plus, dans ces cellules la production de ROS et l'apoptose sont augmentées de même, chez des CSMs de rat diabétiques de type 1, il a été également décrit une augmentation de l'apoptose et une diminution de la prolifération et de l'activité métabolique (Silva et al., 2015). Par ailleurs, chez la souris diabétique de type 1, il a été aussi rapporté une augmentation de l'apoptose, une réduction de leur nombre et de leur taux prolifération comparée à celles de cellules issues des animaux non diabétiques (Ko et al., 2015). Ces altérations ont été corrélées à une expression élevée de $\text{TNF-}\alpha$, et suggèrent l'implication du processus inflammatoire. Cette observation pourrait offrir de nouvelle perspective pour le traitement du diabète, en réduisant l'inflammation pour optimiser le potentiel des CSMs.

Une étude récente dans le cadre du diabète gestationnel, sur les capacités de la prolifération et la viabilité de CSMs de cordon humain a montré que les cellules issues de mères diabétique ont un plus faible taux de prolifération, une augmentation du temps de doublement, une viabilité réduite et une apoptose plus importante. (Wajid et al., 2014). De façon intéressante, comparées aux cellules d'origine non diabétique, ces cellules ont une utilisation du glucose réduite et un potentiel angiogénique augmenté avec surexpression du VEGFA. D'après ces données, le diabète de type 1 réduirait la viabilité et la prolifération de CSMs ce qui pourrait avoir des conséquences sur la physiopathologie osseuse, entraînant une réduction de la formation osseuse et une ostéoporose. De même, le diabète gestationnel semble avoir un effet direct sur les CSMs. Néanmoins, peu de connaissances existent au regard des voies de signalisation impliquées dans ce phénomène et surtout sur l'impact du diabète de type 2 sur ces cellules.

Impact du diabète sur l'effet paracins des CSMs

Les CSMs sont un outil prometteur pour le traitement des blessures, principalement parce qu'elles secrètent une multitude de facteurs bioactifs qui vont conduire à la reformation et à la régénération des tissus (Meirelles Lda et al., 2009; Zdravkovic et al., 2009). Les CSMs activent des mécanismes de régénération intrinsèque en relarguant des facteurs trophiques et immunomodulateurs. Les CSMs produisent et relarguent différents facteurs anti-apoptotiques, immunomodulateur, angiogéniques et chimiotactiques. De fait, de nombreuses études ont modifié leur conclusion quant au mécanisme de régénération passant de la différenciation à un mécanisme paracrin (Aali et al., 2014; Karp and Leng Teo, 2009; Meirelles Lda et al., 2009; Wagner et al., 2009) et il a été montré que les CSMs migrent préférentiellement vers les sites de blessures ce qui pourrait amener les médiateurs nécessaires sur le site de la régénération, permettant la survie et le remplacement des cellules environnantes (Rombouts and Ploemacher, 2003; Shi et al., 2010). Le recrutement des CSMs et le microenvironnement du site de la blessure ou la pathologie sont par conséquent primordiaux pour une régénération optimale (Song et al., 2013; Wang et al., 2013).

Le relargage de facteurs paracrins par les CSM est influencé par différents microenvironnements, par exemple un haut taux de glucose, une inflammation, ou une hypoxie (Favaro et al., 2014; Januszyk et al., 2014; Ko et al., 2015; Rennert et al., 2014; Yan et al., 2012; Zhang et al., 2015). Des pathologies comme le diabète pourraient modifier drastiquement le relargage de facteurs paracrin des CSMs ce qui modifierait leur potentiel régénératif.

Néanmoins, il y a peu de travaux sur les modifications du secrétome des CSMs dans le contexte du diabète ou même dans les pathologies associées, bien que plusieurs données suggèrent une implication sur la fonctionnalité des CSMs. Par exemple, pour le syndrome de Donohue, qui est caractérisé par une sévère résistance à l'insuline, due à une mutation du récepteur à l'insuline (*INSR*) il a été montré que les progéniteurs mésenchymateux maintenaient une signalisation en aval de l' *INSR*, passant par l'*IGF1R* qui pourrait en grande partie compenser la mutation avec une surexpression de *HK1*, *CYC1*, *SOD2* et de *CAT* (Balhara et al., 2015). Dans le cas de diabète expérimental de type 1 (rats traités à la streptozotocine), les MSCs voient une diminution dans l'expression de certains gènes angiogéniques tel que le *Vegfa*, l'*Angpt1*, l'*Angpt2*, le *Vegfc*, le *Fgf2*, le *Pgf*, et le *Pdgfb*, tandis que les niveaux de *Hgf* et de *Tgfb* ne sont pas significativement différents (Kim et al., 2014). Malheureusement, dans cette étude le secrétome n'a pas été caractérisé. Par ailleurs, la surexpression de *PGE2* par des CSMs semble être impliquée dans des

modifications de la réponse immunitaire (Zanone et al., 2010). Dans cette étude sur la réponse immunitaire, les MSCs issues de la moelle osseuse d'individus diabétique de type 1 diminuent *in vitro* la réponse pro-inflammatoire des lymphocytes T à un stimulus antigénique et ils induisent des cellules productrices d'IL-4, ce qui suggère une modification vers un phénotype anti-inflammatoire des cellules T. De plus, le diabète altère le potentiel angiogénique de CSMs issues du tissu adipeux de souris diabétiques de type 2 en sélectionnant des sous-populations cellulaires. Dans cette étude de nombreux facteurs angiogéniques semblent être sous exprimés dans les CSMs diabétiques, tel que le VEGFA, le PDGFA, le FGF2 et l' SDF-1 (Rennert et al., 2014). Les CSMs de moelle osseuse issues de rat diabétique de type 1 et traitées avec un fort taux de glucose présentent une activité angiogénique altérée très probablement par le stress induit par le glucose (Kim, Y. S et al 2014). Ces altérations du potentiel angiogénique seraient médiées par Angiopoietin-Like 4 par et le miR-132. D'ailleurs un taux de glucose élevé dans le milieu de culture permet la surexpression de GSK3 β et d'autre part réprime le CXCR-4, la β -catenin, LEF-1, et la cyclin D1 (Zhang et al., 2015). Enfin, des concentrations élevées de glucose modifiaient le potentiel régénérateur des CSMs. De façon plus précise une équipe a réalisé une série de mesures transcriptomiques sur des cellules diabétiques et a été capable de montrer une différence dans l'expression de nombreux gènes, avec une sous-expression de GPD1, CEACAM1, IL10, IL12, et de la famille des PPAR et une surexpression d'IL6, couplé avec une modification des gènes du métabolisme du glucose (GCG, GCK, INSR, FBP1, CEBPA, et l'IGFBP5) (Cramer et al., 2010). Néanmoins, la encore, une étude complète du sécrétome n'a pas été réalisée.

Les données concernant les modifications du sécrétome des cellules issues d'un microenvironnement diabétique sont donc rares et il n'existe aucune étude complète sur la modification de caractéristique ainsi que des effets paracrin sur les CSMs dans la cadre d'un diabète de type 2. Des études plus approfondies sur les modifications de ce sécrétome sont donc nécessaires pour mieux comprendre le rôle des CSMs dans les pathologies liées au diabète ainsi que l'apport potentiel de ces cellules dans la médecine régénératrice.

Objectif de l'étude

Les diabètes sont des maladies associées à une perturbation du métabolisme glucidique et représentent un problème de santé publique majeur. L'importante majorité des patients (90%) présente un diabète de type 2 qui est bien souvent associé à l'obésité (Ghalandari et al., 2015). Il y a un accroissement des taux de prévalence de manière constante du diabète dans le monde et il touche actuellement 3.3 millions de personnes en France et environ 387 millions dans le monde (Guariguata, 2013). **Notre étude porte donc sur le diabète de type 2 qui est une maladie complexe qui se caractérise par d'une part l'insulinorésistance des tissus qui entraîne que l'organisme est incapable d'adapter sa production d'insuline aux besoins des tissus cibles et d'autre part par l'hyperglycémie.**

Les complications du diabète les plus courantes sont vasculaires. Chez le diabétique, l'angiogenèse est défectueuse et paradoxale. Les conséquences macrovasculaires du diabète entraînent des complications cardiovasculaires qui sont dévastatrices. Un attribut principal des complications cardiovasculaires diabétiques est une athérosclérose accélérée associée à un stress oxydatif, une résistance à l'insuline, et un syndrome métabolique (Martin-Timon et al., 2014). De plus, une angiogenèse exacerbée est responsable de pathologie telle que la rétinopathie ou la néphropathie diabétique. La microangiopathie qui survient lors du diabète modifie aussi le microenvironnement de la moelle osseuse et peut influencer sur l'homéostasie du tissu osseux et la fonctionnalité des CSMs (Oikawa et al, 2010). Il existe donc deux types de conditions angiogéniques qui coexiste dans différents tissus lors du diabète à la fois anti et proangiogénique. Ce paradoxe indique que le microenvironnement local de chaque organe joue un rôle très important dans le processus angiogénique.

Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) sont connues pour leur potentiel de prolifération, de différenciation, qui sont impliquées dans la régénération tissulaire (Tolar et al., 2010). Plus récemment, pour tenir compte du faible taux de survie des CSMs après transplantation, il a été proposé que le rôle des CSMs était précoce, transitoire et consistait en la sécrétion d'un panel de facteurs de croissance favorisant le recrutement, la prolifération et la différenciation de cellules présentes localement. Ces cellules ont d'ailleurs démontré leur

potentiel à sécréter des cytokines et des facteurs de croissance qui peuvent inhiber l'apoptose des cellules endothéliales et favoriser l'angiogenèse (Hung et al, 2007). Les mécanismes qui associent le microenvironnement et les fonctions des CSMs dans un contexte diabétique restent actuellement méconnus. Le diabète modifie le microenvironnement de la moelle osseuse et par conséquent peut modifier les caractéristiques des CSMs et influencer la fonctionnalité de CSMs transplantées tout autant que leurs effets autocrins et/ou paracrins sur les cellules environnantes. L'étude du potentiel de CSMs diabétiques et du microenvironnement diabétique sur de CSMs pourrait alors avoir d'importantes implications cliniques. **Dans une optique cognitive et translationnelle, il est essentiel de déterminer les fonctionnalités pro-angiogène des CSMs et leur sécrétome provenant de sujets sains et diabétiques et d'en identifier l'effet du microenvironnement diabétique sur ces paramètres.**

Dans la pathologie diabétique, il fut très tôt observé par ailleurs des phénomènes qui consistaient à conserver certaines caractéristiques de la maladie même après un retour à la normale de la glycémie et de la production d'insuline. Peu d'importance fut portée à ces travaux jusqu'à ce que des essais cliniques de grande ampleur en viennent aux mêmes conclusions. Ainsi naissait le concept de mémoire métabolique qui consiste à voir certaines conséquences du diabète être transmises de cellule mère à cellule fille, malgré le retour à la normale du taux de glucose et de la production d'insuline. **Ce concept est primordial dans notre étude ou nous proposons d'étudier les modifications subies par les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse sortie de leur contexte diabétique in vitro et de faire le point sur les modifications de fonctionnalité et de sécrétome de ces cellules dans un environnement « sain ».**

L'objectif primaire de cette étude est alors de caractériser l'impact du diabète sur la fonctionnalité et le potentiel angiogénique de CSMs à l'aide du modèle de rat dit Zucker Diabetic Fatty (ZDF). Il existe plusieurs types de modèles de rats diabétiques de type 2 dont notamment le, Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF), le Wistar fatty rats, le Zucker diabetic fatty (ZDF) rats, et le Spontaneously Diabetic Torii (SDT) fatty rats, qui est relativement nouveau et a été établie en introduisant l'allèle fa du Zucker fatty rat dans le génome d'un rat SDT normal. Nous avons choisi d'utiliser le rat ZDF qui a une mutation sur un récepteur de la leptine. Ce

modèle présente toutes les caractéristiques d'un diabète de type 2 à un âge prévisible (Etgen and Oldham, 2000)

Le premier volet des travaux de cette thèse vise à étudier le rôle du microenvironnement diabétique sur diverses fonctionnalités des CSM et en particulier leur pertinence face à l'angiogenèse. Ainsi, le rendement, le nombre de colonies, la migration, la prolifération cellulaire, la multipotentialité ont été évalués.

Le deuxième volet des travaux de la thèse vise à caractériser l'impact du diabète sur les effets paracrins des CSMs et en particulier du secretome et son potentiel pro-angiogénique. Les CSMs issues de moelle osseuse sont prélevées chez les rats ZDF (âgés de 14 semaines ; diabète précoce) et les rats LEAN (contrôles). L'utilisation du surnageant de culture de CSMs afin de caractériser leur sécretome et le potentiel angiogénique de celui-ci *in vitro* et *in vivo* sont au cœur de l'étude.

Introduction de l'article 1

Le diabète de type 2 est associé avec une modification de la neovascularisation et de la cicatrisation de divers organes notamment l'os (Retzepi et al., 2010) (Sidaway, 2015). Bien que les mécanismes exacts derrière ces pathologies restent méconnus, des données actuelles montrent qu'au diabète s'associe des dysfonctionnement cellulaire et moléculaires (Spinetti et al., 2013). Plus précisément, le diabète a été lié à une modification de la fonctionnalité des progéniteurs endothéliaux ce qui a un effet certain sur l'angiogenèse (Spinetti et al., 2013). De plus, le diabète change le profil cellulaire de la moelle osseuse (Piccinin and Khan, 2014) modifiant les cellules qui s'y trouvent notamment les cellules souche mésenchymateuses. Le diabète altère également la différenciation ostéogénique de ces cellules (Madhira et al., 2012).

De nombreuses approches thérapeutiques qui cherchent à pallier aux problèmes liés aux microangiopathies du diabète et aux ont été développées. Des thérapies basées sur l'utilisation de cellules semble très prometteuse car elles pourraient contribuer à la fois directement (via la différenciation) et d'un point de vue paracrin à la régénération tissulaire. Cette approche a d'ailleurs fait l'objet de divers thérapies expérimentales avec injections de fibroblastes ou de coculture de fibroblaste et kératinocytes dans le traitement des blessures cutanées due au diabète (Rennert RC et al., 2013). De plus, de nombreux biomatériaux sont en développement pour optimiser la survie et la fonctionnalité des cellules dans un environnement difficile de transplantation ().

La thérapie cellulaire peut s'appuyer sur diverses sources de cellules. Les cellules souches mésenchymateuse de la moelle osseuse sont un type de cellules souches adultes uniques. Elles auraient la capacité de donner naissance à des cellules endothéliales, des progéniteurs adipocytaires ou ostéoblastiques (Dong et al., 2008; Wagner et al., 2009) de plus leur effets paracrins encouragent grandement l'angiogenèse. Elles migrent sur les sites de blessures et libèrent ces facteurs paracrins qui contribuent à la réparation tissulaire (Dong et al., 2008; Wagner et al., 2009). Elles sont donc une source intéressante pour la thérapie cellulaire grâce à leur multipotentialité et leur sécrétion de facteurs paracrins incluant des facteurs de croissance et

diverses cytokines. Ces cellules ont également montrés leur efficacité dans divers modèles de cicatrisation des plaies, de revascularisation ou de cicatrisation osseuse (Aali et al., 2014; Davey et al., 2014; Napoli et al., 2014; Zorina et al., 2003) . De plus, la moelle osseuse est un réservoir intéressant de cellules qui peuvent être employées pour des applications cliniques autologues. Cette perspective permet de contourner les problèmes liés à l'immunogénécité des cellules dans le cadre de greffe allogéniques.

L'intérêt d'une thérapie cellulaire autologue chez le patient diabétique peut néanmoins être limité de par le fait que le phénotype des cellules peut être impacté de façon négative par le diabète. De fait, l'efficacité d'une thérapie avec des cellules souche mésenchymateuse pour la cicatrisation osseuse et vasculaire chez le diabétique reste à élucider.

L'étude qui suit est axée sur la caractérisation des propriétés fonctionnelles et du potentiel de différenciation de cellules souches mésenchymateuses provenant d'un microenvironnement diabétique. Les expériences ont été menées avec des rats Zucker Diabetic Fatty (ZDF) un model de diabète de type 2 bien documenté (Etgen and Oldham, 2000). Les résultats de la présente étude ont montré que les cellules souches mésenchymateuses issues de rat ZDF présentent des propriétés modifiées après une culture *ex vivo* dans des conditions normoglycémique. Ces données posent la question de leur implication dans les troubles squelettiques liés au diabète et de leur utilisation dans une thérapie cellulaire en autologue.

Article 1: Experimental Type 2 Diabetes impairs differently functional properties of Bone Marrow mesenchymal stromal cells pertinent to tissue engineering.

**Experimental Type 2 Diabetes impairs differently functional properties of Bone
Marrow mesenchymal stromal cells pertinent to tissue engineering**

**JONATHAN RIBOT ¹, CELINE CORDIER ^{*}, GUILHEM FRESCALINE ^{*}, MORAD
BENSIDHOUM¹, HERVE PETITE ¹, FANI ANAGNOSTOU ^{1,2}**

**1 Laboratory of Bioingénierie et Biomécanique Ostéo-articulaires-UMR CNRS 7052
Paris 7-Denis Diderot University, Paris, France.**

**2 Department of Periodontology, Service of Odontology,–Pitié Salpêtrière Hospital, et
Hôtel-Dieu Hospital AP-HP, Paris 7-Denis Diderot University, U.F.R. of Odontology, Paris,
France.**

Running Title: BMMSCs functionality impaired in type 2 diabetes.

Key Words: MSCs, diabetes mellitus type 2, differentiation, functionality

**Laboratoire de Bioingénierie et Bioimagerie Ostéo-Articulaire
Faculté de Médecine Site Villemin 10 avenue de Verdun
75010 Cedex Paris France
Tél. : 01 57 27 85 61 Fax : 01 57 27 85 70**

(En préparation)

ABSTRACT

Bone marrow mesenchymal stromal cells (BMMSCs) have been highlighted as a potential therapeutic tool for cell therapy in diabetes-associated secondary complications. Type 2 diabetes mellitus (T2DM) changes bone marrow environment but its consequences on BMMSCs characteristics remain unclear. This study aimed to investigate therefore the functionality and multipotency of BMMSCs issued from a T2DM microenvironment and regarded as candidates to regenerative medicine. BMMSCs were harvested from Zucker Diabetic Fatty rats (ZDF) (an obese T2DM model) and its littermate Zucker LEAN (ZL) (control). ZDF-BMMSCs were fewer, with limited clonogenicity (by 2-fold $p<0.05$), proliferation (by 50% $p<0.001$) migration abilities (by 25% $p<0.05$) and increased apoptosis rate (by 2.5-fold $p<0.001$), than their ZL counterpart. Moreover, ZDF-BMMSCs had enhanced ability to undergo adipogenic differentiation (by 2-fold $p<0.05$) in response to adipogenic factors in the culture medium, possibly due to having been primed to undergo such differentiation *in vivo*, prior to isolation while their potential to differentiate into an osteoblast phenotype remained unchanged. They expressed differentially angiogenic genes (with 10 genes being upregulated and 11 gene being under-regulated) and despite the fact that under the experimental conditions used in the present study they didn't undergo endothelial differentiation *in vitro* they led to impaired vascular formation *in vivo*. Importantly our findings provide evidence that BMMSCs issued from a T2DM microenvironment remained impaired when cultured *ex vivo* under normoglycemic conditions and/or placed in "healthy" microenvironment and raises questions for their use for autologous stem cell therapy in diabetic individuals.

INTRODUCTION

Type 2 Diabetes mellitus (T2DM) reach epidemic proportions worldwide. This disease is caused by a combination of genetic and non-genetic factors that result in insulin resistance, insulin deficiency and hyperglycaemia and leads to complications in a number of organ systems including the skeleton. Besides macro- and micro vascular complications (cardiovascular diseases, retinopathy, neuropathy, and nephropathy), T2DM is associated with increased risk of osteopenia, osteoporosis, bone fragility (Schwartz, 2015) and impaired wound (Sidaway, 2015) and bone healing (Retzepi et al., 2010) but the underlying mechanisms are not fully understood. Bone disorders seem to involve several, only partly elucidated, mechanisms, such as increased content of advanced glycation end-products, altered bone turnover (Reinwald et al., 2009), changes on cellular makeup of bone marrow (Piccinin and Khan, 2014) as well as altered differentiation of osteogenic cells (Madhira et al., 2012). Indeed, in the bone marrow, T2DM induces vascular endothelial cell dysfunction (Spinetti et al., 2013), increases adiposity (Paccou et al., 2015) and reduces osteoblastogenesis. Adipocytes and osteoblasts are differentiated from bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs), and it is possible that the T2DM-associated bone disorders involve altered BMMSCs behaviour.

BMMSCs are a unique type of adult stem cells. These cells are believed to give rise to endothelial cells and mesenchymal progenitor cells such as adipocytes and osteoblasts. They home to sites of injuries, differentiate into specific cells and contribute to tissue repair (Dong et al., 2008; Wagner et al., 2009). They have high proliferation abilities, differentiate into numerous cells types, including fibroblasts, osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, vascular endothelial cells (Jiang et al., 2002; Pittenger et al., 1999; Tremain et al., 2001), and exert a paracrine effect by the

release of growth factors and cytokines (Hung et al., 2007). They play a key role in the osteogenesis and angiogenesis. Their phenotype is strongly determined by their “milieu” and it has been reported that specific environment (high glucose, inflammation, and hypoxia conditions, ROS production) has deleterious effects (Silva et al., 2015) (Hung et al., 2007; Stolzing et al., 2010) The picture is less clear in the case of obese T2DM in which the data on BMMSCs phenotypical and functional properties are conflicting and less complete (Madhira et al., 2012).

Moreover, BMMSCs, due to their multipotency and ability to secrete angiogenic factors, cytokines, and immunomodulatory substances are an attractive cell source for tissue engineering approaches (Aali et al., 2014; Davey et al., 2014; Napoli et al., 2014; Zorina et al., 2003) and their use to treat T2DM secondary complications it is of particular interest (Davey et al., 2014). The presence of T2DM is an important consideration in preparing BMMSCs from donors and predicting their behaviour in host but relatively little is known about the real consequences of T2DM on BMMSCs characteristics.

This study was focused therefore on the characterisation of the functional properties and differentiation potential of BMMSCs issued from a T2DM microenvironment and regarded as candidates to regenerative medicine. Our investigations were performed using BMMSCs issued from Zucker Diabetic Fatty (ZDF) (Leprfa/fa) rat an obese T2DM- well documented model, and from their age matched littermate; the Zucker Lean control (ZL) (Leprfa+/Lepr+/+) rats (Etgen and Oldham, 2000). Results obtained in the present study provide evidence that the obese T2DM-BMMSCs were dysfunctional and remained impaired when cultured *ex vivo* under normoglycemic conditions and/or placed in “healthy” microenvironment raising therefore

questions for their involvement in bone disorders as well as their use for autologous stem cell therapy in diabetic individuals.

MATERIALS AND METHODS

Animal model

Adult, 8-week old male, Swiss nude mice, and adult 12-13-week old male, obese Zucker fa/fa rats (ZDF) and their lean fa/+ litter-mates (ZL) were purchased from Charles River (L'Arbresle, France). The animals were housed operated and euthanized using procedures in accordance with the European Community Standards on the Care and Use of Laboratory Animals. The experimental procedures were approved by the Ethics Comity of University Paris-Diderot.

Diabetic condition in rats was determined on the day of sacrifice. Venous blood was collected and glycemic state was evaluated using glucometer (Roche Diagnostics, France). Plasma concentrations of glucose and fructosamine were determined using commercially available kits from Roche Diagnostics (Roche Diagnostics, France) following the manufacturer's instructions.

Isolation of rat bone marrow derived mesenchymal stem cells (BMMSCs)

Isolation and characterization of BMMSCs obtained from obese Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats and from Zucker Lean litter-mates (ZL) used as controls in the present study were performed as described previously (Frescaline et al., 2012). The femurs and tibias from each rat were cleaned of connective tissues and their respective epiphyses removed to allow insertion of a 23-gauge needle connected to syringe containing serum-free medium. Mononuclear cells in the harvested marrow were then homogenized in complete medium composed of alpha-Modified Eagle's Medium (α MEM) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum and 1% (v/v) antibiotic/antimycotic (ATB/ATM) solution (PAA Laboratories

GmbH, Pasching, Austria). The isolated cells from ZL and ZDF rats were seeded separately at the density of 5×10^5 cells/cm² on and cultured at 37°C in a humidified 5% CO₂ / 95% air environment. After 2 days of culture, supernatant media containing non-adherent cells were discarded. Fibroblastic colonies (CFU-F) appeared at day 5 of culture and were all pooled at day 12 (cell passage 1). For amplification of the ZL and ZDF-BMMSCs populations, the cells at subconfluent stage (after 3 days) were trypsinized (trypsin 0.005%, EDTA) and were seeded at 10×10^3 cells/cm². The supernatant media were changed twice a week. BMMSCs (passage 2-3) were used for all the experiments in the present study. BMMSCs were assessed for stromal origin by fluorescence-activated cell sorting using makers such as CD29 and CD45 and differentiation into osteogenic and adipogenic lineage.

Fibroblastic Colony-Forming Unit (CFU-F) Assay

Bone marrows, mononuclear cells were seeded at 5×10^5 cells/cm² in individual wells of 6-well tissue culture plates. The supernatant culture medium containing non-adherent cells was discarded and cells were cultured for fourteen days. At that time, cells were rinsed with PBS and stained *in situ* using the May-Grünwald Giemsa protocol. The stained cells in each well were photographed using a Nikon Eclipse TE 2000U inverted microscope. It is considered as derived from one CFU-F each colony (measuring) more than two mm (which contain more than fifty adherent fibroblastoid cells); smaller clusters of cells were excluded from further analysis. The shape of each colony was visualized and the respective surface area automatically marked using the NIS-Elements BR 2.30 computer image analysis system (Nikon Instruments Inc., Melville, NY). For each condition tested, the colony forming efficiency (CFE) was calculated as the total number of CFU-F per well reported to 10^6 cells seeded .

Cell Proliferation

ZDF and ZL-BMMSCs were each seeded at the density of 3×10^3 cells/cm² in individual wells of 12-well culture plates in α MEM containing 10% FBS. Following cell adhesion, BMMSCs proliferation was determined over a period of time for up to 7 consecutive days by counting cells on each well using a Malassez chamber every day.

Apoptosis

BMMSCs derived from ZL and ZDF rats were exposed in serum-free medium for 48 hours. The percentage of apoptotic cells (defined as double positive to annexine-PI staining) was investigated by flow cytometry analysis for 3 independent wells per condition and in 2 independent experiments.

Cell Migration

Cell migration was determined using commercially-available 24-well Boyden chambers whose two compartments were separated with porous polycarbonate membranes with 8- μ m-diameter pores (Corning Costar, Cambridge, MA, USA). Briefly, ZDF and ZL cells (75×10^3 cells/ 100 μ l) in α MEM without FCS (migration medium) were loaded in the upper chamber of transwells. The bottom chamber of the Boyden system contained 0.6 mL of migration medium with 10% FCS. The cell migration experiments were conducted in a humidified, 37°C, 5% CO₂/95% air environment overnight. The cells that had transversed, but still adhered on the other side of the membrane were fixed in 4% paraformaldehyde then stained *in situ* using the May Grunwald-Giemsa stain. At that time each membrane was excised, mounted on glass slide-, visualized using light microscopy, and photographed. The cells present on four randomly-chosen,

separate areas per membrane were counted. The numbers of migrated cells were considered evidence for the extent of cell migration under the different conditions tested.

Differentiation of BMMSCs

Osteogenic

BMMSCs in CM were seeded at 10×10^3 cells/cm² in individual wells of 12-well cell culture plates and cultured under standard cell culture conditions until they reached 90% confluency. At that time, the supernatant media were replaced by either complete medium (CM) or osteogenic-induction medium from Lonza (Lonza France, Levallois). The supernatants media were changed every 2 days of culture. Osteogenic differentiation was determined by monitoring expression of select osteogenic markers (Runx2, Coll1 and Osterix) using quantitative Polymerase Chain Reaction and by the presence of calcium-containing minerals deposits in the extracellular matrix of cultured BMMSCs.

Angiogenic

BMMSCs were seeded at 10×10^3 cells/cm² in individual wells of 12-well cell culture plates and cultured under standard cell culture conditions for 24 hours. At that time, the supernatant media were replaced by either complete medium (CM) or angiogenic-induction medium composed of α MEM, 2% FBS (v/v) and VEGF (50 ng/ml) (all chemicals were from Sigma-Aldrich). BMMSCs were cultured under those conditions for 14 consecutive days. The supernatants media were changed every 2 days of culture. Angiogenic differentiation was determined by monitoring expression of select angiogenic markers using quantitative Polymerase

Chain Reaction (Vegf, Fgf2, Hif1 and Hif2) and by the formation of tubular structure upon cultivation on Matrigel for 24 hours.

Adipogenic

BMMSCs in CM were seeded at 10×10^3 cells/cm² in individual wells of 12-well cell culture plates and cultured under standard cell culture conditions until they reached 90% confluency. The supernatant media of cultures were replaced by complete medium (CM) or adipogenic-induction-medium, i.e., α MEM supplemented with 10% FBS (v/v), 100 ng/mL biotin, 250 nM dexamethasone, 0.5 mM isobutyl methylxanthine, 60 μ M indomethacin, and 10 μ g/mL insulin (all chemicals were from Sigma-Aldrich). These supernatant media were replaced every 2 days of culture. Adipogenic differentiation was determined by monitoring expression of select adipogenic markers (Pparg, AdipoQ and fabp4) using quantitative Polymerase Chain Reaction and by formation of intracellular lipid droplets, detected using Oil Red-O stain.

