HAL
open science

Impact du diabète de type 2 sur la réparation osseuse et vasculaire des défauts osseux craniaux

Guavri Caliaperoumal

To cite this version:

Guavri Caliaperoumal. Impact du diabète de type 2 sur la réparation osseuse et vasculaire des défauts osseux craniaux. Médecine humaine et pathologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT : 2018USPCC166 . tel-02409918

HAL Id: tel-02409918

https://theses.hal.science/tel-02409918v1

Submitted on 13 Dec 2019

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

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

Université Sorbonne Paris Cité

THESE DE DOCTORAT

UNIVERSITÉ SORBONNE - PARIS CITE – Université Paris Diderot
ECOLE DOCTORALE n°561 HEMATOLOGIE ONCOGENESE ET BIOTHERAPIE (HOB)
Laboratoire B2OA CNRS 7052 / Equipe diabète

IMPACT DU DIABETE DE TYPE 2 SUR LA REPARATION OSSEUSE ET VASCULAIRE DES DEFAUTS OSSEUX CRANIAUX

Par **Guavri CALIAPEROUMAL**

Thèse de doctorat Os et Articulations

dirigée par **Fani ANAGNOSTOU**

Présentée et soutenue publiquement
au B2OA, Paris, le 25 juin 2018

Devant un jury composé de:

Pr. Assem SOUEIDAN *PU-Ph, Nantes*	Rapporteur, président du jury
Pr. Agnès HARTEMANN *PU-Ph, Paris 6*	Rapporteur
Pr. Valérie BOUSSON *PU-Ph, Paris 7*	Examinateur
Dr. Graciela PAVON-DJAVID *IR, Paris 13*	Examinateur
Pr. Fani ANAGNOSTOU *PU-Ph, Paris 7*	Directeur de thèse

Except where otherwise noted, this work is licensed under
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements au Dr.Hervé Petite pour m'avoir accueillie au laboratoire durant ces années de thèse et pour ses précieux conseils tout au long de ces travaux.

Je tiens également à remercier très chaleureusement ma directrice de thèse, Pr.Anagnostou Fani, pour sa disponibilité, son écoute, et la qualité de son encadrement.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux membres de mon jury de thèse. Je remercie très sincèrement le Pr.Hartemann et le Pr.Soueidan d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Merci également, au Pr.Valérie Bousson et au Dr.Graciela Pavon-Djavid examinatrice de mon manuscrit.

Je tiens également à remercier le Dr.Reena Bezios, pour son aide à la rédaction de l'article en anglais.

J'aimerais remercier l'ensemble de l'équipe du laboratoire B2OA pour leur accompagnement, leurs conseils et leur soutien. Merci à Ester, Morad, Marianne, Hananne, Delphine, Karim, Mathieu, Adeline, Carole, à ceux qui sont partis en cours de route, Gilles, Joseph, Pierre, Fatimata. Des remerciements tout particuliers à Adrien, Nathanaël et Maïté qui ont été de parfaits soutiens dans les moments de doute. Merci également d'avoir fait du laboratoire B2OA un lieu de travail si agréable.

RESUME

A l'heure où le diabète prend des proportions pandémiques, nous nous sommes intéressés dans le cadre de cette thèse à l'étude de l'impact du diabète de type 2 (TD2M) sur l'os. Il y a peu d'études documentant l'impact du T2DM sur les os maxillo-faciaux d'origine endomembranaire et leurs réparations.

Nos travaux sur le rat diabétique ZDF ont permis de mettre en évidence l'altération de la réparation osseuse dans les défauts de taille-critique et l'altération de la réparation vasculaire dans les défauts de tailles critique et sous-critique de la calvaria de rats T2DM. De même, la microarchitecture osseuse (corticale et trabéculaire) et la vascularisation se trouvent significativement altérées par le T2DM dans les fémurs de rats ZDF.
Au niveau cellulaire, le sécrétome des BMMSCs de rat ZDF présente un profil angiogénique différent de celui des rats ZL contrôles, ce qui peut apporter des éléments de réponses permettant la compréhension de la vascularisation paradoxale dans un contexte T2DM.

Ces résultats devraient permettre d'améliorer la compréhension de l'effet du T2DM sur la cicatrisation osseuse, afin d'améliorer les stratégies thérapeutiques.

SUMMARY

Now that diabetes reaches pandemic proportions, this thesis focuses on the effect of T2DM on bone. Very few studies document the effect of T2DM on maxillo-facial bone and their endomembraneous repair.

Our studies using ZDF rats - a T2DM animal model - showed an alteration of bone repair in critical size defects, and an impaired vascular repair in critical and subcritical T2DM defects. Bone microarchitechture and vasculature parameters were also impaired in ZDF femur. At a cellular level, T2DM BMSCs have an unique angiogenic profile.

These findings may contribute to the better understanding of the adverse vascular healing in T2DM and provide successful bone healing therapies for patients with T2DM.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS **3**
RESUME **5**
SUMMARY **6**
TABLE DES MATIERES **7**
LISTE DES FIGURES **10**
LEXIQUE DES ABREVIATIONS **11**
LEXIQUE DES NOTIONS **12**
INTRODUCTION GENERALE **13**
1. Régénération de l'os: état de l'art **15**
1.1. Généralités sur le tissu osseux 15
1.1.1. Classification des os 15
1.1.2. Structure du tissu osseux 16
1.1.2.1. Os cortical 16
1.1.2.2. Os spongieux 16
1.1.3. Les structures connexes de l'os 17
1.1.3.1. La moelle osseuse 17
1.1.3.2. Le périoste 17
1.1.3.3. L'endoste 18
1.1.3.4. Vascularisation générale et innervation du tissu osseux 18
1.1.4. Composition du tissu osseux 19
1.1.4.1. Structure cellulaire de l'os 19
1.1.4.1.1. Les cellules ostéoblastiques 20
1.1.4.1.2. Les ostéoclastes 20
1.1.4.2. Composition de la matrice extracellulaire du tissu osseux 21
1.1.4.2.1. Composante organique de la matrice extracellulaire osseuse 21
1.1.4.2.2. Composante inorganique de la matrice extracellulaire osseuse 22
1.1.4.2.3. Mécanisme de minéralisation de la matrice 22
1.1.5. Remodelage du tissu osseux 23
1.2. Cicatrisation de l'os 24
1.2.1. Les différentes phases de la réparation osseuse 26
1.2.1.1. La phase inflammatoire 26
1.2.1.2. La phase de reconstruction 27
1.2.1.3. La phase de remodelage 27
1.2.2. Cicatrisation et contrainte mécanique 28
1.3. Rôle de la vascularisation dans la cicatrisation osseuse 29
1.3.1. Anatomie et physiologie 29
1.3.1.1. Effet de l'oxygène sur les cellules osseuses 30
1.3.1.2. Niches vasculaires de l'os 31
1.3.2. Angiogénèse et ossification endomembranaire 31
1.3.2.1. Régulation de l'angiogénèse lors de l'ossification intramembraneuse 32
1.3.2.2. Origine vasculaire des cellules pré-OB dans la réparation intramembraneuse 32
1.3.2.3. Interaction entre les cellules endothéliales et OB 33
1.3.3. Rôle du lit vasculaire dans la régénération osseuse et la réparation 33
1.3.4. Modification de la vascularisation osseuse liée à l'âge et aux maladies systémiques 34
2. Impact du diabète sur l'os et la vascularisation: state of art **36**
2.1. Le diabète: généralités 36
2.1.1. Etymologie 36
2.1.2. Définition 36
2.1.3. Classification et tableau clinique 36
2.1.3.1. Diabète de type 1 (TD1M) 36

2.1.3.2. Diabète de type 2 (TD2M) 37
2.1.3.3. Les autres diabètes 37
2.1.4. Epidémiologie 37
2.1.5. Etiopathogénie 38
2.1.5.1. Diabète de type 1 38
2.1.5.2. Diabète de type 2 38
2.1.6. L'insulino-résistance 38
2.1.6.1. Impact du tissu osseux dans l'installation du T2DM: Insulino-résistance médiée par Ostéocalcine 39
2.1.7. Hyperglycémie et protéines glyquées 40
2.1.7.1. Synthèse et devenir des AGEs (Advanced glycation end-product ou PTG) 40
2.1.7.2. Mécanismes d'action AGE-RAGE 41
2.2. Complications macro- et microvasculaires chez le sujet diabétique 41
2.2.1. Impact des AGEs circulants sur les vaisseaux 41
2.2.1.1. Complications macrovasculaires 42
2.2.2. Complications microvasculaires 43
2.2.2.1. Rétinopathie 43
2.2.2.2. Néphropathie 44
2.2.2.3. Neuropathie 44
2.3. Impact du diabète sur l'os 45
2.3.1. Effet du diabète sur le métabolisme osseux 46
2.3.2. Impact du diabète sur la microarchitecture osseuse : études animales 47
2.3.3. Impact du diabète sur la cicatrisation osseuse : études cliniques 47
2.3.4. Effet du diabète induit sur l'ossification endochondral 48
2.3.4.1. Mécanismes moléculaires impliqués dans le déficit de cicatrisation osseuse diabétique. 48
2.3.5. Impact du diabète induit sur l'ossification intramembraneuse 50
2.3.6. Effet du contrôle glycémique à l'aide d'insuline, sur la physiopathologie de l'os diabétique 52
2.3.7. Conclusion 52

PROBLEMATIQUE DE LA THESE 54

3. <u>Modèle animal pour l'étude de la régénération osseuse maxillo-faciale diabétique</u> 56

3.1. Cicatrisation et réparation de l'os: cahier des charges des méthodes d'évaluation 56
3.2. Critères de choix d'une espèce animale 56
3.3. Modèle *in vivo* de réparation osseuse – modèle de défaut de calvaria 57
3.3.1. Le modèle de calvaria 57
3.3.1.1. Notion de défaut de taille critique 58
3.3.1.2. Modèles à défauts multiples 59
3.4. Méthodes d'évaluation 60
3.4.1. Histologie 60
3.4.2. Microscopie électronique 60
3.4.3. Les techniques d'imagerie radiologiques 60
3.4.3.1. La Microtomographie à rayon X (microCT) 61
3.4.3.2. Visualisation du système vasculaire par microCT 62
3.4.3.2.1. Le Microfil ® 63
3.5. Modèles d'animaux diabètiques 64
3.5.1. Choix de l'espèce animal 64
3.5.2. Choix du site 64
3.6. Animaux diabétiques 65
3.6.1. Choix du type de diabète 65
3.6.2. Modèles de rat T2DM 66
3.6.3. Rat ZDF 66
3.6.3.1. Caractéristique du Rat ZDF Leptr-/- 66
3.6.3.2. Lésions pancréatiques et insulinorésistance 66
3.6.3.3. Lésions oculaires et rénales 67
3.6.3.4. Neuropathies et troubles musculo squelettiques 67

RESULTATS I 68

RESULTATS II **84**

RESULTATS III **115**

4. Discussion **131**

4.1. Impact du T2DM sur les paramètres systémiques 131

4.2. Impact du T2DM sur les paramètres microstructuraux de l'os et de la vasculature . 131

4.3. Impact du T2DM sur la réparation osseuse 132

4.4. Impact du diabète sur la réparation vasculaire 133

4.5. Relation entre l'altération de la réparation vasculaire et osseuse 133

4.6. Altération des BMMSC de l'hôte diabétique 134

4.6.1. Altération du sécrétome des BMMSC ZDF 134

4.6.2. Altération de la différenciation ostéoblastique des BMMSC ZDF 135

4.6.3. Altération du nombre et de la prolifération des BMMSC ZDF 135

4.7. Limitations liées à la technique de l'étude de la microvascularisation dans l'os 136

5. Perspectives **137**

REFERENCES **139**

ANNEXES **155**

Liste des publications **155**

Actes de congrès **155**

Abstract **157**

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Os cortical, ... 16
Figure 2 Interconnexions entre la vascularisation corticale et médullaire 19
Figure 3 Origine des cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques 21
Figure 4 Cycle du remodelage osseux 24
Figure 5 : Processus de réparation osseuse dans le cadre de petites lésions 25
Figure 6 Les différentes phases de la cicatrisation osseuse 28
Figure 7 Formation osseuse et pression partielle en O_2 30
Figure 8 Répartition mondiale des patients diabétiques 38
Figure 9 Durée de la glycémie et formation des protéines glyquées, ... 40
Figure 10 Athérosclérose - Coupe d'une artère saine et d'une artère athérosclérosée 43
Figure 11 Mécanismes conduisants au remodelage de la moelle osseuse dans des conditions d'hyperglycémie prolongée, ... 50
Figure 12 Mécanismes probables conduisant à l'altération de l'os chez les diabétiques. 53
Figure 13 Modèles de défauts multiples sur calvaria de rat 59
Figure 14 Effet de la taille du voxel sur la définition de l'image 62
Figure 15 : Corrélation entre le volume de vaisseaux et la surface d'os formé dans les SCSD et les CSD. 134
Figure 16 Coloration von Kossa des tapis cellulaires après culture de BCSM ZDF et de BMSC ZL dans un milieu ostéoblastique pendant 25 jours. 135
Figure 17 Nombre de cellules mononucléées présentes dans la MO et leur prolifération. 136

Table 1 Espèces animales diabétiques disponibles 64
Table 2 Principaux sites étudié dans l'évaluation osseuse 64

LEXIQUE DES ABREVIATIONS

ALP	Phosphatase alcaline osseuse (bone alkaline phosphatase)
BMPs	Bone morphogenetic protein
BMMSC	Bone marrow stromal cells / cellules stromales médullaires
BMU	Basic multicellular unit
BRU	Basic remodeling unit
BSP	Sialoprotéine osseuse (bone sialoprotein)
BV	Bone volume
CFU	Colony forming unit
CSF-1	Colony stimulating factor 1
CSMs	Cellules souches mésenchymateuses
CT	Computed tomography / tomodensitométrie / scanner
FGF	Fibroblast growth factor
GFP	Green Fluorescent Protein
HA	Hydroxyapatite
IGF	Insulin-like growth factor (IGF1 = somatomedin C)
IL	Interleukine
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
MEC	Matrice extracellulaire
Micro-CT	Micro-computed tomography / micro-scanner
MMP	Métalloprotéase
MSCs	Mesenchymal stem cells / cellules souches mésenchymateuses
OPG	Ostéoprotégérine
Osx	Osterix
P	Phosphate
PDGF	Platelet-derived growth factor
PFTE	Polytetrafluoroethylene
PGA	Acide polyglycolique
PGLA	Acide poly-lactique-glycolique
PLA	Acide polylactique
PMMA	Poly-méthyl-métacrylate
PRP	Plasma enrichi en plaquette (platelet rich plasma)
PTH	Parathormone
PTHrP	Parathyroid hormone-related protein
RANK	receptor activator of nuclear factor kappa-B
SD	Standard deviation / erreur type
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SIBLINGs	Small integrin binding ligand N-linked glycoprotein
Str.Th	Structure thickness
Tb.Th	Trabecular thickness
TCP	Phospate tri-calcique (tri calcic phosphate)
TGFβ	Transforming growth factor béta
TRAP	Tartrate-resistant acid phosphatase
VEGF	Vascular endothelial growth factor
ZDF rat	Zucker Diabetic Fatty rat
ZL rat	Zucker Lean rat

LEXIQUE DES NOTIONS

Biocompatibilité: Propriétés des biomatériaux à ne pas générer de réaction inflammatoire liée à leur présence ou à leur dégradation.

Biomatériaux: Matériaux destinés à être mis en contact avec les tissus vivants et/ou les fluides biologiques pour évaluer, traiter, modifier les formes ou remplacer tout tissu, organe ou fonction du corps.

Calvaria : ensemble des os de la voûte crânienne, composé de l'os occipital, des os pariétaux, de l'os frontal et des os temporaux

Cicatrisation: Reconstruction d'un tissu lésé, présentant une constitution, une composition, une architecture et des propriétés s'approchant du tissu natif.

Ingénierie tissulaire: Approche thérapeutique visant à développer et constituer un substitut biologique pouvant restaurer, maintenir ou améliorer les fonctions des tissus déficients et permettant donc d'obtenir une régénération complète de l'organe ou du tissu lésé

Ingénierie tissulaire cellularisée: Approche thérapeutique d'ingénierie tissulaire basée sur l'utilisation de cellules et éventuellement d'autres effecteurs pour obtenir une régénération tissulaire

Ostéoconduction: Propriété passive d'un matériau à recevoir la repousse osseuse par invasion vasculaire et cellulaire, ce matériau servant alors de support à la formation osseuse

Ostéogénèse: Initiation et formation de la matrice osseuse par des cellules ostéoprogénitrices

Ostéogénèse par distraction : aussi nommé callotasis, distraction du cal osseux, ou encore ostéodistraction, est une technique chirurgicale consistant à régénérer de l'os en lui appliquant des forces progressives de traction des segments sectionnés.

Ostéoinduction: Action de médiateurs permettant le recrutement de cellules ostéoprogénitrices puis leur multiplication et leur différenciation afin de participer à la synthèse d'une matrice minéralisable et donc à la formation osseuse

Ostéoprogéniteur: Cellule capable de donner une cellule de la lignée osseuse (ostéoblaste, ostéocyte)

Régénération: Reconstruction *de novo* d'un tissu, présentant une constitution, une composition, une architecture et des propriétés identiques au tissu natif et sans persistance d'une matrice exogène.

Réparation: Reconstruction d'un tissu présentant une composition, une architecture et des propriétés s'approchant du tissu natif.

INTRODUCTION GENERALE

En odontologie, nous sommes confrontés au quotidien à la gestion de la cicatrisation osseuse. En effet, toutes les pathologies, quelle soit infectieuse tumorale ou traumatique, affectent l'os environnant (maxillaire et mandibulaire). De ce fait, la plupart de nos soins visent à réparer des formes variées de pertes de substances osseuses. De même, la réhabilitation prothétique consécutive à la perte des dents, est souvent tributaire de la qualité et de la quantité d'os présent sur les sites concernés. C'est donc tout naturellement, que nous nous sommes intéressés à la problématique de la cicatrisation osseuse dans la sphère orofaciale. Les travaux effectués au cours de cette thèse ont été réalisés au sein du Laboratoire Bioingénierie et Bioimagerie Ostéo-Articulaires (B2OA), Unité Mixte de Recherche 7052, CNRS, Université Paris-Diderot, dont l'objectif scientifique est de contribuer au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques utilisables pour la réparation et la régénération de tissus ostéo-articulaires.

L'os, sujet principal de l'étude, est un tissu conjonctif complexe capable d'assurer son renouvellement, son remaniement et sa réparation naturelle par des phénomènes de résorption et de formation. Cependant, dans certaines situations, suite à des traumatismes, à l'exérèse de tumeurs, ou encore à des pathologies chroniques; les capacités naturelles de régénération du tissu osseux sont dépassées par le volume d'os à combler.

A l'instar de nombreuses pathologies générales, le T2DM affecte la santé buccodentaire. Le patient diabétique a une susceptibilité plus importante à l'infection et manifeste un retard de cicatrisation osseux et muqueux. Dans le cadre de notre activité, nous constatons au quotidien, l'augmentation de l'incidence du diabète de type 2 (T2DM), ce dernier étant plus ou moins bien équilibré/traité. Il est donc nécessaire d'élaborer des thérapeutiques améliorant la cicatrisation ou permettant le comblement de perte osseuse maxillo-faciale chez le patient T2DM.

Ce travail de thèse s'intègre donc dans un projet global de l'équipe visant à (i) la compréhension et l'élucidation des mécanismes aboutissants à la fragilité et à l'altération de cicatrisation de l'os diabétique ; (ii) l'élaboration de thérapeutique spécifique soutenant la cicatrisation osseuse maxillo-faciale de l'os T2DM. Dans ce manuscrit, nous avons d'abord cherché à mettre en évidence et à décrire, les modifications structurelles de l'os et de sa vascularisation consécutives au T2DM. Pour ce faire, nous nous sommes intéressés à la microarchitecture osseuse et vasculaire de la calvaria de rats ZDF que nous avons mis en parallèle à ceux du fémur d'une part, et au niveau cellulaire au potentiel angiogène et ostéogène des cellules stromales de rats ZDF d'autre part. Puis, nous avons étudié les modifications des structures osseuses et vasculaires de l'os cicatriciel au niveau de la calvaria.

Les particularités de ce travail résident dans; (i) l'utilisation d'un modèle animal - le rat ZDF- mimant très fidèlement les complications cliniques du T2DM ; (ii) la

caractérisation d'un modèle de cicatrisation endomembranaire – le défaut de calvaria - mimant le contexte orofaciale diabétique ; (iii) l'étude de la réparation osseuse sous l'angle de la réparation vasculaire ; et (iv) l'obtention d'une imagerie à haute résolution de la microvascularisation osseuse avec un équipement classique de laboratoire.

En préambule de la présentation des résultats expérimentaux obtenus au cours de ce travail de thèse, une revue bibliographique décrivant l'os, ses capacités et ses limites de réparation, le rôle de sa vascularisation; le T2DM, ses complications et son impact sur l'os, sur les vaisseaux et leur réparations respectives; et la place des modèles animaux sera effectuée.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1. Régénération de l'os: état de l'art

1.1. Généralités sur le tissu osseux

L'os est un tissu associant des cellules à une matrice extracellulaire minéralisée. C'est un tissu conjonctif complexe hautement spécialisé, pouvant s'auto-renouveler. Il a un rôle de soutien et de nombreuses fonctions bien connues:

- fonction mécanique servant d'insertion aux tendons et ligaments,
- fonction de protection physique des organes vitaux au niveau du crâne, de la cage thoracique, du rachis, du bassin…
- participation à l'homéostasie phosphocalcique en servant de réservoir de calcium et de phosphore. En effet, le tissu osseux chez l'Homme contient environ 99% du calcium de l'organisme et près de 90% du phosphore [1],
- fonction hématopoïétique ; la moelle osseuse produisant les érythrocytes, les thrombocytes et leucocytes.

Récemment, il lui a été attribué :

- une fonction dans le métabolisme énergétique [2], [3].
- un rôle dans l'homéostasie et le métabolisme glucidique, en modulant le potentiel de la sécrétion d'insuline pancréatique [4].

1.1.1. Classification des os

Les os sont classés en 3 types suivant leur morphologie: les os courts, les os longs, les os plats. On y retrouve, l'os cortical (partie externe) enveloppé par le périoste et une cavité médullaire, tapissée par l'endoste. Cette cavité abrite l'os spongieux et la moelle osseux.

Les os courts (les vertèbres, les os du carpe ou du tarse) assurent une résistance à la compression et une transmission des forces; leurs mouvements sont très limités. La croissance des os courts se fait par une ossification endochondrale et endomembraneuse.

Les os longs ont une partie centrale, la diaphyse, et deux épiphyses à chaque extrémité ; on les trouve au niveau du squelette appendiculaire/des membres. La croissance des os longs se fait par une ossification endochondrale et endomembraneuse. Les diaphyses sont principalement constituées d'os cortical, alors que les épiphyses et les métaphyses sont principalement constituées d'os spongieux recouvert d'os cortical.

Les os plats ont une fine couche corticale entourant un os spongieux. On les retrouve au niveau de la voûte crânienne, de la scapula, de la mandibule, des os du bassin, et des côtes. Ils servent de barrière protectrice et d'insertions musculaires. La croissance des os plats se fait par une ossification endomembraneuse.