RNA extraction, reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Expression of select osteogenic and adipogenic markers by BMMSCs cultured in either adipogenic, osteogenic or angiogenic medium, were determined using total RNA which was extracted from BMMSCs treated with Trizol reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. The RNA integrity and purity/concentration were checked using spectrophotometry (Nanodrop 1000, Labtech, Palaiseau, France). Random-primed cDNA was synthesized from 1 μ g of total RNA using the SuperScript™ II RT Kit (Invitrogen). Equal volumes of cDNA were used to program amplifications through real-time polymerase chain

reactions (RT-PCR) Qpcr was performed using an iCycler thermocycling apparatus (MyiQ™ Single-Color Real-Time PCR; Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France) in the presence of TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) and the following specific primers were used, osteogenic: Runt-related transcription factor 2 (Runx2), Collagen 1 (coll1) and Osterix. Adipogenic: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (Pparg), Adiponectin (AdipoQ) and fatty acid binding protein 4 (Fabp4). Angiogenic: Vascular endothelial growth factor (Vegf), Basic fibroblast growth factor (Fgf2) and Hypoxia-inducible factors 1 and 2 (Hif1 and 2). Finally the housekeeping gene 18S (kits TaqMan®, Applied Biosystems Inc., Courtaboeuf, France) was used. A more complete analysis of angiogenic factors was determined with a multiplex containing 84 angiogenic related genes (the rat angiogenesis RT² Profiler PCR Array; Qiagen). After activation of DNA polymerase at 95 °C for 10 min, cDNA was amplified by performing 40 two-step PCR cycles: a 15 second denaturation step at 95 °C, followed by a 60 second annealing and an extension step at 60°C. Each sample was run in triplicate. Data were analyzed using MyiQ™ Software (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France). Quantitation of gene expression was performed using the comparative threshold cycle method ($\Delta\Delta C_t$).

Matrigel plug assay

10⁶ BMMSCs from ZL or ZDF rat were injected with 500 µl of ice-cold matrigel subcutaneously into the flank of 8-week old Swiss nude mice. After 14 days, the mice were euthanized and each matrigel implant was excised, placed in 500 µl RIPA buffer, and was processed using a Retsch MM 300 tissue lyser at 30 pulses/min for 2 min. The hemoglobin content in each excised implant was determined using a commercially available assay (Hemoglobin Colorimetric Assay kit; Cayman).

Statistical analysis

Each experiment of the present study was performed in triplicates and repeated at three separate times. Numerical data are reported as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Student's t tests for unpaired two-tailed samples were used for statistical analyses of the experimental data and compared to the respective controls. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Characteristics and laboratory findings

The body weight of the 14 wk-old ZDF rats was significantly ($p<0.001$) higher than that of ZL animals at the same time points. Compared to the ZL, the ZDF rats had significantly ($p<0.05$) increased mean serum glucose and fructosamine levels increased (2 and 1.5-fold, respectively).

T2DM affects the number, clonogenicity, proliferation and apoptosis of BMMSCs

Formation of CFU-Fs was significantly ($p<0.05$) lower in BMMSCs for cells issued from diabetic than from non-diabetic rats (by 2-fold) (Figure 1A). Moreover, the average colony size formed by diabetic BM-MSCs was decreased (by 20%) compared to non-diabetic ones (Figure 1.A).

The sheer number of mononuclear cells in bone marrow from diabetic and control animal was different. In ZDF rat the number of cells were reduced (by 30% $p<0.05$) (Figure 1B).

When BMMSCs from ZDF and ZL were placed in a medium containing 10% FCS and were cultured under standard culture conditions, the number of the respective cells was increased both after 7 days of culture. Nevertheless, when the BMMSCs from ZDF rats were cultured in culture medium containing 10% FCS, their proliferation was significantly ($p<0.001$) less than obtained with the BMMSCs from the ZL animals, specifically after 7 days of culture (Figure 1C).

Next, BMMSCs apoptosis were assessed by flow cytometry of cells double-labeled annexin+/PI. BMMSCs were cultured with a serum-free medium during 2 days. Cells from ZDF

rats exhibited a significantly ($p < 0.001$) higher level of apoptosis than BMMSCs from ZL animals (by 2-fold) (Figure 2A). These results provide evidence that BMMSCs issued from a non-diabetic environment are more sensitive to serum deprivation than cells from the diabetic milieu.

T2DM affects BMMSCs migration

In terms of their chemotactic capability BMMSCs issued from ZDF rats exhibited significantly ($p < 0.001$) less migration (by 25%) than cells from ZL control animals (Figure 2B).

Diabetes type 2 modulates the adipogenic differentiation potential of BMMSCs

The potential of ZDF and ZL-BMMSCs to undergo adipogenic differentiation was assessed by cultured cells in adipogenic medium for a 14 and 21 days period. When BMMSC from ZDF rats were cultured in adipogenic medium, the number of triglyceride droplets was significantly ($p < 0.05$) higher than that of observed in the BMMSCs from the ZL animals (Figure 3A and B). More, selects adipogenic markers Pparg (by 10-fold), AdipoQ (by 6-fold) and Fabp4 (by 8-fold) were upregulated in ZDF-BMMSCs (Figure 3C).

Diabetes type 2 does not modulates the osteogenic differentiation potential of BMMSCs

In terms of osteogenic differentiation, the potential of ZL and ZDF-BMMSCs was not different as shown by calcium staining after 21 days of differentiation which show no significant difference for ZL or ZDF cells (Figure 4A) and the dosage of calcium by alizarin red (Figure 4B).

The expression of transcription factor Runx2, Coll1 and Osterix was not significantly different either in BMMSCs from the ZL and ZDF animal after 14 day of culture (figure 4C).

BMMSCs from diabetic animal do not differentiate into endothelial cells but induce less angiogenesis upon transplantation in nude mice.

BMMSCs from both ZL and ZDF rats fail to differentiate into angiogenic lineage upon our culture condition (figure 5A and B). BMMSCs were also unable to form tubular structure when cultured on Matrigel for 24 hours contrary to HUVEC cells which were used as a positive control (figure 5A). The level of expression of select angiogenic markers such as Vegf, Fgf2, Hif1 and Hif2 did not raise after exposure to angiogenic medium from both ZL and ZDF cells (Figure 5B).

Upon transplantation of the ZL and ZDF-BMMSCs in Matrigel plugs in the flank of nude mice, ZDF-BMMSCs appears to induce less angiogenesis than ZL-BMMSCs as demonstrated by the plug which were pale in color after explantation when containing ZDF BMMSCs and reddish due to the presence of red blood cells when containing ZL-BMMSCs (Figure 5C). The dosage of hemoglobin correlate these result as ZL-BMMSCs induce twice as much angiogenesis than ZDF-BMMSCs (Figure 5C $p < 0.001$). Finally ZDF-BMMSCs shows a difference in several angiogenic mediators without any attempts to differentiate them into endothelial lineage as show by gene expression of significantly differently expressed markers among a multiplex of 84 genes. 10 genes were upregulated and 11 under-regulated in ZDF-BMMSCs (Figure 5D).

DISCUSSION

Due to their differentiation potential to form multiple cells types *in vitro* et *in vivo*, bone marrow mesenchymal stromal cells (BMMSCs) have been highlighted as a potential therapeutic tool for cell therapy in diabetes-associated complications (Davey et al., 2014). However, and despite the emerging evidence of changes in the cellular makeup of the diabetic bone marrow (Piccinin and Khan, 2014), in the case of T2DM, relatively little is known about the consequences on BMMSCs characteristics. We performed therefore a comparative analysis of BMMSCs profile by using ZDF rats, at 13 weeks to represent early diabetic conditions, and their ZL littermates as controls. The results obtained in the present study showed that MSCs issued from a T2DM-bone marrow microenvironment are fewer and with altered functionality and differentiation potential compared to their ZL counterpart. Importantly, these findings provide evidence that T2DM-BMMSCs exhibited an impaired profile when cultured *ex vivo* under normoglycemic conditions and/or placed in “healthy” microenvironment and raises questions for their use for autologous stem cell therapy in diabetic individuals.

At first, our data showed that BMMSCs isolated from T2DM animals were fewer than that from control animals and are consistent with that observed in T2DM (db/db) mouse (Shin and Peterson, 2013). The number of endogenous BMMSCs was reduced also in areas of new bone in T1DM model (Ko et al., 2015). In fact, DM, through alteration of the marrow stem cell environment, may cause cellular changes (Spinetti et al., 2013). The reduced number of BMMSCs harvested may be attributable therefore to depletion of resident stem/progenitor cells in

the bone marrow in diseased animals and may explain the observed impaired bone parameters in diabetic bone such as osteopenia and/or bone healing.

Although T2DM-BMMSCs could be obtained and expanded successfully *in vitro* under normal culture conditions, their clonogenicity and proliferation were significantly decreased, compared to that of ZL-BMMSCs. These alterations are probably due, at least in part, to the hyperglycemia-induced changes of bone marrow microenvironment, as a similar impairment has been reported regarding (i) BMMSCs issued from experimental T1DM (Kim et al., 2014; Silva et al., 2015; Stolzing et al., 2010; Zhao et al., 2013) and (ii) BMMSCs issued from non diabetic environment and cultured under high glucose conditions -in vitro model mimicking the diabetic microenvironment (Zhang et al., 2015). These alterations are associated with an increased expression of p21 and p53, decrease cyclin D1 levels through the Wnt/ β -catenin pathway (Stolzing et al., 2010). Moreover, in the present study T2DM-BMMSCs apoptosis rate was increased compared to that of ZL-BMMSCs indicating that diabetic bone marrow microenvironment makes cells more sensitive to apoptotic stimuli such as serum deprivation. This is in line with previous reports on T1DM-BMMSCs (Ko et al., 2015; Silva et al., 2015; Wajid et al., 2015) as well as on BMMSCs cultured under high glucose concentrations (Zhang et al., 2015). These data showed that BMMSCs issued, from a T2DM microenvironment exhibited impaired key characteristics that appear to be intrinsic and long-standing and have to be considered in preparing cells from T2DM donors.

Further, T2DM-BMMSCs in the present study exhibited changes regarding their differentiation potential. In particular, compared to ZL-BMMSCs, ZDF-BMMSCs, in response to adipogenic factors in culture medium, have enhanced ability to undergo adipogenic differentiation and overexpressed adipocyte-specific genes. This is possibly due to having been

primed to undergo such differentiation *in vivo*, prior to their isolation. An enhanced adipogenic potential has been also reported for cultured BMMSC issued from WNIN/GR-Ob rats (Madhira et al., 2012). However it is to be noted that the expression of adipocyte-specific genes such as PPARG and Fabp4 (AP2) while is increased in undifferentiated T1DM-BMMSCs to their ZL counterpart (Silva et al., 2015; Stolzing et al., 2010) in ZDF-BMMSCs is similar to that in ZL-BMMSCs. Most interestingly, cultured ZDF-BMMSCs in the present study exhibited the same osteogenic phenotype, to that of their ZL counterpart, in contrast to previous studies which shows impaired osteogenic potential of differentiating T1DM-BMMSCs (Zhao et al., 2013; Silva, Sampaio et al. 2015.) and suggest differences between ability of T1DM and T2DM BMMSCs to respond to osteogenic stimuli.

To test whether T2DM affects the endothelial differentiation potential of BMMSCs, cells from ZDF and ZL animals were cultured with angiogenic factors. The angiogenesis-related genes were differently expressed in undifferentiating BMMSCs from ZDF rats when compared to that from ZL animals but cultured cells issued from both, diabetic and non diabetic animals were not able to develop capillary-like networks. Nevertheless, after implantation *in vivo*, the ZDF-BMMSCs cells in matrigel plug were far less angiogenic than the ZL-BMMSCs cells. We could argue that this is due to a modified paracrin effect but the secretome issued from T2DM-BMMSCs is more angiogenic, accordingly to our previous studies (Ribot et al., submitted). The modified functionalities (proliferation, apoptosis) probably might render transplanted cells unable to cope with the harsh environment, and make them not as efficient in promoting angiogenesis. Besides that, it has been also reported that T2DM-BMMSCs in mice have defective proliferation and angiogenic activities and are ineffective for repairing hindlimb ischemia (Yan et al., 2013).

The underlying mechanisms by which T2DM impaired key characteristics of BMMSCs remain unknown and is out of the scope of the present study. BMMSCs issued from animals with early diabetic conditions were impaired after multiple cell divisions *ex vivo* under normoglycemic conditions and/or after transplantation in “a non-diabetic” microenvironment. These findings corroborate previous reports that diabetic stimuli, particularly hyperglycemia, induce heritable alterations of genes, in many type of cells such as endothelial, retinal and cardiac cells (Reddy et al., 2014). Early exposure to hyperglycemia has been shown to predispose an individual to complications and create epigenetic modifications leading to a phenomenon called “metabolic memory” (Chalmers and Cooper, 2008; Pirola et al., 2010). We believed therefore that BMMSCs share a vulnerability to the pathophysiology and retain a metabolic memory of T2DM similar to other differentiated cells.

Despite the fact that ZDF rats are a well-defined T2DM model (Etgen and Oldham, 2000; Liu et al., 2007; Reinwald et al., 2009) because they exhibit obesity, insulin resistance and hyperglycaemia as well as secondary complications of diabetes, they are also leptin receptor-deficient rats. This could affect the BMMSCs multipotency and functionality observed and it is a true limitation of this study. Nevertheless, recent studies showed that the impaired profile and differentiation potential of MSCs issued from ZDF rats adipose tissue is independent of leptin receptor deficiency (Ferrer-Lorente et al., 2014).

In conclusion this study showed for the first time that BMMSCs issued from T2DM microenvironment are dysfunctional *ex vivo* and/or after their transplantation in a “healthy” environment. These data draw attention to the fact that BMMSCs alterations are susceptible to make them dysfunctional *in situ* and to limit their therapeutic potential post- transplantation even

in early T2DM conditions. Nevertheless, these alterations may depend on the stage of T2DM and further research is needed to establish the T2DM status-specific pathogenic characteristics of BMSCs in osteogenesis and angiogenesis in order to optimise their use and clinical application.

Acknowledgements

This study was supported by the « Ministère de la recherche » (2011/47) « Fondation Française pour la Recherche Médicale » (FRM) (FDT20140930864), the « Fondation de l'Avenir » (ET3-694), and the Institut Français pour la Recherche Odontologique (IFRO).

Conflict of interest : The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Aali, E., S. Mirzamohammadi, H. Ghaznavi, Z. Madjd, B. Larijani, S. Rayegan and A. M. Sharifi (2014). "A comparative study of mesenchymal stem cell transplantation with its paracrine effect on control of hyperglycemia in type 1 diabetic rats." *J Diabetes Metab Disord* **13**(1): 76.
- Chalmers, J. and M. E. Cooper (2008). "UKPDS and the legacy effect." *N Engl J Med* **359**(15): 1618-1620.
- Davey, G. C., S. B. Patil, A. O'Loughlin and T. O'Brien (2014). "Mesenchymal stem cell-based treatment for microvascular and secondary complications of diabetes mellitus." *Front Endocrinol (Lausanne)* **5**: 86.
- Dong, Q. Y., L. Chen, G. Q. Gao, L. Wang, J. Song, B. Chen, Y. X. Xu and L. Sun (2008). "Allogeneic diabetic mesenchymal stem cells transplantation in streptozotocin-induced diabetic rat." *Clin Invest Med* **31**(6): E328-337.
- Etgen, G. J. and B. A. Oldham (2000). "Profiling of Zucker diabetic fatty rats in their progression to the overt diabetic state." *Metabolism* **49**(5): 684-688.
- Ferrer-Lorente, R., M. T. Bejar and L. Badimon (2014). "Notch signaling pathway activation in normal and hyperglycemic rats differs in the stem cells of visceral and subcutaneous adipose tissue." *Stem Cells Dev* **23**(24): 3034-3048.
- Frescaline, G., T. Boudierlique, M. B. Huynh, D. Papy-Garcia, J. Courty and P. Albanese (2012). "Glycosaminoglycans mimetics potentiate the clonogenicity, proliferation, migration and differentiation properties of rat mesenchymal stem cells." *Stem Cell Res* **8**(2): 180-192.
- Hung, S. C., R. R. Pochampally, S. C. Chen, S. C. Hsu and D. J. Prockop (2007). "Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis." *Stem Cells* **25**(9): 2363-2370.
- Jiang, Y., B. N. Jahagirdar, R. L. Reinhardt, R. E. Schwartz, C. D. Keene, X. R. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. Du, S. Aldrich, A. Lisberg, W. C. Low, D. A. Largaespada and C. M. Verfaillie (2002). "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow." *Nature* **418**(6893): 41-49.
- Kim, Y. S., H. J. Kang, M. H. Hong, W. S. Kang, N. Choe, H. Kook, M. H. Jeong and Y. Ahn (2014). "Angiopoietin-like 4 is involved in the poor angiogenic potential of high glucose-insulted bone marrow stem cells." *Korean Circ J* **44**(3): 177-183.
- Ko, K. I., L. S. Coimbra, C. Tian, J. Alblowi, R. A. Kayal, T. A. Einhorn, L. C. Gerstenfeld, R. J. Pignolo and D. T. Graves (2015). "Diabetes reduces mesenchymal stem cells in fracture healing through a TNFalpha-mediated mechanism." *Diabetologia* **58**(3): 633-642.
- Liu, I. M., T. F. Tzeng, S. S. Liou and T. W. Lan (2007). "Improvement of insulin sensitivity in obese Zucker rats by myricetin extracted from *Abelmoschus moschatus*." *Planta Med* **73**(10): 1054-1060.
- Madhira, S. L., S. S. Challa, M. Chalasani, G. Nappanveethl, R. R. Bhonde, R. Ajumeera and V. Venkatesan (2012). "Promise(s) of mesenchymal stem cells as an in vitro model system to depict pre-diabetic/diabetic milieu in WNIN/GR-Ob mutant rats." *PLoS One* **7**(10): e48061.
- Napoli, N., R. Strollo, A. Paladini, S. I. Briganti, P. Pozzilli and S. Epstein (2014). "The alliance of mesenchymal stem cells, bone, and diabetes." *Int J Endocrinol* **2014**: 690783.
- Paccou, J., P. Hardouin, A. Cotten, G. Penel and B. Cortet (2015). "The Role of Bone Marrow Fat in Skeletal Health: Usefulness and Perspectives for Clinicians." *J Clin Endocrinol Metab* **100**(10): 3613-3621.

Piccinin, M. A. and Z. A. Khan (2014). "Pathophysiological role of enhanced bone marrow adipogenesis in diabetic complications." Adipocyte **3**(4): 263-272.

Pirola, L., A. Balcerczyk, J. Okabe and A. El-Osta (2010). "Epigenetic phenomena linked to diabetic complications." Nat Rev Endocrinol **6**(12): 665-675.

Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig and D. R. Marshak (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-147.

Reddy, M. A., E. Zhang and R. Natarajan (2014). "Epigenetic mechanisms in diabetic complications and metabolic memory." Diabetologia.

Reinwald, S., R. G. Peterson, M. R. Allen and D. B. Burr (2009). "Skeletal changes associated with the onset of type 2 diabetes in the ZDF and ZSDS rodent models." Am J Physiol Endocrinol Metab **296**(4): E765-774.

Retzepi, M., M. P. Lewis and N. Donos (2010). "Effect of diabetes and metabolic control on de novo bone formation following guided bone regeneration." Clin Oral Implants Res **21**(1): 71-79.

Schwartz, A. V. (2015). "Marrow fat and bone: review of clinical findings." Front Endocrinol (Lausanne) **6**: 40.

Shin, L. and D. A. Peterson (2013). "Human mesenchymal stem cell grafts enhance normal and impaired wound healing by recruiting existing endogenous tissue stem/progenitor cells." Stem Cells Transl Med **2**(1): 33-42.

Sidaway, P. (2015). "Diabetes: Epigenetic changes lead to impaired wound healing in patients with T2DM." Nat Rev Endocrinol **11**(2): 65.

Silva, J. C., P. Sampaio, M. H. Fernandes and P. S. Gomes (2015). "The Osteogenic Priming of Mesenchymal Stem Cells is Impaired in Experimental Diabetes." J Cell Biochem **116**(8): 1658-1667.

Spinetti, G., D. Cordella, O. Fortunato, E. Sangalli, S. Losa, A. Gotti, F. Carnelli, F. Rosa, S. Riboldi, F. Sessa, E. Avolio, A. P. Beltrami, C. Emanuelli and P. Madeddu (2013). "Global remodeling of the vascular stem cell niche in bone marrow of diabetic patients: implication of the microRNA-155/FOXO3a signaling pathway." Circ Res **112**(3): 510-522.

Stolzing, A., D. Sellers, O. Llewelyn and A. Scutt (2010). "Diabetes induced changes in rat mesenchymal stem cells." Cells Tissues Organs **191**(6): 453-465.

Tremain, N., J. Korkko, D. Ibberson, G. C. Kopen, C. DiGirolamo and D. G. Phinney (2001). "MicroSAGE analysis of 2,353 expressed genes in a single cell-derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNAs of multiple cell lineages." Stem Cells **19**(5): 408-418.

Wagner, J., T. Kean, R. Young, J. E. Dennis and A. I. Caplan (2009). "Optimizing mesenchymal stem cell-based therapeutics." Curr Opin Biotechnol **20**(5): 531-536.

Wajid, N., R. Naseem, S. S. Anwar, S. J. Awan, M. Ali, S. Javed and F. Ali (2015). "The effect of gestational diabetes on proliferation capacity and viability of human umbilical cord-derived stromal cells." Cell Tissue Bank **16**(3): 389-397.

Yan, J., G. Tie, T. Y. Xu, K. Cecchini and L. M. Messina (2013). "Mesenchymal stem cells as a treatment for peripheral arterial disease: current status and potential impact of type II diabetes on their therapeutic efficacy." Stem Cell Rev **9**(3): 360-372.

Zhang, B., N. Liu, H. Shi, H. Wu, Y. Gao, H. He, B. Gu and H. Liu (2015). "High glucose microenvironments inhibit the proliferation and migration of bone mesenchymal stem cells by activating GSK3beta." J Bone Miner Metab.

Zhao, Q. S., N. Xia, N. Zhao, M. Li, C. L. Bi, Q. Zhu, G. F. Qiao and Z. F. Cheng (2013). "Localization of human mesenchymal stem cells from umbilical cord blood and their role in repair of diabetic foot ulcers in rats." Int J Biol Sci **10**(1): 80-89.

Zorina, T. D., V. M. Subbotin, S. Bertera, A. M. Alexander, C. Haluszczak, B. Gambrell, R. Bottino, A. J. Styche and M. Trucco (2003). "Recovery of the endogenous beta cell function in the NOD model of autoimmune diabetes." Stem Cells **21**(4): 377-388.

FIGURES LEGENDS

Figure 1. Diabetes affects number, clonogenicity and proliferation of cultured BMMSCs

(A): CFU-Fs assays were performed using bone marrow mononuclear cells from diabetic (ZDF) and non-diabetic (ZL) rats in CM. Representative image of CFU-F colonies (Figure 1A) and the Colony forming efficiency (CFE) and the average area of each colony (Figure 1A). CFE was significantly ($p < 0.05$) lower (by 50%) in ZDF- than in ZL - BMMSCs cultures while the average colony size formed was lower in ZDF-BMMSCs than ZL-BMMSCs. **(B):** Number of mononuclear cells in bone marrow was counted after isolation of BMMSCs for 2 tibias and 2 femurs per rat. ZDF-BMMSCs show a reduced number in marrow from diabetic animal than ZL-BMMSCs **(C):** Proliferation of BMMSCs in the presence of α MEM with 10% FBS and cultured for up to 7 days, ZDF-BMMSCs show a decrease of proliferation over time. Values are mean $\pm$ SEM calculated from 3 independent wells per condition in 3 independent experiments (n=9). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Figure 2. Impaired apoptosis and migration of ZDF-BMMSCs

(A) Flow cytometry analysis of apoptosis with annexine-PI staining shows a significantly higher rate of apoptosis in ZDF-BMMSCs under serum free condition for 48 hours. (B): Transwell assays showed that the migratory capacity of ZDF-MSCs was significantly ($p<0.05$) lower (by 30%) than ZL group. Values are mean $\pm$ SEM calculated from 3 independent wells per condition in 3 independent experiments ($n=9$). * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$).

Figure 3. Augmented adipogenic differentiation of ZDF-BMMSCs.

BMMSC from ZDF and ZL rats were submitted to an adipogenic induction medium. **(A):** Photograph after 21 days of culture in adipogenic media of BMMSC from ZDF and ZL rats. **(B)** Dosage of oil red O by spectrophotometry, after 14 and 21 days of culture in adipogenic media BM-MSC from ZDF rats showed significantly ($p > 0.05$) higher numbers of lipid droplet than that from ZL rats. **(C)** qPCR shows increased levels of the Pparg, AdipoQ and Fabp4 gene when compared with BMMSC from LEAN rats. Values are mean $\pm$ SEM calculated from 3 independent wells per condition in 3 independent experiments (n=9). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Figure 4. No difference in osteogenic differentiation from both ZDF and ZL-BMMSCs.

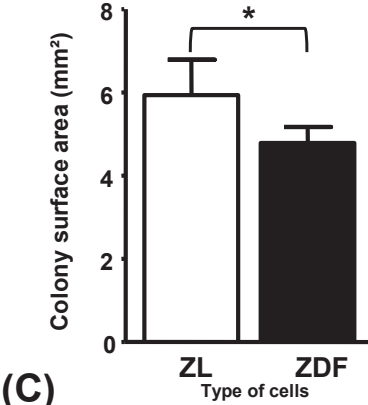
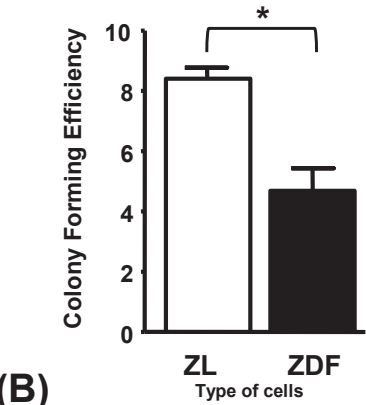
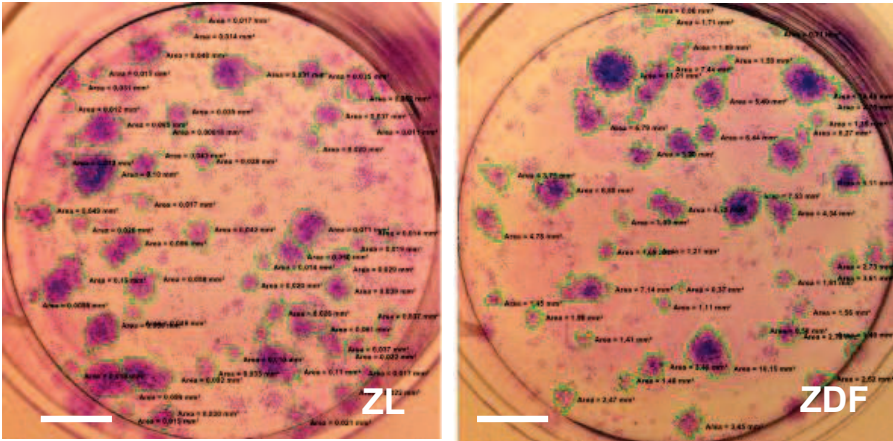
BMMSC from ZDF and ZL rats were submitted to an osteogenic induction medium **(A)** Photograph of Alizarin red staining, after 21 days of culture in osteogenic media, BMMSC from ZDF rats showed similar calcium mineral deposits, considered as an index of extracellular matrix mineralization **(B)** Dosage of alizarin red staining by spectrophotometry shows a similar content in both ZDF and ZL cells. Values are mean $\pm$ SEM calculated from 3 independent wells per condition in 3 independent experiments (n=9) (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

Figure 5. ZDF or ZL-BMMSCs have no endothelial differentiation potential but ZL-BMMSCs are more angiogenic inducing than their ZDF counterpart.

BMMSC from ZDF and ZL rats were submitted to an angiogenic induction medium for A and B panel **(A)** Photographs of ZL, ZDF-BMMSCs and HUVECs cultured on matrigel for 24 hours show a lack of pseudo-tubes formation from ZL and ZDF-BMMSCs. **(B)** qPCR markers related to angiogenic gene were underexpressed after ZL and ZDF-BMMSCs were exposed to angiogenic medium. **(C)** Photograph of matrigel plug after 14 days of implantation (upperpanel) and hemoglobin dosage in the matrigel plus after 14 days of implantation in nude mice (lower panel) shows a better angiogenesis induced by ZL-BMMSCs **(D)** Array of angiogenic gene in qPCR that are modified in ZDF-BMMSCs relative to their ZL counterpart. Values are mean $\pm$ SEM calculated from 3 independent wells per condition in 3 independent experiments (n=9) (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

(A)

Figure 1



(B)

(C)

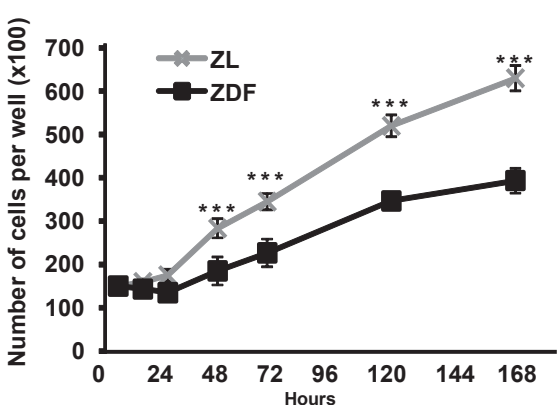
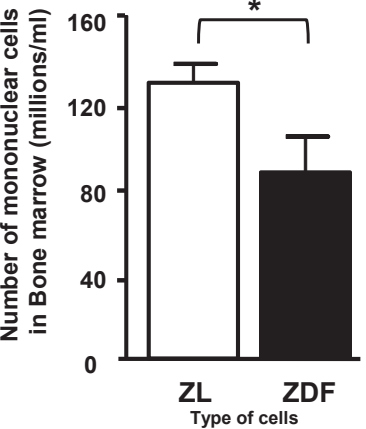


Figure 2

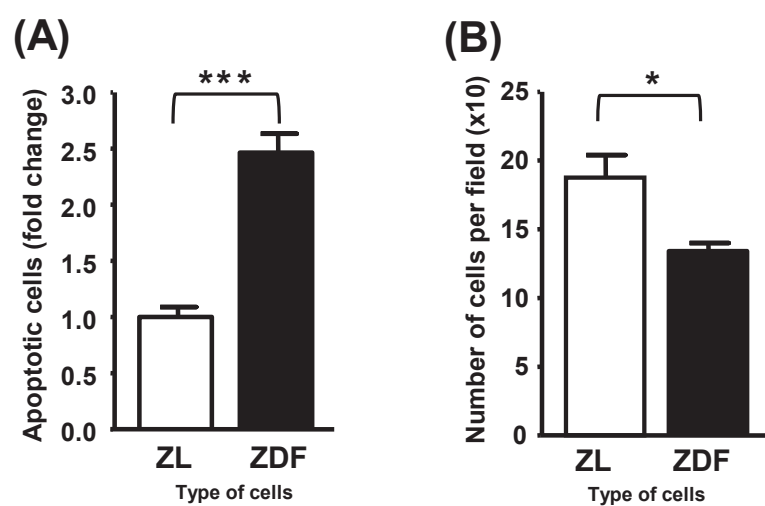


Figure 3

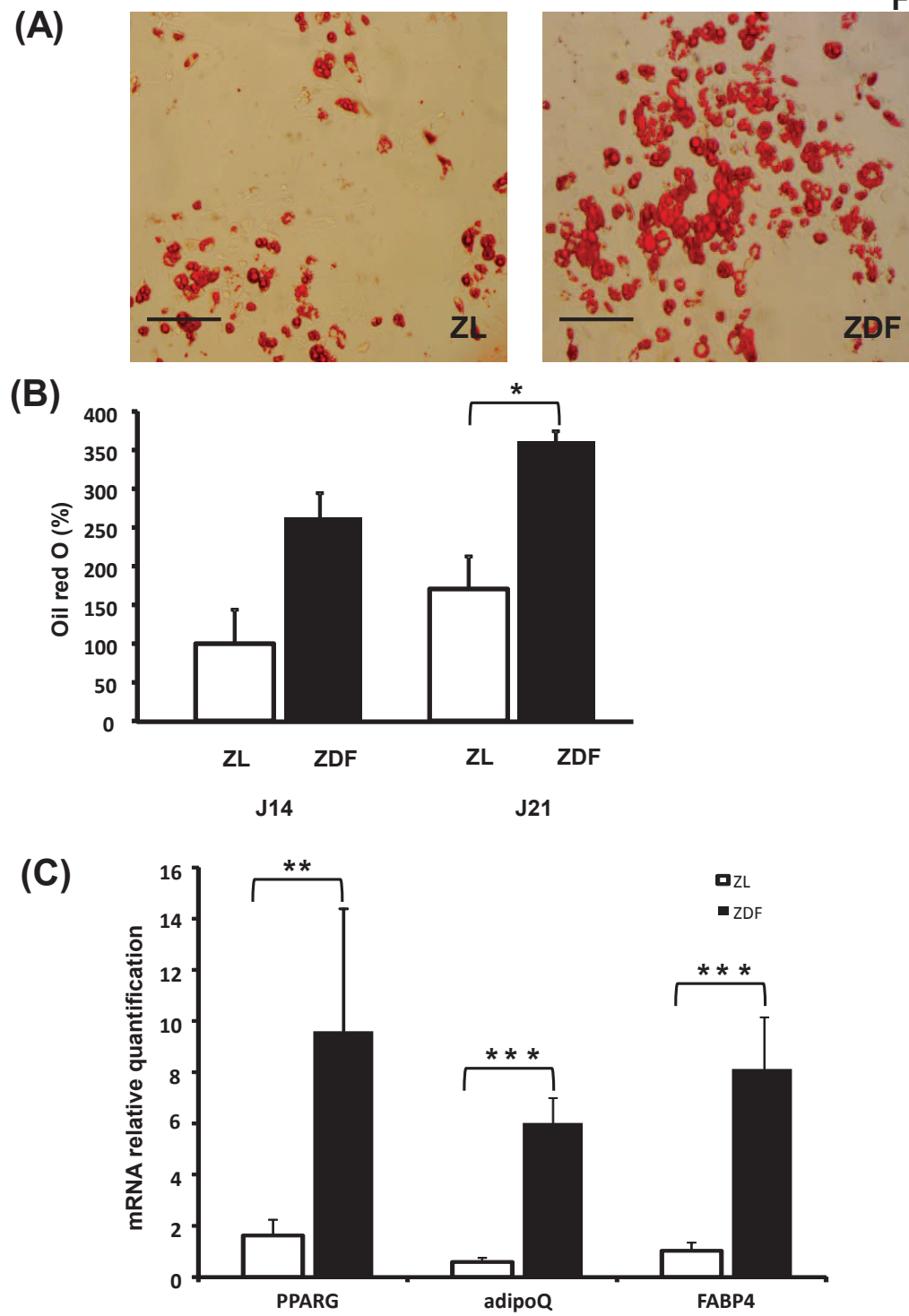


Figure 4

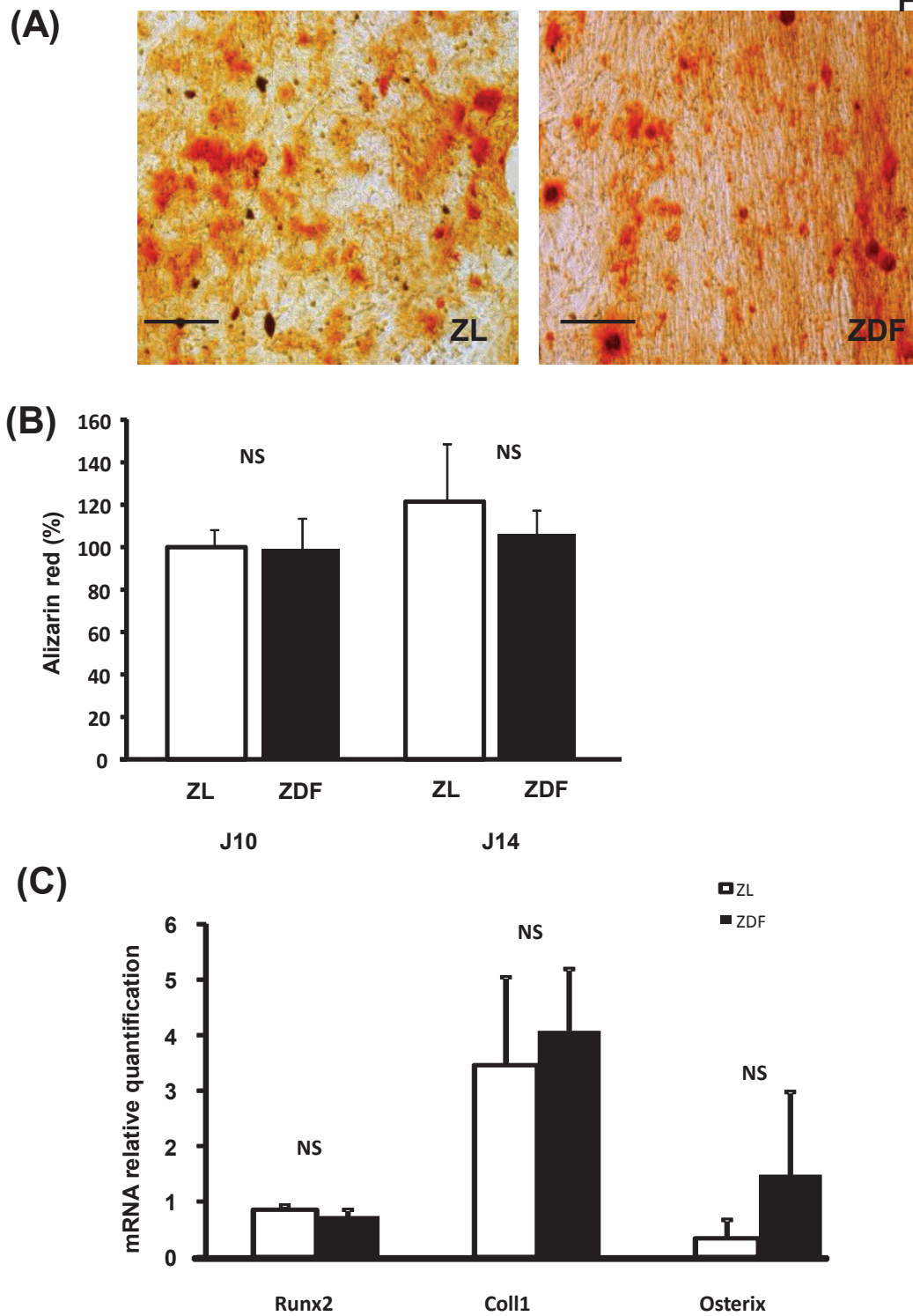
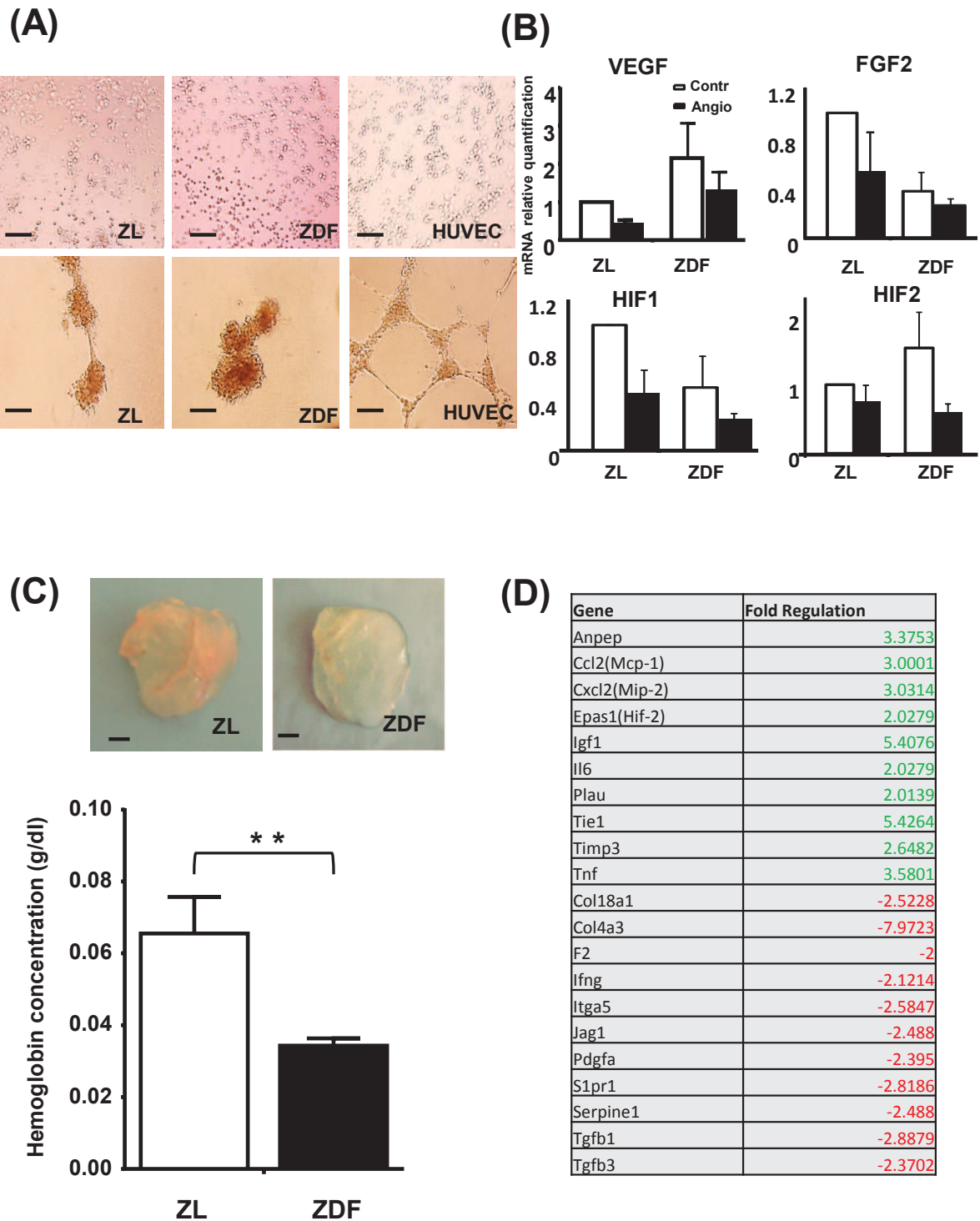


Figure 5



Introduction de l'article 2

Nous nous sommes intéressés au potentiel des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse qui peuvent se différencier en ostéoblastes, adipocytes et chondroblastes *in vitro* (Dong et al., 2008; Wagner et al., 2009) et dont certaine étude montre leur potentiel à se différencier en lignage vasculaire et à intégrer les vaisseaux sanguins (Jiang et al., 2002; Pittenger et al., 1999; Tremain et al., 2001) . Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les BMMSCs permettaient la régénération des tissus sans pour autant que l'on constate un taux de cellules greffées élevé, une différenciation ou même une persistance de celles-ci dans l'organisme. Il a été décrit (Kinnaird et al., 2004a) que le milieu conditionné issu des cultures des CSMs peut stimuler la prolifération de cellules endothéliales d'une manière dose dépendante. Ainsi ces travaux ont démontré que le principal mécanisme derrière l'effet thérapeutique des BMMSCs est d'origine paracrine.

Le diabète de type 2 est associé avec des complications micro et macro vasculaire qui affecte le cœur, les vaisseaux sanguins, les yeux, les reins, les nerfs et la guérison des plaies chez les patients diabétiques (Martin et al., 2003; Oikawa et al., 2010; Tahergorabi and Khazaei, 2012). La plupart des pathologies associées au diabète de type 2 concernent une modification de la vascularisation. En effet, une angiogenèse excessive joue un rôle pivot dans la rétinopathie et la néphropathie diabétique (Abu El-Asrar et al., 2013b; Abu El-Asrar et al., 2006), alors qu'une angiogenèse déficiente contribue à une diminution de la cicatrisation (Golden, 2011; Martin et al., 2003; Tahergorabi and Khazaei, 2012). Malgré de nombreuses recherches, l'équilibre de l'angiogenèse anormale chez les patients diabétiques reste très mal compris.

Nous avons choisi d'utiliser les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (BMMSCs) qui sont liées à une diminution du potentiel vasculaire régénérateur chez les patients diabétiques (Gealekman et al., 2004; Roberts and Porter, 2013; Shin and Peterson, 2012). Le diabète affecte les fonctionnalités des cellules souches mésenchymateuses modifiant leur capacité de prolifération, leur taux d'apoptose, le rendement d'extraction des cellules ou encore leur différenciation. (Shin and Peterson, 2012; Yan et al., 2012) (voir article 1).

Les BMMSCs ont des effets paracrins qui stimulent la migration des cellules endothéliale (Pacini and Petrini, 2014), inhibent leur apoptose et promeuvent l'angiogenèse de façon générale (Hung et al., 2007). Alors que ces cellules sont donc primordiales pour l'angiogenèse, l'impact du diabète de type 2 sur les capacités paracrine des BMMSC et ses propriétés angiogéniques n'a pas encore été caractérisées.

Le travail présenté ici se concentre sur les effets paracrins des BMMSCs dans le milieu diabétique avec pour hypothèse qu'ils sont modifiés et affectent les fonctions des cellules endothéliales différemment. Nous avons testé cette hypothèse en utilisant le Zucker Diabetic Fatty (ZDF) (Lepr^{fa/fa}) rats (un modèle de diabète de type 2) et le Zucker Lean contrôle (LEAN) (Lepr^{fa/+}/Lepr^{+/+}) rats (Etgen GJ, 2000). En se concentrant sur l'impact du diabète de type 2 sur les capacités paracrine des BMMSCs et leur fonction, l'étude présentée ici cherche à élucider le rôle des BMMSCs dans les complications vasculaires liées au diabète.

Article 2: Type 2 diabetes impairs the mesenchymal stem cell secretome composition and angiogenic properties.

Type 2 diabetes impairs the mesenchymal stem cell secretome composition and angiogenic properties.

**JONATHAN RIBOT ¹, GUAVRI CALIAPEROUMAL ¹, JOSEPH PAQUET¹,
CATHERINE BOISSON-VIDAL¹, HERVE PETITE ¹, FANI ANAGNOSTOU ^{1,2}**

**1 Laboratory of Bioingénierie et Biomécanique Ostéo-articulaires-UMR CNRS 7052 Paris
7-Denis Diderot University, Paris, France. Unité Mixte de Recherche S1140, Faculté des
Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris, France.**

**2 Department of Periodontology, Service of Odontology, –Pitié Salpêtrière Hospital, et
Hôtel-Dieu Hospital AP-HP, Paris 7-Denis Diderot University, U.F.R. of Odontology, Paris,
France.**

Running Title: Diabetic MSCs Secretome impaired angiogenesis

Key Words: MSCs, diabetes type 2, secretome, angiogenesis, endothelial cells

Corresponding author : Dr. ANAGNOSTOU FANI

**Laboratoire de Bioingénierie et Bioimagerie Ostéo-Articulaire
Faculté de Médecine Site Villemin 10 avenue de Verdun
75010 Cedex Paris France
Tél. : 01 57 27 85 61 Fax : 01 57 27 85 70
E-mail : fani.anagnostou@univ-paris-diderot.fr**

(Soumis à Angiogenesis)

ABSTRACT

This study aimed at characterizing the impact of type 2 diabetes mellitus (T2DM) on the bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) secretome and its angiogenic properties. BMMSCs from Zucker Diabetic Fatty rats (ZDF) (a T2DM model) and its littermate Zucker LEAN (control) were cultured. The supernatant conditioned media (CM) from BMMSCs of diabetic and control rats were collected and analyzed. Compared to respective results obtained using CM from LEAN-BMMSCs, the bioactive content of ZDF-BMMSC CM (i) affect differently endothelial cell (HUVECS) functions *in vitro* by inducing increased (by 3.5-fold; $p<0.01$) formation of tubular-like structures and migration of these cells (by 3-fold; $p<0.001$), and promote improved vascular formation *in vivo*, and (ii) contain different levels of angiogenic factors (e.g, IGF1) and mediators such as (OSTP, CATD, FMOD LTBP1, LTBP2 which are involved in angiogenesis and/or extracellular matrix composition). Addition of neutralizing antibodies against IGF-1, LTBP1 or LTBP2 in the CM of BMMSCs from diabetic rats decreased its stimulatory effect on HUVEC migration (by approximately 60%, 40% and 40%, respectively). These results demonstrate that BMMSCs from T2DM rats have a unique secretome with impaired angiogenic properties and provide new insights on the role of BMMSCs in angiogenesis in the diabetic milieu.

INTRODUCTION

Type 2 Diabetes mellitus (T2DM) is reaching epidemic proportions worldwide. The persistent hyperglycemic milieu in T2DM is associated with macro- and micro-vascular complications affecting the heart, blood vessels, eyes, kidney, nerves and the wound healing process in diabetic patients (Martin et al., 2003; Oikawa et al., 2010; Tahergorabi and Khazaei, 2012). Most of the T2DM pathological complications are associated with impaired vascularization and/or aberrant angiogenesis. Excessive and abnormal angiogenesis plays a pivotal role in diabetic retinopathy and nephropathy (Abu El-Asrar et al., 2013b; Abu El-Asrar et al., 2006), whereas deficient angiogenesis contributes to impaired wound healing and coronary collateral vessel development (Golden, 2011; Martin et al., 2003; Tahergorabi and Khazaei, 2012). Despite extensive research, the mechanism(s) behind the abnormal angiogenesis balance in diabetic patients is still poorly understood.

At the cellular level, scientific research has provided evidence that different types of cells including endothelial cells, peripheral blood- and bone-marrow mesenchymal-stem cell (BMMSCs) dysfunction, is related to the reduced blood vessel regenerative potential in T2DM (Gealekman et al., 2004; Roberts and Porter, 2013; Shin and Peterson, 2012). Endothelial cells migrate in response of soluble mediators which regulate new blood vessel formation (Sumpio et al., 2002) but their function is impaired in the diabetic milieu (Capla et al., 2007; Gealekman et al., 2004; Kang et al., 2009). BMMSCs, whose phenotype is strongly determined by their specific environment, have the capacity to home in on sites of injury, proliferate, and differentiate into multilineage cell types (Watt et al., 2013). The T2DM milieu affects the regenerative potential of BMMSCs as well as their proliferation (Shin and Peterson, 2012), restricts their multipotency,

and impairs their capacity to augment postischemic neovascularization in diabetic mice (Yan et al., 2012). BMMSCs exert a paracrine effect by the release of growth factors and cytokines (such as IGF-1) which stimulate endothelial cell migration (Pacini and Petrini, 2014), inhibit endothelial apoptosis, and promote angiogenesis (Hung et al., 2007). Moreover, by providing proangiogenic factors, BMMSCs create a favorable microenvironment that promotes neovascularization and tissue regeneration (Kinnaird et al., 2004a; Pacini and Petrini, 2014; Watt et al., 2013). Although important in this respect, the impact of T2DM on the BMMSC secretome and its angiogenic properties has not been characterized yet.

We hypothesized, therefore, that the BMMSC secretome in the diabetic milieu has a different composition and affects angiogenesis-related endothelial cell (EC) functions, including proliferation and new blood vessel formation. We tested this hypothesis using Zucker Diabetic Fatty (ZDF) (Lepr^{fa/fa}) rats, (a model of T2DM) and Zucker Lean control (LEAN) (Lepr^{fa/+}/Lepr^{+/+}) rats (their age matched littermate) (Etgen GJ, 2000). By focusing on the impact of T2DM on the BMMSC secretome function, the present study aimed at both elucidating the contribution of MSCs in diabetic-related vascular complications and at establishing relevant aspects for future cell therapies in diabetes.

MATERIALS AND METHODS

Animal models

Adult, 8-week old, male, Swiss nude mice and adult, 12 to 13-weeks old, male, obese Zucker fa/fa rats (ZDF) and their lean fa/+ litter-mates (LEAN) were purchased from Charles River (L'Arbresle; France). The animals were housed, operated and euthanized using procedures in accordance with the European Community Standards on the Care and Use of Laboratory Animals. The experimental procedures were approved by the Ethics Comity of the University Paris-Diderot.

The diabetic condition of the rats used in the present study was determined on the day of sacrifice. For this purpose, venous blood was collected and the respective glycemic state was evaluated using a glucometer (Roche Diagnostics; France). Plasma concentrations of glucose and fructosamine were determined using commercially available kits (Roche Diagnostics; France) following the manufacturer's instructions.

***In Vitro* Experiments**

Isolation of rat mesenchymal stem cells (BMMSCs)

The femurs and tibiae from each rat were cleaned of connective tissues and their respective epiphyses were removed to allow insertion of 23-gauge needles connected to syringes containing serum-free α MEM (Invitrogen; Cergy Pontoise, France). The cells present in the harvested marrow were then homogenized using complete medium composed of α MEM supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum and 1% (v/v) antibiotic/antimycotic (ATB/ATM) solution (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria). The isolated cells from rats were seeded at 5×10^5

cells/cm² and cultured at 37°C in a humidified 5% CO₂ /95% air environment. After 2 days of culture, the supernatant media (containing non-adherent cells) were discarded. Fibroblastic colonies (CFU-F) appeared at day 5 of culture and were all pooled at day 12 (cell passage 1). For amplification of the LEAN and ZDF-BMMSCs populations, the cells were seeded at 10 x 10³ cells/cm². The supernatant media were changed twice a week. BMMSCs (passage 2-3) were used for the experiments of the present study.

Preparation of Conditioned Media (CM)

BMMSCs were seeded at 10⁴ / cm² in a culture treated flask and cultured in calf-serum-free α MEM under standard cell culture conditions. After 24 hours, the supernatant was collected, centrifuged (700xg, for 4 min), aliquoted, and frozen at -80°C until further use. The concentration of total proteins in the conditioned medium (CM) of BMMSCs from both ZDF and LEAN rats was determined using the Bradford protein assay and following the manufacturer's instructions. For experiments with neutralizing antibodies, anti IGF-1, LTBP1 or LTBP2 were added to CM (5 ng/mL) and maintained at 37°C for one hour before used in experiment with cells.

Culture of Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)

HUVECs in EGM-2 medium (Lonza, France) supplemented with 5% fetal calf serum, and 1% (v/v) ATB/ATM were cultured in tissue-culture flasks pre-coated with 0.5% gelatin under standard cell culture conditions. When the cells reached 80% confluency, they were passaged by trypsinization (Trypsin/EDTA Solution; Life Technologies).

Migration of human umbilical vein endothelial cells in Boyden chambers

HUVEC migration was determined using commercially-available Boyden chambers (Corning Costar; USA) whose two compartments were separated by polycarbonate membranes with 8- μ m-diameter pores. Aliquots of cells (50×10^3 cells) in 100 μ l α MEM without fetal-calf-serum were placed in the upper chamber and the various media of interest to the present study were each placed in the bottom chamber of each Boyden chamber. The cell migration experiments were conducted in a humidified, 37°C, 5% CO₂/95% air environment for 24 hours. The cells that had tranversed, but still adhered on the other side of the membrane separating the Boyden chamber, were then stained *in situ* using May Grunwald-Giemsa stain. All such membranes were excised, mounted on slides, visualized using light microscopy, and photographed.

Wound healing assay

HUVECs were seeded at a density that resulted in ~70-80% confluence on the bottom surface of individual wells of 12-well tissue culture plates within 24 hours of culture. At that time, each monolayer was scratched across the respective center using a new 1-ml pipette tip and was rinsed twice with Phosphate Buffered Saline (PBS) (to remove detached cells). The “wounded” HUVEC samples were then treated with CM from either BMMSCs of diabetic or control rats at 37°C for 6 hours, rinsed twice with PBS and fixed using 4% paraformaldehyde for 30 minutes. The “scar” region on each cell monolayer was visualised using light microscopy and photographed before and after the 6-hour interval. Comparison of the evidence on these two sets of micrographs was used to determine the migration of HUVECs. These data were expressed as the difference in the distance traveled by HUVECs from the edges of each “scratch” region towards the center of the wounded area.

Formation of tubular like structures by HUVECs on Matrigel

Each well of 48-well tissue-culture plates was coated with 10 mg/ml Matrigel (Growth factor reduced Matrigel, VWR France) and maintained in a humidified, 37°C, 5% CO₂/95% air environment for 1 hour. Then 5 x 10⁴ cells in various media were added and cultured at 37°C, 5% CO₂/95% air environment for 24 hours. At that time, four randomly areas were visualized using light microscopy, photographed and analyzed for the presence of tubular like structures. The total length of the formed tubular-like formation was measured using commercially available ImageJ software.

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

HUVECs were seeded at 10⁴ cells per each well of 96-well plates in various media (containing 150 µM of H₂O₂) in a humidified, 37°C, 5% CO₂/95% air environment for 90 min. At that time, the cells were rinsed with PBS and the MTT assay (Life technologies) was performed. The results provided evidence regarding the cell resistance to apoptosis induced by H₂O₂.

Reactive oxygen species (ROS) measurement

To measure ROS production in HUVECs, the DCFH-DA, an oxidation-sensitive indicator, was used. In the presence of ROS, DCFH is oxidized to fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), which can be measured by fluorometry. For this purpose, HUVECs were seeded at 10⁴ cells/well in 96-well cell-culture plates. The supernatant medium was removed and DCFH-DA was added at a concentration of 10 µM per well. These specimens were kept at 37 °C for 1 h. At that time and after rinsing the cells with PBS, CM from BMMSCs of either diabetic or control rats were added. Oxidative stress was induced using tert-butyl hydroperoxide (Luperox, t-BuOOH) at 100 µM. Fluorescence intensity of the samples was measured using a fluorescence spectrophotometer at an excitation and emissions wavelength of 485 nm and 530 nm respectively.