1.1.2. Structure du tissu osseux

On distingue trois types de tissu osseux chez l'Homme : le tissu osseux tissé, l'os en faisceaux et le tissu osseux lamellaire selon l'organisation des fibres de collagène (composante majoritaire de l'os) (Barone 2010).
Le **tissu osseux tissé** est caractéristique de l'os embryonnaire. Le remodelage le remplacera par du tissu lamellaire. Chez d'adulte l'os tissé est présent à certains stades de la cicatrisation de fracture.
L'**os en faisceaux** ("bundle bone") se développe au détriment des tendons, ligaments et périoste puis se maintient à leur contact. Il s'agit d'un arrangement régulier de gros paquets de fibres de collagène intercalées d'ostéocytes. On le trouve principalement au niveau de l'os alvéolaire.
Le **tissu osseux lamellaire** est le tissu osseux adulte présentant des fibres de collagène disposées de manière parallèle et formant des lamelles de 2 à 10µm d'épaisseur. Ceci confère à l'os ses caractéristiques mécaniques. L'os lamellaire renferme des ostéocytes. Au microscope, sous lumière polarisée, l'os lamellaire prend l'apparence d'une alternance de lamelles claires et sombres suivant la densité des fibres de collagène. L'architecture tridimensionnelle des lamelles du tissu osseux distingue l'os cortical de l'os spongieux.

1.1.2.1. Os cortical

L'os cortical est la partie externe des os. Il est délimité par le périoste à l'extérieur et l'endoste à l'intérieur. Chez l'Homme l'os cortical est constitué de la répétition du motif de base qu'est l'ostéon. Les ostéons sont cylindriques et sont juxtaposés parallèlement à la diaphyse, suivant l'axe des contraintes mécaniques maximales. Chaque ostéon, est constitué de lamelles de collagène concentriques délimitant un canal de Havers qui renferme le paquet vasculo-nerveux ; de canaux transverses de Volkmann reliant les ostéons entre eux et au périoste ; de canalicules qui sont un réseau de pores reliant des lacunes contenant des ostéocytes. Les ostéons sont associés entre eux par des lamelles non concentriques appelées lamelles interstitielles. Chaque lamelle est constituée d'un réseau de fibres de collagène (type I majoritairement) et cristaux d'hydroxyapatite (HA). La croissance et le remodelage des ostéons se font de manière centrifuge à partir du canal central.

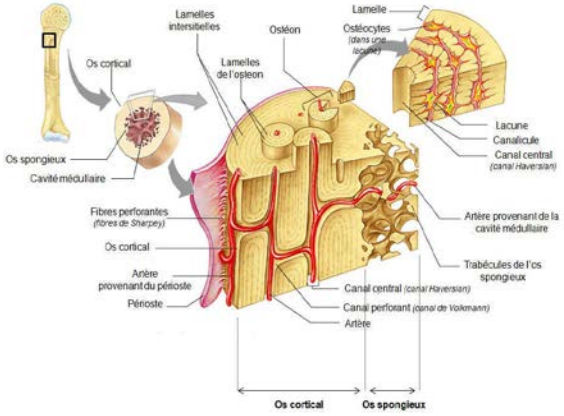


Figure 1 Os cortical, d'après Pearson Education Inc., publishing, Benjamin Cummings, 2006

1.1.2.2. Os spongieux

L'os spongieux, ou os trabéculaire, est caractérisé par la présence d'un compartiment conjonctif plus important que celui de l'os cortical. Il est présent au niveau des épiphyses et des métaphyses des os longs et à l'intérieur des os plats et

des os courts. Il est composé de plaques et de cylindres de lamelles osseuses, constituant des travées osseuses ou trabécules.
L'os spongieux, contrairement à l'os cortical, n'est pas formé d'ostéons et a une porosité beaucoup plus importante. Son unité de base est le trabécule. L'espace laissé libre par les trabécules est comblé par la moelle osseuse. L'orientation des trabécules est déterminée par les contraintes mécaniques s'exerçant sur l'os. L'organisation tridimensionnelle de l'os spongieux lui confère une surface d'échange très importante, permettant un renouvellement très rapide, et une participation active dans l'homéostasie phosphocalcique et le métabolisme osseux.

1.1.3. Les structures connexes de l'os

4 structures anatomiques ont un rôle important dans l'architecture et le métabolisme osseux : la moelle osseuse, le périoste, l'endoste et le cartilage (Barone et al 2010).

1.1.3.1. La moelle osseuse

Délimitée par l'endoste, la moelle osseuse représente près de 3% de la masse corporelle chez le rat adulte, et 5% chez l'Homme [5]. C'est un tissu conjonctif riche en vaisseaux et en cellules, avec une matrice extracellulaire contenant du collagène de type I et III, des glycoprotéines et des glycosaminoglycans [6], localisé dans la cavité médullaire des os. La moelle osseuse est constitué de:

- **CSM**s, à l'origine des ostéoblastes et des cellules stromales médullaires, jouant un rôle prépondérant dans les phénomènes d'ossification, de cicatrisation et de réparation du tissu osseux [5].
- **cellules souches hématopoïétiques**, à l'origine des lignées leucocytaires, érythrocytaires et thrombocytaires [7].

Avec l'âge, la moelle osseuse des os longs subit une involution adipogénique (moelle osseuse jaune en histologie) ; les adipocytes issus des cellules stromales forment alors un tissu adipeux représentant 25 à 75% du volume de la cavité médullaire (Sharkey, Hill, 2010). Au cours du vieillissement, une dégénérescence de la moelle peut apparaître dans les os de la face et dans les os longs.

1.1.3.2. Le périoste

Le périoste est une membrane qui recouvre toute la partie « externe » de l'os non recouvert de cartilage. Le périoste joue un rôle dans la croissance circonférentielle des os et contribue dans une moindre mesure à sa croissance verticale. On y distingue deux couches ; une couche superficielle fibreuse contenant des cellules allongées de type fibroblastique et associée à de nombreuses fibres élastiques et une couche profonde (cambium) contenant de nombreuses cellules, dont des progéniteurs osseux [8]. Des fibres perforantes relient les deux couches du périoste et l'os cortical. L'ensemble du périoste est richement vascularisé et innervé et émet de nombreux vaisseaux perforants irrigant l'os cortical [8].

Chez l'adulte, le périoste est considéré comme quiescent à l'état physiologique, la couche fibreuse se confond avec la couche profonde. On y trouve quelques cellules allongées ressemblant à des fibroblastes susceptibles de se différencier. Le périoste a donc un rôle majeur dans la cicatrisation osseuse. Dans des modèles de fractures chez le rat ou le lapin [9], l'ablation du périoste entraîne un retard ou

même une absence de cicatrisation osseuse. Des études portant sur la réparation de fracture dans des modèles murins, et des modèles cliniques ont mis en évidence, dans le périoste, la présence de cellules ostéoprogénitrices intervenant dans l'ossification endochondrale des os long [10] dans l'ossification intramembraneuse des os cranio-faciaux [11]. Il semblerait que la dure mère ait un rôle plus important que le périoste dans la cicatrisation de la calvaria[1] [12]. Néanmoins, il est aussi décrit que l'action combinée du périoste et de la dura est nécessaire à la cicatrisation ad integrum de la calvaria [13].

1.1.3.3. L'endoste

L'endoste est une fine membrane recouvrant la partie interne de la corticale, au contact de la cavité médullaire. L'endoste est riche en cellules ostéoprogénitrices, en ostéoclastes et en cellules quiescentes intervenant tant dans la formation, le remodelage osseux et la réparation osseuse que dans l'hématopoïèse par les communications existantes entre les ostéoblastes et les cellules souches hématopoïétiques [14]. Des études portant sur la réparation de fractures dans des modèles d'os longs murins semblent mettre en évidence une source importante d'ostéoblastes intervenant dans la cicatrisation osseuse, notamment la cicatrisation osseuse par première intention [10]. Dans les modèles de calvaria, il semblerait que la dure mère ait un rôle plus important que celui de l'endoste à jouer dans la réparation [12].

1.1.3.4. Vascularisation générale et innervation du tissu osseux

Le tissu osseux est vascularisé par un réseau artério-veineux anastomotique, intervenant dans les échanges nutritifs, la formation et le remodelage des tissus corticaux, spongieux et médullaires. Les vaisseaux permettent également à l'os d'assurer son rôle hématologique et métabolique et ils ont une grande importance pour la cicatrisation osseuse (Baron et al, 2010 , [15]). En effet, une communication modulant la prolifération et la différenciation cellulaire existe entre les cellules ostéoblastiques/leurs précurseurs et les cellules endothéliales vasculaires par le biais notamment de jonctions intercellulaires ou de facteurs tels que le VEGF et la BMP-2 [15]-[17]. Cet aspect sera traité plus en détail dans le paragraphe 1.3.

La **microcirculation artérielle** de l'os cortical, est assurée par un réseau de vaisseaux et de capillaires provenant du périoste, de la corticale et de la medulla, circulant dans les canaux de Havers et de Volkmann.

La **microcirculation veineuse** de l'os est satellite de la microcirculation artérielle. La microcirculation artérielle de la cavité médullaire est assurée par un réseau vasculaire sinusoïde diffus, issu de l'anastomose des différentes efférences artérielles et afférences veineuses et est interconnecté avec la microcirculation de l'os cortical.

Le réseau veineux est constitué principalement par un (dans les os longs) ou plusieurs (dans les os plats) sinus veineux drainant les veines de la microcirculation artérielle et se jetant dans des veines perforantes la corticale. De nombreuses veines partent également du périoste, rejoindre les veines musculaires.

Le **drainage lymphatique** de l'os est assuré par des vaisseaux lymphatiques périostés.

[1] **Calvaria**: ensemble des os de la voûte crânienne, composé de l'os occipital, des os pariétaux, de l'os frontal et des os temporaux.

L'innervation de l'os est essentiellement sensitive et vasomotrice. Les nerfs sont satellites des artères et plus abondants en région sous-périostée et dans le tissu spongieux que dans l'épaisseur de l'os cortical ou dans la cavité médullaire (Barone et al, 2010).

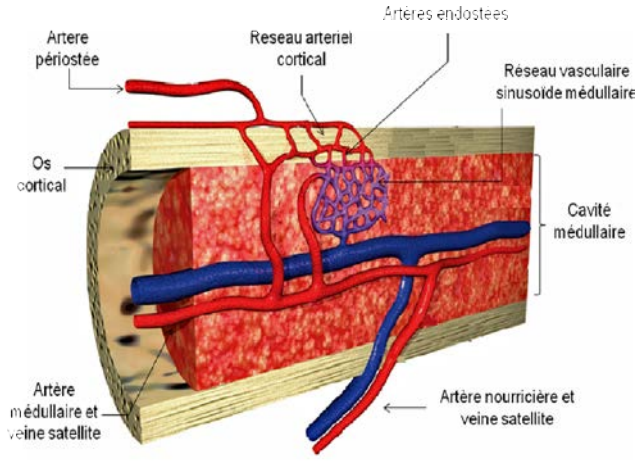


Figure 2 Interconnexions entre la vascularisation corticale et médullaire d'un os d'après Travlos G.S. 2006 [18]

1.1.4. Composition du tissu osseux

1.1.4.1. Structure cellulaire de l'os

La moelle osseuse, située dans la cavité médullaire de l'os, est la niche de deux lignées principales de cellules souches, mésenchymateuse et hématopoïétique, qui sont à l'origine de la plupart des cellules constituant la matrice cellulaire de l'os.

Les cellules stromales médullaires (CSMs), issues des cellules souches mésenchymateuses sont des précurseurs cellulaires à l'origine des chondrocytes, des adipocytes, des fibroblastes et des cellules ostéoblastiques intervenant dans la formation osseuse.
Les pericytes sont des cellules situées à la surface des vaisseaux et présentant des caractéristiques de cellules souches les rapprochant des cellules stromales médullaires. Bien que l'ontogénèse de ces cellules et notamment leurs liens avec les cellules stromales médullaires reste sujet à controverse, il semblerait que les pericytes participent à la formation osseuse tant de manière direct en se différenciant en ostéoblastes, que de manière indirecte par leur action paracrine [19].
Les **cellules souches hématopoïétiques** sont des précurseurs cellulaires à l'origine de cellules sanguines (érythrocytaire et mégacaryocyte) et immunitaires (polynucléaires, macrophages, monocytes). Les cellules ostéoclastiques, intervenant dans les phénomènes de résorption osseuse sont issues de la différenciation des monocytes.
Les cellules spécifiques du tissu osseux sont ainsi de deux grands types, d'une part les cellules ostéoblastiques regroupant les ostéoblastes, les ostéocytes et les cellules bordantes, et d'autre part les ostéoclastes.

1.1.4.1.1. Les cellules ostéoblastiques

Les cellules ostéoblastiques, issues des CMSs, regroupent les ostéoblastes, les ostéocytes et les cellules bordantes.

- Les **ostéoblastes** sont des cellules différenciées et spécialisées, issues de CSMs. Les facteurs de transcription Runx2 et Osterix (Osx) sont deux facteurs majeurs impliqués dans la différenciation ostéoblastique. Les ostéoblastes synthétisent et sécrètent les constituants de la matrice osseuse non minéralisée, composée principalement de protéoglycanes, de glycoprotéines et de collagène.
Les ostéoblastes sont également à l'origine de la production de la phosphatase alcaline osseuse (ALP) qui revêt une action prépondérante dans l'initiation de la minéralisation de la matrice.
Les ostéoblastes ont un rôle majeur dans la formation et la régénération du tissu osseux. Leur rôle est complexe, car en plus d'être responsables de la formation de l'ostéoïde, ils sont également impliqués dans le processus de résorption osseuse par la sécrétion de facteurs tel que RANK-Ligand dont l'action sera d'activer les ostéoclastes. Au cours de la formation de la matrice osseuse, les ostéoblastes peuvent devenir des ostéocytes, des cellules bordantes ou rentrer en apoptose. La proportion d'ostéoblastes se transformant en ostéocytes est variable selon les espèces et les os, mais il est considéré que cette proportion est inférieure à 20% chez l'Homme adulte [20].
- **Les cellules bordantes** sont des ostéoblastes rentrés en phase de quiescence. De forme aplatie, ces cellules sont principalement localisées dans des zones osseuses n'étant pas en remodelage. Ces cellules interviennent dans l'initiation de la résorption osseuse. Sous l'effet de signaux locaux ou systémiques, elles peuvent se détacher laissant une zone propice à l'adhésion ostéoclastique. Elles peuvent également sortir de leur quiescence et redevenir des ostéoblastes actifs.

Les **ostéocytes** sont des cellules provenant de la différenciation des ostéoblastes et sont incorporées à la matrice osseuse minéralisée. Les ostéocytes sont localisés dans les lacunes de la matrice osseuse. Ils représentent plus de 90% des cellules de matrice osseuse. Ils présentent des prolongements cytoplasmiques cheminant dans les canicules de la matrice osseuse qui permettent la communication inter-ostéocytaires par l'intermédiaire de "gap jonction". Les ostéocytes ont une activité métabolique très intense et sont impliqués dans la réponse aux contraintes mécaniques et dans le contrôle du remodelage osseux. Les ostéocytes sécrètent notamment de la sclérostine, antagoniste des voies Wnt dont le rôle est de réguler négativement l'activité des ostéoblastes et des protéines de la famille des SIBLINGs.

1.1.4.1.2. Les ostéoclastes

Les ostéoclastes dérivent de monocytes, cellules issues de cellules souches hématopoïétiques. La différenciation des ostéoclastes est stimulée par le facteur M-CSF. Elle est en grande partie gouvernée par des interactions avec les cellules ostéoblastiques, par l'intermédiaire du couple récepteur/ligand RANK/RANK-L, qui stimule la différenciation ostéoclastique et de l'ostéoprotégérine (OPG) qui inhibe la différenciation ostéoclastique. Cet axe est essentiel aussi pour la régulation de la l'activation des ostéoclastes. Les ostéoclastes activés sont des cellules géantes (70 à

100 µm), multi-nuclées et présentent une polarité nucléaire, les noyaux étant à l'opposé de la matrice osseuse. Le cytoplasme est entouré d'une membrane plasmique qui présente des replis membranaires ("bordure en brosse") en contact avec la matrice osseuse.
Les ostéoclastes sont impliqués dans la résorption osseuse, ils sécrètent d'une part des ions hydrogène qui participent à la dissolution de la matrice minérale osseuse et d'autre part des enzymes lysosomiales telles que des collagénases, de la cathepsine K, des métalloprotéases (MMP) et des phosphatases-acides qui dégradent la matrice organique. La dégradation de la matrice au contact de la bordure en brosse des ostéoclastes génère des espaces, nommés lacunes d'Howship.

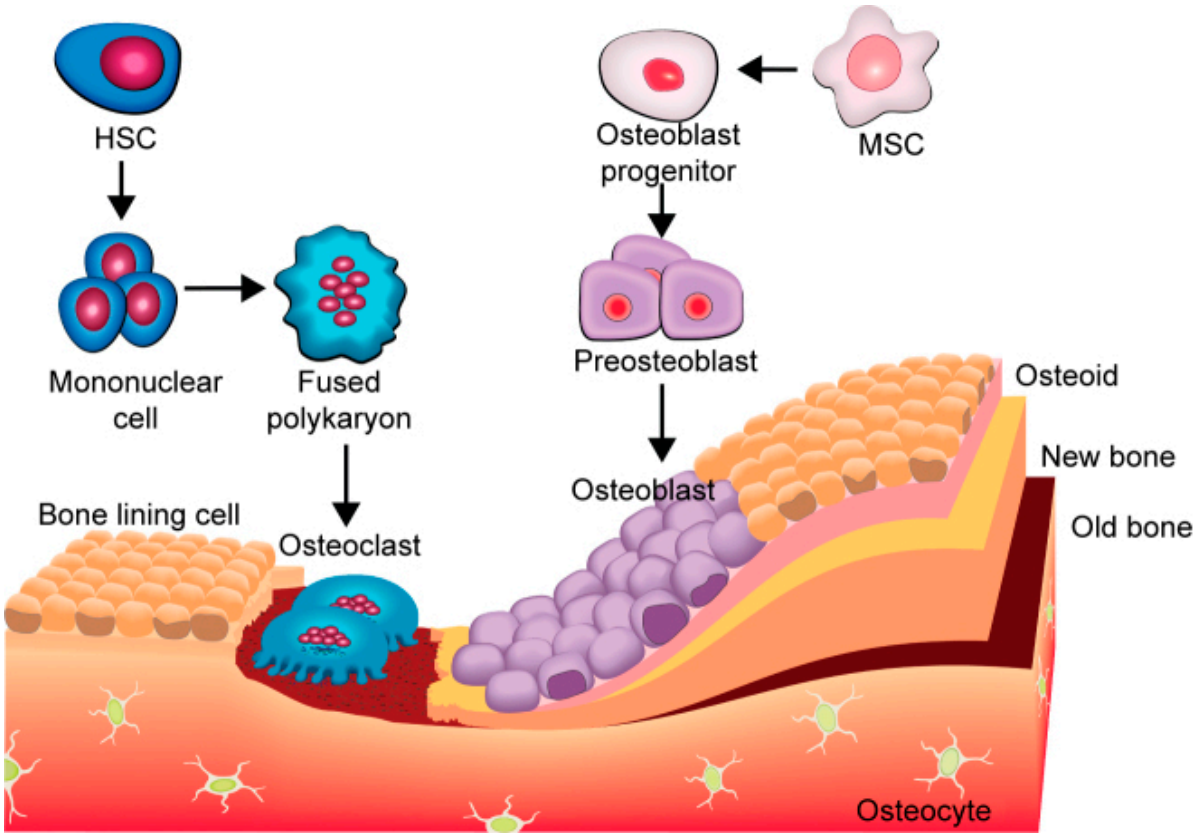


Figure 3 Origine des cellules ostéoblastiques et ostéoclastiques d'après Rahman et al. 2015 [21]

1.1.4.2. Composition de la matrice extracellulaire du tissu osseux

La matrice extracellulaire (MEC) du tissu osseux est composée d'une phase organique et d'une phase inorganique.

1.1.4.2.1. Composante organique de la matrice extracellulaire osseuse

La phase organique de la MEC représente environ 30% du tissu osseux sec et est composée de collagène, de protéoglycanes, de glycoprotéines non collagéniques.
Le **collagène de type I** est la protéine la plus abondante du tissu osseux et représente près de 90% de la composante organique de la MEC. Le collagène sert de support à l'adhérence cellulaire. Il offre l'architecture nécessaire à la

minéralisation osseuse et lui confère ses propriétés mécaniques. Les fibres de collagène s'organisent ensuite sous diverses formes permettant ainsi de distinguer le tissu osseux lamellaire (ou fibrolamellaire), le tissu osseux tissé et le tissu osseux en faisceaux (Barone et al. 2010).
Les autres composants de la fraction organique de la MEC sont les collagènes de type III, V et X présents à l'état de traces et les protéines dites non collagéniques. Ces dernières constituent environ 10% du contenu protéique osseux et ont un rôle important tant dans les mécanismes de minéralisation de la matrice que dans les phénomènes de remodelage osseux. On distingue parmi ces protéines non collagéniques:
- Les Gla protéines – protéines carboxylées au niveau de résidus d'acide glutamique de façon vitamine K-dépendant (ostéocalcine, gla-protéine matricielle, protéine S).
- L'ostéocalcine est la protéine non collagénique la plus abondante dans le tissu osseux.
- Les glycoprotéines SIBLINGs (Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoprotein) telles que l'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse (BSP), la DMP-1 (protéine de la dentine matricielle 1), la sialophosphoprotéine de la dentine et la MEPE (Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein).
- Les glycoprotéines non SIBLINGs telles que les phosphatase alcaline et l'ostéonectine.
- Les protéoglycanes dont les glycososaminoglycanes (chondroïtine sulfate et héparane sulfate) ainsi que la décorine et le biglycan.
- Les protéines d'adhésion (thrombospondine et fibronectine).
- Les facteurs de croissance (BMPs, TGFβ, VEGF, bFGF, IGF…).
- Les métalloprotéases (MMPs).

1.1.4.2.2. Composante inorganique de la matrice extracellulaire osseuse

La matrice inorganique de la MEC représente 70% du tissu osseux sec. Elle est formée essentiellement de cristaux d'hydroxyapatite ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) liés à la matrice collagénique. Elle contient également des traces de carbonate de calcium ($CaCO_3$) ainsi qu'en quantité plus faible par ordre décroissant de concentration: triooxyde de carbone, sodium, magnésium, fluor, potassium, chlore, zinc, cuivre, strontium qui se lient au cristaux d'hydroxyapatite [22]. Ces différents minéraux sont associés aux fibres de collagène et concourent à donner l'aspect lamellaire de l'os. La matrice inorganique confère à l'os sa dureté, sa résistance et sa solidité mais contribue aussi à l'homéostasie phosphocalcique. Compte tenu de la composition chimique de la matrice inorganique de la MEC, l'os se trouve être un réservoir en calcium et en phosphate, permettant d'assurer une mobilisation phosphocalcique rapide suite à l'activation des ostéoclastes par les hormones telle que la parathormone (PTH).

1.1.4.2.3. Mécanisme de minéralisation de la matrice

L'ossification est le processus aboutissant à la formation osseuse. La minéralisation, est une partie de ce processus par lequel la matrice organique se charge en éléments inorganiques et acquiert ses propriétés mécaniques. La minéralisation correspond d'un point de vue microstructurale au dépôt progressif de cristaux de HA dans la matrice collagénique, au niveau des espaces entre les fibres de collagène.

Le processus exact de minéralisation reste pour l'instant soumis à controverse. De nombreux mécanismes potentiels ont été décrits. Un des mécanismes fréquemment décrits dans la littérature est celui faisant intervenir des vésicules matricielles.
Les vésicules matricielles correspondent à l'exocytose de diverticules cytoplasmiques des chondroblastes hypertrophiques et des ostéoblastes. Ces vésicules, de 100 nm de diamètre, sont adhérentes au collagène matriciel de type I dans l'os ou de type II et IX dans le cartilage et elles contiennent des enzymes (ALP, anhydrase carbonique, pryrophosphatase), des protéines membranaires (annexine V, transporteurs ioniques). Elles sont de plus associées à des protéines de la matrice extracellulaire (ostéopontine, sialoprotéine osseuse, ostéonectine, ostéocalcine).
Les vésicules matricielles permettent le passage intracellulaire d'ions calcium et phosphate et leur précipitation sous forme de phosphate de calcium par un phénomène de nucléation et d'inhibition des inhibiteurs de la minéralisation (ATP, pyrophosphate, protéoglycanes à haute concentration).
Le collagène et certaines protéines non collagéniques (notamment, l'ostéocalcine, l'ostéonectine, la BSP, et la DMP-1) semblent avoir un rôle prépondérant dans l'initiation de la nucléation en milieu sous saturé. Puis le cristal grossit (croissance cristalline), sort de la vésicule pour se retrouver au niveau de la matrice extracellulaire.

Les protéoglycanes et notamment les biglycans, semblent quant à eux avoir un rôle important dans l'organisation de la matrice inorganique ainsi que dans la croissance cristalline. De plus, de nombreuses enzymes, régulant les processus de phosphorylation et de déphosphorylation des phosphoprotéines interviennent dans le processus de minéralisation. Parmi celles-ci, l'ALP, produit par les ostéoblastes (sécrétée et exprimée sur la surface cellulaire), hydrolyse les esters du phosphate et d'une part permet une augmentation locale de la concentration en phosphate propice à la minéralisation, et d'autre part diminue la concentration extracellulaire en pyrophosphate, un inhibiteur de la minéralisation.

1.1.5. Remodelage du tissu osseux

L'os est un tissu en constant renouvellement grâce à un « délicat » équilibre entre la formation osseuse, assurée par les ostéoblastes et la résorption osseuse, assurée par les ostéoclastes. Ce processus dynamique est connu sous le nom de remodelage osseux ou remodelage Haversien. Il permet à l'organisme d'assurer l'homéostasie osseuse sous le contrôle de facteurs biochimiques, hormonaux et mécaniques. Le remodelage osseux assure les réparations de "micro-fractures", ainsi que les échanges phosphocalciques avec le reste de l'organisme. Chez l'Homme près de 25% de l'os trabéculaire et 2% de l'os cortical, sont renouvelés par an [23].
Le remodelage de l'os est caractérisé par un couplage entre résorption et formation osseuse et se structure par une succession de phases correspondant à une phase d'initiation (ou d'activation), une phase de résorption, une phase intermédiaire, une phase de formation osseuse, puis une phase de quiescence précédant l'établissement d'un nouveau cycle de remodelage osseux.
Cette succession de phases, se produisant de manière simultanée à différents endroits du squelette, fait appel à des acteurs cellulaires, et notamment les ostéoblastes et les ostéoclastes. Ces acteurs, au niveau de l'os cortical, sont organisés en unités de remodelage fonctionnelle centrées sur le canal vasculaire central de l'ostéon, et dénommés par l'acronyme BMU (Basic Multicellular Unit). L'organisation spatiale de ces acteurs au sein d'une unité de remodelage est appelée par l'acronyme BRU (Bone Remodeling Unit) [24].

Au niveau de l'os spongieux et des surfaces endostées, les mêmes processus sont mis en jeu, mais sont associés à un plexus veineux, et dénommés par les acronymes BRC (Bone Remodeling Compartment) ou BSU (Basic Structural Unit) [24].

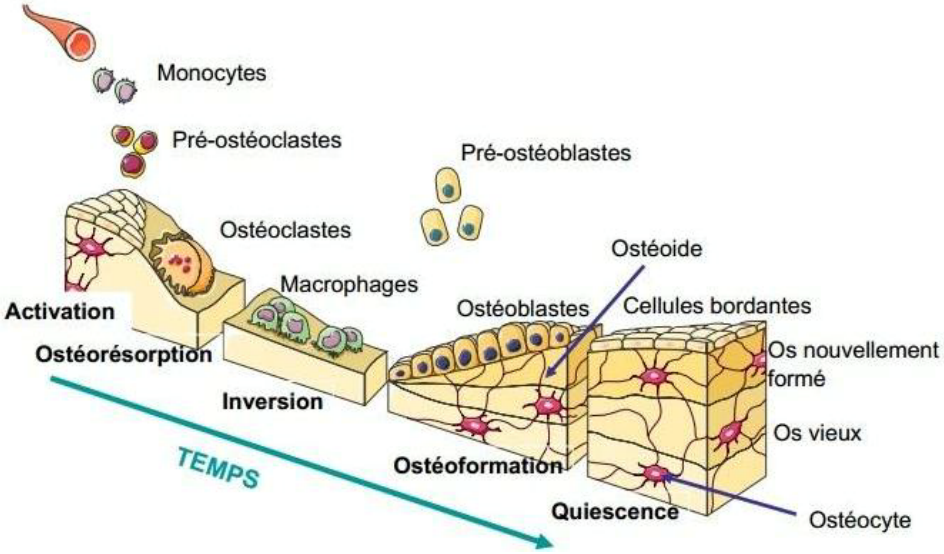


Figure 4 Cycle du remodelage osseux *(Source : **http://www.pearltrees.com**)*

1.2. Cicatrisation de l'os

La réparation d'un os est un phénomène complexe faisant intervenir les processus impliqués dans le remodelage osseux, mais également ceux présents dans l'ontogenèse de l'os [25]. Le squelette est constitué de différents types d'os impliquant tous la différenciation de cellules mésenchymateuses. En fonction de la voie de différenciation des cellules mésenchymateuses, l'os peut se former selon deux types de processus d'ossification. L'ossification endomembraneuse au cours de laquelle les cellules mésenchymateuses se différencient initialement en ostéoblastes; et l'ossification endochondrale au cours de laquelle les cellules mésenchymateuses se différencient initialement en chondroblastes [24].

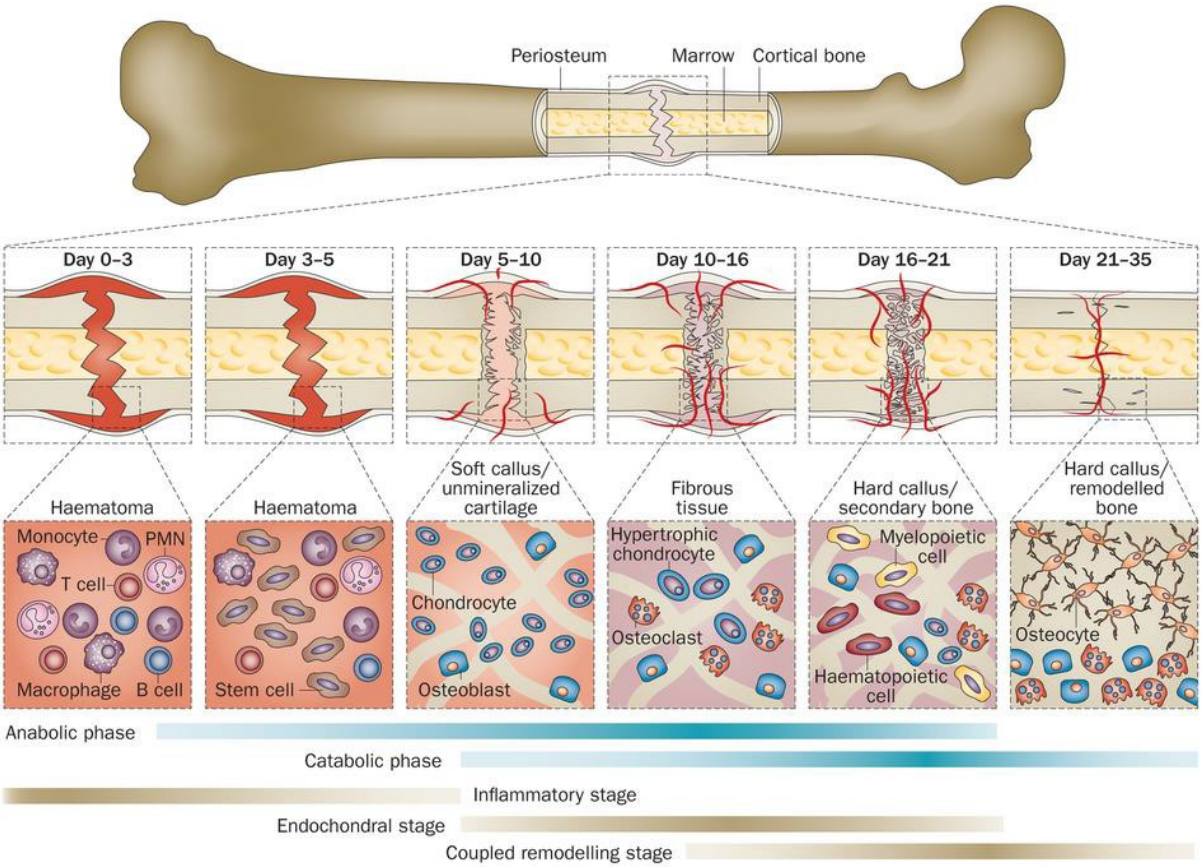


Figure 5 : Processus de réparation osseuse dans le cadre de petites lésions (adapté de Thomas A. Einhorn et Louis C. Gerstenfeld2014) [25]

L'ossification endochondrale correspond à une formation osseuse par le remplacement progressif d'une matrice cartilagineuse dans une région initialement peu ou pas vascularisée, par une matrice osseuse. Initialement, des cellules souches mésenchymateuses se condensent pour former une matrice délimitant le contour de l'os, puis se différencient en chondrocytes. De manière simultanée, d'autres cellules se condensent en périphérie de cette matrice et forment le périoste (ou périchondrium durant l'ontogenèse osseuse), qui est à l'origine de la formation d'un « collier » osseux entourant la matrice cartilagineuse.
Dans la partie centrale cartilagineuse, les chondrocytes subissent une hypertrophie, puis une calcification et finalement entrent en apoptose laissant un réseau vasculaire provenant de la périphérie envahir les lacunes apoptotiques et la matrice cartilagineuse dégradée. Cette invasion vasculaire est associée à un afflux d'ostéoblastes issus du périoste permettant la mise en place d'un os spongieux et donc de l'ossification progressive de l'os.
Cette ossification est à l'origine de la formation et la croissance en longueur des os longs notamment de leur partie spongieuse (en effet, la formation de la partie corticale diaphysaire et donc la croissance de l'os en diamètre est assurée par condensation de l'os issu de l'ossification endochondrale mais aussi en partie par le périoste).

L'ossification endomembraneuse correspond à une ossification directe liée à la différenciation de cellules souches mésenchymateuses condensées en ostéoblastes.

eux-mêmes à l'origine de la production de la matrice extracellulaire et de sa minéralisation. La condensation des cellules souches et leur différenciation sont à l'origine de la formation de la partie spongieuse puis de la partie corticale de l'os et est associé à une invasion vasculaire progressive.

L'os initialement formé est un os tissé, car les fibres de la matrice extracellulaire ne sont pas agencées de manière régulière, mais est secondairement remodelé pour former un os lamellaire mature dans lequel les fibres de la matrice sont organisées linéairement. Cette ossification est essentiellement à l'origine de la formation des os plats et notamment ceux de la voûte crânienne et de la face. L'ossification endomembraneuse est également rencontrée dans la formation des os longs, où elle participe d'une part à la mise en place de la corticale par le périoste et son précurseur, le périchondrium, et d'autre part en intervenant dans la croissance circonférentielle de l'os.

1.2.1. Les différentes phases de la réparation osseuse

Ce procédé consiste en une interaction coordonnée de cellules, de facteurs de croissance et de matrice extracellulaire, que l'on peut diviser schématiquement en 3 phases englobant la réponse inflammatoire locale juste après la blessure, la mobilisation des cellules mésenchymateuses et hématopoïétiques vers le site lésé, la formation d'un nouveau réseau vasculaire, la formation du cartilage et/ou de l'os, puis la formation d'os mature. Les tissus connexes, autour de la lésion (l'os cortical, le périoste, la moelle osseuse, les tissus mous environnants) participent à des degrés divers, au processus de cicatrisation en fonction des stimuli présents (facteurs de croissance, nutriments hormones, pH, pO_2, et la stabilité mécanique). Immédiatement après le trauma, les lésions vasculaires du site créent un caillot ou hématome. Ce caillot, contient des plaquettes, des leucocytes, des macrophages, de la fibrine, des facteurs de croissances solubles des cytokines. Il offre une matrice sur laquelle peuvent migrer les cellules inflammatoires, endothéliales et les fibroblastes [26].

1.2.1.1. La phase inflammatoire

La première phase du processus de réparation est la phase inflammatoire, qui débute dans les 12 à 14 heures suivant le trauma, connait son apogée à 24h et se termine environ au 7ème jour. Cette phase se caractérise par une inflammation aigue en hypoxie. Les premières cellules arrivant sur le site sont les neutrophiles, suivis des macrophages et des lymphocytes. Les macrophages phagocytent les tissus nécrotiques et relarguent des facteurs de croissance et des cytokines qui vont initier le processus de réparation de la lésion osseuse. Parmi les facteurs secrétés par les plaquettes, les macrophages et les cellules osseuses, on retrouve des TGF-β, des VEGF, des PDGF, des IL-1 et IL-6, TNF-α, des BMPs, FGF, IGF. Ces derniers provoquent la migration de cellules pluripotentes, depuis probablement le périoste, la moelle osseuse, les vaisseaux sanguins, et des tissus mous environnants, et induisent leurs différenciations en fibroblastes, chondroblastes ou ostéoblastes.

1.2.1.2. La phase de reconstruction

Suit la phase de reconstruction qui est caractérisée par la formation de vaisseaux sanguins et une réorganisation du thrombus en tissu de granulation. En fonction du type d'os, du type de lésion, de la morphologie et de la structure des tissus, des méthodes de stabilisation, la réparation osseuse peut être soit primaire, où les OB secrètent une matrice ostéoïde qui sera directement minéralisée (ossification endomembraneuse); ou secondaire, où les chondrocytes secrètent une matrice cartilagineuse, qui sera remplacée dans un second temps par une matrice ostéoïde, puis minéralisée (ossification endochondrale). Ses processus sont sous la dépendance de nombreux facteurs de croissance et en particulier de PDGF, BMPs, IGFs, TGF-β, FGF et VEGF.

La vascularisation locale du site de la blessure a été identifiée comme étant un paramètre important influençant la cicatrisation [27], [28]. La formation osseuse ne peut se faire qu'en présence d'un tissu suffisamment vascularisé [29]; c'est pourquoi l'angiogénèse est un élément clé de la réparation osseuse. Les vaisseaux néoformés convoient l'oxygène et les nutriments nécessaires au cal métaboliquement actif, favorisant les échanges gazeux, l'évacuation des déchets métaboliques, et amènent les cellules de l'inflammation et les précurseurs du cartilage et de l'os [30], [31]. Ils permettent aux facteurs systémiques circulants de venir moduler le processus de cicatrisation osseuse [30]. La vascularisation est nécessaire à la formation osseuse endomembraneuse et endochondrale. Pendant la formation osseuse endochondrale, le cartilage avasculaire est envahi de vaisseaux qui permettent aux ostéoblastes, aux chondroblastes et aux cellules progénitrices de déposer de l'os sur la surface des îlots de cartilage. Pendant l'ossification endomembraneuse, l'arrivée sur le site des précurseurs ostéoblastiques nécessitent des vaisseaux [30]. L'angiogénèse et la migration des cellules endothéliales sont contrôlées par les facteurs pro-angiogéniques tels que VEGF, BPM, TGF-β, FGF et les angiopoietines (particulièrement angiopoietine I and II) [32].

1.2.1.3. La phase de remodelage

Des mois plus tard, intervient la phase de remodelage de l'os cicatriciel durant laquelle la structure et les propriétés mécaniques originelles de l'os sont restaurées. Pendant cette phase, les ostéoclastes, stimulés par des facteurs et cytokines osteoclastogéniques comme TNF-α, TGF et les BMPs résorbent le tissu osseux néoformé. Les ostéoblastes déposent plus de matrice ostéoïde et de phosphate de calcium au niveau de l'os régénéré augmentant ainsi la densité de la matrice minéralisée. C'est ainsi que nous assistons à une diminution du diamètre/épaisseur de l'os alors de la densité minérale des structures internes augmente, se rapprochant de l'architecture de l'os natif. La cellularité diminue également au fur et à mesure de l'augmentation de la densité osseuse [33].

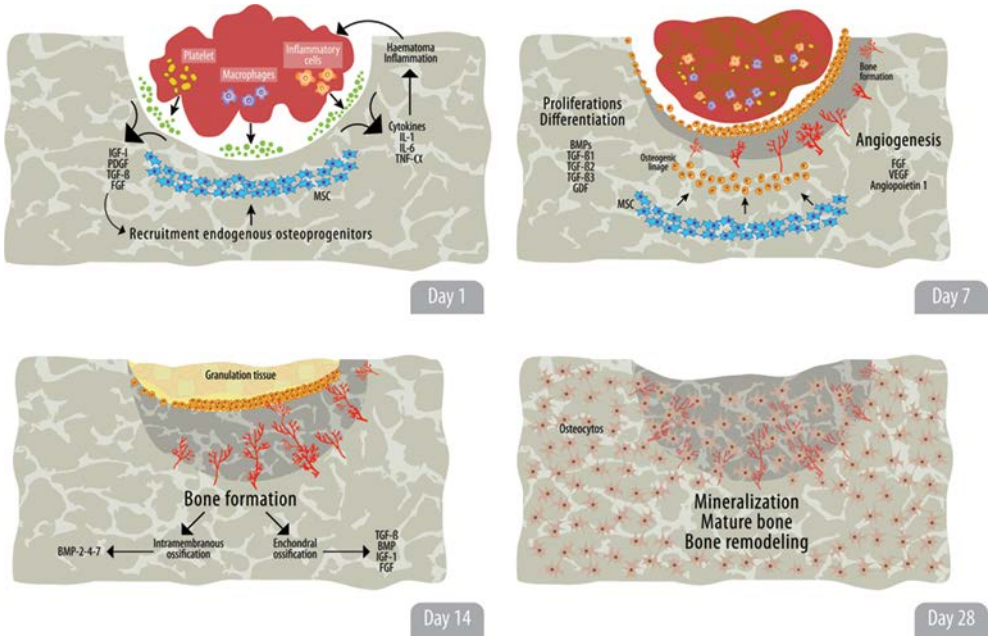


Figure 6 Les différentes phases de la cicatrisation osseuse d'après Chapparo et Linero 2016 [26]

1.2.2. Cicatrisation et contrainte mécanique

Les forces mécaniques ont un rôle non seulement dans l'initiation des fractures, mais aussi dans leur cicatrisation. Avec l'ostéogénèse, l'ostéoinduction et l'ostéoconduction, l'environnement mécanique semble être la quatrième face de la pierre angulaire de la cicatrisation osseuse.

En effet, l'os peut être soumis à différentes forces:

- La compression *("compressive strain")*
- La traction, ou l'étirement *("tensile strain")*
- Le cisaillement *("shear strain")*
- La flexion
- La rotation

Le tissu osseux est une structure anisotrope, sa déformation n'est pas la même en fonction des régions et des forces appliquées. L'os est plus rigide et résistant dans son axe longitudinal que dans son axe transversal. De plus, l'os cortical est plus résistant en compression qu'en traction. Sa résistance à la compression est liée à l'orientation des ostéons et à l'arrangement des cristaux d'hydroxyapatite dans la matrice, alors que sa résistance à la traction ou à l'étirement est essentiellement liée à la présence des fibres de collagène dans la matrice. L'os est également moins résistant à la flexion et au cisaillement.

Les forces mécaniques ont un rôle dans le remodelage osseux par le biais notamment de la fonction mécanoréceptrice des ostéocytes, mais aussi dans le processus de réparation et ce essentiellement par leur action sur les cellules souches mésenchymateuses, sensibles aux forces mécaniques environnementales autant qu'aux médiateurs chimiques. De plus, des micromouvements se produisant dans les phases précoces après une fracture, sembleraient favoriser la néoangiogénèse et une cicatrisation par seconde intention.

D'un point de vue mécanique, il est actuellement considéré que chaque type de force entraîne des modalités spécifiques de cicatrisation. Néanmoins, dans un contexte fracturaire, les différentes forces interagissent de manière complexe. De

plus, l'évolution du cal fracturaire au cours de la cicatrisation entraîne une évolution de sa réponse mécanique, car sa modification de composition est à l'origine d'une modification de sa résistance intrinsèque et donc de sa résistance et de sa réponse aux stimuli mécaniques.
L'augmentation des forces de compression favoriserait le développement de l'ossification endochondrale au détriment de l'ossification endomembranaire [34].

1.3. Rôle de la vascularisation dans la cicatrisation osseuse

L'importance de l'apport vasculaire pour l'os est bien connue. Le sang apporte l'oxygène, les nutriments et les médiateurs aux cellules, et élimine les « déchets » comme le CO_2 et les acides. Le squelette reçoit environ 10% du débit sanguin cardiaque, ce qui permet à l'os d'avoir une cellularité, un taux de remodelage et de réparation supérieur au cartilage qui est avasculaire [15]. Le sang est amené à la cavité médullaire par des artères nourricières, qui se divisent en sinusoïdes avant de ressortir de l'os via de nombreux vaisseaux qui se ramifieront. La cavité médullaire contient de nombreuses niches vasculaires qui sembleraient réguler la croissance et la différentiation hématopoïétique des cellules stromales via un gradient de pO_2 [15]. La qualité de l'apport vasculaire de l'os semble diminuée avec l'âge et la survenue de pathologies courantes telles que l'anémie, le diabète, les pathologies respiratoires, les tumeurs et l'immobilisation. La diminution de l'apport vasculaire est associée à une perte de la masse osseuse [15]. Ceci peut être directement lié à un effet de l'hypoxie, qui bloque la fonction des ostéoblastes et donc la formation osseuse ; et en parallèle, augmente l'ostéoclastogénèse et la résorption osseuse. Des facteurs comme l'hormone parathyroïdienne (PTH) ou les dérivés nitrés (NO), qui sont tous les deux vasodilatateurs, auraient un effet ostéogénique via la vascularisation.