RNA extraction, reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Expression of select angiogenic markers by BMMSCs was determined by using total RNA which had been extracted from these cells using the Trizol reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's protocols. Real time PCR was performed using an iCycler thermocycling apparatus (MyiQ™ Single-Color Real-Time PCR; Bio-Rad Laboratories; Marnes-la-Coquette, France). After activation of the DNA polymerase at 95 °C for 10 min, cDNA was amplified by performing 40 two-step PCR cycles: a 15 second denaturation step at 95 °C followed by a 60 second annealing and an extension step at 60°C. The Multiplex used contained 84 angiogenic related genes (the rat angiogenesis RT² Profiler PCR Array; Qiagen).

Each sample was run in triplicate and each analysis was repeated at four separate occasions. Data were analyzed using MyiQ™ Software (Bio-Rad Laboratories; Marnes-la-Coquette, France). The data were normalized with respect to results obtained from LEAN-BMMSCs.

Proteomic analysis

Each supernatant CM from LEAN and ZDF-BMMSCs was separately concentrated and desalted using an Amicon Ultra-2 Centrifugal device column (Milipore, france). Briefly, 500 µl of each conditioned medium tested were loaded in a column and centrifuged at 4500xg for 75 min; this treatment resulting in a 10-fold increase in protein concentration. The proteins in the concentrated CM were then analyzed using a mass spectrometer (LTQ-Orbitrap) at the Jacques-Monod

Institute (Paris, France). The data were normalized with respect to results obtained from LEAN-BMMSCs.

***In Vivo* Experiments**

Matrigel plug assay

Samples of supernatant CM from either LEAN-BMMSCs or ZDF-BMMSCs, in α MEM either supplemented with 10% fetal calf serum or serum-free were freeze-dried using a Christ Alpha 1-2 freezer-drier overnight. At that time, 500 μ g protein from each dried CM sample was mixed with 500 μ l of ice-cold Matrigel (Growth factor reduced Matrigel; VWR, France) and was injected subcutaneously into the flank of 8-week old Swiss nude mice. After 14 days, the mice were euthanized and each matrigel implant was excised, placed in 500 μ l RIPA buffer, and was processed using a Retsch MM 300 tissue lyser at 30 pulses/min for 2 min. The hemoglobin content in each excised implant was determined using a commercially available assay (Hemoglobin Colorimetric Assay kit; Cayman).

Statistical analysis

Each experiment of the present study was performed in triplicates and repeated at three separate times. Numerical data are reported as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Student's t tests for unpaired two-tailed samples were used for statistical analyses of the experimental data and compared to the respective controls. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Conditioned medium (CM) from BMMSCs of diabetic rats affects HUVEC functions

In order to characterize the impact of diabetes type 2 (T2DM) on the BMMSC secretome the effect of CM on selected functions (specifically migration, proliferation, apoptosis and reactive oxygen species production of HUVECs) as well as *in vitro* and *in vivo* angiogenesis was examined.

CM from BMMSCs of diabetic rats increase HUVEC vascular-like tube formation *in vitro*

The angiogenic potential of CM, collected from either ZDF-BMMSCs (CM-ZDF) or LEAN-BMMSCs (CM-LEAN), was determined using HUVEC on Matrigel in the presence of either CM-ZDF, CM-LEAN, α MEM containing 10% SVF (FM), or SVF-free α MEM (NCM) for 24 hours (Figure 1A). The CM-LEAN group was the reference in this experiment. The supernatant CM-ZDF induced a significantly ($p < 0.01$) increased (3.5-fold) formation of HUVEC tubular-like structures compared to results obtained with either supernatant CM-LEAN or NCM (Figure 1A and 1B). The protein content in the CM-LEAN and CM-ZDF was similar (Figure 1C) but it was lower ($p < 0.01$) than that contained in FM (Figure 1C). These results suggest that MSCs from diabetic rats secrete soluble, bioactive, angiogenic mediators into their supernatant medium that affect HUVEC tube-like formation.

CM from BMMSCs of diabetic rats promoted increased HUVEC migration *in vitro*

The chemotactic potential of CM was examined using both the transwell cell migration assay and the *in vitro* scratch, wound-healing assay. HUVEC migration through the porous transwell membrane (8 µm pore diameter) was observed after 24 hours with CM-LEAN, CM-ZDF, or FM but not when NCM was used as the chemoattractant (Figure 2A). Compared to either CM-LEAN or FM, CM-ZDF induced a significantly ($p<0.001$) increased (3-fold) migration of HUVEC (Figure 2B). After 6 hours, HUVEC migration in the scratch wound healing assay was significantly ($p<0.01$) enhanced (1.4-fold) in the presence of CM-ZDF compared to results obtained with either CM-LEAN or FM (Figure 2C and 2D). These results provide evidence that BMMSCs from diabetic rats secrete soluble, bioactive, chemotactic mediators into their supernatant media which promote HUVEC migration.

CM from BMMSCs of diabetic rats does not affect either HUVEC proliferation or apoptosis and has a limited effect on reactive oxygen species production

The effect of the supernatant CM collected from either ZDF-BMMSCs or LEAN-BMMSCs after 24 hours of culture was assessed on the proliferation of HUVECs. For this purpose, HUVECs were cultured in CM-LEAN, CM-ZDF, FM or NCM and their proliferation was determined over a period of time for up to 7 consecutive days. Compared to results obtained from the other conditions tested, HUVECs cultured in FM exhibited increased proliferation starting at day 3; this trend increased by 4-fold at day 7 of culture (Figure 3A). The HUVECs did not survive in the absence of serum in the supernatant media (Figure 3A). HUVECs cultured with either CM-LEAN or CM-ZDF survived but did not proliferate over the 7 days of the experiments.

Moreover, the number of HUVECs under either CM-ZDF or CM-LEAN was similar for the duration of the experiments (Figure 3A). The effect of the various supernatant CM tested on HUVEC resistance to apoptosis was assessed by exposing HUVECs to 150 μ M of H₂O₂ in each medium of interest to the present study for 90 min. HUVECs exposed to either CM-LEAN, CM-ZDF or NCM had similar apoptosis levels which were significantly ($p < 0.001$) higher than those observed under FM (Figure 3B).

Furthermore, upon exposure to either CM-LEAN or CM-ZDF, production of reactive oxygen species (ROS) by HUVECs was higher when the cells were exposed to CM-ZDF than to CM-LEAN; this difference in ROS was approximately 15% after 1 hour of measurement ($p < 0.001$) (Figure 3C).

CM from BMSCs of diabetic rats promote increased neoangiogenesis *in vivo*

To evaluate the proangiogenic potential of the CM-ZDF *in vivo*, Matrigel plugs were implanted in a mouse model. Such matrigel plugs, prepared using either CM-ZDF or CM-LEAN (each containing 500 μ g/ml of proteins), as well as either NCM or FM were injected into the flank of nude mice, and were implanted for a 14-day period. At that time, the explanted, plugs containing either NCM, CM-LEAN or FM were pale in color, indicating no, or little, blood-vessel content (Figure 4A). In contrast, plugs containing CM-ZDF appeared dark-red in color due to the presence of red blood cells, indicating the presence of blood vessels (Figure 4A). Compared to plugs prepared with either CM-LEAN or NCM, the implanted Matrigel plugs containing CM-ZDF had a significant ($p < 0.05$) increase (2.5-fold) in hemoglobin content (Figure 4B). In

conjunction with the *in vitro* results, the *in vivo* data provided evidence that supernatant CM from ZDF-BMMSCs promotes increased angiogenesis *in vivo*.

BMMSCs of diabetic rats express differentially angiogenic genes

The underlying mechanism(s) of the observed increased angiogenesis of the CM-ZDF was explored by determining expression of 84 known angiogenic genes by BMMSCs. Nine pro-angiogenic genes including ANPEP (3-fold), MCP-1 (3-fold), MIP-2 (3-fold), HIF-2 (2-fold), IGF-1 (5.5-fold), IL-6 (2-fold), PLAU (2-fold), TIE1 (5.5-fold) and TNF α (4-fold) were significantly ($p < 0.05$) up-regulated in ZDF-BMMSCs. In addition, eight anti-angiogenic genes including COL18A1 (2-fold), COL4A3 (8-fold), F2 (2-fold), INF γ (2-fold), S1PR1 (3-fold), Serpine1 (3-fold), TGF β 1 (3-fold) and TGF β 3 (2-fold) were down-regulated in ZDF-BMMSCs (Figure 5A). Several other angiogenic mediators including VEGF α , FGF2, EGF, and HIF1 α were expressed similarly by both ZDF-BMMSCs and LEAN-BMMSCs (data not shown).

ELISA analysis of the protein content in the conditioned media provided evidence that, among the five different mediators tested, only the content of IGF-1 correlated ($p < 0.001$) with the observed difference in gene expression by ZDF-BMMSCs (Figure 5B). The concentrations of IL-6, MCP-1 and PLAU were similar in CM from LEAN- and ZDF-BMMSCs. TNF α was not detected in all media tested (Figure 5B). The presence of bioactive IGF-1 in CM from ZDF-BMMSCs was confirmed by the reduced (by 60%; $p < 0.001$) HUVEC migration when this CM was supplemented with antibodies against IGF-1 (Figure 6A and 6B). Blocking IGF-1 in CM from ZDF-BMMSCs did not affect the formation of tubular structures (Figure 6C and 6D).

CM from BMMSCs of diabetic rats overexpressed several extracellular matrix proteins related to angiogenesis

Proteomic analysis of the supernatant CM from either diabetic or control BMMSCs revealed over two-fold ($p < 0.05$) up-regulation of 27 and down-regulation of 17 proteins in the CM-ZDF (Figure 7A). Eight proteins related to glucose metabolism, specifically, ALDOA (by 2-fold), LDHA (by 2.5-fold), KPXM (by 2.5-fold), G6P (by 2.5-fold), PTMA (by 3-fold), OAS2 (by 2-fold), ALD1 (by 4-fold) and IBP2 (by 2.5-fold), were differentially expressed and down-regulated in the CM of ZDF-BMMSCs (Figure 7B). This result indicates possible modification of the glucose metabolism in the BMMSCs from diabetic rats.

Several proteins whose genes were overexpressed by the ZDF-BMMSCs are either extracellular matrix components or are involved in the process of extracellular matrix remodeling (Figure 7C) including LTBP1 (by 2-fold), LTBP2 (by 2-fold), OSTP (by 5-fold), PGS1 (by 2-fold), CCD80 (by 4-fold), COBA1 (by 5-fold), CATL1 (by 2-fold), NUCB1 (by 2-fold), NID1 (by 2-fold), PRS23 (by 2-fold), ATS1 (by 2-fold), SAP (by 3-fold) and FMOD (by 5-fold).

Some of these components could be related to angiogenesis and may be involved in the observed enhanced chemotactic response of endothelial cells (Figure 7D). In fact, among the proteins differentially expressed in ZDF-BMMSC CM, seven proteins, specifically LTBP1 (by 2-fold), LTBP2 (by 2-fold), OST (by 5-fold), CATD (by 2-fold), SAP (by 2-fold) and FMOD (by 5-fold), are related to angiogenesis and were over-expressed (Figure 7D). Blocking either LTBP1 or LTBP2 in the CM from ZDF-BMMSCs resulted in a decrease (by 40%) of the stimulatory effect of these chemical compounds on HUVEC migration (Figure 8A and 8B) but did not affect

tubular structure formation (Figure 8C and 8D). These results indicate that, compared to the secretome of control BMMSCs, the secretome of ZDF-BMMSCs contains matrix-related proteins (such as LTBP1 or LTBP2) and promotes angiogenesis (Figure 8).

DISCUSSION

Despite the fact that BMMSC-derived paracrine factors were reported to be largely involved in neovascularization and tissue repair, the impact of type 2 diabetes mellitus (T2DM) on the BMMSC secretome and its effects on angiogenesis is still unknown (Hung et al., 2007; Kinnaird et al., 2004a). We performed therefore a comparative analysis of BMMSCs secretome and its effects on endothelial cells, by using ZDF rats, at 13 weeks to represent early diabetic conditions, and their LEAN littermates as controls. The results obtained provided the first evidence that short-term T2DM impairs the BMMSC secretome composition and angiogenic capabilities.

The results of the present study demonstrated that angiogenesis-related genes are differently expressed in BMMSCs from ZDF rats when compared to results from LEAN animals. In fact, several pro-angiogenic genes were overexpressed while anti-angiogenic ones were underexpressed (Figure 5). Among the upregulated (over 5-fold) genes, were the following: IGF-1 and TIE1, which are critical regulators of the angiogenesis process (Shigematsu et al., 1999); MCP-1 and IL-6, homing factors for BMMSCs and EC/EPCs, respectively (Middleton et al., 2014; Salcedo et al., 2000); as well as IL-6 and TNF α , critical mediators of the inflammatory process. Nevertheless, expression of several angiogenic genes didn't correlate with the released protein levels in the supernatant conditioned medium (CM) in the present study. Analysis of the protein content in the 24 hours secreted CM from LEAN- and ZDF-BMMSCs provided evidence that, among the different mediators tested, only the content of IGF-1 correlated ($p < 0.001$) with the observed difference in gene expression by ZDF-BMMSCs (Figure 5B). The concentrations of IL-6, MCP-1 and PLA₂ were similar in CM from LEAN- and ZDF-BMMSCs. TNF α was not detected in all media tested. In the literature, it has been described that IGF-1 plays a significant role in the physiology of endothelial cells by promoting their migration (Bach, 2015; Shigematsu

et al., 1999). IGF-1 is also overexpressed by several cells implicated in T2DM-proliferative retinopathy (Beltramo et al., 2014; Romaniuk et al., 2013). Under our experimental conditions, IGF-1 released by ZDF-BMMSCs accounted for approximately 60% of the observed enhanced HUVECs migration (Figure 6A and 6B). The present study provide therefore evidence that IGF-1 might be a key factor in the paracrine action of T2DM-BMMSCs on endothelial cells thus contributing to the pathogenesis of microvascular complications associated with the diabetic condition including diabetic retinopathy.

Moreover, proteomic analysis of the T2DM-BMMSC secretome revealed some proteins that are related to angiogenesis through several mechanisms. Specifically, the results showed (i) decreased levels of $\alpha\beta$ -crystallin, a chaperon for VEGF-A and (ii) increased levels of LTBP1 and LTBP2, regulators of TGF- β availability (Tatti et al., 2008) as and well as of OSTP and FMOD, which are components of the extracellular matrix and might be involved in paracrine action of T2DM-BMMSCs on endothelial cells (Berchem et al., 2002; Jian et al., 2013; Kale et al., 2014; Todorovic V, 2012). The role of extracellular matrix components in angiogenesis has been highlighted by both *in vitro* and *in vivo* studies reported in the literature (Neve et al., 2014; Sottile, 2004). In this respect, the data of the present study revealed a different secretory profile of BMMSCs that may explain how these cells affect the environmental niche and paradoxal angiogenesis in the diabetic milieu.

In addition, the proteomic analysis of T2DM-BMMSC CM demonstrated a specific secretory phenotype of extracellular matrix remodeling and glucose metabolism. Compared to LEAN-BMMSCs, among 261 proteins released by ZDF-BMMSCs, 44 were differentially secreted: 27 at higher- and 17 at lower-levels, respectively (Figure 7). Among the 27 overexpressed proteins, were extracellular matrix homeostasis and remodeling-related molecules (Monnier et al., 2005).

In contrast, proteins involved in the metabolism of glucose (such as ALDOA, LDHA, KPYM, G6P, PTMA, OAS2, ALD1 and IBP2) were secreted at lower levels (figure 7C). An impaired glucose metabolism was already observed in T2DM muscle cells (Gao et al., 2014) but to our knowledge, it is the first time reported in BMMSCs secretome. Targeting of such molecules may offer insight into the underlying mechanisms of T2DM- BMMSCs physiology.

Compared to LEAN-BMMSCs-, ZDF-BMMSCs secretome was unique, despite the fact that ZDF-BMMSCs were extensively expanded by *ex vivo* culture, at normal glucose levels. These findings show that the effects of the diabetic milieu on the BMMSCs were evident even after multiple cell divisions *in vitro* in a normo-glycemic environment. Moreover, these results corroborate literature reports that aspects of the diabetic condition, particularly hyperglycaemia, induce transmissible alterations, in many type of cells such as endothelial, vascular smooth muscle, retinal and cardiac cells (Reddy et al., 2014). In fact, the process by which hypomethylation of genes promoters lead to deregulated gene expression in T2DM is known as “metabolic memory” (Park et al., 2014; Reddy et al., 2014) and is implicated in the persistence of vascular complications of diabetes even after return to normal blood glucose levels (Park et al., 2014; Reddy et al., 2014). Regarding ZDF rat, alteration of hepatic DNA methylation at early diabetic conditions (12 weeks) was already previously reported (Williams and Schalinske, 2012). For this reason, it is possible that the altered secretome observed in ZDF-BMMSCs is due to a “metabolic memory” phenomenon. Further studies are needed to determine whether such changes are initiated during the pre-diabetic state in the ZDF rat model.

The present study is the first to directly compare both *in vitro* and *in vivo* the angiogenic potential of BMMSCs-CM from T2DM and control animals. In line with previous studies reporting the

angiogenic potential of the BMMSC secretome (Fam et al., 2003; Kinnaird et al., 2004a), BMMSCs-CM from both ZDF rats - and age-matched-LEAN rats also showed angiogenic properties. The CM from T2DM-BMMSCs however, affected differently endothelial cell functions. Such differences are due to changes in the levels of several bioactive compounds such as IGF-1, LTBP1 and LTBP2 and reflect the interactive and possible synergistic action of those multiple bioactive mediators leading to a promotion of angiogenesis.

Another important result of the present study is that the CM from T2DM-BMMSCs promoted enhanced angiogenesis evidenced by the increase of *in vitro* endothelial cell migration and tubular structure formation, as well as by *in vivo* vascular formation in athymic mice (Figure 4). A similar response to that observed in the present study had been reported for BMMSCs cultured under *in vitro* hypoxic and high glucose conditions, used to mimic *in vitro* the diabetic environment (Deschepper et al., 2011; Page et al., 2014). This increase in angiogenic response may reflect the “adaptive” BMMSC response to the severe stress conditions of the diabetic milieu. Since CM deliver paracrine/trophic angiogenic factors, it is important to take these aspects of diabetic pathology into consideration in the development of BMMSC-based therapies aimed at improving tissue repair in diabetes.

A limitation of the present study is the fact that it is hard to separate the effects of hyperglycemia from those of obesity. The reason the ZDF rat was chosen as the animal model is that these animal initially develop insulin resistance followed by T2DM at predictable ages and display many of the human T2DM characteristics including obesity, abnormal blood lipid profiles, and related vascular complications (Etgen GJ, 2000) making them a clinically-relevant model.

In summary, the data of the present study provided the first evidence that, compared to control animals, BMMSCs from T2DM rats exhibit an altered secretome pattern and angiogenic properties, and underline the critical role of paracrine factors of MSC-mediated angiogenesis in the diabetic milieu. These results provide valuable insight in the vascular complications associated with diabetes and could be used in the development of BMMSC-based therapies to improve diabetic tissue repair.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the help of Prof. Rena Bizios for the paper critical review. We also thank Dr Graciela Pavon-Djavid for expert help with ROS production. This study was supported by the « Ministère de la recherche » (2011/47) « Fondation Française pour la Recherche Médicale » (FRM) (FDT20140930864), the « Fondation de l'Avenir » (ET3-694), and the Institut Français pour la Recherche Odontologique (IFRO).

Conflict of interest : The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Martin A, Komada MR, Sane DC (2003) Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. *Medicinal research reviews* 23 (2):117-145. doi:10.1002/med.10024
2. Oikawa A, Siragusa M, Quaini F, Mangialardi G, Katare RG, Caporali A, van Buul JD, van Alphen FP, Graiani G, Spinetti G, Kraenkel N, Prezioso L, Emanuelli C, Madeddu P (2010) Diabetes mellitus induces bone marrow microangiopathy. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30 (3):498-508. doi:10.1161/ATVBAHA.109.200154
3. Tahergorabi Z, Khazaei M (2012) Imbalance of angiogenesis in diabetic complications: the mechanisms. *International journal of preventive medicine* 3 (12):827-838
4. Abu El-Asrar AM, Nawaz MI, Kangave D, Siddiquei MM, Ola MS, Opdenakker G (2013) Angiogenesis regulatory factors in the vitreous from patients with proliferative diabetic retinopathy. *Acta diabetologica* 50 (4):545-551. doi:10.1007/s00592-011-0330-9
5. Abu El-Asrar AM, Struyf S, Kangave D, Geboes K, Van Damme J (2006) Chemokines in proliferative diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy. *European cytokine network* 17 (3):155-165
6. Golden SH (2011) Emerging therapeutic approaches for the management of diabetes mellitus and macrovascular complications. *The American journal of cardiology* 108 (3 Suppl):59B-67B. doi:10.1016/j.amjcard.2011.03.017
7. Gealekman O, Brodsky SV, Zhang F, Chander PN, Friedli C, Nasjletti A, Goligorsky MS (2004) Endothelial dysfunction as a modifier of angiogenic response in Zucker diabetic fat rat: amelioration with Ebselen. *Kidney international* 66 (6):2337-2347. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.66035.x
8. Shin L, Peterson DA (2012) Impaired therapeutic capacity of autologous stem cells in a model of type 2 diabetes. *Stem cells translational medicine* 1 (2):125-135. doi:10.5966/sctm.2012-0031
9. Roberts AC, Porter KE (2013) Cellular and molecular mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes. *Diabetes & vascular disease research : official journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease* 10 (6):472-482. doi:10.1177/1479164113500680
10. Sumpio BE, Riley JT, Dardik A (2002) Cells in focus: endothelial cell. *The international journal of biochemistry & cell biology* 34 (12):1508-1512
11. Capla JM, Grogan RH, Callaghan MJ, Galiano RD, Tepper OM, Ceradini DJ, Gurtner GC (2007) Diabetes impairs endothelial progenitor cell-mediated blood vessel formation in response to hypoxia. *Plastic and reconstructive surgery* 119 (1):59-70. doi:10.1097/01.prs.0000244830.16906.3f
12. Kang L, Chen Q, Wang L, Gao L, Meng K, Chen J, Ferro A, Xu B (2009) Decreased mobilization of endothelial progenitor cells contributes to impaired neovascularization in diabetes. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 36 (10):e47-56. doi:10.1111/j.1440-1681.2009.05219.x
13. Watt SM, Gullo F, van der Garde M, Markeson D, Camicia R, Khoo CP, Zwaginga JJ (2013) The angiogenic properties of mesenchymal stem/stromal cells and their therapeutic potential. *Br Med Bull* 108 ():25-53. doi:10.1093/bmb/ldt031
14. Yan J, Tie G, Wang S, Messina KE, DiDato S, Guo S, Messina LM (2012) Type 2 diabetes restricts multipotency of mesenchymal stem cells and impairs their capacity to augment postischemic neovascularization in db/db mice. *Journal of the American Heart Association* 1 (6):e002238. doi:10.1161/JAHA.112.002238
15. Pacini S, Petrini I (2014) Are MSCs angiogenic cells? New insights on human nestin-positive bone marrow-derived multipotent cells. *Frontiers in cell and developmental biology* 2:20. doi:10.3389/fcell.2014.00020
16. Hung SC, Pochampally RR, Chen SC, Hsu SC, Prockop DJ (2007) Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem cells* 25 (9):2363-2370. doi:10.1634/stemcells.2006-0686

17. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE (2004) Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circulation research* 94 (5):678-685. doi:10.1161/01.RES.0000118601.37875.AC
18. Etgen GJ OB (2000) Profiling of Zucker diabetic fatty rats in their progression to the overt diabetic state. *Metabolism*
19. Shigematsu S, Yamauchi K, Nakajima K, Iijima S, Aizawa T, Hashizume K (1999) IGF-1 regulates migration and angiogenesis of human endothelial cells. *Endocrine journal* 46 Suppl:S59-62
20. Middleton K, Jones J, Lwin Z, Coward JI (2014) Interleukin-6: an angiogenic target in solid tumours. *Critical reviews in oncology/hematology* 89 (1):129-139. doi:10.1016/j.critrevonc.2013.08.004
21. Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, Oppenheim JJ, Murphy WJ (2000) Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* 96 (1):34-40
22. Bach LA (2015) Endothelial cells and the IGF system. *Journal of molecular endocrinology* 54 (1):R1-R13. doi:10.1530/JME-14-0215
23. Romaniuk D, Kimsa MW, Strzalka-Mrozik B, Kimsa MC, Kabiesz A, Romaniuk W, Mazurek U (2013) Gene expression of IGF1, IGF1R, and IGFBP3 in epiretinal membranes of patients with proliferative diabetic retinopathy: preliminary study. *Mediators of inflammation* 2013:986217. doi:10.1155/2013/986217
24. Beltramo E, Lopatina T, Berrone E, Mazzeo A, Iavello A, Camussi G, Porta M (2014) Extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells induce features of diabetic retinopathy in vitro. *Acta diabetologica* 51 (6):1055-1064. doi:10.1007/s00592-014-0672-1
25. Tatti O, Vehvilainen P, Lehti K, Keski-Oja J (2008) MT1-MMP releases latent TGF-beta1 from endothelial cell extracellular matrix via proteolytic processing of LTBP-1. *Experimental cell research* 314 (13):2501-2514. doi:10.1016/j.yexcr.2008.05.018
26. Todorovic V RD (2012) LTBP1, more than just an escort service. *Journal of cellular biochemistry*. doi:10.1002/jcb.23385
27. Kale S, Raja R, Thorat D, Soundararajan G, Patil TV, Kundu GC (2014) Osteopontin signaling upregulates cyclooxygenase-2 expression in tumor-associated macrophages leading to enhanced angiogenesis and melanoma growth via alpha9beta1 integrin. *Oncogene* 33 (18):2295-2306. doi:10.1038/ncr.2013.184
28. Berchem G, Glondou M, Gleizes M, Brouillet JP, Vignon F, Garcia M, Liaudet-Coopman E (2002) Cathepsin-D affects multiple tumor progression steps in vivo: proliferation, angiogenesis and apoptosis. *Oncogene* 21 (38):5951-5955. doi:10.1038/sj.onc.1205745
29. Jian J, Zheng Z, Zhang K, Rackohn TM, Hsu C, Levin A, Enjamuri DR, Zhang X, Ting K, Soo C (2013) Fibromodulin promoted in vitro and in vivo angiogenesis. *Biochemical and biophysical research communications* 436 (3):530-535. doi:10.1016/j.bbrc.2013.06.005
30. Neve A, Cantatore FP, Maruotti N, Corrado A, Ribatti D (2014) Extracellular matrix modulates angiogenesis in physiological and pathological conditions. *BioMed research international* 2014:756078. doi:10.1155/2014/756078
31. Sottile J (2004) Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. *Biochimica et biophysica acta* 1654 (1):13-22. doi:10.1016/j.bbcan.2003.07.002
32. Monnier VM, Mustata GT, Biemel KL, Reihl O, Lederer MO, Zhenyu D, Sell DR (2005) Cross-linking of the extracellular matrix by the maillard reaction in aging and diabetes: an update on "a puzzle nearing resolution". *Annals of the New York Academy of Sciences* 1043:533-544. doi:10.1196/annals.1333.061
33. Gao Y, Wu F, Zhou J, Yan L, Jurczak MJ, Lee HY, Yang L, Mueller M, Zhou XB, Dandolo L, Szendroedi J, Roden M, Flannery C, Taylor H, Carmichael GG, Shulman GI, Huang Y (2014) The H19/let-7 double-negative feedback loop contributes to glucose metabolism in muscle cells. *Nucleic acids research* 42 (22):13799-13811. doi:10.1093/nar/gku1160

34. Reddy MA, Zhang E, Natarajan R (2014) Epigenetic mechanisms in diabetic complications and metabolic memory. *Diabetologia*. doi:10.1007/s00125-014-3462-y
35. Park LK, Maione AG, Smith A, Gerami-Naini B, Iyer LK, Mooney DJ, Veves A, Garlick JA (2014) Genome-wide DNA methylation analysis identifies a metabolic memory profile in patient-derived diabetic foot ulcer fibroblasts. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* 9 (10):1339-1349. doi:10.4161/15592294.2014.967584
36. Williams KT, Schalinske KL (2012) Tissue-specific alterations of methyl group metabolism with DNA hypermethylation in the Zucker (type 2) diabetic fatty rat. *Diabetes/metabolism research and reviews* 28 (2):123-131. doi:10.1002/dmrr.1281
37. Fam NP, Verma S, Kutryk M, Stewart DJ (2003) Clinician guide to angiogenesis. *Circulation* 108 (21):2613-2618. doi:10.1161/01.CIR.0000102939.04279.75
38. Page P, DeJong J, Bandstra A, Boomsma RA (2014) Effect of serum and oxygen concentration on gene expression and secretion of paracrine factors by mesenchymal stem cells. *International journal of cell biology* 2014:601063. doi:10.1155/2014/601063
39. Deschepper M, Oudina K, David B, Myrtil V, Collet C, Bensidhoum M, Logeart-Avramoglou D, Petite H (2011) Survival and function of mesenchymal stem cells (MSCs) depend on glucose to overcome exposure to long-term, severe and continuous hypoxia. *Journal of cellular and molecular medicine* 15 (7):1505-1514. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01138.x

FIGURES

Fig. 1. Conditioned supernatant medium from BMMSCs of diabetic rats promotes tubular-like formation by HUVECs.