1.3.1. Anatomie et physiologie

Les canaux et vaisseaux dans l'os ont été décrits par Van Leeuwenhoek et Havers à la fin du 17ème siècle. L'importance de l'apport vasculaire était reconnue par les chirurgiens dès le 19ème siècle. Au 20ème siècle, les avancées en chirurgie orthopédique ont impulsé l'étude plus approfondie de la vascularisation de l'os avec les travaux pionniers de Trueta dans les années 60s [35], [36]. Des études princeps de Brokes et al., [37] démontrèrent que l'apport vasculaire des os sains se fait principalement par l'artère nourricière, qui pénètre dans l'os cortical et se divise en sinusoïdes dans la cavité médullaire, puis en ressort via de nombreuses petites veines. L'os cortical est vascularisé par l'artère nourricière d'une part et par plusieurs petits vaisseaux venant du périoste. Chez le sujet jeune, la vascularisation des os longs est principalement centrifuge à partir de la cavité médullaire [15].
Des os sains requièrent un apport conséquent en oxygène et nutriments, et nécessitent l'élimination du CO_2 et des déchets métaboliques. On estime que le squelette perçoit entre 5,5 et 11% du débit sanguin cardiaque [38]. L'os est richement perfusé afin de satisfaire les besoins des cellules osseuses d'une part, mais aussi ceux de la moelle osseuse (lignée hématopoïétique, les cellules stromales, et les adipocytes), et des cellules endothéliales d'autre part. L'apport vasculaire permet une croissance et un remodelage (adaptation aux stimuli mécaniques) rapide qui n'est pas possible dans le cartilage qui est principalement avasculaire.

1.3.1.1. Effet de l'oxygène sur les cellules osseuses

On reconnaît depuis longtemps que la croissance osseuse et la réparation osseuse se font en présence d'un apport vasculaire important. Ces constatations ont un rapport avec le rôle nutritif de la vascularisation, par l'apport de nutriment de minéraux et de facteurs de régulation. Ces dernières années les chercheurs ont mis en évidence le rôle de la pression partielle d'O_2 et de l'hypoxie dans les fonctionnalités de l'os [15].

L'hypoxie survient quand l'irrigation du tissu est diminuée ou interrompue. La pO_2 dans le sang artériel est d'environ 12,64 kPa ; dans le sang veineux et les capillaires est d'environ 5,32 kPa (respectivement12% et 5% de la pO_2 de l'air). Dans les tissus sains la moyenne de la pO_2 varie de 3 à 9% [39]. Des mesures sur l'aspirât de MO de donneurs volontaires montrent des pO_2 d'environ 6,6% [40]. Les concentrations cellulaires en oxygène ont de très faibles variations physiologiques. Les cellules répondent aux modifications de pO_2 via la dégradation oxygène-dépendante de facteurs de transcriptions ; les Hypoxia inducible factors (HIFs).

En présence de O_2, HIF-1α et HIF-2α, sont hydrolysés par la prolyl hydrolase (en présence d'ascorbate), ce qui conduit à leur dégradation protésomale. En absence de quantité suffisante d'O_2, les prolyl hydrolases sont inactives, HIF-1α est stabilisé et crée un hétéro dimère avec HIF-1β. L'hétéro dimère se fixe sur les promoteurs hypoxia responsive éléments (HRE), initiant la transcription des gènes cibles intervenant dans divers processus cellulaire tel que l'angiogénèse (via VEGF), le métabolisme énergétique, la prolifération/la survie cellulaire et le control du pH [41], [42] ; L'hypoxie s'est révélée être un facteur stimulant fortement le nombre et la taille des ostéoclastes en augmentant fortement les puits de résorption ostéoclastique. Dandajena et al. [43] montrent à l'opposé, qu'une haute teneur en oxygène diminue la fonction et la formation des OC [44].
A l'inverse l'hypoxie aurait une forte action inhibitrice sur les ostéoblastes. La diminution de l'ostéogénèse en hypoxie serait due à la fois à l'inhibition de la prolifération et de la différenciation des ostéoblastes, associée à une diminution de la production de collagène et d'ALP.

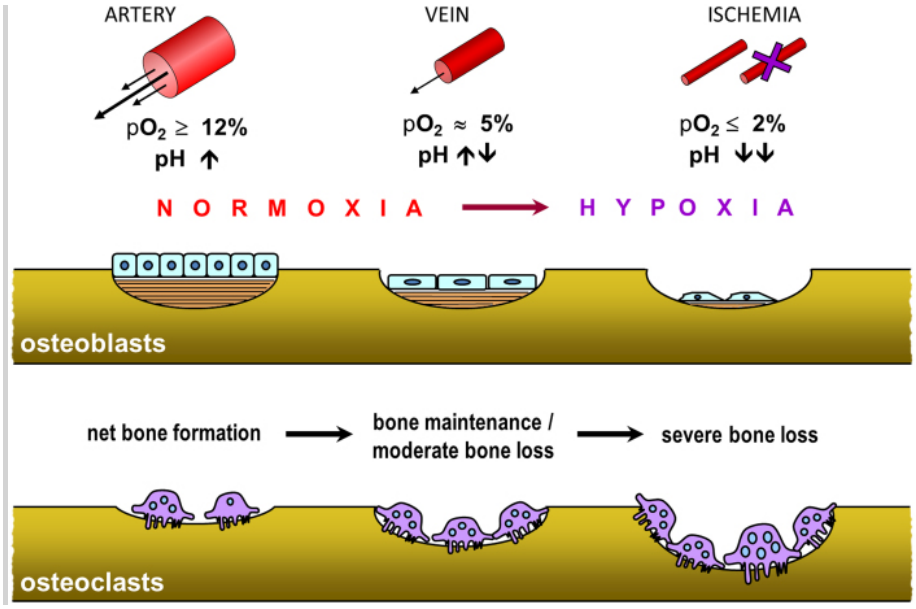


Figure 7 Formation osseuse et pression partielle en O_2 d'après Marenzana and Arnett 2013 [15].

1.3.1.2. Niches vasculaires de l'os

La moelle est le site de l'hématopoïèse, et sert de réservoir de cellules stromales pouvant se différencier en ostéoblastes, fibroblastes ou adipocytes. L'hypoxie semblerait stimuler la formation d'ostéoclastes [45], et maintenir les cellules pluripotentes à l'état quiescent [39].
Un autre microenvironnement vasculaire au sein de l'os, où se concentrent les recherches actuellement est « le compartiment de remodelage osseux » (BRU). C'est un site où la résorption et la formation de l'os ont lieu de manière couplée [46]. Il est composé de cellules OB-like aplaties et immatures (comme les cellules bordantes de l'os). Parfitt en 2000 [47] a décrit le rôle de la vascularisation au sein d'un BRU, comme pouvant servir à recréer des conditions optimales en pO_2 et pH pour la résorption et la formation osseuse.
Il est à noter que la visualisation des fines structures anatomiques de la vascularisation de l'os requiert des techniques spécialisées en histologie, notamment du fait de la présence d'os mais aussi de la fragilité des vaisseaux et des sinusoïdes, constitués d'une monocouche de cellules endothéliales [48].

1.3.2. Angiogénèse et ossification endomembranaire

Le rôle majeur de l'angiogénèse durant l'ossification endochondrale des os longs est clairement établi, alors que son importance pendant l'ossification endomembraneuse est souvent présumée. On utilise actuellement des données issues des études de l'angiogénèse pendant l'ostéogénèse endochondrale et l'ostéogénèse par distraction, pour comprendre le rôle de l'angiogénèse pendant l'ossification endomembraneuse.
Seule une étude portant sur l'ostéogénèse d'os frontal de poussin souligne l'association de l'angiogénèse avec l'ossification endomembraneuse des os de la voûte crânienne [49]. Selon cette étude, pendant le développement, avant l'ossification initiale de l'os frontal, de petits capillaires migrent vers la couche avasculaire de mésenchyme lâche, entourant la condensation mésenchymateuse, puis ils envahissent la condensation au niveau du site initial d'ossification. Au sein de l'os frontal de poussin en maturation, la couche d'OB se retrouve principalement le long des petits capillaires. Cette description suggère qu'il y aurait des similitudes dans le schéma d'invasion vasculaire des condensations mésenchymateuses lors de l'ossification de la calvaria avec l'ossification initiale des os longs depuis un modèle cartilagineux.
En effet, pendant l'ossification endochondrale des os longs, le réseau vasculaire pénètre la couche tampon avasculaire de cellules mésenchymateuses peu dense au milieu de la diaphyse, juste avant d'initier l'angiogénèse et la minéralisation d'un anneau d'os dans le périchondre [50]. L'invasion vasculaire du périchondre est nécessaire à la différenciation ostéoblastique dans le périchondre, à sa transformation en périoste, à l'arrivée dans un second temps de bourgeons endothéliaux colonisant cette matrice cartilagineuse à mi-hauteur de la diaphyse [51]. On retrouve des chondroclastes au sommet des capillaires qui progressent pendant l'ostéogénèse, permettant aux cellules endothéliales de se frayer un chemin dans le cartilage. De plus, des bourgeons capillaires constitués de cellules endothéliales sont retrouvés à proximité de pré ostéoblastes durant les premières phases de l'ostéogénèse endochondrale [52].

Malgré les similitudes de l'invasion vasculaire d'un mésenchyme lâche avasculaire, et l'association des invasions vasculaires avec la minéralisation lors de l'ostéogénèse des os longs et de la calvaria, les différences fondamentales entre l'ostéogénèse endochondrale et intramembranaire laissent penser que le rôle de l'angiogénèse durant ces deux types d'ossification pourraient être différents. Ce qui nous amène à proposer un modèle d'étude distinct pour l'angiogénèse lors de la cicatrisation endomembranaire.

1.3.2.1. Régulation de l'angiogénèse lors de l'ossification intramembraneuse

Parce que l'hypoxie active l'expression génique associée à l'angiogénèse chez les chondrocytes dans les modèles d'ossification enchondraux; il est communément présumé que l'hypoxie au niveau des condensations mésenchymateuses (avasculaire) soit également à l'origine de l'angiogénèse lors de l'ossification endomembranaire [17].

Le VEGF est indispensable à l'invasion vasculaire puis à l'ossification des centres [53]; La délétion d'un seul allèle de VEGF rend l'embryon non viable chez la souris, la perte de certains isoformes conduit à de sérieuses malformations des os de la calvaria associé à un retard de l'invasion vasculaire [53]. VEGF contribue non seulement à l'angiogénèse mais également à la différentiation chondrocytaire et ostéoblastique, ce qui rend son rôle dans l'ostéogénèse complexe [54], [55].

La production de facteur pro-angiogéniques est un des moyens pour les cellules de la lignée ostéoblastique de réguler les cellules endothéliales et autres cellules vasculaires. Ces mécanismes d'interactions entre les cellules vasculaires et ostéoblastiques lors de l'ossification endomembranaire n'ont pas été élucidés. Des mécanismes Vit D-dépendants ont été décrit comme régulant l'invasion vasculaire de la matrice cartilagineuse lors de l'ossification endochondrale. Même si cela peut nous sembler évident, l'invasion vasculaire de la condensation mésenchymateuse lors de l'ossification endomembraneuse peut avoir d'autre déclencheur que l'hypoxie.
Sur un modèle de fœtus porcin, HIF-1α est retrouvé dans l'ossification endochondrale seule (humérus), alors que les autres facteurs angiogéniques associés à l'hypoxie tels que HIF-2α, l'angiopoietine, VEGF sont retrouvés dans le palais (ossification endomembraneuse) et l'humérus [56]. Il est aussi à noter que l'augmentation expérimentale de HIF-1α conduit à une augmentation de la vascularisation des os longs murins alors que la vascularisation de la calvaria demeure inchangée[57].

Ces mécanismes d'interactions entre les cellules vasculaires et ostéoblastiques n'ont pas été étudiés lors de l'ossification endomembranaire. Des similitudes d'expression de facteurs pro-angiogéniques oxygène-dépendants, suggèrent l'hypoxie comme étant un facteur clé, bien que d'autres études sont nécessaires.

1.3.2.2. Origine vasculaire des cellules pré-OB dans la réparation intramembraneuse

Les vaisseaux servent également au transport des cellules préostéoblastiques dans les zones d'ossification et de réparation. De nombreuses cellules circulantes pré-OB

contribuent à la formation d'os sur les sites de traumas ou de fractures [58]. Cependant, nous ne savons pas dans quelle proportion ces cellules contribuent à la réparation ou au remodelage osseux [59], [60], d'autant plus que des études montrent le périoste, la moelle osseuse comme étant les principaux pourvoyeurs de cellules ostéoprogénitrices [8], [10]. Ces cellules circulantes n'ont pas le même rôle lors de l'ostéogénèse prénatale que lors de la réparation ou le remodelage osseux[17]. Lors de l'ostéogénèse prénatale les OB proviennent principalement de la différenciation du mésenchyme ou du périchondre adjacent [51] alors que les cellules endothéliales dériveraient de précurseurs externes [52]. Dans la calvaria, les précurseurs OB proviendrait de zone proche des sutures principalement et dans une moindre mesure des pré-OB circulants [61].

1.3.2.3. Interaction entre les cellules endothéliales et OB

Le réseau vasculaire en formation sert non seulement de route à l'arrivée des différents éléments cellulaires et moléculaires nécessaire à l'ostéogénèse, mais agit aussi comme facteur induisant la différenciation, régulant le métabolisme et la survie des cellules de la lignée ostéoblastiques [62]. La plupart des interactions entre les facteurs endothéliaux et l'os n'ont pas été étudié sur l'os membranaire, si ce n'est que l'addition de facteur ou cellules endothéliales à des produits d'ingénierie osseuse pour augmenter la formation osseuse [63], [64].

La quasi totalité des études disponibles porte sur l'ossification endochondrale ou la réparation des os long. Certaines études comparants l'ossification crânienne et celle des os longs relèvent une similitude et une conservation de motif d'expression géniques [65], même si elle semble être retardée dans le temps [66].
Toutefois, des radiographies de capillaires de calvaria (os pariétal fœtal humain) montrent une construction vasculaire partant du centre de la condensation mésenchymateuse et irradiant vers l'extérieure [67], suivant donc un motif centrifuge différent du « collier » d'os cortical des os long, même s'il semblerait exister un couplage entre invasion vasculaire et ossification [68]. Il faut également garder à l'esprit que les études sur l'ossification primaire ne peuvent pas être intégralement transposé à la réparation osseuse ou à la croissance post natale. Ceci souligne, malgré d'importantes similitudes, la nécessité de confirmer les mécanismes dans un modèle de cicatrisation endomembranaire. L'un des rares modèles où l'angiogénèse est étudiée dans le cadre de la réparation osseuse endomembranaire est le modèle de l'alvéole dentaire. Les auteurs y décrivent une cascade d'événements se chevauchant dans le temps et dans l'espace : la formation du caillot, la migration et la prolifération des MSCs, en parallèle de la constitution d'un tissu de granulation, l'angiogénèse, la prolifération des fibroblastes et la synthèse de collagène pour finir la formation osseuse et son remodelage [69].

1.3.3. Rôle du lit vasculaire dans la régénération osseuse et la réparation

La perfusion en O_2 et en nutriments de l'os est conditionnée par le débit sanguin et la densité vasculaire du site. La densité vasculaire et plus généralement le lit vasculaire dépendent de facteurs angiogéniques et vasculogéniques locaux. L'angiogénèse a souvent été étudiée en relation avec une ossification endochondrale [70].

Un des facteur-clés permettant de corréler l'angiogénèse au remodelage osseux est VEGF. Le VEGF quand il est surexprimé au niveau des cellules ostéoblastiques *in vivo*, conduit à un phénotype avec augmentation de la masse osseuse, fibrose de la MO, et une augmentation des vaisseaux sanguins [68]. A l'opposé, les souris déficientes en VEGF dans les progéniteurs d'ostéoblastes, ont un phénotype avec une masse osseuse réduite et une MO plus adipeuse [71]. HIF-1a est le facteur de transcription clé régulant la production de VEGF par les cellules osseuses en réponse à l'hypoxie [72].

Le traumatisme d'une fracture ou d'une chirurgie endommage l'irrigation du site, conduisant à une hypoxie locale, qui peut être entretenue par des mécanismes d'inflammation [73]. Chez le lapin, la pO_2 dans l'hématome est de <1% et de 1 à 3% dans la cavité médullaire après ostéotomie. La voie des HIF-α activée par l'hypoxie semble être un point clé reliant la croissance osseuse et l'angiogénèse ; en augmentant l'expression des VEGFs dans les OB. En effet les souris, surexprimant HIF-α dans les OB ont un réseau vasculaire très dense dans leurs os [74]. Ces souris forment plus d'os dans des modèles ostéotomie tibiale, ou de distraction osseuse, alors que les souris déficientes en HIF-1α, présentent une angiogénèse et une réparation osseuse altérées.

La séquence générale d'activation des différentes cellules osseuses suivant la fracture ou la chirurgie osseuse, est cohérente avec les réponses connues des OB et des OC aux changements en pO_2. En effet, les premières phases d'hypoxie suite au trauma, favorisent le recrutement des OC et inhibent les OB (qui peuvent persister à l'état quiescent). Puis la revascularisation progressive favoriserait les différentes fonctions des ostéoblastes (prolifération, différenciation et formation osseuse). On retrouve aussi des précurseurs ostéoblastiques qui migreraient sur le site de la fracture avec l'arrivée des vaisseaux [72]. Néanmoins, il est à noter que la mise en charge fonctionnelle précoce, ou trop tardive pourrait respectivement inhiber ou stimuler la néovascularisation dans un modèle de grands défauts osseux chez le rat [75]. Ceci permet de penser que la stimulation biomécanique pourrait moduler la croissance vasculaire pendant la réparation osseuse, en modifiant la séquence des différentes réponses cellulaires citées auparavant.

1.3.4. Modification de la vascularisation osseuse liée à l'âge et aux maladies systémiques

L'association entre l'âge, le dysfonctionnement vasculaire et la perte osseuse, a longtemps été suspectée, alors qu'elle n'a été mis en évidence que bien plus tard. Des mesures en échographie Doppler ont montré que le débit des artères fémorales chez l'homme âgé (64 ans en moyenne) est plus faible de 30% que chez le jeune (28 ans en moyenne)[76]. Les femmes âgées ayant de l'ostéoporose auraient un débit fémoral plus faible et une moelle osseuse plus adipeuse que les femmes du même âge n'ayant pas d'ostéoporose (étude sur des IRM)[77]. Des études chez le rat, ont également mis en évidence à l'aide de microsphères avec des radioéléments, que la diminution du débit fémoral chez le sujet âgé pouvait être corrélée à la diminution de la résistance de l'os [78], et à la diminution de la vasodilatation endothélium-dépendante [79]. Chez les rats femelles, 8 semaines après une ovariectomie (modèle d'étude de l'ostéoporose post-ménopause) on constate à l'IRM que le débit sanguin au niveau des vertèbres est diminué, ceci est associé à une diminution de la BMD [80].

Un des facteurs majeurs contribuant à la diminution du débit sanguin chez le sujet âgé, est l'augmentation de la rigidité et de la résistance vasculaire due à la calcification des parois musculaires des gros vaisseaux. Il y a une corrélation bien connue, entre la « déminéralisation » des os et les dépôts de minéral dans les vaisseaux de gros calibre ; un cercle vicieux [81]. La diminution du débit sanguin dans l'os, diminue la pO_2 médullaire, ce qui augmente la résorption ostéoclastique, et diminue la formation osseuse. L'efflux de calcium de l'os augmente la calcémie, ce qui pourrait favoriser la minéralisation des parois vasculaires [15]. La rigidificaton caractéristique des vaisseaux chez les sujets hypertendus, est causée par plusieurs facteurs, dont le dérèglement des hormones ostéotropiques, le dérèglement de la fonction endothéliale due à la diminution de NO, et la vasodilation dysfonctionnelle [81]. Certains traitements hypotenseurs diminuent l'impact de la HTA sur l'hémodynamie et la physiologie des vaisseaux. Il a été décrit que les anticoagulants, les β-bloquants et les bloqueurs des canaux calciques ont un effet bénéfique sur la masse osseuse [15].
Outre l'âge, le tabac et certaines pathologies systémiques peuvent altérer l'irrigation sanguine de l'os, et donc contribuer à une altération de la masse osseuse. Le tabagisme, en délivrant de fortes doses de vasoconstricteurs (nicotine), serait aussi associé à la perte osseuse [82], [83]. Parmi les pathologies figurent, les pneumopathies chroniques obstructives, les anémies et le diabète - cette partie sera traitée dans la deuxième partie de l'introduction bibliographique - [84].
De même une diminution de l'utilisation ou une diminution de la mise en charge mécanique d'un os, comme lors d'une immobilisation, peut aussi conduire à une perte osseuse corrélée à une diminution de l'apport vasculaire.

Le tissu osseux est caractérisé par sa capacité à s'autorégénérer à la suite d'une lésion ou d'une perte osseuse, dans un contexte physiologique adéquat. Néanmoins, un microenvironnement défavorable, des techniques chirurgicales approximatives, une absence de stabilité biomécanique, sont autant de facteurs pouvant conduire à un mauvais pronostic de réparation osseuse [85]. Les lésions orthopédiques volumineuses, pour lesquelles les capacités physiologiques de réparation de l'hôte sont insuffisantes, requièrent des biomatériaux (céramiques, métaux, polymères, composites), aux propriétés biologiques et mécaniques adaptées à leur réparation [86].

La médecine régénératrice et l'ingénierie tissulaire permettent plusieurs approches visant à réparer, augmenter, remplacer ou encore régénérer le tissu osseux perdu [86]. Les clés de la formation osseuse *de novo*, résident dans la transplantation, le recrutement, le homing et la modulation des cellules ostéoprogénitrices et des ostéoblastes. Ces cellules requièrent un environnement adéquat, afin d'adhérer, de proliférer et de se différencier de manière contrôlée, et ainsi élaborer un tissu osseux mature aux propriété biomécaniques requises [86], [87]. Comme nous l'avons vu précédemment, la revascularisation du site du défaut est primordiale et confère un cadre optimal pour la réparation osseuse.

Ces situations cliniques ont un impact socioéconomique important et porte atteinte à la qualité de vie du patient [87]. Des maladies systémiques, peuvent également affecter l'équilibre physiologique de l'os, perturbant ainsi les mécanismes de réparation de ce dernier [88], [89].

Il est communément admis qu'il y ait des retards et des perturbations du processus de cicatrisation chez les patients diabétiques. Mais qu'en est-il vraiment ?

2. Impact du diabète sur l'os et la vascularisation: state of art

2.1. Le diabète: généralités

2.1.1. Etymologie

Le mot diabète (/ˌdaɪ.əˈbiːtiːz/ ou /ˌdaɪ.əˈbiːtɪs/) vient du Latin *diabētēs*, qui vient lui-même de l'ancient grec διαβήτης (*diabētēs*) qui signifie littéralement, passer à travers. Les médecins de la Grèce antique l'on utilisé dans le sens de « miction importante » pour nommer la maladie. Le mot diabète est retrouvé dans les écrits anglais en 1425. Le mot « sucré » ou « mellitus » en anglais a été ajouté en 1675 par Thomas Willis quand il remarqua la glycosurie qui par ailleurs avait déjà été observée dans l'antiquité par les grecs, les chinois, les égyptiens, les indiens ou encore les perses.

2.1.2. Définition

La définition clinique du diabète est fondée sur le seuil glycémique à risque de microangiopathie en particulier de rétinopathie. Le diabète se définit donc par une hyperglycémie chronique, soit une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/l (7 mmol/l) à deux reprises[2].