(A) Representative images of HUVECs in either CM-LEAN, CM-ZDF, FM, or NCM cultured on Matrigel for 24 hours showing formation of tubular-like structures. Scale bar = 100 μ m. (B) Quantification of the tubular-like structures formed by HUVECs in either CM-LEAN, CM-ZDF, FM, or NCM cultured on Matrigel. Data are expressed as a percentage of the results obtained in the case of the CM-LEAN (group control). (C) Protein content in the supernatant CM-LEAN, CM-ZDF, FM and NCM. Values are mean $\pm$ SEM of four randomly selected fields on each Matrigel surface tested. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. CM-LEAN: supernatant, conditioned medium from BMMSCs of control rats. CM-ZDF: supernatant conditioned medium from BMMSCs of diabetic rats. FM: Alpha MEM containing 10% fetal-bovine serum FBS not exposed to cells. NCM: Alpha MEM FBS-free not exposed to cells.

Fig. 2. Conditioned supernatant medium from BMMSCs of diabetic rats induces increased HUVEC migration.

HUVEC migration was determined using Boyden chambers. **(A)** Representative images showing HUVEC migration. Stain: Giemsa. Scale bar = 200 μ m. **(B)** Number of migrated HUVEC in the presence of either CM-LEAN, CM-ZDF, FM, or NCM. HUVEC using the *in vitro* scratch wound healing assay. **(D)**. **(C)** Distance of migrated HUVEC exposed to either supernatant CM-LEAN, CM-ZDF, FM, or NCM Representative light micrographs of the “scratch area” after 6 hours. The dotted lines delineate the original scratched area after 6 hours. Scale bar = 100 μ m. Data are expressed as a percentage of the results obtained from the control (CM-LEAN) group. Values are mean $\pm$ SEM of four fields on each surface tested. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. CM-LEAN: supernatant, conditioned medium from BMMSCs of control rats. CM-ZDF: supernatant conditioned medium from BMMSCs of diabetic rats. FM: Alpha MEM containing 10% Fetal-bovine serum (FBS) not exposed to cells. NCM: Alpha MEM FBS-free not exposed to cells.

Fig. 3. Conditioned supernatant medium from BMMSCs of either diabetic or healthy rats has no effect on either HUVEC proliferation or apoptosis and a limited effect on Reactive Oxygen Species production

(A) Proliferation of HUVECs in the presence of supernatant CM-LEAN, CM-ZDF, FM, and NCM cultured for up to 7 days. (B) HUVEC apoptosis determined using the MTT assay. HUVECs were exposed to 150 μ M of H₂O₂ in either supernatant CM-LEAN, CM-ZDF, FM, or NCM for 90 min. (C) ROS production by HUVECs exposed to either CM-LEAN or CM-ZDF for 5 hours. A.U: arbitrary units. Values are a mean $\pm$ SEM. *** $p < 0.001$. CM-LEAN: supernatant, conditioned medium from BMMSCs of control rats. CM-ZDF: supernatant conditioned medium from BMMSCs of diabetic rats. FM: Alpha MEM containing 10% fetal-bovine serum (FBS) not exposed to cells. NCM: Alpha MEM FBS-free not exposed to cells.

Fig. 4. Conditioned supernatant medium from BMMSCs of diabetic rats enhances *in vivo* angiogenesis.

Matrigel plugs (500 μ l) containing proteins (500 μ g) from freeze-dried either supernatant CM-ZDF, CM-LEAN, FM or NCM were injected subcutaneously into the flank of nude mice. After 14 days, these Matrigel plugs were excised, photographed and their hemoglobin contents were quantified. **(A)** Representative photographs of the excised Matrigel plugs. Scale bar = 1 mm. **(B)** Quantification of the hemoglobin contents in the excised Matrigel plugs. Values are mean $\pm$ SEM; n = 6 per experimental group. * $p < 0.05$. CM-LEAN: supernatant, conditioned medium from BMMSCs of control rats. CM-ZDF: supernatant conditioned medium from BMMSCs of diabetic rats. FM: Alpha MEM containing 10% FBS not exposed to cells. NCM: Alpha MEM FBS-free not exposed to cells.

Fig. 5. Expression of angiogenic gene mediators is modified in BMMSCs of diabetic rats.

(A) Expression of select pro-angiogenic genes (black bars) and of anti-angiogenic genes (grey bars) in ZDF-MSCs relative to results obtained from LEAN-MSCs. (B) ELISA results of the analysis of overexpressed pro-angiogenic genes in samples from ZDF-MSCs. Values are mean $\pm$ SEM. n=3. *** $p < 0.001$. LEAN-MSCs: BMMSCs from control rats. ZDF-MSC: BMMSCs from diabetic rats. CM-LEAN: supernatant, conditioned medium from BMMSCs of control rats. CM-ZDF: supernatant conditioned medium from BMMSCs of diabetic rats.

Fig. 6. IGF-1 in CM-ZDF promotes migration of HUVECs but not tubular formation

HUVEC migration assays were performed using the *in vitro* scratch/wound-healing assay.. **(A)** Distance of migrated HUVEC exposed to either supernatant CM-ZDF or CM-ZDF containing a blocking antibody for IGF-1 **(B)** Representative light micrographs of the “scratch area” after 6 hours. The dotted lines delineate the original scratched area after 6 hours. Scale bar = 100 μ m. **(C)** Representative images of HUVECs in either CM-ZDF without or CM-ZDF with a blocking antibody for IGF-1 (Anti-IGF-1) cultured on Matrigel for 24 hours. Scale bar = 100 μ m. **(D)** Quantification of the tubular-like structures formed by HUVECs in either CM-ZDF without or CM-ZDF with blocking antibody for IGF-1 cultured on Matrigel. Data are expressed as a percentage of the results obtained in the case of the CM-ZDF without anti-IGF-1 (control group). Values are a mean $\pm$ SEM of four fields on each surface tested. *** $p < 0.001$.

Fig. 7. The content of angiogenic mediators in conditioned medium (CM) from BMMSCs of diabetic rats and of controls is different

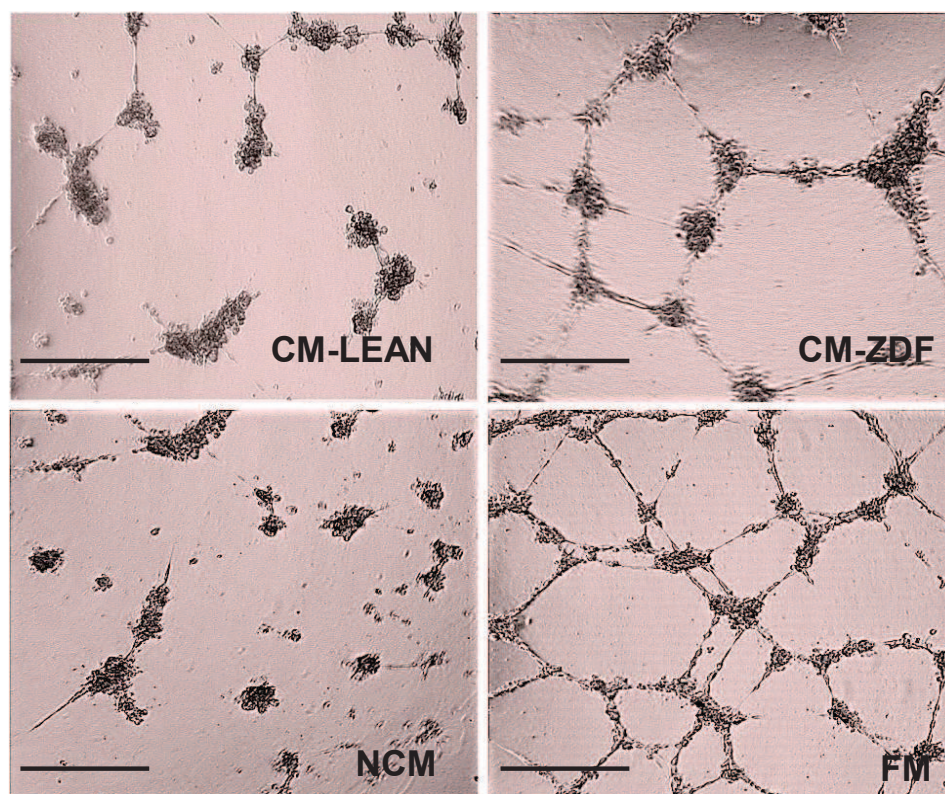
Proteomic analysis of the protein content in supernatant CM-ZDF compared to the results obtained from CM-LEAN. Underexpressed and overexpressed proteins are shown in red and green respectively in all frames. **(A)** Proteins which were differentially expressed in supernatant CM-ZDF compared to CM-LEAN **(B)** Proteins present in the supernatant CM-ZDF which are related to the extracellular matrix. **(C)** Proteins present in the supernatant CM-ZDF which are related to glucose metabolism. **(D)** Proteins present in the supernatant CM-ZDF which are related to angiogenesis. Values are mean $\pm$ SEM. n=3. $p < 0.05$ CM-LEAN: supernatant conditioned medium from BMMSCs of control rats. CM-ZDF: supernatant conditioned medium from BMMSCs of diabetic rats.

Fig. 8. Specific extracellular matrix proteins (specifically, LTBP-1 and LTBP-2) are involved in the enhanced migration of CM-ZDF.

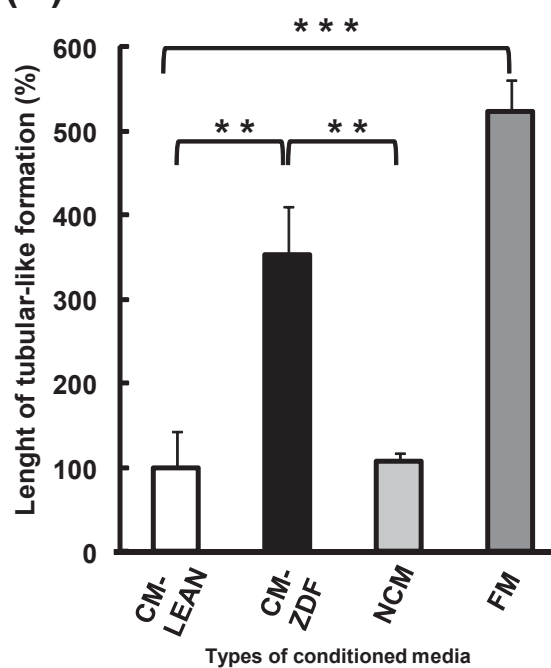
HUVEC migration assays were performed using the *in vitro* scratch/wound-healing assay. **(A)** Distance migrated by HUVEC exposed to either supernatant CM-ZDF or CM-ZDF in the presence or absence of blocking antibodies for either LTBP-1 or LTBP-2 or both. **(B)** Representative light micrographs of the “scratch area” 6 hours post cell injury. The dotted lines delineate the original scratched area after 6 hours. Scale bar = 100 μ m. **(C)** Representative images of HUVECs in either CM-ZDF or CM-ZDF and in the presence or absence of blocking antibodies for either LTBP-1 or LTBP-2 or both, cultured on Matrigel for 24 hours. Scale bar = 100 μ m. **(D)** Quantification of the tubular-like structures formed by HUVEC exposed to either CM-ZDF or CM-ZDF in either the presence or absence of blocking antibodies for either LTBP-1 or LTBP-2 or both, cultured on Matrigel for 24 hours. Data are expressed as percentage of the results obtained when the cells were cultured in CM-ZDF (control group). Values are mean $\pm$ SEM of four fields on each surface tested. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Figure 1

(A)



(B)



(C)

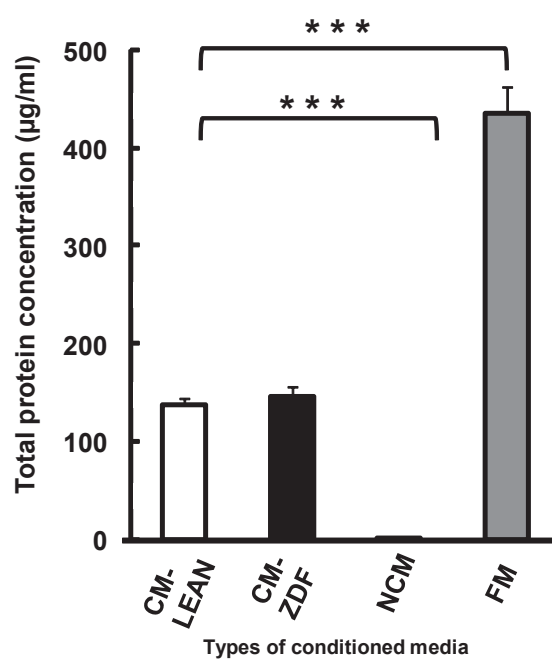


Figure 2

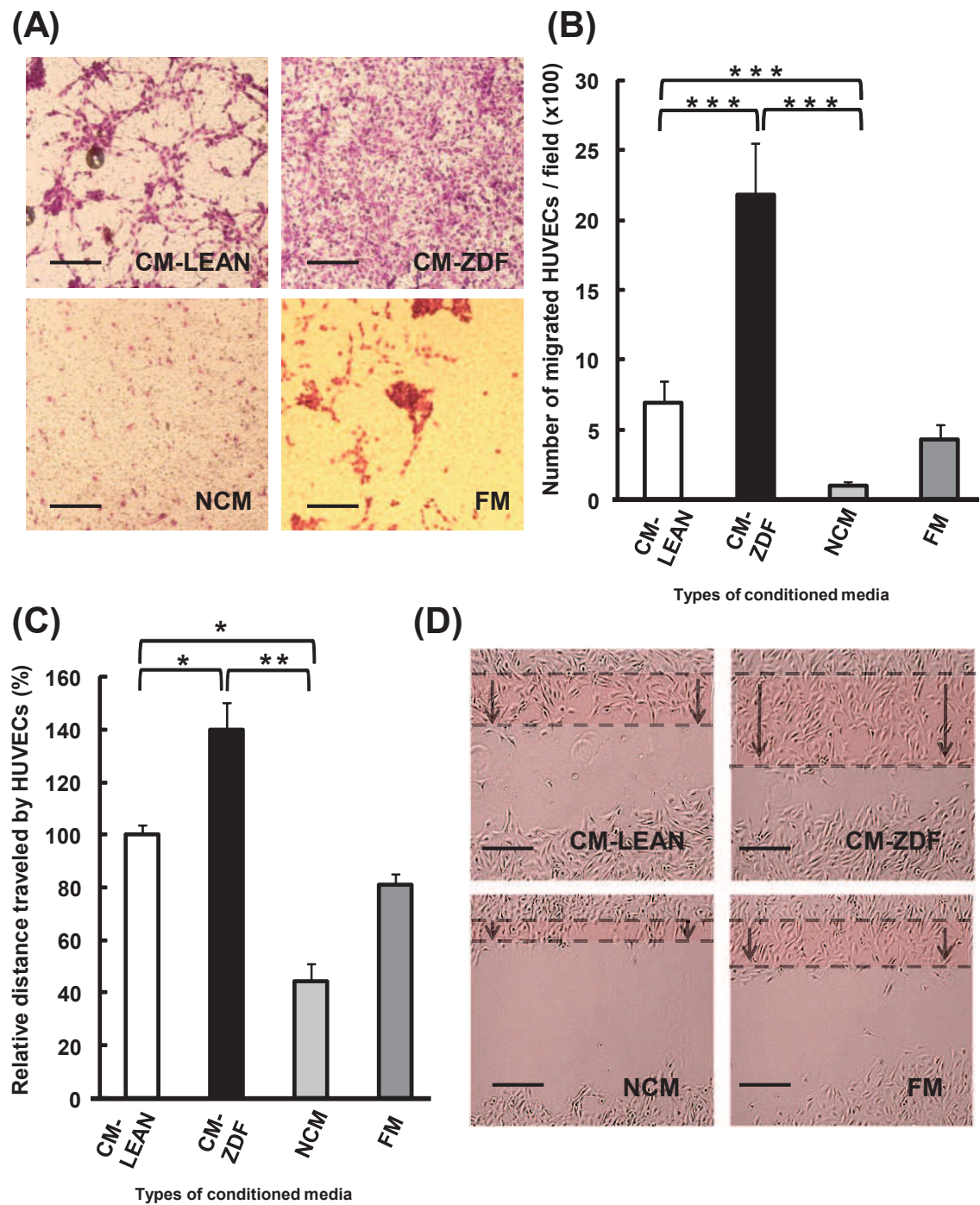
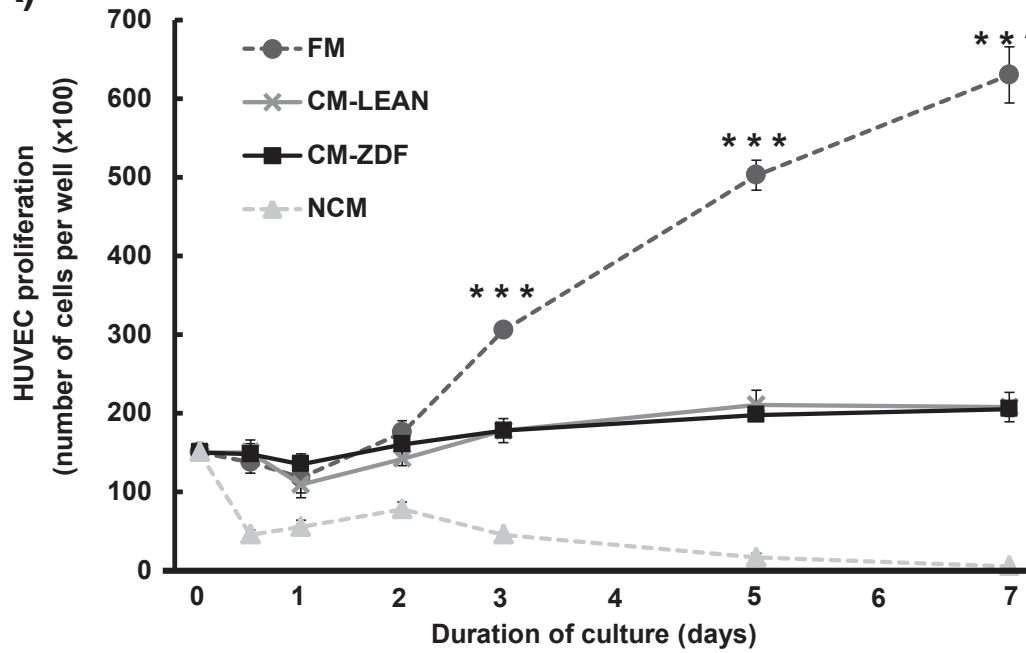
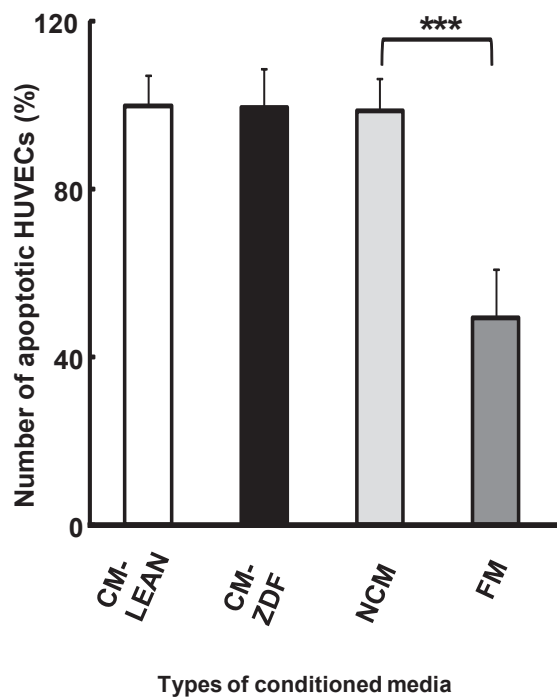


Figure 3

(A)



(B)



(C)

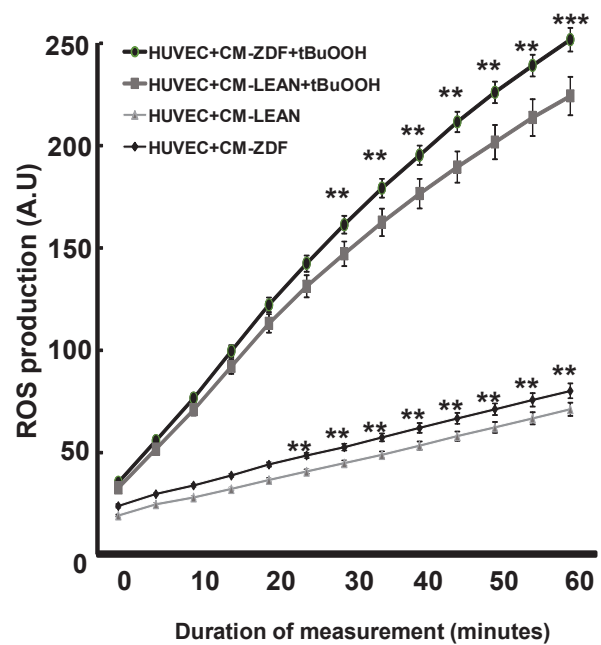


Figure 4

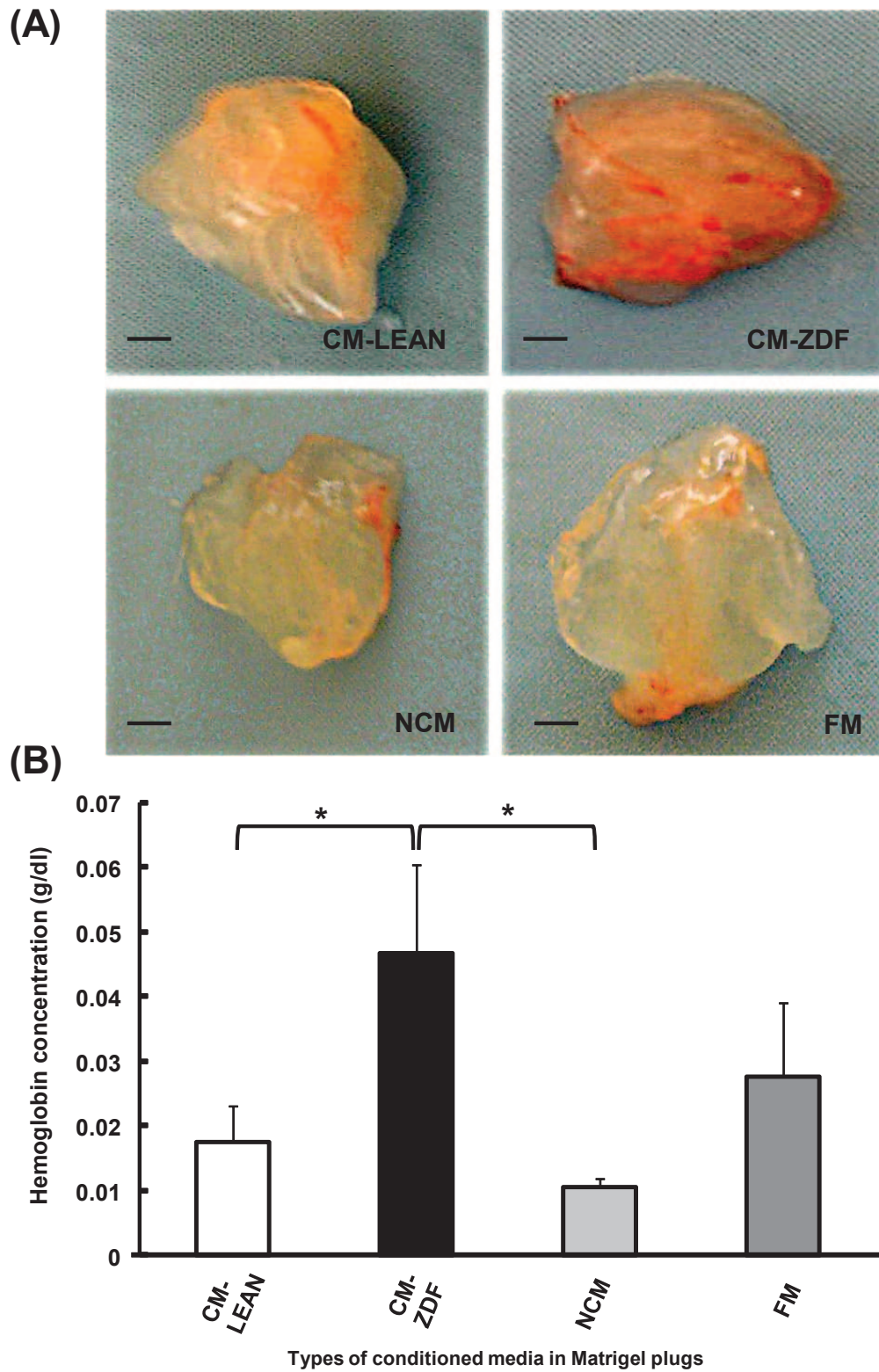


Figure 5

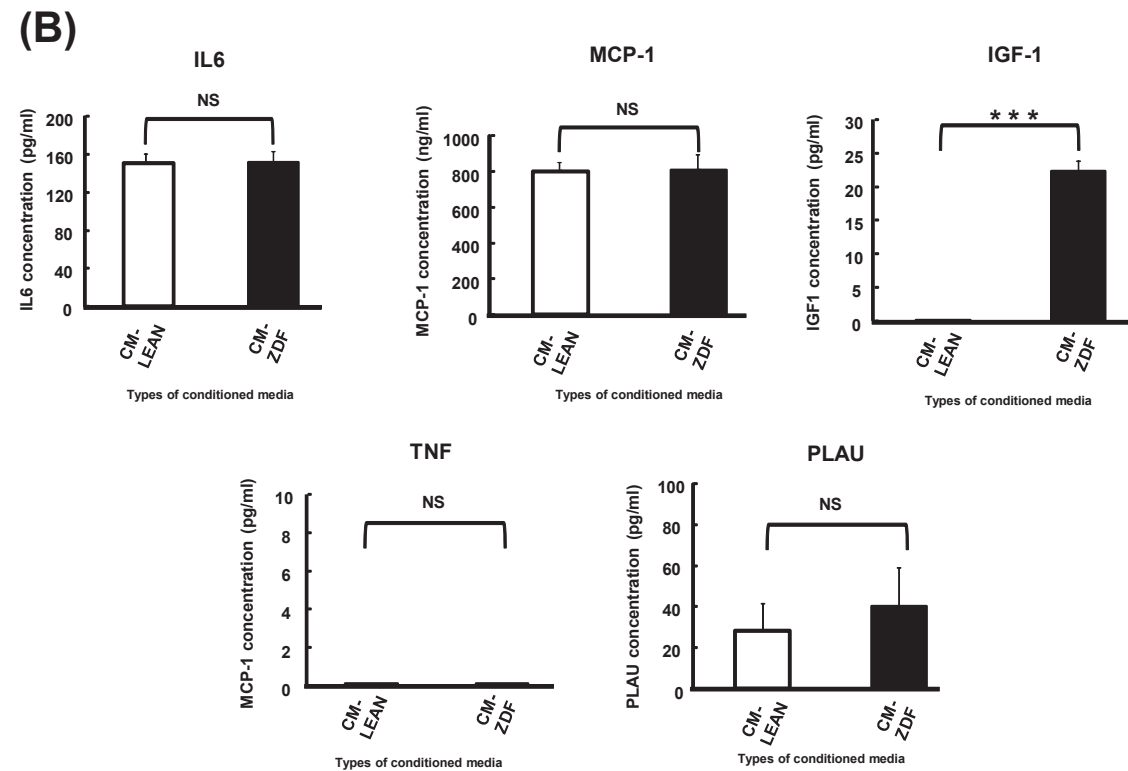
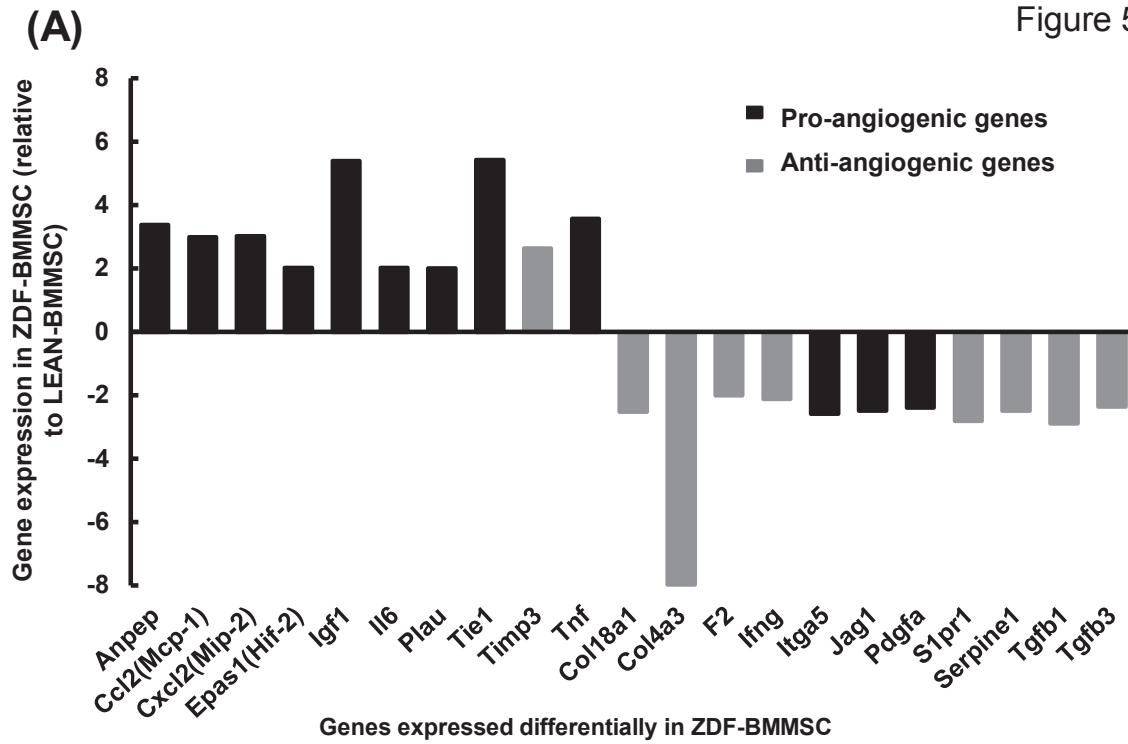


Figure 6

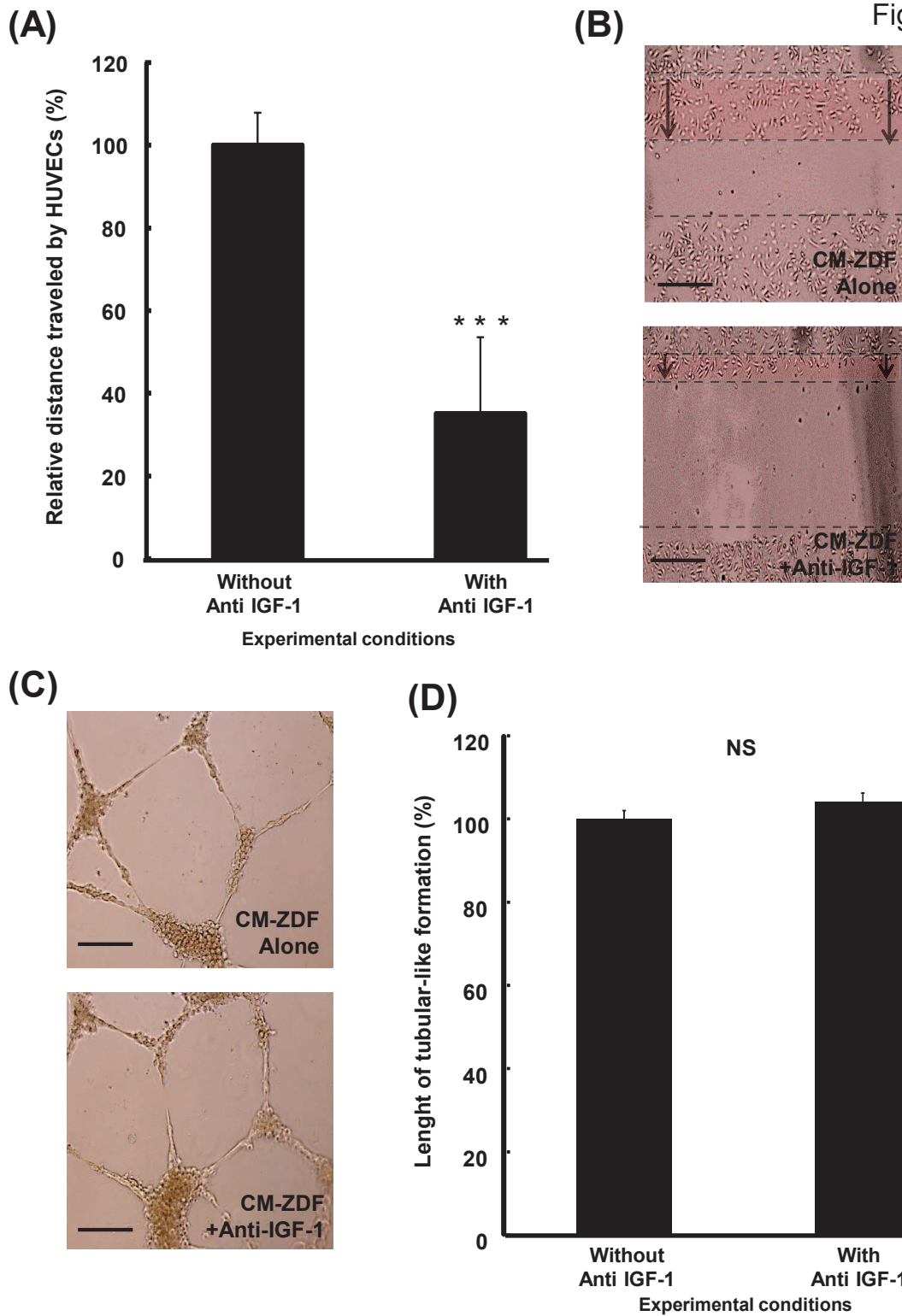


Figure 7

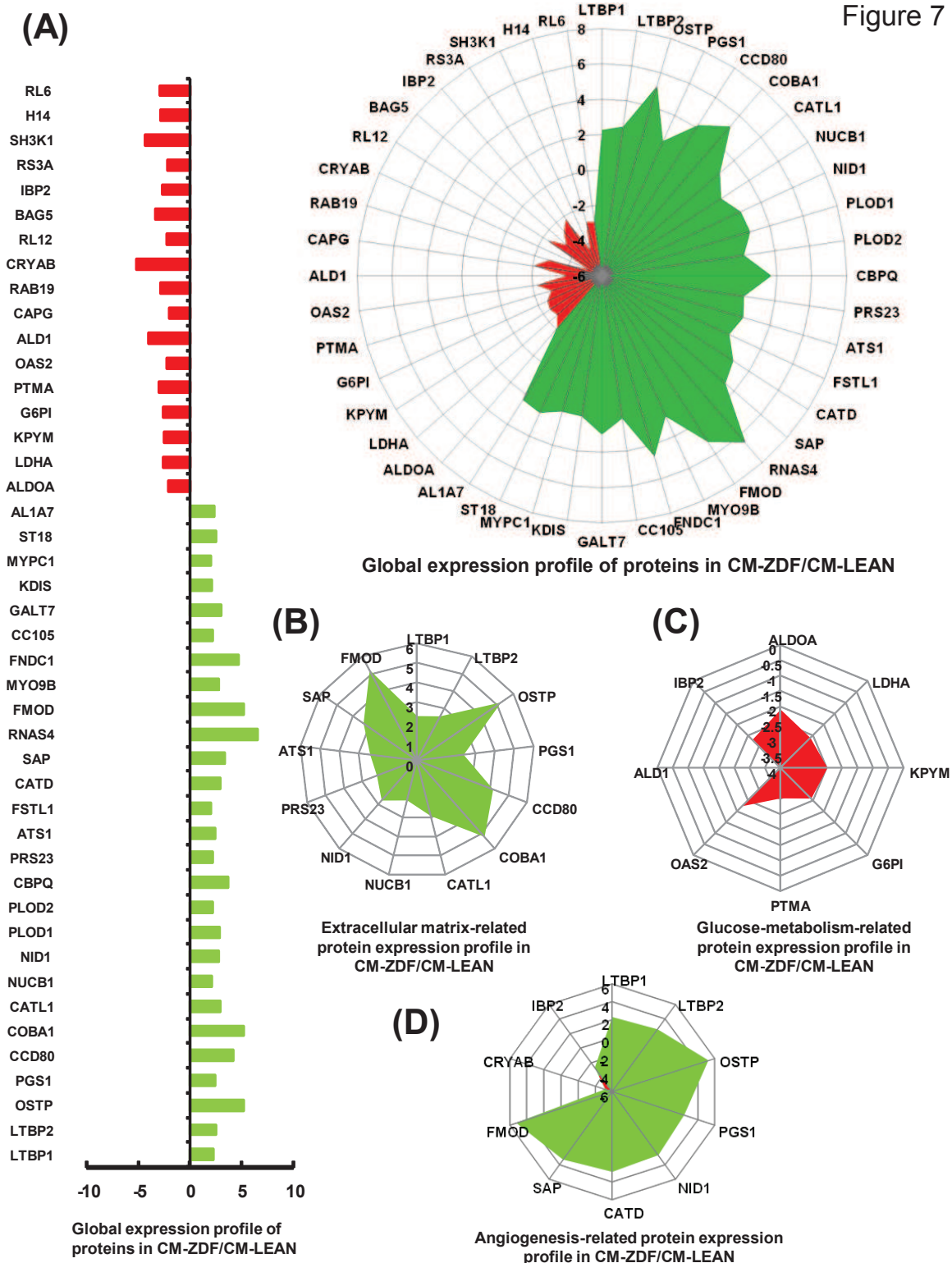
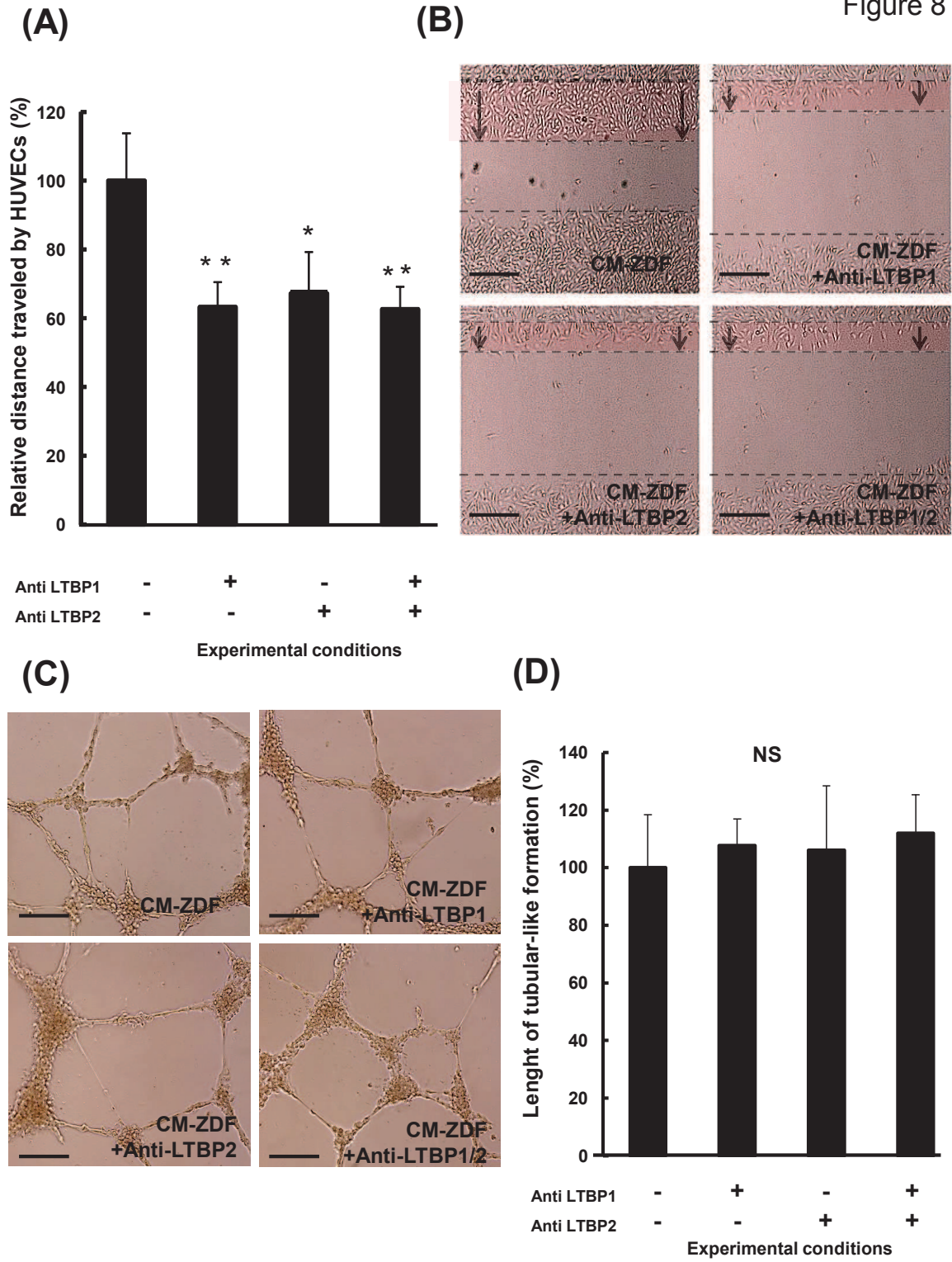


Figure 8



Discussion et perspectives

L'utilisation des cellules souches adultes mésenchymateuses en thérapie cellulaire fait l'objet de nombreuses études prometteuses pour le futur de la régénération tissulaire. (Dong et al., 2008; Wagner et al., 2009). On a longtemps pensé que la capacité de différenciation des cellules était responsable de la régénération tissulaire observée, mais des études récentes laissent à penser que cette régénération est principalement due à des effets paracrins des cellules qui ne restent pas longtemps dans l'organisme après transplantations (Aali et al., 2014; Karp and Leng Teo, 2009; Meirelles Lda et al., 2009; Wagner et al., 2009).

Des études récentes montrent qu'un environnement diabétique peut avoir des effets variés sur les CSMs en modifiant par exemple leur capacité à survivre ou leur prolifération ex vivo (Silva et al., 2015). Néanmoins on ne connaît pas suffisamment ces modifications et les mécanismes impliqués. Dans un contexte diabétique, les voies de signalisation qui pourraient entraîner des modifications majeures de la fonction des cellules souches mésenchymateuses restent pour l'instant à découvrir.

Dans les travaux présentés dans ce manuscrit on s'est efforcé de déterminer quels sont les effets d'une exposition à un environnement diabétique de type 2 sur les CSMs. Dans un premier temps, d'un point de vue de la prolifération, de la résistance à l'apoptose, de la clonogénicité et du potentiel de la différenciation de ces cellules puis de l'éventuelle modification de leur secretome et de ses capacités à induire l'angiogenèse.

Nos travaux ont montré que des CSMs issues de moelle osseuse d'un modèle de rat de diabète de type 2 présentent une clonogénicité, une prolifération et un potentiel de différenciation modifié, particulièrement en ce qui concerne l'adipogenèse. Des travaux antérieurs ont montré également cette baisse de prolifération et cette fragilité face à l'apoptose (Silva et al., 2015) ainsi que cette propension des cellules diabétique de se différencier plus facilement en adipocytes (Madhira et al., 2012). Des cellules exposées à un milieu diabétique voient une hyper méthylation de leurs promoteurs ce qui entraînerait une surexpression d'un grand nombre de gènes avec pour effet de modifier leur potentiel de régénération des cellules (Sarras et al., 2015). Ce mécanisme est connu dans la littérature comme la mémoire métabolique. Ainsi, une cellule ayant subi des modifications épigénétiques la transmet à ses cellules filles ce qui modifie de façon durable le

potentiel des cellules au sein d'un organisme. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle un diabète « ne doit pas s'installer », car même après un retour à la normale de la glycémie et de l'insulinémie des modifications cellulaires durables restent. Par exemple, la rétinopathie et les lésions sur l'œil qui l'accompagnent sont susceptibles d'apparaître chez un patient après un diabète même si celui-ci est par la suite pris en charge et il est contrôlé (Tewari et al., 2012; Zhong and Kowluru, 2010, 2011, 2013). En effet, les cellules sur laquelle nous avons effectué nos expériences étant sortie d'un contexte diabétique et montrant néanmoins des altérations fonctionnelles durables, il est primordial de bien comprendre le mécanisme à l'origine de cet état de fait.

Des caractéristiques modifiées des cellules issues d'un environnement diabétique peuvent être expliquées par une sélection de différents types cellulaires, plus précisément de certains progéniteurs au sein même des CSMs de la moelle osseuse en effets, des travaux récents (Rennert et al., 2014) on conclut que dans un contexte diabétique une sélection avait lieux au sein des CSMs du tissu adipeux privilégiant une sous population cellulaire sur une autre.

Il est difficile de différencier deux populations cellulaires proches, de par le fait que l'on travaille sur un modèle de rat où les marqueurs sont limités et que les phénotypes probablement très proches des cellules soient particulièrement ardues à mettre en évidence. Il nous est donc difficile de conclure sur cette hypothèse dans les travaux que nous présentons ici, mais il est certain qu'une étude approfondie des différents marqueurs cellulaires est nécessaire afin de déterminer si ces populations sont bien les mêmes ou non. Une telle étude a bien sûr des limites, les éventuelles modifications épigénétiques subies par les cellules n'excluant pas des changements dans leurs marqueurs de surfaces.

Une autre question que l'on peut se poser est le rôle du modèle ZDF utilisé dans nos études dans l'interprétation des résultats obtenus. En effet, le rat ZDF a une mutation sur le récepteur de la leptine or, la signalisation de la leptine a été liée non seulement aux capacités de différenciation des CSMs mais également aux propriétés thérapeutiques de ces cellules dans un contexte d'ischémie (Hu et al., 2014). Il est néanmoins important de rappeler ici que de nombreuses études montrent que des variant génétique sur le récepteur de la leptine prédisposent au développement d'un diabète de type 2 chez l'être humain (Ghalandari et al., 2015) notre modèle et les cellules qui en découlent nous sont donc apparues comme le modèle le plus fiable

d'un diabète de type 2 disponible. De plus, l'utilisation de rat Zucker Lean devenu diabétiques après injection de nicotinamide (230 mg/kg) et streptozotocin (65 mg/kg) peut aider pour distinguer les caractéristiques phénotypiques liées à la présence de la mutation du récepteur à la leptine de celles liées au contexte hyperglycémique qui imitent le diabète de type 1. Tout de même diverses expériences inhibant le récepteur de la leptine dans des cellules issues de rats contrôles peuvent être envisagées afin de déterminer quelle est la part de la mutation et quelle est la part du diabète en soi dans les phénotypes que nous avons observés.

Le deuxième volet de nos travaux a été axé sur le secrétome de ces CSMs diabétiques et au leur potentiel angiogénique. Il apparaît important de noter que les CSMs produisent différents facteurs de croissance et cytokines qui peuvent être anti-apoptotique,, immunomodulatrice, angiogénique et chimiotactique (Aali et al., 2014; Davey et al., 2014; Napoli et al., 2014; Zorina et al., 2003). Elles sont étaient associées à diverses pathologies liées au diabète. Une production accrue de VEGF ou d'IGF1 dans l'œil est par exemple une des causes de la rétinopathie diabétique (Iannetti et al., 2011). De façon surprenante, le secretome des cellules issu de rat ZDF et différent du secretome de cellules issu de rats contrôle. En effet, le potentiel angiogénique de ce secrétome semble exacerbé chez les cellules diabétiques, ainsi on a pu voir une formation de pseudo-tubes plus importants chez des cellules endothéliales en présence du milieu conditionné de cellules issues de rats ZDF avec également une migration de ces cellules endothéliales plus importante. De plus, la transplantation de ce milieu issue de cellules diabétiques *in vivo* dans un plug de matrigel a entraîné une vascularisation plus importante et divers test par qPCR, ELISA et protéomique ont montrés que les facteurs présents dans ce milieu étaient différent du milieu contrôle avec par exemple la présence d'IGF1, un des responsables connus de la rétinopathie diabétique.

Ces résultats soulèvent de nombreuses questions. En effet, des cellules qui prolifèrent moins, ont une clonogenicité diminuée et sont moins résistantes à l'apoptose voient en revanche le potentiel de leur secrétome pro-angiogène augmenté. On peut émettre l'hypothèse que le stress qu'entraîne un environnement diabétique est à l'origine de cet état de fait. D'ailleurs, et il existe dans la littérature des données qui montrent qu'une cellule stressée ou sénescence voit son secrétome drastiquement modifié (Deschepper et al., 2011; Page et al., 2014).

La part de CSMs dans certaines pathologies telle que la rétinopathie diabétique est confuse et cet excès d'angiogenèse que nous avons pu observer dans le secrétome des cellules diabétique pourrait être pathologique dans un contexte de diabète *in vivo*. Un travail d'observation sur la vascularisation apportée par le milieu conditionné et sur la perfusion des vaisseaux est donc nécessaire pour aller plus loin dans ces recherches.

Il est également à noter que cet excès d'angiogenèse observé pour le secrétome des cellules n'a pas été observé quand les cellules elles-mêmes et non plus leur milieu ont été transplantées *in vivo*. La fragilité des cellules, leur résistance à l'apoptose moindre, leur prolifération faible ou même la possibilité qu'elles meurent plus rapidement dans les conditions de transplantations (hypoxie et peu de nutriment) pourraient donc expliquer en grande partie la différence entre les résultats observés après l'implantation des cellules elles-mêmes et de leur milieu conditionné.

Enfin ce travail avait pour but de mieux comprendre l'impact du diabète sur des cellules souches mésenchymateuses afin de déterminer leurs spécificités d'utilisation dans le cadre de la thérapie cellulaire chez l'individu diabétique. Néanmoins, au vu des résultats il apparaît que les CSMs de diabétique voient leurs fonctions modifiées par l'influence du milieu et que des études supplémentaires sont nécessaires pour définir leur apport en autologue pour les patients atteints de diabète de type 2 qui souhaitent recourir à une thérapie cellulaire.

Références

- Aali, E., Mirzamohammadi, S., Ghaznavi, H., Madjd, Z., Larijani, B., Rayegan, S., and Sharifi, A.M. (2014). A comparative study of mesenchymal stem cell transplantation with its paracrine effect on control of hyperglycemia in type 1 diabetic rats. *Journal of diabetes and metabolic disorders* 13, 76.
- Abdul-Ghani, M.A., and DeFronzo, R.A. (2009). Plasma glucose concentration and prediction of future risk of type 2 diabetes. *Diabetes care* 32 *Suppl* 2, S194-198.
- Abdulameer, S.A., Sulaiman, S.A., Hassali, M.A., Subramaniam, K., and Sahib, M.N. (2012). Osteoporosis and type 2 diabetes mellitus: what do we know, and what we can do? *Patient preference and adherence* 6, 435-448.
- Abu El-Asrar, A.M., Midena, E., Al-Shabrawey, M., and Mohammad, G. (2013a). New developments in the pathophysiology and management of diabetic retinopathy. *Journal of diabetes research* 2013, 424258.
- Abu El-Asrar, A.M., Nawaz, M.I., Kangave, D., Siddiquei, M.M., Ola, M.S., and Opdenakker, G. (2013b). Angiogenesis regulatory factors in the vitreous from patients with proliferative diabetic retinopathy. *Acta diabetologica* 50, 545-551.
- Abu El-Asrar, A.M., Struyf, S., Kangave, D., Geboes, K., and Van Damme, J. (2006). Chemokines in proliferative diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy. *European cytokine network* 17, 155-165.
- Adutler-Lieber, S., Ben-Mordechai, T., Naftali-Shani, N., Asher, E., Loberman, D., Raanani, E., and Leor, J. (2013). Human macrophage regulation via interaction with cardiac adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics* 18, 78-86.
- Ahmed, A.M. (2002). History of diabetes mellitus. *Saudi medical journal* 23, 373-378.
- Anjos-Afonso, F., Siapati, E.K., and Bonnet, D. (2004). In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions. *Journal of cell science* 117, 5655-5664.
- Assis, A.C., Carvalho, J.L., Jacoby, B.A., Ferreira, R.L., Castanheira, P., Diniz, S.O., Cardoso, V.N., Goes, A.M., and Ferreira, A.J. (2010). Time-dependent migration of systemically delivered bone marrow mesenchymal stem cells to the infarcted heart. *Cell transplantation* 19, 219-230.
- Augello, A., Tasso, R., Negrini, S.M., Amateis, A., Indiveri, F., Cancedda, R., and Pennesi, G. (2005). Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *European journal of immunology* 35, 1482-1490.
- Bach, L.A. (2015). Endothelial cells and the IGF system. *Journal of molecular endocrinology* 54, R1-R13.
- Badiavas, E.V., and Falanga, V. (2003). Treatment of chronic wounds with bone marrow-derived cells. *Archives of dermatology* 139, 510-516.
- Bae, J.S., Han, H.S., Youn, D.H., Carter, J.E., Modo, M., Schuchman, E.H., and Jin, H.K. (2007). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote neuronal networks with functional synaptic transmission after transplantation into mice with neurodegeneration. *Stem cells* 25, 1307-1316.
- Balhara, B., Burkart, A., Topcu, V., Lee, Y.K., Cowan, C., Ronald Kahn, C., and Patti, M.E. (2015). Severe Insulin Resistance Alters Metabolism in Mesenchymal Progenitor Cells. *Endocrinology*, en20141403.
- Barrilleaux, B., Phinney, D.G., Prockop, D.J., and O'Connor, K.C. (2006). Review: ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells. *Tissue engineering* 12, 3007-3019.
- Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., Hardy, W., Devine, S., Ucker, D., Deans, R., *et al.* (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental hematology* 30, 42-48.
- Bays, H., Mandarino, L., and DeFronzo, R.A. (2004). Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89, 463-478.

Beltramo, E., Lopatina, T., Berrone, E., Mazzeo, A., Iavello, A., Camussi, G., and Porta, M. (2014). Extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells induce features of diabetic retinopathy in vitro. *Acta diabetologica* 51, 1055-1064.

Bentzon, J.F., Otsuka, F., Virmani, R., and Falk, E. (2014). Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circulation research* 114, 1852-1866.

Berchem, G., Glondou, M., Gleizes, M., Brouillet, J.P., Vignon, F., Garcia, M., and Liaudet-Coopman, E. (2002). Cathepsin-D affects multiple tumor progression steps in vivo: proliferation, angiogenesis and apoptosis. *Oncogene* 21, 5951-5955.

Besler, C., Doerries, C., Giannotti, G., Luscher, T.F., and Landmesser, U. (2008). Pharmacological approaches to improve endothelial repair mechanisms. *Expert review of cardiovascular therapy* 6, 1071-1082.

Bluestone, J.A., Herold, K., and Eisenbarth, G. (2010). Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* 464, 1293-1300.

Bohlen, L., de Courten, M., and Weidmann, P. (1994). Comparative study of the effect of ACE-inhibitors and other antihypertensive agents on proteinuria in diabetic patients. *American journal of hypertension* 7, 84S-92S.

Bonner-Weir, S., Li, W.C., Ouziel-Yahalom, L., Guo, L., Weir, G.C., and Sharma, A. (2010). Beta-cell growth and regeneration: replication is only part of the story. *Diabetes* 59, 2340-2348.

Botolin, S., and McCabe, L.R. (2007). Bone loss and increased bone adiposity in spontaneous and pharmacologically induced diabetic mice. *Endocrinology* 148, 198-205.

Boyd, A.S., and Wood, K.J. (2010). Characteristics of the early immune response following transplantation of mouse ES cell derived insulin-producing cell clusters. *PloS one* 5, e10965.

Broglio, F., Arvat, E., Benso, A., Gottero, C., Muccioli, G., Papotti, M., van der Lely, A.J., Deghenghi, R., and Ghigo, E. (2001). Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86, 5083-5086.

Calcutt, N.A., Cooper, M.E., Kern, T.S., and Schmidt, A.M. (2009). Therapies for hyperglycaemia-induced diabetic complications: from animal models to clinical trials. *Nature reviews Drug discovery* 8, 417-429.

Capla, J.M., Grogan, R.H., Callaghan, M.J., Galiano, R.D., Tepper, O.M., Ceradini, D.J., and Gurtner, G.C. (2007). Diabetes impairs endothelial progenitor cell-mediated blood vessel formation in response to hypoxia. *Plastic and reconstructive surgery* 119, 59-70.

Carpentier, A., Mittelman, S.D., Bergman, R.N., Giacca, A., and Lewis, G.F. (2000). Prolonged elevation of plasma free fatty acids impairs pancreatic beta-cell function in obese nondiabetic humans but not in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* 49, 399-408.

Chalmers, J., and Cooper, M.E. (2008). UKPDS and the legacy effect. *The New England journal of medicine* 359, 1618-1620.

Chang, A.M., and Halter, J.B. (2003). Aging and insulin secretion. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 284, E7-12.

Charbord, P. (2010). Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Human gene therapy* 21, 1045-1056.

Cheung, B.M., Ong, K.L., Cherny, S.S., Sham, P.C., Tso, A.W., and Lam, K.S. (2009). Diabetes prevalence and therapeutic target achievement in the United States, 1999 to 2006. *The American journal of medicine* 122, 443-453.

Chew, E.Y., Dowler, J., and Flynn, H. (2004). Diabetic retinopathy: should this patient receive laser treatment? *The British journal of ophthalmology* 88, 433.

Chiarelli, F., Spagnoli, A., Basciani, F., Tumini, S., Mezzetti, A., Cipollone, F., Cuccurullo, F., Morgese, G., and Verrotti, A. (2000). Vascular endothelial growth factor (VEGF) in children, adolescents and young

adults with Type 1 diabetes mellitus: relation to glycaemic control and microvascular complications. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 17, 650-656.

Conboy, I.M., Conboy, M.J., Wagers, A.J., Girma, E.R., Weissman, I.L., and Rando, T.A. (2005). Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 433, 760-764.

Considine, R.V., and Caro, J.F. (1996). Leptin in humans: current progress and future directions. *Clinical chemistry* 42, 843-844.

Cooper, C. (1999). Epidemiology of osteoporosis. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 9 Suppl 2, S2-8.