Le diabète est aussi définit comme « un ensemble de désordres métaboliques caractérisé par une hyperglycémie, consécutive à une perturbation de la sécrétion d'insuline, de son mécanisme d'action, ou des deux » (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus 1997). La très grande majorité des patients présentent 2 types de diabète :

- Type 1 ou (T1DM), caractérisé par une abolition de la sécrétion d'insuline, consécutive à une destruction autoimmune des cellules β de Langerhans du pancréas.
- Type 2 ou diabète sucré (T2DM), caractérisé par une altération de la fonction de l'insuline, i.e une « résistance » à l'action de l'insuline (insulino-résistance), associé à une incapacité de l'hôte à compenser en sécrétant toujours plus d'insuline.

2.1.3. Classification et tableau clinique

(D'après http://www.chups.jussieu.fr/polys/diabeto/POLY.Chp.1.3.html)

2.1.3.1. ***Diabète de type 1 (TD1M)***

Son **début est brutal. Les patients présentent** un **syndrome cardinal** associant polyuropolydipsie, polyphagie, amaigrissement et asthénie chez un sujet jeune,

[2] Source: http://www.chups.jussieu.fr/polys/diabeto/POLY.Chp.1.2.html

mince, avec **cétonurie** associée à la glycosurie. Il n'y a pas d'antécédent familial dans 90% des cas. Il survient essentiellement avant 20 ans. Il peut être associé à d'autres maladies auto-immunes (vitiligo, maladie de Basedow, thyroïdites, maladie de Biermer).

2.1.3.2. Diabète de type 2 (TD2M)

A l'opposé, le TD2M se caractérise typiquement par la **découverte fortuite** d'une hyperglycémie chez un sujet de **plus de 40 ans** avec un **surpoids** ou ayant été obèse, avec surcharge pondérale de prédominance **abdominale**. Il y a souvent une **hérédité familiale**. Le T2DM est associé à une **hypertension artérielle essentielle** et/ou à une **hypertriglycéridémie**. Le diagnostic se fait généralement lors d'un **examen systématique**. En effet, le TD2M est asymptomatique. Le retard au diagnostic est d'environ 5 ans. Dans 20 % des cas, les patients présentent déjà une complication du diabète au moment du diagnostic.

2.1.3.3. Les autres diabètes

Les autres diabètes, plus rares, sont classés en fonction de leurs étiologies. On retrouve entre autres, le diabète gravidique, iatrogène, de type 3, les MODYs ceux consécutifs à une pancréatite aigue ou à un cancer du pancréas.

2.1.4. Epidémiologie

On compte 3,3 millions de diabétiques en France soit environ 4,7% de la population en 2013; dont 15 % sont diabétiques insulino-dépendant, 85 % non insulino-dépendant. Le diabète est un problème de santé publique aussi bien en France, où l'on dénombre environ 2 640 000 diabétiques connus et 660 000 diabétiques qui s'ignorent, qu'en Europe où le nombre de diabétiques est évalué à 52 millions. Aux Etats-Unis, il y aurait 15 millions de diabétiques dont la moitié non dépistés[3].
On dénombre environ 387 millions de diabétiques dans le monde [90].

- 10 à 15 % de diabétiques de type 1
- 85 à 90 % de diabétiques de type 2.

Le T2DM pose un problème de santé publique. Sa prévalence augmente parallèlement au vieillissement, à l'urbanisation, à la sédentarisation et au développement de l'obésité dans les populations des pays industrialisés. Cette maladie n'épargne pourtant pas les pays sous développés où elle atteint parfois une prévalence de 20 à 30 %, en raison d'une prédisposition génétique couplée à une modification rapide du mode de vie : urbanisation brutale, sédentarisation et alcoolisation des populations.

Le diabète représente un coût financier important en raison du taux élevé de complications dégénératives. 13% des dialysés en France sont diabétiques tandis que ce taux dépasse 30 % aux Etats Unis. 50 à 75 % des diabétiques dialysés, sont des diabétiques de type 2. Le diabète reste la première cause médicale de cécité avant 50 ans dans les pays développés. 5 à 10 % des diabétiques subiront un jour une amputation d'orteil, de pied ou de jambe (4/5 sont T2DM). Le quart des journées d'hospitalisation pour le diabète concernent des problèmes podologiques. Le coût du diabète est estimé à 12,5 milliards d'euros pour l'assurance maladie en 2010. Le coût des dépenses liées au diabète est estimé à 548 milliards d'USD en 2013 et 1

[3] source: http://www.chups.jussieu.fr/polys/diabeto/POLY.Chp.1.html

dollar sur 9 dépensé en santé l'est pour le diabète [91]-[93].

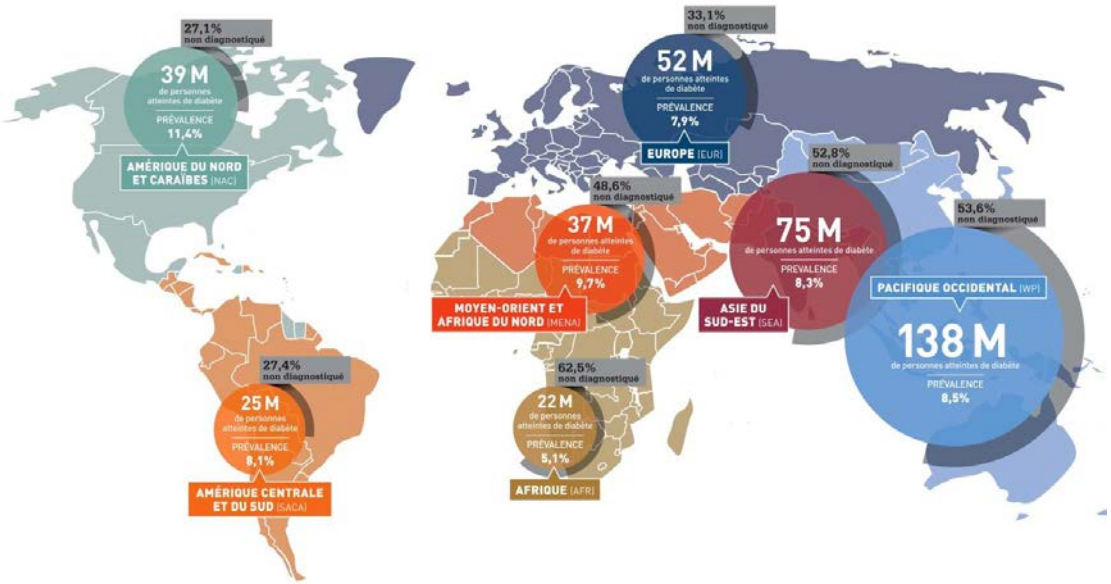


Figure 8 Répartition mondiale des patients diabétiques(D'après Atlas du Diabète de la FID 6e édition) **[94]**

2.1.5. <u>Etiopathogénie</u> *(d'après Grimaldi et al.)* **[95]**

2.1.5.1. Diabète de type 1

Type 1 ou (T1DM), est caractérisé par une abolition de la sécrétion d'insuline, consécutive à une destruction autoimmune des cellules β de Langerhans du pancréas par des lymphocytes T helper CD4 et des lymphocytes T cytotoxiques CD8. Ce processus se déroule à bas bruit pendant plusieurs années. Des auto-anticorps dirigés contre certains antigènes pancréatiques sont alors produits.

2.1.5.2. Diabète de type 2

Type 2 ou diabète sucré (T2DM), caractérisé par une altération de la fonction de l'insuline, une « résistance » à l'action de l'insuline (insulino-résistance), associé à une incapacité de l'hôte à compenser en sécrétant toujours plus d'insuline.
Le T2DM résulte de la conjonction de plusieurs gènes de susceptibilité, dont l'expression dépend de facteurs environnementaux, au premier rang desquelles, la consommation excessive de graisses saturées et de sucres rapides, et la sédentarité.
L'insulino-déficience responsable de l'hyperglycémie du TD2M est précédée par 10 ou 20 ans, d'hypersécrétion insulinique (hyperinsulinisme) secondaire à une insulino-résistance des tissus périphériques. L'anomalie métabolique fondamentale qui précède le T2DM est l'**insulinorésistance.**

2.1.6. <u>L'insulino-résistance</u>

Il semblerait y avoir une prédisposition génétique à l'insulino-résistance. En effet, on la retrouve, chez les enfants ayant une tolérance glucidique normale mais ayant deux parents diabétiques non insulinodépendants. Sur le plan métabolique**,** le stockage et l'utilisation du glucose sont diminués au niveau musculaire alors qu'au

niveau hépatique, il y a une stimulation de la néoglucogenèse. Tout ceci concours à augmenter la glycémie. Le glucose étant le principal régulateur de concentration plasmatique en insuline, les cellules β des îlots de Langerhans réagissent à une augmentation de celui-ci par une augmentation de la sécrétion d'insuline, qui voit donc son taux plasmatique augmenter. Cette hyperinsulinémie traduit la résistance à l'insuline.

On ne connaît toujours pas l'anomalie primitive à l'origine du développement de l'insulino-résistance puis du T2DM. Nombre d'auteurs pensent que le trouble primitif siège au niveau du tissu musculaire. L'insulino-résistance musculaire serait responsable d'un hyperinsulinisme qui favoriserait l'obésité androïde. D'autres pensent que le trouble primitif siège au niveau du tissu adipeux avec une hypersensibilité à l'insuline responsable du développement de l'obésité androïde. D'autres encore estiment que le trouble primitif se situe au niveau de la cellule β du pancréas avec une hypersensibilité au stimulus insulino-sécréteur. Depuis peu, certains auteurs avancent l'hypothèse, selon laquelle le tissu osseux pourrait avoir un rôle à jouer dans l'insulino-résistance [96], [97].

2.1.6.1. **Impact du tissu osseux dans l'installation du T2DM: Insulino-résistance médiée par Ostéocalcine** (d'après Fuzele et al.[96], [97])

Depuis quelques années a émergé la description d'une autre boucle de régulation faisant intervenir l'os. Le remodelage permanent de l'os fait intervenir les OC et les OB qui produisent de l'ostéocalcine. L'ostéocalcine sera majoritairement incorporée à l'os ; la portion résiduelle se retrouvera dans le sang sous deux formes circulantes, une forme carboxylée inactive et une forme décarboxylée active ce qui ferait de l'os un organe endocrine.
En effet, l'ostéocalcine sous sa forme active (décarboxylée) agit sur les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas en augmentant la libération d'insuline et en activant la prolifération de ces cellules. Elle agit également en augmentant la sensibilité des cellules cibles de l'insuline notamment celle des OB. Enfin elle augmente la dépense énergétique des cellules. **Ces différentes actions de l'ostéocalcine convergent toutes pour aboutir à un effet hypoglycémiant.**
La question qui se pose est bien évidemment de savoir si la voie de régulation ainsi mise en évidence a un effet physiologique réel. La réponse semble bien être positive. En effet, il existe une lignée de souris dont les ostéoblastes sont dépourvus de récepteur à l'insuline. On constate qu'avec l'âge se développe chez ces souris une hyperglycémie associée à une intolérance au glucose et à une résistance à l'insuline, ainsi que le développement important de la masse adipeuse périphérique (effets que l'on retrouve aussi chez des souris dépourvues d'ostéocalcine). On a également une diminution de la masse osseuse et du nombre d'ostéoblastes. Ces résultats témoignent du rôle effectif de l'insuline dans la régulation du métabolisme énergétique et du développement de l'os, du moins chez la souris.

L'ostéocalcine participerait donc à la coordination de l'homéostasie glucidique, des dépôts lipidiques et du métabolisme osseux post-natal. L'insulino-résistance quelque soit son mécanisme d'installation conduit à une hyperglycémie ; à laquelle l'organisme tente de répondre par une augmentation de production de l'insuline toujours plus importante (hyperinsulénémie). Au delà d'un certain stade, les cellules β de Langerhans finissent par ne plus produire d'insuline, le patient T2DM devient donc insulino-déficient.

2.1.7. Hyperglycémie et protéines glyquées

Toutes protéines en contact avec un milieu contenant du glucose peuvent être glyquées dans un processus non enzymatique, c'est la réaction de Maillard. Elle aboutit à la formation de produits de glycation terminaux (PTG), aussi appelés AGEs en anglais (Advanced glycation-end products). La plus connue des protéines glyquées, est l'hémoglobine. En effet, HbA1c est utilisée dans les bilans sanguins en contrôle de routine de l'équilibre glycémique. L'hémoglobine comme toutes les protéines de l'organisme subit une glycation (fixation d'une molécule de glucose par une liaison céto-amine) non enzymatique, lente et irréversible. La fixation du glucose dépend de la glycémie et de la durée d'exposition de la protéine au glucose. La durée de vie d'un globule rouge étant de 120 jours, on considère que l'HbA1c est un index rétrospectif et cumulatif de l'état glycémique durant les 4-8 semaines qui précèdent le dosage. Chez un patient normo-glycémique l'HbA1c est de 4-6%, elle augmente d'un pourcent, à chaque fois que la glycémie augmente de 0,35g/L de manière prolongée, soit 5% pour une glycémie à 1g/L, 7% pour une glycémie moyenne à 1,7g/L.

2.1.7.1. Synthèse et devenir des AGEs (Advanced glycation end-product ou PTG)

Les produits de glycation précoces sont obtenus par la condensation de Maillard et le réarrangement d'Amadori. Ce sont des protéines de demi-vie brèves ou intermédiaires comme l'HbA1c. Mais si l'on considère la suite de la réaction de Maillard, on obtient des produits de Maillard aussi appelés produits terminaux de glycation (PTG), soient des protéines structurales de durée de vie prolongée. Le taux de formation de ces composés est, contrairement aux précédents, indépendant de la concentration en sucre mais dépend seulement de la durée de l'hyperglycémie et du temps du renouvellement protéique (*turn-over* protéique).
Les deux premières étapes ont une réversibilité potentielle suivant la glycémie, la 3e progresse à partir du moment où il y a présence de sucres avec lesquels réagir. Les AGEs ainsi formés, étant très réactifs, sont responsables de nombreuses complications. La concentration des AGEs est ainsi proportionnelle à la glycémie sur de longues périodes de temps.

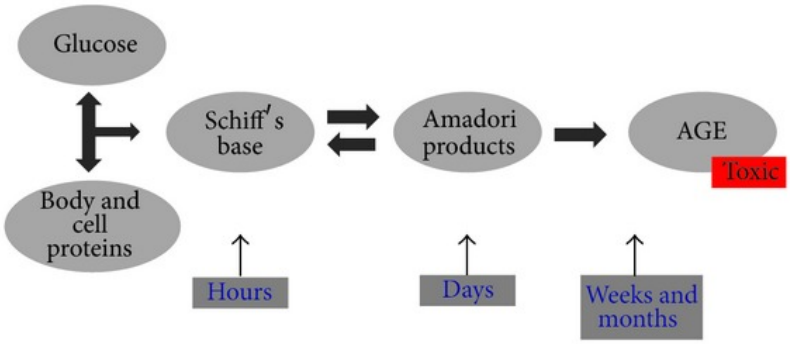


Figure 9 Durée de la glycémie et formation des protéines glyquées, d'après Tarr et al. 2013[98]

De plus, les AGEs ne peuvent être ni détruits, ni libérés des cellules dans laquelle ils ont été formés, contrairement aux produits précoces. Petit à petit, ces protéines glyquées encrassent la cellule, entraînant un dysfonctionnement de son métabolisme et enfin sa mort.

2.1.7.2. Mécanismes d'action AGE-RAGE

L'interaction AGE-RAGE active de nombreuses voies de signalisation, dont les voies Jak/Stat, NADPH oxidase, les MAP-kinase, comme p38, ou encore la voie des ERK 1-2. L'association AGE-RAGE conduit à l'activation de facteurs de transcription comme NF-kB ou les IFN-stimulated response elements (ISRE) conduisant à l'augmentation de l'expression de cytokines, de facteurs de croissance. Alors que la fixation de AGE à son récepteur RAGE activerait donc les voies pro-inflammatoires, d'autres récepteurs de la famille des scavengers ont un rôle dans l'endocytose des AGEs, conduisant à leur dégradation partielle après fusion avec des lysosomes [99].

Les voies de signalisation activées par AGE–RAGE sont impliquées dans la fonction pulmonaire, les propriétés mécaniques du tissu osseux, dans la réponse immunitaire innée ou encore le renouvellement du tissu nerveux; autant de facteurs pouvant impacter directement ou indirectement la réparation osseuse.

2.2. Complications macro- et microvasculaires chez le sujet diabétique

2.2.1. Impact des AGEs circulants sur les vaisseaux [100]

Un vaisseau sanguin est constitué de trois épaisseurs, du centre vers l'extérieur, l'intima, la média et l'adventice. C'est au niveau de l'intima que l'essentiel de la glycation s'effectue. Les sucres, ainsi que de nombreuses protéines et les AGEs, circulent au centre du vaisseau et y réagissent. L'intima est constituée d'un complexe endothélio-mésenchymateux, formé de cellules épithéliales très aplaties, et de cellules mésenchymateuses, indifférenciées. Enfin, l'intima est entourée d'une lame basale qui joue le rôle de filtre et empêche les molécules dont le diamètre est supérieur à 60 Å de passer. La matrice extracellulaire quand à elle est constituée de protéines fibreuses, notamment des fibres de collagènes et de protéoglycanes qui contrôlent le trafic moléculaire, entre le sang circulant dans les capillaires et les cellules.

La glycation de certaines protéines des parois vasculaires leur fait perdre une partie de leurs propriétés mécaniques les rendant « résistantes » aux enzymes nécessaires au remodelage. Ceci contribue à l'irréversibilité de l'épaississement de la paroi artérielle à l'origine de vasoconstriction et de thrombose.
Des phénomènes de réticulation touchent aussi d'autres protéines (les AGEs étant très réactifs), ce qui aboutit à la formation d'agrégats et de dépôts sur les parois. Ces derniers, obstruent plus ou moins les espaces intercellulaires, mais aussi ceux, au niveau de la membrane basale ; ce qui empêche les échanges intercellulaires.

Les modifications structurales au niveau de la membrane basale peuvent masquer les sites de reconnaissance des protéoglycanes qui contrôlent la perméabilité des lames basales. Ainsi, la glycation dérègle le contrôle des échanges entre les vaisseaux et les cellules.

- la glycation perturbe l'assemblage plurimoléculaire de la membrane basale, la fragilise et entraîne donc des fuites vasculaires.
- la glycation réduit la susceptibilité à l'hydrolyse des protéines, en l'occurrence celle du collagène, ce qui contribue à l'épaississement irréversible des membranes basales et donc aux problèmes d'échanges intermoléculaires.
- à la suite de la liaison d'AGEs sur des récepteurs RAGE (Receptor of Advanced Glycation Endproducts) spécifiques des macrophages, ceux-ci sécrètent des messagers chimiques, les cytokines, et des facteurs de croissance, qui entraînent la prolifération des cellules endothéliales et la destruction accrue des protéoglycanes, induisant d'une part des vasoconstrictions et des thromboses, et d'autre part une hyperperméabilité vasculaire.

La glycation a donc un effet négatif sur la fonctionnalité des vaisseaux sanguins. Les conséquences de la glycation des protéines sont multiples ; elles perdent certaines de leurs propriétés et participent ainsi au développement des complications du diabète.

Parmi les complications vasculaires diabètiques, on distingue les complications macrovasculaires que sont les maladies coronariennes, les artérites des membres inférieurs, les AVC et les complications microvasculaires qui engendrent les rétinopathies, les néphropathies et les neuropathies [101], [102].

L'angiogénèse est la formation de nouveaux vaisseaux à partir des vaisseaux existant. Son mécanisme semble altéré dans chacune de ces complications, une angiogénèse exacerbée lors des rétinopathies et néphropathies diabétiques, et une angiogénèse inhibée lors de la cicatrisation de plaies et de rejet de transplants [103]. L'inhibition de l'angiogénèse limite l'arrivée des cellules inflammatoires, des nutriments et de l'oxygène sur le site perturbant le processus de cicatrisation. En effet, en appliquant du glucose localement sur des plaies cutanée de rat non diabétiques on constate une diminution de la cicatrisation de celles-ci [101], [104]. Tout ceci concourt à montrer une sérieuse dérégulation de la néovascularisation consécutive au diabète.

2.2.1.1. Complications macrovasculaires

Par opposition à la microangiopathie qui touche la micro-circulation, on désigne sous le terme de macroangiopathie diabétique, l'atteinte des artères musculaires allant de l'aorte jusqu'aux petites artères distales d'un diamètre supérieur à 200 µm.
En réalité, la macroangiopathie diabétique associe deux maladies artérielles distinctes :

- **l'athérosclérose** qui se caractérise par le dépôt d'une plaque essentiellement composée de lipides (athérome) sur la paroi des artères. A terme, ces plaques peuvent se rompre ou entrainer la lésion de la paroi artérielle (sclérose) conduisant à l'obstruction du vaisseau ou à une médiacalcose.
- **l'artériosclérose**, caractérisée par une prolifération endothéliale et une dégénérescence de la média aboutissant à la **médiacalcose**[4]**.**

[4] **La médiacalcose** ou médiacalcinose est une sclérose calcifiante progressive des tuniques moyennes (media) artérielles touchant préférentiellement les artères de moyen calibre. Elle se caractérise cliniquement par une

Le diabète entraîne un risque relatif d'athérosclérose de 1,5 à 2 pour les accidents vasculaires cérébraux, de 2 à 4 pour l'insuffisance coronaire, de 5 à 10 pour l'artérite des membres inférieurs. Les pathologies coronariennes et les artérites sont souvent indolores chez les patients diabétiques du fait de l'atteinte neurologique, ce qui amène les patients à consulter tardivement. Parallèlement aux progrès des traitements hypoglycémiants et anti-infectieux, l'athérosclérose est devenue la principale cause de décès des diabétiques, bien avant les comas métaboliques et les complications infectieuses[5].

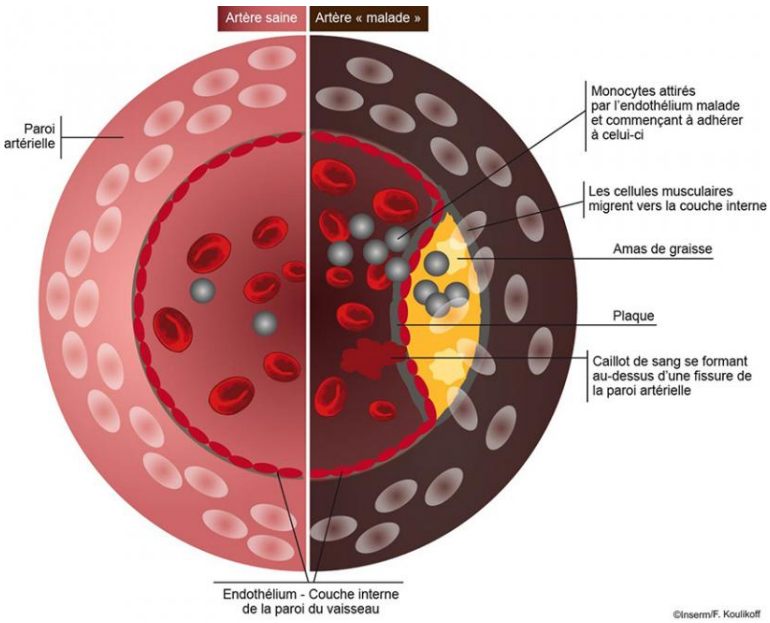


Figure 10 Athérosclérose - Coupe schématique d'une artère saine et d'une artère athérosclérosée d'après https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/atherosclerose

2.2.2. Complications microvasculaires

2.2.2.1. Rétinopathie

Dans les pays développés, la rétinopathie diabétique **reste la première cause de cécité** chez les sujets de 20 à 60 ans. 2 % des diabétiques deviennent aveugles et 10 % deviennent mal voyants. Sa survenue est corrélée à **la durée du diabète et au degré d'équilibre glycémique**. Inversement, plusieurs articles ont prouvé qu'un excellent contrôle glycémique prévient ou retarde la rétinopathie. Il est donc prouvé que maintenir à long terme un taux correct d'HbA1c (inférieure à 150 % de la normale) met à l'abri des complications microvasculaires dont fait partie la rétinopathie.

Quel que soit le taux initial d'HbA1c, obtenir un abaissement de 2 % diminue le risque d'apparition ou d'aggravation de la rétinopathie diabétique de 60 %.

L'hyperglycémie chronique est en effet responsable de perturbations précoces de la microcirculation avec sur le plan fonctionnel :

- une augmentation du débit, de la pression et de la perméabilité capillaire.

diminution ou abolition de la perception des pouls périphériques (rigidité artérielle, "artères incompressibles")

[5] Source: http://www.chups.jussieu.fr/polys/diabeto/POLY.Chp.6.3.html

- une perte de l'autorégulation hémodynamique, une tendance thrombogène avec notamment une augmentation du facteur de Willebrand synthétisé par les cellules endothéliales et une augmentation de la viscosité sanguine.

La rétinopathie débute par de micro anévrismes. Puis des exsudats lipoprotéiques et sanguins conduisent au développement d'œdèmes maculaires, d'ischémies, de colatéralisation et de dilatation des veinules. Puis les dérèglements prolifératifs apparaissent (croissance anormale de vaisseaux sur le disque optique et la rétine, prolifération des fibroblastes et hémorragie vitreuse [105].

2.2.2.2. Néphropathie

La principale manifestation de la glomérulopathie diabétique est l'augmentation de l'albuminurie. Elle a une double signification :

- elle peut être le symptôme d'une néphropathie diabétique débutante (TD1M, TD2M). Il existe le plus souvent une rétinopathie sévère. La pression artérielle s'élève progressivement.
- elle peut être le marqueur d'une glomérulopathie vasculaire non spécifique, en particulier chez le diabétique de type II obèse, hypertendu, hyperlipidémique, et témoigne alors d'une macroangiopathie diffuse avec un risque coronarien.

La néphropathie diabétique se complique souvent d'une véritable angiopathie maligne associant à une microangiopathie sévère, une athérosclérose accélérée responsable d'accidents vasculaires cérébraux, d'infarctus du myocarde, d'artérite des membres inférieurs.

L'hypertrophie glomérulaire est une des facettes de la néphropathie diabétique ; celle-ci est caractérisée *in vivo*, et en clinique par l'allongement et l'augmentation en nombre des capillaires. Dans le cas de TD2M, les lésions vasculaires seraient consécutives à une prolifération trop importantes des cellules endothéliales probablement du à la surexpression de VEGF-A et des récepteurs TGF-β provoquée par l'hyperglycémie (dérégulation de la balance prolifération/apoptose) [101].

L'autre facette de la néphropathie diabétique est l'hypertension glomérulaire. Afin de diminuer la pression artérielle, les vaisseaux en proliférant provoqueraient des shunts entre les capillaires glomérulaires et les capillaires péri tubulaires [106]. Il semblerait que ce soit un défaut du couplage NO/VEGF qui soit à l'origine de la prolifération vasculaire dans les néphropathies diabétique. [107]

2.2.2.3. Neuropathie

La fréquence de la neuropathie diabétique est diversement appréciée selon les critères pris en compte pour la définir. Si on retient des critères cliniques, on estime sa prévalence à 50 % chez les diabétiques dont la maladie évolue depuis plus de 20 ans et également à 50 % chez les diabétiques âgés de plus de 65 ans. Les facteurs déterminant la survenue de la neuropathie diabétique sont d'abord **l'équilibre glycémique** et **la durée du diabète**, comme pour la rétinopathie et la glomérulopathie. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle on parle de triopathie diabétique pour définir l'atteinte « œil - pied - rein ».

L'atteinte du système nerveux périphérique chez les patients diabétiques se manifeste par la perte de la sensibilité des membres inférieurs, diminuant les réflexes de protections et conduisant à des plaies ulcérantes. Les mécanismes conduisant à cette atteinte neuropathique sont entre autre la glycation des protéines impliquées dans la fonction nerveuse, l'augmentation du ROS, l'atteinte microvasculaire perturbant l'apport sanguin des nerfs. Structuralement au niveaux des vaisseaux

satellites des nerfs on constate : une atténuation artériolaire, une dilatation veineuse, des shunts atério-veineux, la formation de nouveau vaisseaux avec une hyperplasie et hypertrophie de l'intima, et une dénervation.
Au niveau des vaisseaux sanguins contenus dans les nerfs, l'atteinte microvasculaire conduit à une hypertrophie endothéliale, une hyperplasie de la membrane basale, et la diminution des pericytes.
Dans les premiers temps de la maladie, on constate une augmentation du nombre de vaisseaux dans les nerfs de patients diabétiques puis lorsque la maladie chronique s'installe, on constate une diminution du nombre de vaisseaux.

Cas du « Pied diabétique »

Le processus normal de cicatrisation d'une plaie comporte 5 phases: l'hémostase, l'inflammation et le débridement, la prolifération, épithélialisation et le remodelage. Lors de l'ulcération d'une plaie diabètiques, 2 de ces 5 phases sont perturbées: l'inflammation débridement et la prolifération [103].

5 à 10 % des diabétiques seront un jour victime d'une amputation. On comptabilise 3 000 à 5 000 amputations par an dues au diabète. En France, 50 % de ces amputations pourraient être évitées[6]. Le mal perforant diabétique siège électivement au niveau des points d'appuis, en particulier sous les têtes des métatarsiens. *Des shunts artério-veineux* avec perte du réflexe veino-artériel physiologique sont à l'origine d'œdèmes neurotrophiques associés à une mauvaise distribution sanguine fragilisant les os du pied. Ainsi se constituent des ostéonécroses et des fractures indolores responsables de l'ostéoarthropathie nerveuse. Cette ostéonécrose et ces fractures apparaissent au niveau des zones de contrainte maximale, en particulier au sommet de l'arche interne du pied, au niveau du premier cunéiforme et du scaphoïde. Leur fracture-nécrose-luxation entraîne l'effondrement de l'arche interne du pied : c'est le classique pied de Charcot diabétique.

2.3. Impact du diabète sur l'os

Le TD2M ainsi que TD1M ont été associés à un déficit de cicatrisation osseuse. Des études mettent en évidence un taux plus élevé de complications durant la réparation osseuse chez les patients diabétiques, ainsi que des perturbations dans l'ossification intramembraneuse et endochondrale en présence d'un diabète non équilibré.

En effet, le diabète a été associé à une série de complications impliquant l'os dès les années 90, communément regroupé sous le nom « d'ostéopathie diabétique » ou encore de « maladie osseuse diabétique » [108]. Les répercussions osseuses du diabète sont :

- Une diminution de la croissance générale durant la puberté chez les adolescents diabétiques.

[6] source: http://www.chups.jussieu.fr/polys/diabeto/POLY.Chp.6.4.html

- Des modifications de la BMD en particulier dans le cas du TD1M associé à un risque élevé d'ostéopénie ou d'ostéoporose [109];
- une augmentation du risque de fracture [110], [111];
- une réparation osseuse de « mauvaise qualité » et un appauvrissement du potentiel de régénération osseuse [112], [113].

2.3.1. Effet du diabète sur le métabolisme osseux

La méta analyse de Vestergaard de 2007, montre que le TD1M est clairement associé à une diminution de la densité osseuse avec un risque accru de fractures ; quant au TD2M, même si on relève une légère augmentation du risque relatif de fracture de la hanche, la BMD au niveau de la hanche et des vertèbres est augmentée [111], [113].
Etant donné, l'association de l'hyperinsulénémie avec l'augmentation de la BMD [114], il a été émis l'hypothèse que les disparités de BMD entre les patients atteints de TD1M et TD2M pouvaient être liées aux disparités d'insulinémie dans les deux types de diabète, insulinopénie dans le T1DM et hyperinsulénémie dans T2DM.
La diminution de la densité minérale osseuse chez patients T1DM, peut trouver son étiologie dans la diminution du turnover de l'os, qui dépend de la formation d'os par les ostéoblastes et de sa résorption par les OC [115]. Le T1DM est associé à une diminution de l'activité ostéoblastique, de la concentration sanguine d'ostéocalcine et d'IGF-1 chez les patients [115] et dans les modèles animaux diabétiques *in vivo* [116]. Les analyses histomorphométriques montrent chez les sujets non traités, une diminution de la formation de matrice ostéoïde, associée à un défaut d'apposition de minéral osseux [117]. Cette diminution de la formation osseuse et du recrutement/activation des OBs dans des modèles avec un déficit en insuline, a été confirmée par des biopsies osseuses chez les patients T1DM [118]. Par opposition à la formation osseuse, les données sur la résorption osseuse sont divergentes. Les marqueurs de la résorption sont soit, augmentés, similaires voir diminués chez les T1DM selon les études [115].
On retrouve également cette ostéopénie chez les rats ZDF diabétiques de type 2 [119], [120] associée à une baisse de la concentration plasmatique d'ostéocalcine {149}, ce qui suggère que la baisse de BMD pourrait être associée à une baisse de l'activité ostéoblastique, et à une diminution de la formation osseuse.

Dans les modèles animaux avec des diabètes non traités, les marqueurs de la résorption osseuse sont inaltérés ou diminués [115], [121], [122]. Dans la mesure ou le remodelage osseux est une association de signalisation bidirectionnelle entre les OB et les OC, il semblerait que la baisse de l'activité ostéoblastique, plutôt qu'une augmentation de l'activité ostéoclastique soit à mettre en cause dans les changements ostéoporotiques retrouvés dans l'os diabétique de type 1 [123]. Les données sont très disparates et contradictoires quant à l'altération du remodelage dans le TD2M [115].

2.3.2. Impact du diabète sur la microarchitecture osseuse : études animales

Chez le rat, en plus de la diminution de la BMD, des modifications dans la morphologie, dans la composition de la matrice extracellulaire, dans la minéralisation, conduisent à une détérioration des propriétés biomécaniques de l'os diabétiques (résistance à la torsion, absorption d'énergie, déformation angulaire)[124]. Quant à la microarchitecture osseuse, des données d'histomorphométrie quantitative sur des modèles de TD1M induit montrent ; une faible connectivité trabéculaire, une porosité augmentée et un rapport os/moelle diminué [125]. On constate également une modification du rapport Ca/P dans la composition de l'hydroxyapatite osseuse dans le cas des TD1M [124]. De plus, la quantité de matrice collagénique est réduite [116].
Spanheimer et al. (1988) rapportent une diminution de 48% de la production de collagène dans les deux semaines suivants l'induction du diabète. Des constituants de la matrice collagénique lorsqu'ils sont glyqués induisent des interconnections, pouvant expliquer en partie la détérioration de la qualité de l'os diabétique [126].

2.3.3. Impact du diabète sur la cicatrisation osseuse : études cliniques

Les études cliniques montrent que les patients diabétiques ont une cicatrisation de fracture retardée, avec une formation et une maturation du cal osseux ralenties [111], [127]. Loder (1988) rapporte que le temps de fermeture des fractures est augmenté de 87% dans les cas de fractures non déplacées chez les patients diabétiques ne présentant pas de neuropathies associées, comparé aux patients non diabétiques. Une étude rétrospective, sur la cicatrisation des fractures du calcanéum, montre un risque 3,4 plus élevé de survenu de complications chez le patient diabétique [128]. On note également, l'augmentation de survenue de complications infectieuses, le retard ou l'absence de soudure, la redislocation ou en une pseudarthrose après chirurgie orthopédique chez le sujet diabétique [129]. Il est à noter, que nous manquons, à ce jour, d'études pertinentes à grande échelle sur la survenue de complications lors du processus de cicatrisation chez les sujets diabétiques et en particulier au niveau des os plats [113], [116].

- **Effet du diabète sur l'ostéointégration des implants dentaires**

Au niveau de la cavité buccale, de nombreux essais cliniques évaluent les effets du diabète sur la survie des implants dentaires. Certaines concluent à une augmentation relative du risque d'échec implantaire chez les patients diabétiques (x2,75) [130], alors que d'autres ne trouvent pas de corrélation entre le diabète et l'échec implantaire [131], [132].
Il semblerait que la majorité des échecs implantaires associés au diabète surviennent assez rapidement après l'intervention, même si on retrouve dans la littérature des cas d'échec après la mise en charge de l'implant, probablement associé à l'altération du potentiel de remodelage [116]. Le torque[7] nécessaire au dévissage d'un implant est plus faible à 8 et 12 semaines d'ostéointégration chez les animaux diabétiques [133]. L'ostéointégration peut être obtenue dans un contexte de

[7] **Torque**: Force nécessaire pour faire tourner un objet sur son axe.

diabète non contrôlé, néanmoins l'os autour de l'implant est altéré. Les mécanismes conduisant à cette altération ne sont pas clairement établis.

2.3.4. Effet du diabète induit sur l'ossification endochondral

Des études histologiques qualitatives sur le cal osseux, site d'ossification endochondrale, dans des modèles animaux TD1M montrent une présence moindre de MSC indifférenciées. A 4 et 7 jours on note également moins de formation de cartilage et de prolifération de chondrocytes dans le cal diabétique [134].

Dans un modèle similaire, les auteurs rapportent également un retard de maturation du cal à 2 semaines de cicatrisation, ainsi que la présence de chondrocytes hypertrophiques s'ossifiant à 4 semaines, démontrant ainsi un retard de dans la différenciation osseuse chez les animaux diabétiques [135]. Les analyses histomorphométriques du cal à 2 et 4 semaines, montrent une diminution de l'apposition, de la formation, et de la séquence de minéralisation [135]. Ces observations confortent les observations faites par la même équipe, sur des animaux spontanément diabétiques, après une ostéotomie circulaire de 10mm au niveau de fémur [136]. Dans le groupe d'animaux avec un mauvais contrôle de la glycémie, le processus de minéralisation était moindre et retardé ; moins d'apposition, de formation, et retard de la minéralisation pendant les 14 premiers jours de cicatrisation.

D'autres études montrent à des temps plus tardifs ; 6 et 8 sem post opératoires, une fermeture incomplète du défaut par le cal, un remodelage moindre, et proportionnellement moins de minéralisation du cal chez les animaux diabétiques, comparé aux contrôles [134].

Chez le rat ZDF, il a été décrit un retard de cicatrisation des fractures du fémur, ainsi qu'une diminution de la force nécessaire pour créer une solution continuité [137]. Le retard de cicatrisation serait du a une résorption prématurée de la matrice cartilagineuse associée à une augmentation de l'activité ostéoclastique [138], [139].

En conclusion, les différents modèles diabétiques, mettent en évidence une plus faible cellularité du site de la fracture dans les premières semaines suivant la fracture/défaut, ce qui conduit à un retard de la différenciation et de la minéralisation du cartilage, et à un déficit des paramètres biomécaniques dans les phases tardives de la réparation endochondrale.

2.3.4.1. Mécanismes moléculaires impliqués dans le déficit de cicatrisation osseuse diabétique.

Dans le contexte de TD1M non contrôlé, la baisse de cellularité observée lors des phases précoces de la réparation osseuse peut provenir d'un recrutement inefficace des MSCs, d'une prolifération ou d'une différenciation ostéoblastique altérée de cette lignée cellulaire, ou encore d'une diminution de l'activité de ces cellules (OB) [123]. Cette hypothèse de l'altération de l'engagement des MSCs dans la voie ostéoblastique pendant le processus de réparation osseuse dans des modèles de diabète non équilibré, est vérifiée par la baisse de l'expression des

facteurs de transcription impliqués dans le phénotype ostéoblastique. De manière plus précise, la diminution de mRNA de Dlx5 et de Runx-2, qui contrôlent l'acquisition du phénotype ostéoblastique, a été observé à 4 et 6 jours postopératoires dans des modèles de cicatrisation endomembraneuse par ablation de la moelle osseuse [88]. Ceci laisse penser que la diminution de formation osseuse liée au diabète peut être liée à la différenciation des MSCs en cellules ostéoprogénitrices et à la maturation des cellules de la lignée ostéoblastique [123].

Une diminution de la prolifération des ostéoblastes a été avancée comme mécanisme probable conduisant à l'altération de la réparation osseuse. En effet, des études associent la faible cellularité couramment observée dans le cal osseux, associée à une diminution maximale de 50% des marqueurs immunohistochimiques de la prolifération cellulaire dans le cal intersticiel à 2, 4 et 7 jours de cicatrisation [116].
Corroborant ces observations immunohistochimiques, des études du profil d'expression génique montrent que le T1DM non contrôlé induit une inhibition des voies de la division cellulaire, de la production d'énergie et de l'ostéogénèse pendant la phase de cicatrisation endomembraneuse dans les régénérations tissulaires guidées [140]. Les causes sous jacentes de la diminution du taux de prolifération sont inconnues. Certains auteurs proposent la diminution de facteurs de croissance clés, perturbant le bon déroulement du processus inflammatoire et de l'ostéogénèse lors des phases précoces de cicatrisation comme explication possible [134]. On a également observé une diminution des mRNA et de l'expression protéique des PDGF lors de fractures fémorales pouvant conduire à une diminution de la prolifération lors des premières semaines de cicatrisation endochondrale [141]. Gandhi et al (2005) confirment la baisse de l'expression des protéines suivantes, PDGF, TGF-β1, IGF-I et VEGF, sur les sites de fractures à 4 et 7 jours de cicatrisation chez les souris TD1M non équilibrés. Les résultats des études évaluant l'efficacité de délivrance locale de facteurs de croissance favorisant la cicatrisation osseuse confirment l'hypothèse d'une altération de la production ou du mécanisme d'action des facteurs de croissance, impliqués dans le processus de cicatrisation osseuse chez les diabétiques non équilibrés.
Thaller et *al. (1995)*[142] montrent que la délivrance de IGF-I dans des défauts de taille critique de calvaria de rat diabétiques (STZ induits) promeut la cicatrisation osseuse. Santana et *al.*(2003) [143] rapportent qu'une application de rhFGF-2 promeut le pontage des berges osseuses (x2.6) dans les défauts de calvaria de souris diabétiques (STZ induit) à 14j de cicatrisation.

L'idée d'une réduction de l'activité des cellules ostéoblastiques conduisant à la diminution du potentiel de réparation chez les diabétiques, est soutenue par la diminution de l'expression des mRNA des protéines spécifiques de l'os telles que l'ostéocalcine, et le collagène de type 1 à 4 et 6 jours de cicatrisation intramembranaire dans le modèle d'ablation de la moelle osseuse [88].
Une baisse de la différentiation, de la prolifération et de l'activité des cellules ostéoblastiques durant les phases précoces « critiques » de la cicatrisation semblent être impliquées dans les mécanismes conduisant à une mauvaise formation osseuse chez les diabétiques non-équilibrés.

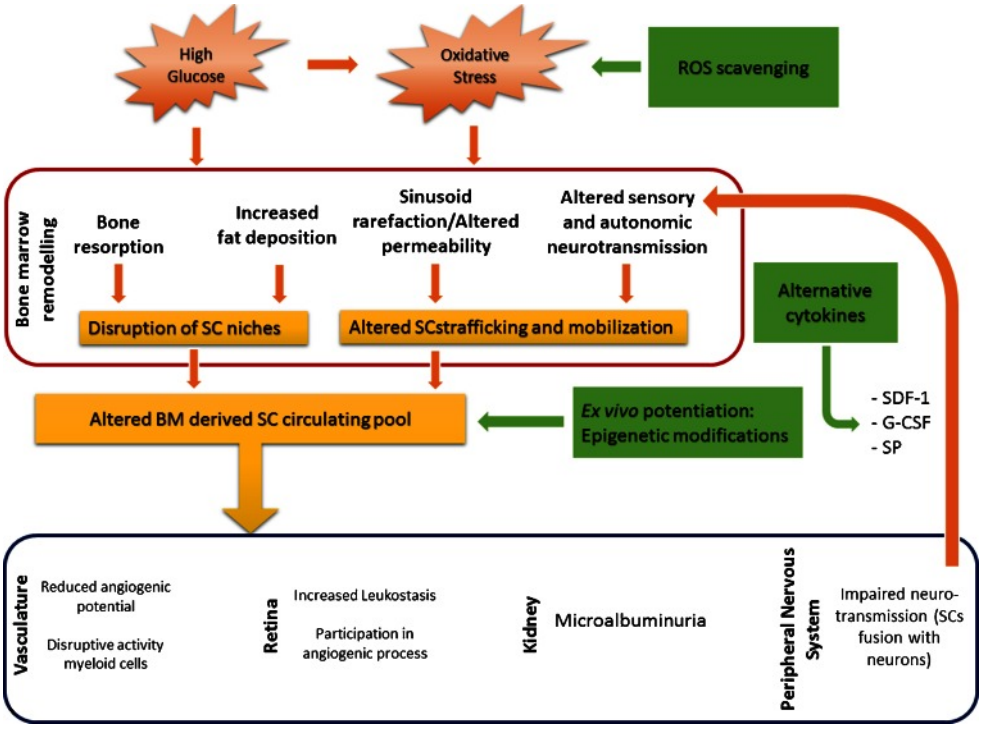


Figure 11 Mécanismes conduisants au remodelage de la moelle osseuse dans des conditions d'hyperglycémie prolongée, d'après Mangialardi et Madeddu 2016**[144]**

2.3.5. Impact du diabète induit sur l'ossification intramembraneuse

Les problèmes de cicatrisation osseuse intramembranaire ont été mis en évidence par des études histologiques et histomorphométriques dans de nombreux modèles d'ostéotomie fracturaire chez des animaux dont le diabète était induit (TD1M). Santana et al. (2003) [145] rapporte une formation osseuse intramembranaire réduite, dans un modèle de défaut de calvaria[8] de 1 ; 1,6 et 2,1 mm de diamètre, chez la souris. L'histologie a révélé une diminution de l'espace médullaire, de la cellularité et de la vascularisation après 14j de cicatrisation. La formation osseuse était diminuée de 40% chez les animaux diabétiques quelque soit la taille du défaut.

Follak et al. (2004) [136] ont étudié la réparation de défaut fémoraux de plusieurs tailles, dans des modèles de rat TD1M. Les auteurs n'ont pas trouvé de différences dans la réparation des petits défauts entre les animaux ayant un mauvais contrôle de la glycémie et les animaux sains. Dans les défauts de 0,8 mm de diamètre, une diminution de la quantité d'os trabéculaire a été constatée chez les animaux ayant un mauvais contrôle de la glycémie à 24 et 42 jours post opératoires. Pour les défauts de taille supérieure à 1,2 mm, chez les animaux avec un mauvais contrôle de la glycémie il y avait une forte perturbation de la minéralisation lors des deux premières semaines de cicatrisation, moins d'apposition et de formation. Il est à noter que c'est la taille du défaut qui semble être le facteur limitant la réparation osseuse [116], [146].

[8] Modèle d'évaluation de la cicatrisation osseuse chez l'animal après réalisation d'un défaut osseux circulaire dans la voûte crânienne.