Cooper, M.E., Gilbert, R.E., and Epstein, M. (1998). Pathophysiology of diabetic nephropathy. *Metabolism: clinical and experimental* 47, 3-6.

Coresh, J., Selvin, E., Stevens, L.A., Manzi, J., Kusek, J.W., Eggers, P., Van Lente, F., and Levey, A.S. (2007). Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *Jama* 298, 2038-2047.

Cramer, C., Freisinger, E., Jones, R.K., Slakey, D.P., Dupin, C.L., Newsome, E.R., Alt, E.U., and Izadpanah, R. (2010). Persistent high glucose concentrations alter the regenerative potential of mesenchymal stem cells. *Stem cells and development* 19, 1875-1884.

Cusi, K., Maezono, K., Osman, A., Pendergrass, M., Patti, M.E., Pratipanawatr, T., DeFronzo, R.A., Kahn, C.R., and Mandarino, L.J. (2000). Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *The Journal of clinical investigation* 105, 311-320.

Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A.B., Kuo, F.C., Palmer, E.L., Tseng, Y.H., Doria, A., *et al.* (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *The New England journal of medicine* 360, 1509-1517.

da-Silva, W.S., Harney, J.W., Kim, B.W., Li, J., Bianco, S.D., Crescenzi, A., Christoffolete, M.A., Huang, S.A., and Bianco, A.C. (2007). The small polyphenolic molecule kaempferol increases cellular energy expenditure and thyroid hormone activation. *Diabetes* 56, 767-776.

Dai, W., Hale, S.L., and Kloner, R.A. (2005). Stem cell transplantation for the treatment of myocardial infarction. *Transplant immunology* 15, 91-97.

Danis, R.P., and Yang, Y. (1993). Microvascular retinopathy in the Zucker diabetic fatty rat. *Investigative ophthalmology & visual science* 34, 2367-2371.

Date, Y., Nakazato, M., Hashiguchi, S., Dezaki, K., Mondal, M.S., Hosoda, H., Kojima, M., Kangawa, K., Arima, T., Matsuo, H., *et al.* (2002). Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 51, 124-129.

Davey, G.C., Patil, S.B., O'Loughlin, A., and O'Brien, T. (2014). Mesenchymal stem cell-based treatment for microvascular and secondary complications of diabetes mellitus. *Frontiers in endocrinology* 5, 86.

Deak, E., Seifried, E., and Henschler, R. (2010). Homing pathways of mesenchymal stromal cells (MSCs) and their role in clinical applications. *International reviews of immunology* 29, 514-529.

DeFronzo, R.A., Hompesch, M., Kasichayanula, S., Liu, X., Hong, Y., Pfister, M., Morrow, L.A., Leslie, B.R., Boulton, D.W., Ching, A., *et al.* (2013). Characterization of renal glucose reabsorption in response to dapagliflozin in healthy subjects and subjects with type 2 diabetes. *Diabetes care* 36, 3169-3176.

DeFronzo, R.A., and Tripathy, D. (2009). Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes care* 32 Suppl 2, S157-163.

Deschepper, M., Oudina, K., David, B., Myrtil, V., Collet, C., Bensidhoum, M., Logeart-Avramoglou, D., and Petite, H. (2011). Survival and function of mesenchymal stem cells (MSCs) depend on glucose to overcome exposure to long-term, severe and continuous hypoxia. *Journal of cellular and molecular medicine* 15, 1505-1514.

Devine, S.M., Cobbs, C., Jennings, M., Bartholomew, A., and Hoffman, R. (2003). Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood* 101, 2999-3001.

Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanesi, M., Longoni, P.D., Matteucci, P., Grisanti, S., and Gianni, A.M. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99, 3838-3843.

Dong, Q.Y., Chen, L., Gao, G.Q., Wang, L., Song, J., Chen, B., Xu, Y.X., and Sun, L. (2008). Allogeneic diabetic mesenchymal stem cells transplantation in streptozotocin-induced diabetic rat. *Clinical and investigative medicine Medecine clinique et experimentale* 31, E328-337.

Engerman, R.L., and Kern, T.S. (1987). Progression of incipient diabetic retinopathy during good glycemic control. *Diabetes* 36, 808-812.

Etgen GJ, O.B. (2000). Profiling of Zucker diabetic fatty rats in their progression to the overt diabetic state. *Metabolism*.

Etgen, G.J., and Oldham, B.A. (2000). Profiling of Zucker diabetic fatty rats in their progression to the overt diabetic state. *Metabolism: clinical and experimental* 49, 684-688.

Falanga, V., Iwamoto, S., Chartier, M., Yufit, T., Butmarc, J., Kouttab, N., Shraye, D., and Carson, P. (2007). Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue engineering* 13, 1299-1312.

Fam, N.P., Verma, S., Kutryk, M., and Stewart, D.J. (2003). Clinician guide to angiogenesis. *Circulation* 108, 2613-2618.

Farmer, K.L., Li, C., and Dobrowsky, R.T. (2012). Diabetic peripheral neuropathy: should a chaperone accompany our therapeutic approach? *Pharmacological reviews* 64, 880-900.

Farooqi, I.S., and O'Rahilly, S. (2009). Leptin: a pivotal regulator of human energy homeostasis. *The American journal of clinical nutrition* 89, 980S-984S.

Favaro, E., Carpanetto, A., Lamorte, S., Fusco, A., Caorsi, C., Deregibus, M.C., Bruno, S., Amoroso, A., Giovarelli, M., Porta, M., *et al.* (2014). Human mesenchymal stem cell-derived microvesicles modulate T cell response to islet antigen glutamic acid decarboxylase in patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* 57, 1664-1673.

Felson, D.T., Zhang, Y., Hannan, M.T., and Anderson, J.J. (1993). Effects of weight and body mass index on bone mineral density in men and women: the Framingham study. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 8, 567-573.

Fernandez-Moure, J.S., Corradetti, B., Chan, P., Van Eps, J.L., Janecek, T., Rameshwar, P., Weiner, B.K., and Tasciotti, E. (2015). Enhanced osteogenic potential of mesenchymal stem cells from cortical bone: a comparative analysis. *Stem cell research & therapy* 6, 203.

Ferrer-Lorente, R., Bejar, M.T., and Badimon, L. (2014). Notch signaling pathway activation in normal and hyperglycemic rats differs in the stem cells of visceral and subcutaneous adipose tissue. *Stem cells and development* 23, 3034-3048.

Fisher, A.B. (2004). Reactive oxygen species and cell signaling with lung ischemia. *Undersea & hyperbaric medicine : journal of the Undersea and Hyperbaric Medical Society, Inc* 31, 97-103.

Fong, D.S., Aiello, L., Gardner, T.W., King, G.L., Blankenship, G., Cavallerano, J.D., Ferris, F.L., 3rd, Klein, R., and American Diabetes, A. (2003). Diabetic retinopathy. *Diabetes care* 26, 226-229.

Fonseca, V.A. (2009). Defining and characterizing the progression of type 2 diabetes. *Diabetes care* 32 Suppl 2, S151-156.

Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D., and Semenza, G.L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Molecular and cellular biology* 16, 4604-4613.

Fox, C.S., Coady, S., Sorlie, P.D., D'Agostino, R.B., Sr., Pencina, M.J., Vasan, R.S., Meigs, J.B., Levy, D., and Savage, P.J. (2007). Increasing cardiovascular disease burden due to diabetes mellitus: the Framingham Heart Study. *Circulation* 115, 1544-1550.

Frank, R.N. (2004). Diabetic retinopathy. *The New England journal of medicine* 350, 48-58.

Freeman, J.S. (2009). Role of the incretin pathway in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Cleveland Clinic journal of medicine* 76 Suppl 5, S12-19.

Frescaline, G., Boudierlique, T., Huynh, M.B., Papy-Garcia, D., Courty, J., and Albanese, P. (2012). Glycosaminoglycans mimetics potentiate the clonogenicity, proliferation, migration and differentiation properties of rat mesenchymal stem cells. *Stem cell research* 8, 180-192.

Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., and Lalykina, K.S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics* 3, 393-403.

Friedman, J.M. (2009). Leptin at 14 y of age: an ongoing story. *The American journal of clinical nutrition* 89, 973S-979S.

Gaede, P. (2008). Intensive glucose control and cardiovascular disease in type 2 diabetes--should we change the recommended target for glycated hemoglobin? Commentary to ACCORD and ADVANCE trials. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 118, 619-621.

Galiano, R.D., Tepper, O.M., Pelo, C.R., Bhatt, K.A., Callaghan, M., Bastidas, N., Bunting, S., Steinmetz, H.G., and Gurtner, G.C. (2004). Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *The American journal of pathology* 164, 1935-1947.

Gao, Y., Wu, F., Zhou, J., Yan, L., Jurczak, M.J., Lee, H.Y., Yang, L., Mueller, M., Zhou, X.B., Dandolo, L., *et al.* (2014). The H19/let-7 double-negative feedback loop contributes to glucose metabolism in muscle cells. *Nucleic acids research* 42, 13799-13811.

Gealekman, O., Brodsky, S.V., Zhang, F., Chander, P.N., Friedli, C., Nasjletti, A., and Goligorsky, M.S. (2004). Endothelial dysfunction as a modifier of angiogenic response in Zucker diabetic fat rat: amelioration with Ebselen. *Kidney international* 66, 2337-2347.

Gerber, H.P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B.A., Dixit, V., and Ferrara, N. (1998). Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *The Journal of biological chemistry* 273, 30336-30343.

Gerich, J.E., Meyer, C., Woerle, H.J., and Stumvoll, M. (2001). Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis. *Diabetes care* 24, 382-391.

German, J.P., Wisse, B.E., Thaler, J.P., Oh, I.S., Sarruf, D.A., Ogimoto, K., Kaiyala, K.J., Fischer, J.D., Matsen, M.E., Taborsky, G.J., Jr., *et al.* (2010). Leptin deficiency causes insulin resistance induced by uncontrolled diabetes. *Diabetes* 59, 1626-1634.

Ghalandari, H., Hosseini-Esfahani, F., and Mirmiran, P. (2015). The Association of Polymorphisms in Leptin/Leptin Receptor Genes and Ghrelin/Ghrelin Receptor Genes With Overweight/Obesity and the Related Metabolic Disturbances: A Review. *International journal of endocrinology and metabolism* 13, e19073.

Giacco, F., and Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation research* 107, 1058-1070.

Giunti, S., Barit, D., and Cooper, M.E. (2006). Diabetic nephropathy: from mechanisms to rational therapies. *Minerva medica* 97, 241-262.

Glennie, S., Soeiro, I., Dyson, P.J., Lam, E.W., and Dazzi, F. (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 105, 2821-2827.

Gnecchi, M., He, H., Noiseux, N., Liang, O.D., Zhang, L., Morello, F., Mu, H., Melo, L.G., Pratt, R.E., Ingwall, J.S., *et al.* (2006). Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-

mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20, 661-669.

Golden, S.H. (2011). Emerging therapeutic approaches for the management of diabetes mellitus and macrovascular complications. *The American journal of cardiology* 108, 59B-67B.

Grant, R.W., Moore, A.F., and Florez, J.C. (2009). Genetic architecture of type 2 diabetes: recent progress and clinical implications. *Diabetes care* 32, 1107-1114.

Green, D.R., and Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.

Guariguata, L. (2013). Contribute data to the 6th edition of the IDF Diabetes Atlas. *Diabetes research and clinical practice* 100, 280-281.

Gudjonsson, T., and Magnusson, M.K. (2005). Stem cell biology and the cellular pathways of carcinogenesis. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 113, 922-929.

Hamann, C., Goettsch, C., Mettelsiefen, J., Henkenjohann, V., Rauner, M., Hempel, U., Bernhardt, R., Fratzl-Zelman, N., Roschger, P., Rammelt, S., *et al.* (2011). Delayed bone regeneration and low bone mass in a rat model of insulin-resistant type 2 diabetes mellitus is due to impaired osteoblast function. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 301, E1220-1228.

Hammes, H.P., Klinzing, I., Wiegand, S., Bretzel, R.G., Cohen, A.M., and Federlin, K. (1993). Islet transplantation inhibits diabetic retinopathy in the sucrose-fed diabetic Cohen rat. *Investigative ophthalmology & visual science* 34, 2092-2096.

Haurigot, V., Villacampa, P., Ribera, A., Llombart, C., Bosch, A., Nacher, V., Ramos, D., Ayuso, E., Segovia, J.C., Bueren, J.A., *et al.* (2009). Increased intraocular insulin-like growth factor-I triggers blood-retinal barrier breakdown. *The Journal of biological chemistry* 284, 22961-22969.

Hayek, A., and Woodside, W. (1979). Correlation between morphology and function in isolated islets of the Zucker rat. *Diabetes* 28, 565-569.

Heppner, K.M., and Tong, J. (2014). Mechanisms in endocrinology: regulation of glucose metabolism by the ghrelin system: multiple players and multiple actions. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 171, R21-32.

Herman, M.A., and Kahn, B.B. (2006). Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony. *The Journal of clinical investigation* 116, 1767-1775.

Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M.S., Wildiers, H., Van Oosterom, A.T., and De Bruijn, E.A. (2004). Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacological reviews* 56, 549-580.

Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S., Keating, A., and International Society for Cellular, T. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7, 393-395.

Hoshi, S., Shu, Y., Yoshida, F., Inagaki, T., Sonoda, J., Watanabe, T., Nomoto, K., and Nagata, M. (2002). Podocyte injury promotes progressive nephropathy in zucker diabetic fatty rats. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 82, 25-35.

Hu, F.B. (2011). Diet and exercise for new-onset type 2 diabetes? *Lancet* 378, 101-102.

Hu, X., Wu, R., Jiang, Z., Wang, L., Chen, P., Zhang, L., Yang, L., Wu, Y., Chen, H., Chen, H., *et al.* (2014). Leptin signaling is required for augmented therapeutic properties of mesenchymal stem cells conferred by hypoxia preconditioning. *Stem cells* 32, 2702-2713.

Hung, S.C., Pochampally, R.R., Chen, S.C., Hsu, S.C., and Prockop, D.J. (2007). Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem cells* 25, 2363-2370.

Iannetti, L., Accorinti, M., Malagola, R., Bozzoni-Pantaleoni, F., Da Dalt, S., Nicoletti, F., Gradini, R., Traficante, A., Campanella, M., and Pivetti-Pezzi, P. (2011). Role of the intravitreal growth factors in the

pathogenesis of idiopathic epiretinal membrane. *Investigative ophthalmology & visual science* 52, 5786-5789.

Ihnat, M.A., Thorpe, J.E., Kamat, C.D., Szabo, C., Green, D.E., Warnke, L.A., Lacza, Z., Cselenyak, A., Ross, K., Shakir, S., *et al.* (2007). Reactive oxygen species mediate a cellular 'memory' of high glucose stress signalling. *Diabetologia* 50, 1523-1531.

Ilic, D., Almeida, E.A., Schlaepfer, D.D., Dazin, P., Aizawa, S., and Damsky, C.H. (1998). Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis. *The Journal of cell biology* 143, 547-560.

Januszyk, M., Sorkin, M., Glotzbach, J.P., Vial, I.N., Maan, Z.N., Rennert, R.C., Duscher, D., Thangarajah, H., Longaker, M.T., Butte, A.J., *et al.* (2014). Diabetes irreversibly depletes bone marrow-derived mesenchymal progenitor cell subpopulations. *Diabetes* 63, 3047-3056.

Jeerakathil, T., Johnson, J.A., Simpson, S.H., and Majumdar, S.R. (2007). Short-term risk for stroke is doubled in persons with newly treated type 2 diabetes compared with persons without diabetes: a population-based cohort study. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 38, 1739-1743.

Jian, J., Zheng, Z., Zhang, K., Rackohn, T.M., Hsu, C., Levin, A., Enjamuri, D.R., Zhang, X., Ting, K., and Soo, C. (2013). Fibromodulin promoted in vitro and in vivo angiogenesis. *Biochemical and biophysical research communications* 436, 530-535.

Jiang, W., Ma, A., Wang, T., Han, K., Liu, Y., Zhang, Y., Dong, A., Du, Y., Huang, X., Wang, J., *et al.* (2006). Homing and differentiation of mesenchymal stem cells delivered intravenously to ischemic myocardium in vivo: a time-series study. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 453, 43-52.

Jiang, X.X., Zhang, Y., Liu, B., Zhang, S.X., Wu, Y., Yu, X.D., and Mao, N. (2005). Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 105, 4120-4126.

Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., *et al.* (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49.

Kahles, T., Luedike, P., Endres, M., Galla, H.J., Steinmetz, H., Busse, R., Neumann-Haefelin, T., and Brandes, R.P. (2007). NADPH oxidase plays a central role in blood-brain barrier damage in experimental stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 38, 3000-3006.

Kahn, S.E., Prigeon, R.L., Schwartz, R.S., Fujimoto, W.Y., Knopp, R.H., Brunzell, J.D., and Porte, D., Jr. (2001). Obesity, body fat distribution, insulin sensitivity and Islet beta-cell function as explanations for metabolic diversity. *The Journal of nutrition* 131, 354S-360S.

Kale, S., Raja, R., Thorat, D., Soundararajan, G., Patil, T.V., and Kundu, G.C. (2014). Osteopontin signaling upregulates cyclooxygenase-2 expression in tumor-associated macrophages leading to enhanced angiogenesis and melanoma growth via alpha9beta1 integrin. *Oncogene* 33, 2295-2306.

Kamata, T. (2009). Roles of Nox1 and other Nox isoforms in cancer development. *Cancer science* 100, 1382-1388.

Kamihata, H., Matsubara, H., Nishiue, T., Fujiyama, S., Tsutsumi, Y., Ozono, R., Masaki, H., Mori, Y., Iba, O., Tateishi, E., *et al.* (2001). Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation* 104, 1046-1052.

Kang, L., Chen, Q., Wang, L., Gao, L., Meng, K., Chen, J., Ferro, A., and Xu, B. (2009). Decreased mobilization of endothelial progenitor cells contributes to impaired neovascularization in diabetes. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 36, e47-56.

Karp, J.M., and Leng Teo, G.S. (2009). Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell stem cell* 4, 206-216.

Kawada, H., Fujita, J., Kinjo, K., Matsuzaki, Y., Tsuma, M., Miyatake, H., Muguruma, Y., Tsuboi, K., Itabashi, Y., Ikeda, Y., *et al.* (2004). Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* 104, 3581-3587.

Keating, A. (2008). How do mesenchymal stromal cells suppress T cells? *Cell stem cell* 2, 106-108.

Khazaei, M., Fallahzadeh, A.R., Sharifi, M.R., Afsharmoghaddam, N., Javanmard, S.H., and Salehi, E. (2011). Effects of diabetes on myocardial capillary density and serum angiogenesis biomarkers in male rats. *Clinics* 66, 1419-1424.

Kim, J., Kim, C.S., Sohn, E., Kim, H., Jeong, I.H., and Kim, J.S. (2011). KIOM-79 Prevents Lens Epithelial Cell Apoptosis and Lens Opacification in Zucker Diabetic Fatty Rats. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2011.

Kim, J., Piao, Y., Pak, Y.K., Chung, D., Han, Y.M., Hong, J.S., Jun, E.J., Shim, J.Y., Choi, J., and Kim, C.J. (2015). Umbilical cord mesenchymal stromal cells affected by gestational diabetes mellitus display premature aging and mitochondrial dysfunction. *Stem cells and development* 24, 575-586.

Kim, K.A., Shin, Y.J., Kim, J.H., Lee, H., Noh, S.Y., Jang, S.H., and Bae, O.N. (2012). Dysfunction of endothelial progenitor cells under diabetic conditions and its underlying mechanisms. *Archives of pharmacol research* 35, 223-234.

Kim, Y.S., Kang, H.J., Hong, M.H., Kang, W.S., Choe, N., Kook, H., Jeong, M.H., and Ahn, Y. (2014). Angiopoietin-like 4 is involved in the poor angiogenic potential of high glucose-insulted bone marrow stem cells. *Korean circulation journal* 44, 177-183.

King, J.B., Schauerhamer, M.B., and Bellows, B.K. (2015). A review of the clinical utility of duloxetine in the treatment of diabetic peripheral neuropathic pain. *Therapeutics and clinical risk management* 11, 1163-1175.

Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M.S., Lee, C.W., Barr, S., Fuchs, S., and Epstein, S.E. (2004a). Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circulation research* 94, 678-685.

Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M.S., Shou, M., Lee, C.W., Barr, S., Fuchs, S., and Epstein, S.E. (2004b). Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 109, 1543-1549.

Kitaori, T., Ito, H., Schwarz, E.M., Tsutsumi, R., Yoshitomi, H., Oishi, S., Nakano, M., Fujii, N., Nagasawa, T., and Nakamura, T. (2009). Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model. *Arthritis and rheumatism* 60, 813-823.

Klein, B.E. (2007). Overview of epidemiologic studies of diabetic retinopathy. *Ophthalmic epidemiology* 14, 179-183.

Ko, K.I., Coimbra, L.S., Tian, C., Alblowi, J., Kayal, R.A., Einhorn, T.A., Gerstenfeld, L.C., Pignolo, R.J., and Graves, D.T. (2015). Diabetes reduces mesenchymal stem cells in fracture healing through a TNF α -mediated mechanism. *Diabetologia* 58, 633-642.

Kume, S., Kato, S., Yamagishi, S., Inagaki, Y., Ueda, S., Arima, N., Okawa, T., Kojiro, M., and Nagata, K. (2005). Advanced glycation end-products attenuate human mesenchymal stem cells and prevent cognate differentiation into adipose tissue, cartilage, and bone. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 20, 1647-1658.

Lacey, D.C., Simmons, P.J., Graves, S.E., and Hamilton, J.A. (2009). Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 17, 735-742.

Lewis, E.J., Hunsicker, L.G., Bain, R.P., and Rohde, R.D. (1993). The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *The New England journal of medicine* 329, 1456-1462.

Li, J., Li, D., Liu, X., Tang, S., and Wei, F. (2012). Human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce systemic inflammation and attenuate LPS-induced acute lung injury in rats. *Journal of inflammation* 9, 33.

Liew, C.G., Moore, H., Ruban, L., Shah, N., Cosgrove, K., Dunne, M., and Andrews, P. (2005). Human embryonic stem cells: possibilities for human cell transplantation. *Annals of medicine* 37, 521-532.

Liu, I.M., Tzeng, T.F., Liou, S.S., and Lan, T.W. (2007). Improvement of insulin sensitivity in obese Zucker rats by myricetin extracted from *Abelmoschus moschatus*. *Planta medica* 73, 1054-1060.

Liu, Z.Y., Ganju, R.K., Wang, J.F., Schweitzer, K., Weksler, B., Avraham, S., and Groopman, J.E. (1997). Characterization of signal transduction pathways in human bone marrow endothelial cells. *Blood* 90, 2253-2259.

Lobo, M., and Zachary, I. (2000). Nuclear localization and apoptotic regulation of an amino-terminal domain focal adhesion kinase fragment in endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 276, 1068-1074.

Lull, M.E., and Block, M.L. (2010). Microglial activation and chronic neurodegeneration. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 7, 354-365.

Madec, A.M., Mallone, R., Afonso, G., Abou Mrad, E., Mesnier, A., Eljaafari, A., and Thivolet, C. (2009). Mesenchymal stem cells protect NOD mice from diabetes by inducing regulatory T cells. *Diabetologia* 52, 1391-1399.

Madhira, S.L., Challa, S.S., Chalasani, M., Nappanveethl, G., Bhonde, R.R., Ajumeera, R., and Venkatesan, V. (2012). Promise(s) of mesenchymal stem cells as an in vitro model system to depict pre-diabetic/diabetic milieu in WNIN/GR-Ob mutant rats. *PloS one* 7, e48061.

Mahdy, R.A., Nada, W.M., Hadhoud, K.M., and El-Tarhony, S.A. (2010). The role of vascular endothelial growth factor in the progression of diabetic vascular complications. *Eye* 24, 1576-1584.

Martin-Timon, I., Sevillano-Collantes, C., Segura-Galindo, A., and Del Canizo-Gomez, F.J. (2014). Type 2 diabetes and cardiovascular disease: Have all risk factors the same strength? *World journal of diabetes* 5, 444-470.

Martin, A., Komada, M.R., and Sane, D.C. (2003). Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. *Medicinal research reviews* 23, 117-145.

Mauer, S.M., Steffes, M.W., Ellis, E.N., Sutherland, D.E., Brown, D.M., and Goetz, F.C. (1984). Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. *The Journal of clinical investigation* 74, 1143-1155.

Meirelles Lda, S., Fontes, A.M., Covas, D.T., and Caplan, A.I. (2009). Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & growth factor reviews* 20, 419-427.

Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Gobel, U., Daubener, W., and Dilloo, D. (2004). Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 103, 4619-4621.

Melton, L.J., 3rd, Atkinson, E.J., O'Fallon, W.M., Wahner, H.W., and Riggs, B.L. (1993). Long-term fracture prediction by bone mineral assessed at different skeletal sites. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 8, 1227-1233.

Meyer, C., Stumvoll, M., Nadkarni, V., Dostou, J., Mitrakou, A., and Gerich, J. (1998). Abnormal renal and hepatic glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus. *The Journal of clinical investigation* 102, 619-624.

Middleton, K., Jones, J., Lwin, Z., and Coward, J.I. (2014). Interleukin-6: an angiogenic target in solid tumours. *Critical reviews in oncology/hematology* 89, 129-139.

Mimeault, M., and Batra, S.K. (2006). Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem cells* 24, 2319-2345.

Mirotsoy, M., Jayawardena, T.M., Schmeckpeper, J., Gneccchi, M., and Dzau, V.J. (2011). Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* 50, 280-289.

Mittendorfer, B., Horowitz, J.F., DePaoli, A.M., McCamish, M.A., Patterson, B.W., and Klein, S. (2011). Recombinant human leptin treatment does not improve insulin action in obese subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* 60, 1474-1477.

Monnier, V.M., Mustata, G.T., Biemel, K.L., Reihl, O., Lederer, M.O., Zhenyu, D., and Sell, D.R. (2005). Cross-linking of the extracellular matrix by the maillard reaction in aging and diabetes: an update on "a puzzle nearing resolution". *Annals of the New York Academy of Sciences* 1043, 533-544.

Morton, G.J., and Schwartz, M.W. (2011). Leptin and the central nervous system control of glucose metabolism. *Physiological reviews* 91, 389-411.

Nakamura, J., Hamada, Y., Sakakibara, F., Hara, T., Wakao, T., Mori, K., Nakashima, E., Naruse, K., Kamijo, M., Koh, N., *et al.* (2001). Physiological and morphometric analyses of neuropathy in sucrose-fed OLETF rats. *Diabetes research and clinical practice* 51, 9-20.

Napoli, N., Strollo, R., Paladini, A., Briganti, S.I., Pozzilli, P., and Epstein, S. (2014). The alliance of mesenchymal stem cells, bone, and diabetes. *International journal of endocrinology* 2014, 690783.

Nathan, D.M., Buse, J.B., Davidson, M.B., Ferrannini, E., Holman, R.R., Sherwin, R., Zinman, B., American Diabetes, A., and European Association for Study of, D. (2009). Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes care* 32, 193-203.

Nauck, M.A., El-Ouaghli, A., Gabrys, B., Hucking, K., Holst, J.J., Deacon, C.F., Gallwitz, B., Schmidt, W.E., and Meier, J.J. (2004). Secretion of incretin hormones (GIP and GLP-1) and incretin effect after oral glucose in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Regulatory peptides* 122, 209-217.

Neve, A., Cantatore, F.P., Maruotti, N., Corrado, A., and Ribatti, D. (2014). Extracellular matrix modulates angiogenesis in physiological and pathological conditions. *BioMed research international* 2014, 756078.

O'Loughlin, A., Kulkarni, M., Creane, M., Vaughan, E.E., Mooney, E., Shaw, G., Murphy, M., Dockery, P., Pandit, A., and O'Brien, T. (2013). Topical administration of allogeneic mesenchymal stromal cells seeded in a collagen scaffold augments wound healing and increases angiogenesis in the diabetic rabbit ulcer. *Diabetes* 62, 2588-2594.

O'Loughlin, A., McIntosh, C., Dinneen, S.F., and O'Brien, T. (2010). Review paper: basic concepts to novel therapies: a review of the diabetic foot. *The international journal of lower extremity wounds* 9, 90-102.

Ohkouchi, S., Block, G.J., Katsha, A.M., Kanehira, M., Ebina, M., Kikuchi, T., Saijo, Y., Nukiwa, T., and Prockop, D.J. (2012). Mesenchymal stromal cells protect cancer cells from ROS-induced apoptosis and enhance the Warburg effect by secreting STC1. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 20, 417-423.

Oikawa, A., Siragusa, M., Quaini, F., Mangialardi, G., Katare, R.G., Caporali, A., van Buul, J.D., van Alphen, F.P., Graiani, G., Spinetti, G., *et al.* (2010). Diabetes mellitus induces bone marrow microangiopathy. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30, 498-508.

Okazaki, T., Magaki, T., Takeda, M., Kajiwar, Y., Hanaya, R., Sugiyama, K., Arita, K., Nishimura, M., Kato, Y., and Kurisu, K. (2008). Intravenous administration of bone marrow stromal cells increases survivin and Bcl-2 protein expression and improves sensorimotor function following ischemia in rats. *Neuroscience letters* 430, 109-114.