Lu et al. (2003) [88] ont utilisé le modèle d'ablation de la moelle osseuse afin d'étudier l'impact du TD1M induit dans la formation d'os endomembranaire. La moelle osseuse et l'os trabéculaire de la diaphyse tibiale ont été retirés, laissant place à une formation osseuse endomembraneuse dans la cavité médullaire. L'évaluation histomorphométrique, montre une quantité similaire de tissu mésenchymateux chez l'animal diabétique et l'animal sain à 4 jours ; alors qu'à J6 et J10, on constate une diminution de la formation d'os et de moelle osseuse dans le groupe des animaux diabétiques.
Le modèle d'ostéogénèse par distraction[9] a également été utilisé dans l'étude de la régénération osseuse endomembranaire chez l'animal diabétique. Fowlkes et al. (2008) [147], sur un modèle de souris rendue diabétique par injection de STZ, évaluent à 19.3±12.5% la formation osseuse chez les animaux diabétiques contre 52.4±6.2% chez les contrôles.

Liu et al. (2013) [148], ont conduit des études dans un modèle de distraction tibiale chez la souris TD2M (souche Avy/a). A l'analyse de radiographies à haute résolution, n'y aurait pas de différences dans la quantité d'os formé chez les souris diabétiques non traitées et les contrôles (66.38% vs 63.34%). Par contre, le traitement du diabète par la roziglitazone entrainent des modifications sévères de l'os néoformé chez les animaux diabétiques (43.42%) tout en améliorant leur glycémie. De plus, on constate les mêmes effets sur les animaux contrôles ayant reçu de la roziglitazone (44.09%). L'histologie révèle une augmentation des adipocytes de la MO (x3,5 chez les diabétiques), le roziglitazone multiplie par 2 la fraction adipocytaire de la MO chez les diabétiques comme chez les contrôles.
Liu et al. (2007)[149], avec ce même modèle de distraction osseuse mais sur des rats ZDF, avaient alors constaté radiologiquement une moindre formation osseuse avec une densité minérale réduite comparée aux contrôles. Les résultats histologiques montrèrent quant à eux à 14 jours une fermeture quasi complète de la zone de distraction par de l'os avec des apposition de collagène parallèlement aux forces de distraction chez les rats contrôles, alors que les rats ZDF présentait un réseau de collagène lâche contenant des cellules fibroblastes-like et la quantité d'os formé était diminuée, voir absente dans certain cas.
Les données histologiques disponibles dans la littérature montrent que le modèle diabétique est associé à une perturbation de la cicatrisation endomembraneuse, principalement dans la première et la deuxième semaine de la réparation osseuse dans le TD1M. Il est à noter que la taille et le type de défaut semblent être des paramètres impactant la cicatrisation. Nous disposons également de très peu de données relatives à la cicatrisation endomembraneuse dans la sphère orofaciale dans un contexte de TD2M.

[9] **Ostéogénèse par distraction** : aussi nommé callotasis, distraction du cal osseux, ou encore ostéodistraction, est une technique chirurgicale consistant à régénérer de l'os en appliquant des forces progressives de traction au niveau des segments sectionnés.

2.3.6. Effet du contrôle glycémique à l'aide d'insuline, sur la physiopathologie de l'os diabétique

Plusieurs études montrent un effet préventif de l'insuline sur les complications osseuses du diabète à l'aide de modèles de TD1M induit par la STZ [125] ou spontanés [150].
L'insuline « normalise » les paramètres biomécaniques ; la rigidité, la résistance à la flexion et au cisaillement, chez les animaux spontanément diabétiques et les paramètres histomorphométriques de minéralisation, du cal en fin de cicatrisation [151].
L'insuline améliore le pontage osseux dans les modèles de défaut de calvaria [145] et de fémur [152] ainsi que l'ostéointégration des implants chez les animaux TD1M [153].

L'insuline joue donc un rôle lors des phases précoces de la cicatrisation [151]. Follack et al. [135] montrent qu'une glycémie contrôlée grâce à l'insuline normalise les paramètres dynamiques de minéralisation ; d'apposition, de formation de la matrice ostéoïde et de la vitesse de minéralisation, chez les animaux spontanément diabétique durant les 4 premières semaines de cicatrisation osseuse de fracture fémoral. Le taux de prolifération cellulaire dans le cal dans les 4 premières semaines est similaire dans les groupes animaux sains et diabétiques contrôlés, et de 25% plus faible chez les diabétiques non-equilibrés [151]. Follack et al. [135] trouvent également une amélioration de la prolifération cellulaire chez les sujets diabétiques traités pendant les 4 premières semaines de cicatrisation.

2.3.7. Conclusion

Le diabète augmente donc la fonction ostéoclastique et diminue la fonction ostéoblastique. L'hyperglycémie serait à l'origine de la production par les OBs de MCSF, TNF-α, RANKL qui activerait la prolifération et la différenciation des OC. De plus, le diabète et l'hyperglycémie réduisent la prolifération et la fonction ostéoblastique en abaissant l'expression de Runx-2, d'ostéocalcine et d'ostéopontine. La différenciation adipogénique des BMMSCs est augmentée. En effet on retrouve une augmentation des marqueurs tels que PPAR-γ, aP2, l'adipsine et la resistine. Une diminution de la néovascularisation aggraverait cette perte osseuse. La qualité de l'os est détériorée par les AGEs, augmentant le risque de fracture.
Les données histologiques disponibles dans la littérature montrent que le modèle diabétique est associé à une perturbation de la cicatrisation endomembraneuse, principalement dans la première et la deuxième semaine de la réparation osseuse dans le TD1M. Il est à noter que la taille et le type de défaut semblent être des paramètres impactant la cicatrisation. Nous disposons également de très peu de données relatives à la cicatrisation endomembraneuse dans la sphère orofaciale dans un contexte de TD2M.

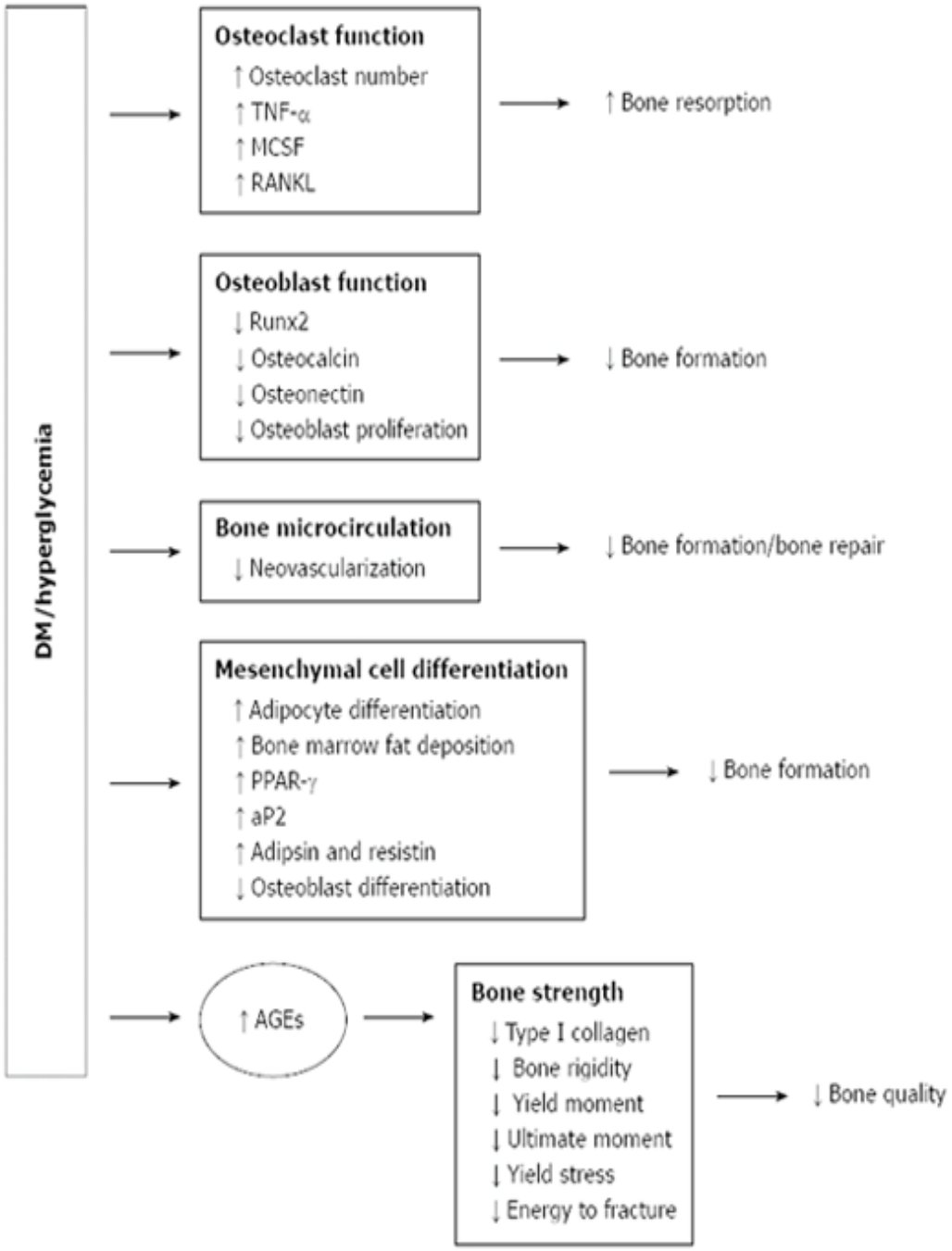


Figure 12 Mécanismes probables conduisant à l'altération de l'os chez les diabétiques. D'après Wongdee et Charoenphandhu 2011 **[154]**

PROBLEMATIQUE DE LA THESE

La première partie de l'introduction bibliographique nous a montré **qu'une rapide revascularisation était une des conditions sine qua none, à la cicatrisation osseuse**. Un apport sanguin est indispensable aux cellules pour subvenir à leur besoin en oxygène, nutriments et à l'évacuation des déchets métaboliques [155]. La deuxième partie nous a montré que, le diabète impactait de façon considérable à la fois la vascularisation et la réparation osseuse. L'incidence du diabète augmentant quasi exponentiellement ce, associée au vieillissement de la population, font que les patients diabétiques de type 2 présentant des lésions osseuses à traiter vont augmenter. De ce fait, il est nécessaire de comprendre les mécanismes compromettant la cicatrisation osseuse chez les patients diabétiques afin d'améliorer cette réparation osseuse et/ou d'accélérer la réparation vasculaire du site de la lésion.

Plusieurs pistes sont actuellement étudiées, notamment l'association de facteur de croissance [156], [157] ou de cellules. Nombre de **ces études ont été conduites sur des animaux sains** ; or le diabète altère les potentiels de réparation vasculaire et osseux. Il est donc nécessaire d'avoir des **modèles animaux diabétiques,** afin de se rapprocher de la réalité clinique et de faciliter le transfert chez l'homme des produits élaborés.

Les rares études de la cicatrisation osseuse sur modèles diabétiques comparent l'efficacité relative de différentes combinaisons de biomatériaux, cellules et facteurs sur la réparation osseuse [158], [159]. Ces études partent du postulat que l'atteinte de la capacité de réparation vasculaire intraosseuse serait similaire à celle d'autres tissus, alors même que le diabète a un rôle ambigu dans la néovascularisation. En effet, selon l'organe considéré, les sujets diabétiques peuvent à la fois présenter des zones survascularisées, et des zones hypovascularisées ; les deux altérant la fonction de l'organe. Ce phénomène est appelé « angiogénèse paradoxale diabétique » [160]. On observe d'une part une vascularisation exorbitante dans certaines rétinopathies et néphropathies diabétiques; alors que la néovascularisation semble diminuée lors de cicatrisation des plaies, entrainant des "pieds diabétiques" ou encore le rejet de greffon [103].
L'**étude de l'atteinte vasculaire du tissu osseux diabétique de type 2** est donc nécessaire.

De plus, très peu d'études portent sur la réparation osseuse chez le sujet **T2DM**. Autant le retard de cicatrisation et la formation d'un os cicatriciel de moindre qualité chez les sujets diabétiques sont clairement établis pour le TD1M, il y a très peu d'études sur l'effet du TD2M sur la cicatrisation osseuse, si ce n'est quelques études contradictoires. Dans le cadre du TD2M, le risque de fracture est plus important alors que la densité osseuse des patients est augmentée; on constate également des calcifications atypiques sur différents sites alors que l'os réparé est hypominéralisé avec de moins bonnes qualités mécaniques. **L'atteinte du tissu osseux endomembranaire dans un contexte de TD2M** reste à caractériser.

C'est pourquoi, nous nous sommes attachés dans **une première étude à mettre en évidence les différences de réparation vasculaire et osseuse propre à l'os diabétique de type 2; c'est à dire, sans cellules, sans matériau ou facteurs (article 1)** dans un modèle de réparation osseuse endomembranaire (celui des os maxillocraniofaciaux) chez le rat ZDF (modèle mimant fidèlement le T2DM et ses multiples complications). Chez ces mêmes animaux, l'impact du T2DM sur la vascularisation et la microstructure osseuse du fémur a également été évalué (**article 2**).
Ceci devrait nous permettre de mieux comprendre le rôle de la vascularisation dans la cicatrisation chez le sujet diabétique, et de préparer des produits d'ingénierie tissulaire sur mesure pour pallier la déficience exacte.

Les cellules candidates à entrer dans la composition des produits d'ingénierie tissulaire sont les CSM de l'hôte ; or, le diabète impacte le réservoir de CSM de l'hôte et modifie certaines de leurs fonctions. **Dans la deuxième partie de nos travaux nous nous sommes donc intéressés à l'impact du diabète sur des cellules souches mésenchymateuses et plus particulièrement à la modification des propriétés angiogéniques de leur sécrétome (art 3).**

3. Modèle animal pour l'étude de la régénération osseuse maxillo-faciale diabétique

3.1. Cicatrisation et réparation de l'os: cahier des charges des méthodes d'évaluation

La conception de la méthodologie expérimentale, permettant d'évaluer la réparation osseuse avec ou sans substituts osseux et matériaux issus de l'ingénierie tissulaire nécessite le recueil d'un certain nombre de données. Selon Muschler et al. [161] pour pouvoir transposer l'étude chez l'homme, le modèle utilisé devrait, mimer l'environnement clinique et biologique, permettre l'évaluation quantitativement et qualitativement de la réparation osseuse, et permettre l'identification de différences significatives de l'efficacité des différents matériaux testés.

Les études *in vitro*, permettent de comprendre les mécanismes biologiques (transcription, signalisation intracellulaire, régulation du cycle cellulaire, les interactions ligands/récepteurs etc…); et de caractériser l'activité biologique, la toxicité, l'immunogénicité, la réponse cellulaire directe et indirecte au contact du matériau [162]. Des modèles *in vitro* plus complexe, permettent d'étudier la réponse biologique alliant co-cultures de différentes populations cellulaire et matériau. Malgré cela, les études *in vitro*, ne sont pas suffisantes pour prédire les performances cliniques du matériau élaboré [163].

Les modèles *in vivo*, sont très utilisés dans la recherche biomédicale sur l'os, dans la mesure où ils permettent le recueil de données significatives sur la réponse osseuse, pouvant être transférées à la clinique. Les rongeurs en particulier, ont été largement utilisés dans les études de la réparation osseuse. Le modèle de calvaria de rat se révèle être particulièrement utile dans ce contexte, même si la notion de défaut de taille critique (CSD) – défaut ne cicatrisant pas spontanément - et de défaut de taille sous critique (SCSD) semble être controversée.

3.2. Critères de choix d'une espèce animale

Les espèces les plus couramment étudiées, sont les rongeurs et les grands animaux. Les modèles de rongeurs sont utilisés principalement pour des études de biologie moléculaire, d'histologie et dans une moindre mesure pour des études biomécaniques, alors que les grands animaux sont plutôt utilisés pour des études histologiques et/ou biomécaniques.
Les primates seraient des animaux de choix pour leur proximité avec l'homme, mais leur coût financier et éthique en font des modèles peu utilisés. Quant aux rongeurs, ils grandissent et remodèlent leur squelette tout au long de leur vie, les cartilages de croissance sont présents tout au long de la vie. Les rongeurs ne sont pas adaptés aux

études longues nécessitant plusieurs biopsies ou de volumineux prélèvement sanguins. Ils sont peu coûteux facile à manipuler et à héberger. La durée de vie des animaux étant réduite, l'étude du vieillissement sur l'os est aussi possible.
En résumé, les modèles de rongeurs sont très utiles à la recherche sur l'os, des modèles de premier choix pour étudier la cicatrisation et la réparation de l'os ainsi que l'efficacité des différentes techniques régénératrices.

3.3. Modèle *in vivo* de réparation osseuse – modèle de défaut de calvaria

On distingue deux types de modèles en recherche sur l'os, les modèles ectopiques et les modèles orthotopiques, en fonction de la présence ou non d'os de l'hôte autour du défaut. En effet, le modèle ectopique de rat a été utilisé pour caractériser le comportement d'un matériau ou d'un substitut osseux avant d'évaluer dans un second temps le potentiel ostéogène du matériau en contact direct avec l'os, en sites orthotopiques.
Les sites sous-cutanés communément utilisés sont le dos et la partie supérieur de l'abdomen [164]. Les essais en site ectopique sont courants pour les tests de biocompatibilité du matériau, mais ne sont pas suffisant pour la transposition clinique du protocole, et ce malgré la quantité de résultats obtenus [165].

Afin de passer outre les limitations des études en site ectopiques, des modèles de défauts intraosseux ont été proposés. Les os peuvent être partiellement ou totalement sectionnés, la cicatrisation être évaluée avec ou sans mise en charge. Les sites osseux de prédilection retrouvés dans la littérature sont, la calvaria, la mandibule, avec des défauts corticaux seuls ou cortico-spongieux (épaisseur totale) et les os longs (fémur /tibia) [166].
En sites orthopiques, les principaux modèles de réparation des os longs sont soit des modèles de distraction osseuse[10], soit de section des os (tibia, fémur, ulna). Outre la nécessité de fixateurs pour maintenir les différents fragments en place, ces modèles ont une ossification endochondrale; pour les os endomenbraneux la calvaria est le site de prédilection.

3.3.1. Le modèle de calvaria

Le modèle de calvaria semble être un modèle adapté à l'étude de la réparation osseuse et à l'évaluation de l'efficacité de substituts destinés à la régénération des défauts osseux crânio-faciaux [167]. Ce modèle existe dans de nombreux animaux; souris, rats, lapins, chiens, brebis, chèvres, porcs, primates; les rats et les lapins étant les plus utilisés. Les chercheurs plébiscitent ce modèle, car la calvaria permet de réaliser des défauts standardisés, reproductibles, et facile à évaluer par radiologie et histologie.

[10] **Ostéogénèse par distraction** : aussi nommé callotasis, distraction du cal osseux, ou encore ostéodistraction, est une technique chirurgicale consistant à régénérer de l'os en appliquant des forces progressives de traction au niveau des segments sectionnés.

57

De plus la situation anatomique permet un abord chirurgical aisé ; la dure-mère sous le défaut et la peau (et/ou le périoste) permettent de maintenir le matériau implanté sur le site sans avoir à recourir à des moyens de fixations externes [164]. Ce modèle ne permet pas de mise en charge biomécanique. Les défauts mandibulaires sont préférés dans ce cas.

3.3.1.1. Notion de défaut de taille critique

Parmi les modèles orthotopiques utilisés pour l'étude de l'os, les modèles de défaut osseux de calvaria ont largement été utilisés tant en recherche fondamentale qu'en recherche appliquée. Néanmoins, il persiste un débat autour de l'utilisation de défaut de taille critique (critical size defect, CSD), qui ne se répare pas spontanément durant la vie de l'animal ; ou de défaut de taille sous-critique (subcritical size defect, SCSD) dont la réparation complète spontanée est possible.
La taille critique du défaut dépend de l'espèce animale, de la souche, du sexe, de l'âge, du site anatomique, de la forme du défaut, et de l'environnement micromécanique [168]-[171]. Pour Schmitz *et al.* **le défaut de taille critique est défini comme étant la plus petite lésion intraosseuse d'un os donné, qui ne se répare pas spontanément durant la vie de l'animal** [168], [169]. Le défaut de taille critique peut être considéré comme un défaut par discontinuité, où le seuil physiologique des capacités de réparation/régénération de l'hôte est dépassé. Les mécanismes biologiques conduisant à la cicatrisation complète d'un défaut ne sont pas totalement élucidés.

La réponse inflammatoire suivant la chirurgie, serait à l'origine de l'activité ostéogénique. Ceci est montré dans plusieurs études in vivo [172]-[174].
La détermination d'un CSD ne repose pas seulement sur la réparation du défaut en terme de taille, mais surtout dans « la qualité » des tissus régénérés. Les tissus fibreux se reconstruisent plus rapidement que le tissu osseux, du fait d'une migration plus rapide des fibroblastes sur le site de la lésion, comparée à celle des OB [175]. Des travaux pionniers de Najjar et al. [176], [167] ont montré que dans les modèles animaux de défauts osseux, la cicatrisation se faisait d'abord par un tissu conjonctif fibrovasculaire, qui sera remplacé par un tissu osseux immature, qui sera à son tour remodeler en tissu osseux mature.
Mise à part la taille du défaut, d'autres facteurs comme **le site anatomique et la stabilité primaire** conditionnent la « qualité » et la « quantité » du tissu osseux néoformé [167]. Parmi les autres facteurs, ayant un rôle significatif, on trouve, la structure intrinsèque du tissu osseux, l'adéquation de l'apport vasculaire, l'implication de l'os cortical et la présence ou pas de périoste. L'âge de l'animal est un point à prendre en considération dans l'élaboration du protocole, les animaux jeunes ayant une capacité accrue de réparation de la calvaria, pouvant être imputé à un profil d'expression différent des gènes [177].
Chez le rat, on trouve des données disparates quant à le détermination du CSD au niveau de la calvaria. Hollinger *et al.* (1986 ; 1990) [169], [178] considèrent la taille de 8mm comme CSD chez les rats Long Evans and Walter Reed, de part leur inaptitude à combler le défaut spontanément après 13 semaines postopératoire, avec un maximum de 10% de réparation osseuse. D'autres études, à l'autre extrême, reconnaissent le défaut de 5mm comme CSD ; Bosch *et al. en* 1998 *[179]* n'y observent que peu de formation osseuse, principalement au contact des berges du défaut, 1 an post

58

opératoire [146]. De plus le défaut de 5mm de diamètre présente plusieurs avantages ; la possibilité d'en faire 2 par calvaria et celui de réaliser des défauts à distance des sutures crâniennes, sans empiéter sur le sinus sagittal médian, lui évitant ainsi toute lésion. Néanmoins, le défaut de 8mm de diamètre continue à être largement utilisé dans les études de régénération osseuse, même s'il semblerait que le CSD soit établi à 5 mm de diamètre ; ce, dans un souci de se positionner dans des situations cliniques les moins favorables possible.
On comprend la nécessité de définir une CSD pour chaque modèle, mais les défauts plus petits (de taille sous-critique, SCSD) permettent d'étudier les nombreux effets biologiques, que peuvent avoir les matériaux implantés dans le tissu osseux ou lors de sa réparation endomembraneuse. Les SCSDs sont souvent utilisés pour évaluer la réparation osseuse dans des modèles pathologiques comme le diabète [145], [180] ; pour évaluer l'impact de thérapeutiques [181], [182] ou de techniques chirurgicales [183], [184] améliorant la réparation osseuse. Chez la souris, les SCSD de 1mm sont couramment utilisés pour leur cicatrisation rapide (14j) afin d'évaluer l'action inhibitrice ou stimulante des facteurs locaux testés. Pour les rats, les défauts inférieurs à 5mm sont couramment utilisés comme SCSD.