Oltman, C.L., Coppey, L.J., Gellett, J.S., Davidson, E.P., Lund, D.D., and Yorek, M.A. (2005). Progression of vascular and neural dysfunction in sciatic nerves of Zucker diabetic fatty and Zucker rats. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 289, E113-122.

Orr, W.C., and Sohal, R.S. (1994). Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 263, 1128-1130.

Ouellet, V., Labbe, S.M., Blondin, D.P., Phoenix, S., Guerin, B., Haman, F., Turcotte, E.E., Richard, D., and Carpentier, A.C. (2012). Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *The Journal of clinical investigation* 122, 545-552.

Paccou, J., Hardouin, P., Cotten, A., Penel, G., and Cortet, B. (2015). The Role of Bone Marrow Fat in Skeletal Health: Usefulness and Perspectives for Clinicians. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 100, 3613-3621.

Pacini, S., and Petrini, I. (2014). Are MSCs angiogenic cells? New insights on human nestin-positive bone marrow-derived multipotent cells. *Frontiers in cell and developmental biology* 2, 20.

Page, P., DeJong, J., Bandstra, A., and Boomsma, R.A. (2014). Effect of serum and oxygen concentration on gene expression and secretion of paracrine factors by mesenchymal stem cells. *International journal of cell biology* 2014, 601063.

Pagotto, U. (2009). Where does insulin resistance start? The brain. *Diabetes care* 32 Suppl 2, S174-177.

Park, L.K., Maione, A.G., Smith, A., Gerami-Naini, B., Iyer, L.K., Mooney, D.J., Veves, A., and Garlick, J.A. (2014). Genome-wide DNA methylation analysis identifies a metabolic memory profile in patient-derived diabetic foot ulcer fibroblasts. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* 9, 1339-1349.

Patel, S.A., Meyer, J.R., Greco, S.J., Corcoran, K.E., Bryan, M., and Rameshwar, P. (2010). Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta. *Journal of immunology* 184, 5885-5894.

Patterson, C.C., Gyurus, E., Rosenbauer, J., Cinek, O., Neu, A., Schober, E., Parslow, R.C., Joner, G., Svensson, J., Castell, C., *et al.* (2012). Trends in childhood type 1 diabetes incidence in Europe during 1989-2008: evidence of non-uniformity over time in rates of increase. *Diabetologia* 55, 2142-2147.

Pereira, R.F., Halford, K.W., O'Hara, M.D., Leeper, D.B., Sokolov, B.P., Pollard, M.D., Bagasra, O., and Prockop, D.J. (1995). Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 4857-4861.

Petersen, J., Ross, J., and Rabkin, R. (1988). Effect of insulin therapy on established diabetic nephropathy in rats. *Diabetes* 37, 1346-1350.

Pfeifer, M.A., Graf, R.J., Halter, J.B., and Porte, D., Jr. (1981). The regulation of glucose-induced insulin secretion by pre-stimulus glucose level and tolbutamide in normal man. *Diabetologia* 21, 198-205.

Piccinin, M.A., and Khan, Z.A. (2014). Pathophysiological role of enhanced bone marrow adipogenesis in diabetic complications. *Adipocyte* 3, 263-272.

Pirola, L., Balcerczyk, A., Okabe, J., and El-Osta, A. (2010). Epigenetic phenomena linked to diabetic complications. *Nature reviews Endocrinology* 6, 665-675.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.

Poitout, V., and Robertson, R.P. (2002). Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* 143, 339-342.

Polovina, M.M., and Potpara, T.S. (2014). Endothelial dysfunction in metabolic and vascular disorders. *Postgraduate medicine* 126, 38-53.

Poykko, S.M., Kellokoski, E., Horkko, S., Kauma, H., Kesaniemi, Y.A., and Ukkola, O. (2003). Low plasma ghrelin is associated with insulin resistance, hypertension, and the prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 2546-2553.

Prasad, R.B., and Groop, L. (2015). Genetics of type 2 diabetes-pitfalls and possibilities. *Genes* 6, 87-123.

Prockop, D.J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276, 71-74.

Pugh, C.W., O'Rourke, J.F., Nagao, M., Gleadle, J.M., and Ratcliffe, P.J. (1997). Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *The Journal of biological chemistry* 272, 11205-11214.

Rand, L.I., Krolewski, A.S., Aiello, L.M., Warram, J.H., Baker, R.S., and Maki, T. (1985). Multiple factors in the prediction of risk of proliferative diabetic retinopathy. *The New England journal of medicine* 313, 1433-1438.

Reddy, M.A., Zhang, E., and Natarajan, R. (2014). Epigenetic mechanisms in diabetic complications and metabolic memory. *Diabetologia*.

Reinwald, S., Peterson, R.G., Allen, M.R., and Burr, D.B. (2009). Skeletal changes associated with the onset of type 2 diabetes in the ZDF and ZSDS rodent models. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 296, E765-774.

Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A.I., Zhao, R.C., and Shi, Y. (2008). Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell stem cell* 2, 141-150.

Rennert, R.C., Sorkin, M., Januszyk, M., Duscher, D., Kosaraju, R., Chung, M.T., Lennon, J., Radiya-Dixit, A., Raghvendra, S., Maan, Z.N., *et al.* (2014). Diabetes impairs the angiogenic potential of adipose-derived stem cells by selectively depleting cellular subpopulations. *Stem cell research & therapy* 5, 79.

Retzepi, M., Lewis, M.P., and Donos, N. (2010). Effect of diabetes and metabolic control on de novo bone formation following guided bone regeneration. *Clinical oral implants research* 21, 71-79.

Riddle, M.C. (2011). Glycemic control and cardiovascular mortality. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 18, 104-109.

Ritz, E., and Stefanski, A. (1996). Diabetic nephropathy in type II diabetes. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 27, 167-194.

Roberts, A.C., and Porter, K.E. (2013). Cellular and molecular mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes. *Diabetes & vascular disease research : official journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease* 10, 472-482.

Romaniuk, D., Kimsa, M.W., Strzalka-Mrozik, B., Kimsa, M.C., Kabiesz, A., Romaniuk, W., and Mazurek, U. (2013). Gene expression of IGF1, IGF1R, and IGFBP3 in epiretinal membranes of patients with proliferative diabetic retinopathy: preliminary study. *Mediators of inflammation* 2013, 986217.

Rombouts, W.J., and Ploemacher, R.E. (2003). Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia* 17, 160-170.

Rosberger, D.F. (2013). Diabetic retinopathy: current concepts and emerging therapy. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 42, 721-745.

Rose, R.A., Keating, A., and Backx, P.H. (2008). Do mesenchymal stromal cells transdifferentiate into functional cardiomyocytes? *Circulation research* 103, e120.

Roth, J.D., Maier, H., Chen, S., and Roland, B.L. (2009). Implications of amylin receptor agonism: integrated neurohormonal mechanisms and therapeutic applications. *Archives of neurology* 66, 306-310.

Rouwkema, J., Westerweel, P.E., de Boer, J., Verhaar, M.C., and van Blitterswijk, C.A. (2009). The use of endothelial progenitor cells for prevascularized bone tissue engineering. *Tissue engineering Part A* 15, 2015-2027.

Roy, M.S., Klein, R., O'Colmain, B.J., Klein, B.E., Moss, S.E., and Kempner, J.H. (2004). The prevalence of diabetic retinopathy among adult type 1 diabetic persons in the United States. *Archives of ophthalmology* 122, 546-551.

Roy, S., Sala, R., Cagliero, E., and Lorenzi, M. (1990). Overexpression of fibronectin induced by diabetes or high glucose: phenomenon with a memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 404-408.

Ruberte, J., Ayuso, E., Navarro, M., Carretero, A., Nacher, V., Haurigot, V., George, M., Llombart, C., Casellas, A., Costa, C., *et al.* (2004). Increased ocular levels of IGF-1 in transgenic mice lead to diabetes-like eye disease. *The Journal of clinical investigation* 113, 1149-1157.

Rubinat, E., Ortega, E., Traveset, A., Arcidiacono, M.V., Alonso, N., Betriu, A., Granado-Casas, M., Hernandez, M., Soldevila, J., Puig-Domingo, M., *et al.* (2015). Microangiopathy of common carotid vasa vasorum in type 1 diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 241, 334-338.

Salcedo, R., Ponce, M.L., Young, H.A., Wasserman, K., Ward, J.M., Kleinman, H.K., Oppenheim, J.J., and Murphy, W.J. (2000). Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* 96, 34-40.

Sarras, M.P., Jr., Leontovich, A.A., and Intine, R.V. (2015). Use of zebrafish as a model to investigate the role of epigenetics in propagating the secondary complications observed in diabetes mellitus. *Comparative biochemistry and physiology Toxicology & pharmacology* : CBP.

Sasaki, M., Abe, R., Fujita, Y., Ando, S., Inokuma, D., and Shimizu, H. (2008). Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *Journal of immunology* *180*, 2581-2587.

Schmidinger, G., Maar, N., Bolz, M., Scholda, C., and Schmidt-Erfurth, U. (2011). Repeated intravitreal bevacizumab (Avastin((R))) treatment of persistent new vessels in proliferative diabetic retinopathy after complete panretinal photocoagulation. *Acta ophthalmologica* *89*, 76-81.

Schwartz, A.V. (2015). Marrow fat and bone: review of clinical findings. *Frontiers in endocrinology* *6*, 40.

Schwartz, R.E., Reyes, M., Koodie, L., Jiang, Y., Blackstad, M., Lund, T., Lenvik, T., Johnson, S., Hu, W.S., and Verfaillie, C.M. (2002). Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *The Journal of clinical investigation* *109*, 1291-1302.

Semb, H. (2005). Human embryonic stem cells: origin, properties and applications. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* *113*, 743-750.

Sheng, H., Wang, Y., Jin, Y., Zhang, Q., Zhang, Y., Wang, L., Shen, B., Yin, S., Liu, W., Cui, L., *et al.* (2008). A critical role of IFN γ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell research* *18*, 846-857.

Shi, Y., Hu, G., Su, J., Li, W., Chen, Q., Shou, P., Xu, C., Chen, X., Huang, Y., Zhu, Z., *et al.* (2010). Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell research* *20*, 510-518.

Shigematsu, S., Yamauchi, K., Nakajima, K., Iijima, S., Aizawa, T., and Hashizume, K. (1999). IGF-1 regulates migration and angiogenesis of human endothelial cells. *Endocrine journal* *46 Suppl*, S59-62.

Shin, L., and Peterson, D.A. (2012). Impaired therapeutic capacity of autologous stem cells in a model of type 2 diabetes. *Stem cells translational medicine* *1*, 125-135.

Shin, L., and Peterson, D.A. (2013). Human mesenchymal stem cell grafts enhance normal and impaired wound healing by recruiting existing endogenous tissue stem/progenitor cells. *Stem cells translational medicine* *2*, 33-42.

Shintani, S., Murohara, T., Ikeda, H., Ueno, T., Sasaki, K., Duan, J., and Imaizumi, T. (2001). Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* *103*, 897-903.

Sidaway, P. (2015). Diabetes: Epigenetic changes lead to impaired wound healing in patients with T2DM. *Nature reviews Endocrinology* *11*, 65.

Silva, J.C., Sampaio, P., Fernandes, M.H., and Gomes, P.S. (2015). The Osteogenic Priming of Mesenchymal Stem Cells is Impaired in Experimental Diabetes. *Journal of cellular biochemistry* *116*, 1658-1667.

Simo, R., Carrasco, E., Garcia-Ramirez, M., and Hernandez, C. (2006). Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. *Current diabetes reviews* *2*, 71-98.

Sohal, R.S., Ku, H.H., Agarwal, S., Forster, M.J., and Lal, H. (1994). Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mechanisms of ageing and development* *74*, 121-133.

Sommer, C.A., Sommer, A.G., Longmire, T.A., Christodoulou, C., Thomas, D.D., Gostissa, M., Alt, F.W., Murphy, G.J., Kotton, D.N., and Mostoslavsky, G. (2010). Excision of reprogramming transgenes improves the differentiation potential of iPS cells generated with a single excisable vector. *Stem cells* *28*, 64-74.

Song, G., Habibovic, P., Bao, C., Hu, J., van Blitterswijk, C.A., Yuan, H., Chen, W., and Xu, H.H. (2013). The homing of bone marrow MSCs to non-osseous sites for ectopic bone formation induced by osteoinductive calcium phosphate. *Biomaterials* *34*, 2167-2176.

Sottile, J. (2004). Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. *Biochimica et biophysica acta* *1654*, 13-22.

Spaggiari, G.M., Capobianco, A., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Mingari, M.C., and Moretta, L. (2008). Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 111, 1327-1333.

Spinetti, G., Cordella, D., Fortunato, O., Sangalli, E., Losa, S., Gotti, A., Carnelli, F., Rosa, F., Riboldi, S., Sessa, F., *et al.* (2013). Global remodeling of the vascular stem cell niche in bone marrow of diabetic patients: implication of the microRNA-155/FOXO3a signaling pathway. *Circulation research* 112, 510-522.

Spraul, C.W., Kaven, C., Amann, J., Lang, G.K., and Lang, G.E. (2000). Effect of insulin-like growth factors 1 and 2, and glucose on the migration and proliferation of bovine retinal pigment epithelial cells *in vitro*. *Ophthalmic research* 32, 244-248.

Stevens, M.J., Dananberg, J., Feldman, E.L., Lattimer, S.A., Kamijo, M., Thomas, T.P., Shindo, H., Sima, A.A., and Greene, D.A. (1994). The linked roles of nitric oxide, aldose reductase and, (Na⁺,K⁺)-ATPase in the slowing of nerve conduction in the streptozotocin diabetic rat. *The Journal of clinical investigation* 94, 853-859.

Stolzing, A., Sellers, D., Llewelyn, O., and Scutt, A. (2010). Diabetes induced changes in rat mesenchymal stem cells. *Cells, tissues, organs* 191, 453-465.

Stumvoll, M., Chintalapudi, U., Perriello, G., Welle, S., Gutierrez, O., and Gerich, J. (1995). Uptake and release of glucose by the human kidney. Postabsorptive rates and responses to epinephrine. *The Journal of clinical investigation* 96, 2528-2533.

Sukpat, S., Isarasena, N., Wongphoom, J., and Patumraj, S. (2013). Vasculoprotective effects of combined endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells in diabetic wound care: their potential role in decreasing wound-oxidative stress. *BioMed research international* 2013, 459196.

Sumpio, B.E., Riley, J.T., and Dardik, A. (2002). Cells in focus: endothelial cell. *The international journal of biochemistry & cell biology* 34, 1508-1512.

Tahergorabi, Z., and Khazaei, M. (2012). Imbalance of angiogenesis in diabetic complications: the mechanisms. *International journal of preventive medicine* 3, 827-838.

Takagi, H., Yoshimura, N., Tanihara, H., and Honda, Y. (1994). Insulin-like growth factor-related genes, receptors, and binding proteins in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 35, 916-923.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.

Takahashi, M., Li, T.S., Suzuki, R., Kobayashi, T., Ito, H., Ikeda, Y., Matsuzaki, M., and Hamano, K. (2006). Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 291, H886-893.

Tang, J.M., Wang, J.N., Zhang, L., Zheng, F., Yang, J.Y., Kong, X., Guo, L.Y., Chen, L., Huang, Y.Z., Wan, Y., *et al.* (2011). VEGF/SDF-1 promotes cardiac stem cell mobilization and myocardial repair in the infarcted heart. *Cardiovascular research* 91, 402-411.

Tang, Y.L., Zhao, Q., Qin, X., Shen, L., Cheng, L., Ge, J., and Phillips, M.I. (2005). Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. *The Annals of thoracic surgery* 80, 229-236; discussion 236-227.

Tateishi-Yuyama, E., Matsubara, H., Murohara, T., Ikeda, U., Shintani, S., Masaki, H., Amano, K., Kishimoto, Y., Yoshimoto, K., Akashi, H., *et al.* (2002). Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 360, 427-435.

Tatti, O., Vehvilainen, P., Lehti, K., and Keski-Oja, J. (2008). MT1-MMP releases latent TGF-beta1 from endothelial cell extracellular matrix via proteolytic processing of LTBP-1. *Experimental cell research* 314, 2501-2514.

Tesfamariam, B., Palacino, J.J., Weisbrod, R.M., and Cohen, R.A. (1993). Aldose reductase inhibition restores endothelial cell function in diabetic rabbit aorta. *Journal of cardiovascular pharmacology* 21, 205-211.

Tewari, S., Zhong, Q., Santos, J.M., and Kowluru, R.A. (2012). Mitochondria DNA replication and DNA methylation in the metabolic memory associated with continued progression of diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science* 53, 4881-4888.

Thomas, T.P., Feldman, E.L., Nakamura, J., Kato, K., Lien, M., Stevens, M.J., and Greene, D.A. (1993). Ambient glucose and aldose reductase-induced myo-inositol depletion modulate basal and carbachol-stimulated inositol phospholipid metabolism and diacylglycerol accumulation in human retinal pigment epithelial cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 9712-9716.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.

Todorovic V, R.D. (2012). LTBP, more than just an escort service. *Journal of cellular biochemistry*.

Tokuyama, Y., Sturis, J., DePaoli, A.M., Takeda, J., Stoffel, M., Tang, J., Sun, X., Polonsky, K.S., and Bell, G.I. (1995). Evolution of beta-cell dysfunction in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* 44, 1447-1457.

Tolar, J., Le Blanc, K., Keating, A., and Blazar, B.R. (2010). Concise review: hitting the right spot with mesenchymal stromal cells. *Stem cells* 28, 1446-1455.

Tomlinson, D.R., Willars, G.B., and Carrington, A.L. (1992). Aldose reductase inhibitors and diabetic complications. *Pharmacology & therapeutics* 54, 151-194.

Tremain, N., Korkko, J., Ibberson, D., Kopen, G.C., DiGirolamo, C., and Phinney, D.G. (2001). MicroSAGE analysis of 2,353 expressed genes in a single cell-derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNAs of multiple cell lineages. *Stem cells* 19, 408-418.

Tropel, P., Platet, N., Platel, J.C., Noel, D., Albrieux, M., Benabid, A.L., and Berger, F. (2006). Functional neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem cells* 24, 2868-2876.

Varkonyi, T., and Kempler, P. (2008). Diabetic neuropathy: new strategies for treatment. *Diabetes, obesity & metabolism* 10, 99-108.

Vora, J.P., Zimsen, S.M., Houghton, D.C., and Anderson, S. (1996). Evolution of metabolic and renal changes in the ZDF/Drt-fa rat model of type II diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 7, 113-117.

Wagner, J., Kean, T., Young, R., Dennis, J.E., and Caplan, A.I. (2009). Optimizing mesenchymal stem cell-based therapeutics. *Current opinion in biotechnology* 20, 531-536.

Wajid, N., Naseem, R., Anwar, S.S., Awan, S.J., Ali, M., Javed, S., and Ali, F. (2014). The effect of gestational diabetes on proliferation capacity and viability of human umbilical cord-derived stromal cells. *Cell and tissue banking*.

Wajid, N., Naseem, R., Anwar, S.S., Awan, S.J., Ali, M., Javed, S., and Ali, F. (2015). The effect of gestational diabetes on proliferation capacity and viability of human umbilical cord-derived stromal cells. *Cell and tissue banking* 16, 389-397.

Wang, S.P., Wang, Z.H., Peng, D.Y., Li, S.M., Wang, H., and Wang, X.H. (2012). Therapeutic effect of mesenchymal stem cells in rats with intracerebral hemorrhage: reduced apoptosis and enhanced neuroprotection. *Molecular medicine reports* 6, 848-854.

Wang, X., Wang, Y., Gou, W., Lu, Q., Peng, J., and Lu, S. (2013). Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review. *International orthopaedics* 37, 2491-2498.

Warram, J.H., Martin, B.C., Krolewski, A.S., Soeldner, J.S., and Kahn, C.R. (1990). Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. *Annals of internal medicine* 113, 909-915.

Waterman, R.S., Morgenweck, J., Nossaman, B.D., Scandurro, A.E., Scandurro, S.A., and Betancourt, A.M. (2012). Anti-inflammatory mesenchymal stem cells (MSC2) attenuate symptoms of painful diabetic peripheral neuropathy. *Stem cells translational medicine* 1, 557-565.

Watt, S.M., Gullo, F., van der Garde, M., Markeson, D., Camicia, R., Khoo, C.P., and Zwaginga, J.J. (2013). The angiogenic properties of mesenchymal stem/stromal cells and their therapeutic potential. *Br Med Bull* 108, 25-53.

Whone, A.L., Kemp, K., Sun, M., Wilkins, A., and Scolding, N.J. (2012). Human bone marrow mesenchymal stem cells protect catecholaminergic and serotonergic neuronal perikarya and transporter function from oxidative stress by the secretion of glial-derived neurotrophic factor. *Brain research* 1431, 86-96.

Williams, K.T., and Schalinske, K.L. (2012). Tissue-specific alterations of methyl group metabolism with DNA hypermethylation in the Zucker (type 2) diabetic fatty rat. *Diabetes/metabolism research and reviews* 28, 123-131.

Wu, Y., Chen, L., Scott, P.G., and Tredget, E.E. (2007). Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem cells* 25, 2648-2659.

Xiang, J., Tang, J., Song, C., Yang, Z., Hirst, D.G., Zheng, Q.J., and Li, G. (2009). Mesenchymal stem cells as a gene therapy carrier for treatment of fibrosarcoma. *Cytotherapy* 11, 516-526.

Yamagishi, S., Nakamura, K., Inoue, H., Kikuchi, S., and Takeuchi, M. (2005). Possible participation of advanced glycation end products in the pathogenesis of colorectal cancer in diabetic patients. *Medical hypotheses* 64, 1208-1210.

Yan, J., Tie, G., Wang, S., Messina, K.E., DiDato, S., Guo, S., and Messina, L.M. (2012). Type 2 diabetes restricts multipotency of mesenchymal stem cells and impairs their capacity to augment postischemic neovascularization in db/db mice. *Journal of the American Heart Association* 1, e002238.

Yan, J., Tie, G., Xu, T.Y., Cecchini, K., and Messina, L.M. (2013). Mesenchymal stem cells as a treatment for peripheral arterial disease: current status and potential impact of type II diabetes on their therapeutic efficacy. *Stem cell reviews* 9, 360-372.

Yau, J.W., Rogers, S.L., Kawasaki, R., Lamoureux, E.L., Kowalski, J.W., Bek, T., Chen, S.J., Dekker, J.M., Fletcher, A., Grauslund, J., *et al.* (2012). Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes care* 35, 556-564.

Yu, J., Li, M., Qu, Z., Yan, D., Li, D., and Ruan, Q. (2010). SDF-1/CXCR4-mediated migration of transplanted bone marrow stromal cells toward areas of heart myocardial infarction through activation of PI3K/Akt. *Journal of cardiovascular pharmacology* 55, 496-505.

Zanone, M.M., Favaro, E., Miceli, I., Grassi, G., Camussi, E., Caorsi, C., Amoroso, A., Giovarelli, M., Perin, P.C., and Camussi, G. (2010). Human mesenchymal stem cells modulate cellular immune response to islet antigen glutamic acid decarboxylase in type 1 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 95, 3788-3797.

Zdravkovic, N., Shahin, A., Arsenijevic, N., Lukic, M.L., and Mensah-Brown, E.P. (2009). Regulatory T cells and ST2 signaling control diabetes induction with multiple low doses of streptozotocin. *Molecular immunology* 47, 28-36.

Zhang, B., Liu, N., Shi, H., Wu, H., Gao, Y., He, H., Gu, B., and Liu, H. (2015). High glucose microenvironments inhibit the proliferation and migration of bone mesenchymal stem cells by activating GSK3beta. *Journal of bone and mineral metabolism*.

Zhao, Q.S., Xia, N., Zhao, N., Li, M., Bi, C.L., Zhu, Q., Qiao, G.F., and Cheng, Z.F. (2013). Localization of human mesenchymal stem cells from umbilical cord blood and their role in repair of diabetic foot ulcers in rats. *International journal of biological sciences* 10, 80-89.

Zheng, Z., Chen, H., Li, J., Li, T., Zheng, B., Zheng, Y., Jin, H., He, Y., Gu, Q., and Xu, X. (2012). Sirtuin 1-mediated cellular metabolic memory of high glucose via the LKB1/AMPK/ROS pathway and therapeutic effects of metformin. *Diabetes* 61, 217-228.

Zhong, Q., and Kowluru, R.A. (2010). Role of histone acetylation in the development of diabetic retinopathy and the metabolic memory phenomenon. *Journal of cellular biochemistry* 110, 1306-1313.

Zhong, Q., and Kowluru, R.A. (2011). Epigenetic changes in mitochondrial superoxide dismutase in the retina and the development of diabetic retinopathy. *Diabetes* 60, 1304-1313.

Zhong, Q., and Kowluru, R.A. (2013). Epigenetic modification of Sod2 in the development of diabetic retinopathy and in the metabolic memory: role of histone methylation. *Investigative ophthalmology & visual science* 54, 244-250.

Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., *et al.* (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell stem cell* 4, 381-384.

Zorina, T.D., Subbotin, V.M., Bertera, S., Alexander, A.M., Haluszczak, C., Gambrell, B., Bottino, R., Styche, A.J., and Trucco, M. (2003). Recovery of the endogenous beta cell function in the NOD model of autoimmune diabetes. *Stem cells* 21, 377-388.

Annexes

Poster:

Ribot J, Caliaperumal G, Petite H, Anagnostou F. Secretome from diabetic mesenchymal stem cells modifies endothelial cells functionality. journées du GDR GRIMIT 2014 Lyon

Ribot J, Caliaperumal G, Paquet J, Petite H, Anagnostou F. Secretome from diabetic mesenchymal stem cells modifies endothelial cells functionality. BIOMAT 2015 Ile de ré

Ribot J, Caliaperumal G, Paquet J, Petite H, Anagnostou F. Type 2 diabetes impairs the mesenchymal stromal cell secretome angiogenic properties. Journée Odontologie faculté Garencière 2015

Presentation:

Ribot J, Caliaperumal G, Petite H, Anagnostou F. Type 2 diabetes impairs the mesenchymal stem cell secretome composition and angiogenic properties. journée SFR IMOSAR 2015 Paris

Ribot J, Caliaperumal G, Paquet J, Petite H, Anagnostou F. Type 2 diabetes impairs the mesenchymal stromal cell secretome angiogenic properties. Journée Odontologie faculté Garencière 2015

Ribot J, Caliaperumal G, Paquet J, Petite H, Anagnostou F. Type 2 diabetes impairs the mesenchymal stromal cell secretome angiogenic properties. Journée B2OA 2015

Abstract

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a disease associated with impaired glucose metabolism and represents a major health problem. Main diabetes complications are vascular and affect heart, kidneys, nerves and eyes. Angiogenesis in patients with diabetes is paradoxical. Microangiopathy which occurs during diabetes involved in retinopathy and nephropathy impairs wound healing and modifies microenvironment of bone marrow. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (BMSCs) have the capacity to proliferate, differentiate into multilineage and home in on sites of injury. They have been highlighted as a potential tool for cell therapy but the impact of type 2 diabetes mellitus on their characteristics is not fully understood. This study investigated therefore the functionality and multipotency and angiogenic potential of BMSCs issued from a T2DM microenvironment using the Zucker Diabetic Fatty (ZDF) a well-documented T2DM rat model. Our results showed that BMSCs have modified functionalities with (i) impaired clonogenicity, proliferation and migration potential and apoptosis (ii) modified differentiation potential and (iii) modified composition of and angiogenic properties of their secretome. The study of diabetic MSCs potential and the diabetic microenvironment on MSCs could have major clinical implications. Results obtained may contribute to understand the physiopathology of vascular complications and to develop BMSCs-based cell therapy for diabetic tissue repair.

Le diabète de type 2 est une maladie associée à une perturbation du métabolisme glucidique et représente un problème de santé publique majeur. Les complications les plus courantes sont vasculaires et affectent le cœur, les reins, les nerfs et les yeux. Chez le diabétique, l'angiogenèse est défectueuse et paradoxale. La microangiopathie, qui survient lors du diabète, est impliquée dans la physiopathologie de la rétinopathie ou la néphropathie, retarde la cicatrisation et la réparation tissulaire et modifie le microenvironnement de la moelle osseuse. Les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse CSMs sont connues pour leur potentiel de prolifération, de différenciation et de libération de facteurs paracrins, impliqués dans la régénération tissulaire. Néanmoins, bien que biologie de CSMs dans un contexte sain est relativement bien connu, peu de données existent quant à leur fonctionnalité dans un contexte diabétique. L'objectif de cette étude était alors de caractériser l'impact du diabète sur la fonctionnalité et le potentiel angiogénique de CSMs à l'aide du modèle de rat dit Zucker Diabetic Fatty (ZDF) qui développe spontanément le diabète de type 2 et les complications vasculaires qui l'accompagnent. Les résultats ont montré que les CSMs issues d'un environnement diabétique ont une fonctionnalité modifiée avec (i) une diminution de la clonogénicité, de la prolifération du potentiel de migration et de la résistance à l'apoptose (ii) une modification de leur multipotentialité et (iii) une modification de la composition et du potentiel angiogénique de leur secrétome. Les résultats obtenus pourraient alors avoir des implications dans la compréhension de la physiopathologie des complications vasculaires et le développement de la thérapie cellulaire pour réparer les tissus diabétiques.