3.3.1.2. Modèles à défauts multiples

Principalement dans un soucis éthique et économique, on cherche à réduire le nombre d'animaux nécessaire à l'étude, en faisant plusieurs défauts sur un même calvaria. Ceci a également l'avantage de diminuer la variabilité interindividuelle. Ainsi nous retrouvons toutes sorte de combinaison possible dans la littérature, plusieurs lésions de même taille ou encore des lésions de tailles différentes (fig 13). Les défauts peuvent également être centrés ou pas sur les sutures.

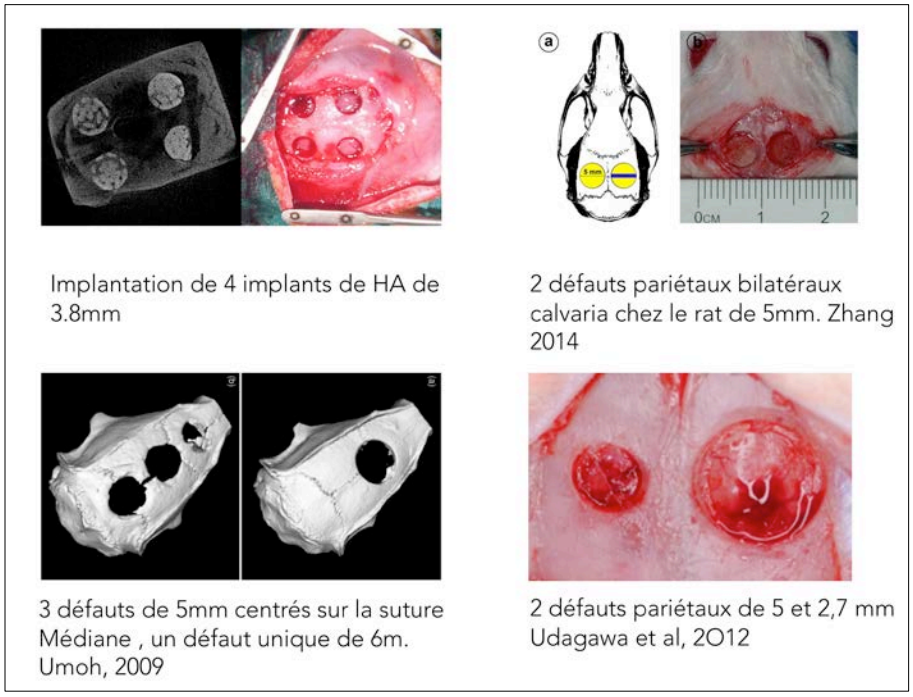


Figure 13 Modèles de défauts multiples sur calvaria de rat

59

3.4. Méthodes d'évaluation

L'évaluation de la réparation osseuse peut se faire par plusieurs méthodes complémentaires. Les techniques d'histologie/histomorphométrie, de microscopie électronique, et techniques radiologiques sont parmi les plus utilisées [185].

3.4.1. Histologie

L'histologie et l'histomorphométrie sont classiquement réalisées après colorations standard (HE, picrofuschine, Bleu de Stevenel). Elles permettent le recueil de données sur la morphologie, la disposition cellulaire, en rapport avec la matrice extra cellulaire ou le matériau. L'histomorphométrie permet une analyse quantitative des données en termes de longueur, distance, surface ou nombre selon les paramètres étudiés, tel que la formation osseuse ou les cellules. Une analyse semi quantitative utilisant des données à variances non paramétriques est possible (score).
Le tissu osseux peut également être marqué *in vivo* afin d'évaluer quantitativement l'os néoformé ou le remodelage. Les fluorochromes se lient de façon irréversible au calcium de l'os en formation. Les zones marquées sont visibles en microscopie à fluorescence. Il semblerait que la faculté de l'os en formation à lier les fluorochromes soit du à la taille réduite des cristaux d'hydroxyapatite en formation contrairement à l'os natif, où les cristaux de HA sont volumineux [167]. Les fluorochromes communément utilisés sont la tétracycline, la calcéine, les alizarins et le xylenol. L'immunohisthochimie directe ou indirecte est aussi souvent utilisée afin de situer les protéines et peptides d'intérêt et leurs rapports anatomiques [186].

3.4.2. Microscopie électronique

Le microscope électronique à balayage (MEB) est aussi utilisé pour l'analyse de la structure et de la morphologie des tissus osseux. Il sert principalement à caractériser les surfaces de l'os cortical, de l'os trabéculaire, des implants, des matériaux ou encore de l'interface os-matériau. Les limites de l'utilisation du MEB pour l'évaluation du tissu osseux résident dans la taille réduite des échantillons analysés, et la nécessité de les déshydrater, ce qui peut conduire à des modifications de morphologies ou de structures spatiales des tissus.

Le microscope électronique à transmission (MET) permet d'analyser l'ultrastructure et la morphologie des composants cellulaires, et les interactions du biomatériau avec les tissus environnants. On obtient une imagerie à très haute résolution mais sur un champ très réduit.

3.4.3. Les techniques d'imagerie radiologiques

Les techniques radiologiques sont des techniques de choix pour l'évaluation de la réparation osseuse [187]. Les analyses pré-chirurgicales permettent de caractériser le terrain en amont; les clichés postopératoires permettent d'objectiver un point 'zéro'

60

avec ou sans matériau. Les clichés intermédiaires permettent le suivi dans le temps de la réparation (spatial et en qualité via la BMD) [188]. Malgré la nécessité d'une anesthésie, tous ces clichés peuvent être obtenus chez le même animal sans geste invasif. Les techniques de radiographies 2D sont de plus en plus remplacées par de l'imagerie 3D. De part la multitude de dénominations, menant à des erreurs d'interprétation, les travaux de Parfitt en 1988 [189], sont considérées depuis comme une standardisation faisant consensus pour la nomenclature, les symboles et les unités.

La microtomographie à rayon X (microCT) s'est révélée être d'une aide précieuse dans le domaine l'ingénierie osseuse [187]. Elle permet, de manière non invasive la reconstruction tridimensionnelle de tout objet radiopaque (os ou vascularisation avec agent de contraste) dans un champs allant de 6-8 mm à haute résolution à une dizaine de cm en plus basse résolution. Le microCT permet une analyse quantitative et qualitative de la minéralisation et de la formation osseuse dans le temps et l'espace. Les techniques d'analyse 3D couplées aux techniques de traitement de l'image permettent une analyse fine de l'os néoformé [190]. L'avènement des microscanners *in vivo*, permet de suivre la formation d'os dans le défaut, et de monitorer le remodelage osseux [191].

3.4.3.1. La Microtomographie à rayon X (microCT)

Jusque très récemment, l'histologie était la technique de choix dans l'étude de l'architecture l'os trabéculaire et cortical. Bien que l'analyse histologique soit la seule technique permettant d'apprécier la cellularité et la dynamique du remodelage osseux, l'analyse micro architecturale reste limitée, car il s'agit souvent d'extrapolation stéréologique de données structurales 2D. L'imagerie 3D à haute résolution telle que le microCT, évalue directement la microarchitecture osseuse sans extrapolation. Depuis sa première utilisation par Feldkamp à la fin des années 80, le microscanner est devenu le gold standard pour l'évaluation de la morphologie et de la microarchitecture osseuse chez la souris et les petits animaux. Les microscanners actuels peuvent atteindre à une résolution de voxels ayant quelques microns de côté, les trabécules de souris faisant approximativement 30 à 50 µm.

L'excellente reproductibilité et la précision des mesures en microCT pour la morphologie osseuse ont été montrés dans plusieurs études animales [192] et humaines [193]. Ces études montrent un haut degré de similitudes entre les mesures 2D et 3D faites grâce aux microscanners, et les résultats obtenus par histomorphométrie. Il est à noter que les paramètres tels que la résolution de l'image ou le seuillage utilisé pour la segmentation peuvent interférer avec les résultats. En effet, certaines études concluent à une surestimation de l'épaisseur des trabécules (Tb.Th, trabecular thickness) au microscanner, par rapport à l'histomorphométrie. Ceci peut être du à un choix de résolution inadapté à la taille des trabécules en 3D, ou encore à l'utilisation d'un modèle de plaques pour l'estimation en histomorphométrie, le choix du seuillage de segmentation, ou encore la prise en compte par l'ordinateur des interconnexions entre les poutres lors des calculs qui augmentent le Tb.Th [187]. Malgré tout, cette forte corrélation entre les deux techniques, confirme le microscanner comme outil fiable dans l'évaluation de la morphométrie osseuse[194].

61

Il y a de nombreux avantages à l'utilisation de microCT dans l'étude du volume osseux et de la morphométrie des échantillons *ex vivo* ; la technique : (1) permet une évaluation 3D directe de la morphologie trabéculaire, via les paramètres tels que l'épaisseur et la séparation des trabécules (trabecular thickness Tb.Th ; separation Tb.Sp) ; (2) le volume d'intérêt analysé est plus important et entier ; (3) l' analyse est plus rapide ; (4) les échantillons n'étant pas détruits, ils peuvent être réutilisés pour des tests mécaniques ou la réalisation de coupes histologiques.

Le microscanner est de plus en plus utilisé dans l'étude de la réparation osseuse et de l'architecture tridimensionnelle de la vascularisation lorsqu'il est associé à un agent de contraste. Afin de pouvoir comparer les études entres elles, Bouxsein et al. (2010) [187] propose un guide de bonnes pratiques, de rédaction et de choix des paramètres étudiés.
Différents paramètres d'acquisition et de reconstruction influent sur les résultats d'analyses.

Le **positionnement de l'échantillon** est le premier paramètre conditionnant la qualité de l'acquisition. Afin de faciliter la reconstruction, il est conseillé de positionner le grand axe de la VOI perpendiculairement au rayon incident.

L'énergie du rayonnement: la plupart des microCT émettent entre 20 et 100kV. La faculté de discerner l'os de la moelle est meilleure à basse énergie. Compte tenu de l'atténuation des rayons X, seuls de petits échantillons peuvent être scannés à basses énergies; au delà le bruit ne permet pas d'analyses quantitative.

L'information contenue dans un voxel dépend du rapport bruit/ratio, qui lui-même dépend du nombre de photons incidents et de la sensibilité du capteur. Le nombre de photons incidents dépend du milliampérage, de la durée d'exposition et du nombre de répétition des images (frame averaging).

Effet de la taille du voxel sur la qualité de l'image: plus le voxel sera petit, plus la définition de l'image sera importante.

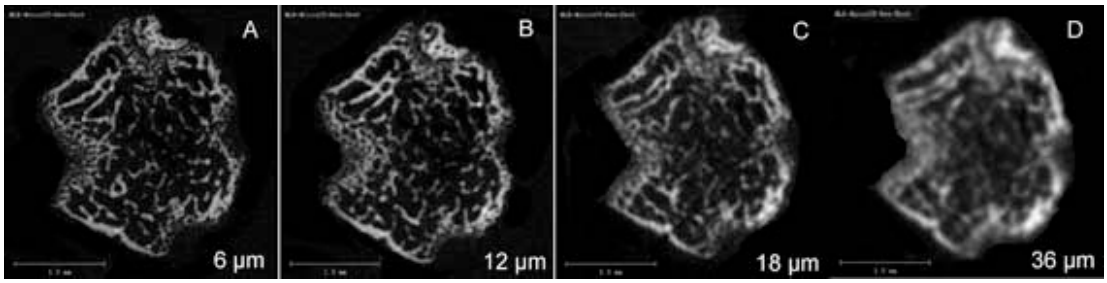


Figure 14 Effet de la taille du voxel sur la définition de l'image Image de fémur acquis aux résolutions respectives de *2D (A) 6µm, (B) 12µm, (C) 18µm, and (D) 36µm par voxel. 70kVp, 114mA, et 200-* (*Courtoisie de Rajaram Manoharan, Beth Israel Deaconess Medical Center*).

3.4.3.2. Visualisation du système vasculaire par microCT

La vascularisation, essentielle à la plupart des tissues, est une des données clés de la

62

réparation osseuse. Plusieurs techniques permettent de visualiser la vascularisation, *in vivo*, *ex vivo*, en 2D ou en 3D. On compte parmi elles, l'histologie, l'immunohistochimie, l'imagerie à rayon X, l'angiographie, la microscopie, ou encore l'imagerie par microscanner ou le synchotron. La vascularisation peut être étudiée avec ou sans agent de contraste [195].
Nous nous sommes intéressés dans le cadre de notre étude, aux résultats obtenus par microscanner (Skyscan 1172, Brucker Belgium) après injection d'un silicone radiopaque, le Microfil® dans le système vasculaire de l'animal.
Ceci nous a permis, tout comme Bléry et al. [195], de mettre en évidence les petits vaisseaux et leur caractérisation tridimensionnelle, qui ne pouvaient être obtenus à plus faible résolution dans d'autres études [196].

3.4.3.2.1. Le Microfil ®

Le Microfil est un silicone injectable, dont la viscosité (20-30 centipoise) et le temps de prise (20-30 min) sont optimisés pour permettre le remplissage totale des vaisseaux de l'animal, avant qu'il ne se fige. La radioopacité est obtenue par l'incorporation de chromate de plomb. La radioopacité du microfil est identique à celle de l'os, ce qui nous oblige à décalcifier les échantillons afin de pouvoir analyser l'architecture des vaisseaux. Afin d'obtenir une perfusion complète de l'animal, le système vasculaire doit être au préalable vidé son contenu sanguin, tout en évitant la formation de caillots.

Dans un modèle d'ischémie de la patte postérieure chez la souris, Duvall et al.[197] ont été les premiers à montrer l'utilité du microscanner pour l'analyse morphologique des paramètres du réseau vasculaire (vessel volume, thickness, number, connectivity, and degree of anisotropie) après injection de produit de contraste (Microfil MV-122, Flow Tech, Carver, MA, USA). Le microfil a été utilisé dans les études sur la réponse à l'ischémie, de caractérisation de la réparation tissulaire et du remodelage, des thérapies d'angiogénèse, sur la réparation des fractures, et l'ingénierie tissulaire [187].

Les seuils de segmentation et la résolution de l'image, jouent un rôle dans la détection des vaisseaux de différentes tailles au microscanner [197]. Afin de bien dissocier le réseau vasculaire des travées osseuses il est nécessaire de déminéraliser les échantillons. Afin d'analyser l'architecture osseuse et vasculaire sur un même échantillon, il est possible de combiner microscanner *in vivo* de l'os et analyse post-mortem des vaisseaux après décalcification.

Les éventuelles limites de cette technique résident dans le remplissage incomplet du système vasculaire. Des artefacts peuvent être provoqués par une injection à trop haute pression du produit, provoquant une extravasation du produit de contraste. Le suivi dans le temps de la vascularisation est impossible avec cette technique. Des agents de contraste *in vivo* font leur apparition sur le marché, la segmentation reste tout de même difficile [198]. Pour finir, il est difficile de faire des analyses hémodynamiques comme le permettrait une écho Doppler [199] avec cette technique.

63

3.5. Modèles d'animaux diabètiques

3.5.1. Choix de l'espèce animale

Parmi les rongeurs utilisés pour l'étude du diabète figurent des lapins et des souris et des rats.

Animal	Avantages	Inconvénients
Lapin (3)	Facilité de création des défauts.	Diabète induit chimiquement
Souris (4)	Modèle: TD1M	Taille: plutôt modèle os long
Rat (20)	Modèle de calvaria Modèle de TD1M et TD2M	Etude immunohistochimique difficile

Table 1 Espèces animales diabétiques disponibles

3.5.2. Choix du site

Parmi les sites couramment utilisés pour l'évaluation des produits d'ingénierie tissulaire osseuse on retrouve plusieurs sites craniofaciaux et des sites fémoraux et tibiaux au niveau des os longs.

Animal	Avantages	Inconvénients
Craniofacial		
Calvaria (10)	Accès possible sur les petits animaux.	Taille et nombre des défauts,
Section mandibulaire (1)	Modèle pertinent	Difficulté de mise en œuvre Alimentation animaux
Alvéole d'extraction (3)	Modèle pertinent	Difficulté de mise en œuvre Alimentation animaux
Squelette appendiculaire		
Section os long (8)	Accès, tout type d'animaux	Eloignement de la sphère orofaciale, type de cicatrisation

Table 2 Principaux sites étudié dans l'évaluation osseuse

64

3.6. Animaux diabétiques

Il existe principalement deux types de modèles animaux diabétiques: les animaux sains dont le diabète est induit par la destruction des cellules β des îlots de Langherhans du pancréas (ablation chirurgicale, injection de streptozocine ou d'Alloxan) et les animaux qui ont été génétiquement modifiés pour développer un TD1M ou un TD2M.

Les modèles animaux de diabète induit s'apparente plus à un TD1M dans mesure où l'apparition du diabète est soudain, avec une absence totale de production d'insuline. Dans les modèles animaux génétiquement modifiés nous trouvons, principalement des rongeurs.

3.6.1. Choix du type de diabète

Diabète	Avantages	Inconvénients
Génétique (7)	Homogénéité de l'affection, reproductibilité	Coût, disponibilité Pas de lapin, quelques rats et souris
Induit Pancréatomie (2) streptozotocine(13) Alloxan (3)	Tout type d'animaux disponibles, coût	Reproductibilité, temps de latence entre l'induction et les effets osseux inconnu Manipulation supplémentaire
Type 1	Installation rapide	Insulinodépendance Mortalité Difficultés de survie en animalerie
Type 2	Peu de mortalité Non insulinodépendant Plusieurs animaux disponibles	Atteinte osseuse controversée Début du diabète variable

65

3.6.2. Modèles de rat T2DM (D'après Katsuda et al, 2014[200])

	Rats OLETF	Rats wistar fatty	Rats ZDF	Rats SDT fatty
Hyperglycémie	18 semaines	8 semaines	8 semaines	6 semaines
Lésions pancréatiques				
Ilôts	Hypertrophie	Hypertrophie	Hypertrophie puis dégénération	Hypertrophie puis dégénération
Masse des cellules β	Augmentation puis diminution	Augmentation	Augmentation puis diminution	Augmentation puis diminution
Lésions rénales				
Albuminérie	10 semaines	20 semaines	6 semaines	4 semaines
Sclérose glomérulaire	Diffuse	Diffuse	Diffuse	Diffuse
Lésions nodulaire	Oui	Non	Non	Oui
Lésions tubulaires	Oui	Oui	Oui	Oui
Lésions tubulo-interstitiel	Oui	Oui	Oui	Oui
Lésions oculaires				
Cataracte	40 semaine	-	20 semaines	8 semaines
ERG	délais de latence	-	-	Délais de latence
Lésions des capillaires rétiniens	Oui	Oui	Oui	Oui
Lésions neurales				
Diminution de la vitesse de conduction nerveuse	40 semaines		12 semaines	12 semaines
Atrophie neuro-axonale	Oui			Oui
Lésions osseuses				
Ostéoporose	21 semaines			24 semaines

3.6.3. Rat ZDF

3.6.3.1. Caractéristique du Rat ZDF Leptr-/-

Nous avons opté pour un modèle de rat présentant un T2DM, d'installation assez précoce de façon à pouvoir travailler sur des animaux ayant un diabète installé durant toute la période de cicatrisation osseuse (8 semaines) sans avoir à les garder en vie trop vieux (24 semaines maximum). Le rat Zucker Diabetic Fatty rat (ZDF), présente une mutation sur le récepteur de la leptine, qui conduit à une installation progressive de l'obésité et du diabète par un mécanisme d'insulino-résistance. Il présente aussi, toutes les complications chroniques du TD2M; rétinopathie, néphropathie, neuropathie et ceci à un âge prévisible [200].

3.6.3.2. Lésions pancréatiques et insulinorésistance

Le rat ZDF développe une résistance à l'insuline et une intolérance au glucose entre 6 et 10 semaines et devient diabétique (hyperglycémie) aux alentours de 12 semaines. Histologiquement, les ilots β de Langerhans du rat ZDF sont plus larges et ont des

66

frontières irrégulières, comparés au rat ZL (contrôle) à partir de 7 semaines (prédiabétiques). Ces différences s'accentuent à 12 semaines. On constate de plus une corrélation entre l'augmentation en ADN des îlots β 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 [200].

3.6.3.3. Lésions oculaires et rénales

Chez les rats ZDF âgés de 20 semaines, on peut observer la formation de cataracte et une augmentation de l'apoptose des cellules de la cornée par rapport aux rats contrôles [201].

L'excrétion urinaire d'albumine des rats ZDF augmente progressivement à partir de 6 semaines. Le taux de filtration glomérulaire est élevé jusqu'à 12 semaines, mais diminue à 28 semaines. De plus, la protéinurie augmente même durant la période où le taux de filtration glomérulaire est élevé [202]. Enfin, une hypertrophie rénale est observée à 12 semaines; elle est plus prononcée à 16 semaines [203].

3.6.3.4. Neuropathies et troubles musculo squelettiques

La vélocité de la conduction nerveuse motrice est diminuée à 12 semaines chez les rats ZDF [204]. A 21 semaines, la densité osseuse du fémur et de la colonne vertébrale était diminuée, compares aux ZL. L'évaluation histomorphométrique montre également une minéralisation plus basse du tissue osseux [205].

En conclusion le modèle de rat ZDF présente toutes les caractéristiques et les pathologies associées au TD2M. C'est le modèle retenu pour nos travaux sur l'impact du diabète TD2M sur la cicatrisation osseuse au niveau de la calvaria.

67

RESULTATS I

Cette première étude vise à mettre en évidence les différences, de réparation vasculaire et osseuse propre à l'os diabétique de type 2 dans un modèle de défaut de calvaria chez le rat ZDF (modèle mimant fidèlement le T2DM et ses multiples complications). Nous avons dans un premier temps cherché à déterminer si le défaut de taille critique (8mm) établi pour les autres souches de rat, était le même pour les ZDFs. Puis, nous avons évalué principalement à l'aide du micro-CT la réparation vasculaire et osseuse des défauts de différentes tailles (8mm; 6mm; 4mm; 2mm).

Les rats ZDF et leurs contrôles ZL ont été opérés à 16 semaines, la cicatrisation osseuse a été évaluée durant les 8 semaines postopératoires, la cicatrisation vasculaire a été évaluée après le sacrifice à 8 semaines postopératoire.

Comparé à la cicatrisation des ZL, les défauts de 8mm des rats ZDF avaient une cinétique de cicatrisation perturbée, moins de volume osseux réparé ($p<0.01$), moins de surface du défaut réparée ($p<0.01$) à 8 semaine postopératoire. La cicatrisation osseuse des défauts de taille sous critique, de 2-4-6 mm n'a pas été impactée par le facteur taille ou la condition diabétique.
La réparation vasculaire quant à elle était réduite en volume et en surface dans tous les défauts diabètiques quelque soit leur taille ($p<0.05$).

Ceci a permis de mettre en évidence que le T2DM impactait la formation osseuse des CSDs et la réparation vasculaire des CSDs et SCSDs.

68

Bone 112 (2018) 161–172

Contents lists available at ScienceDirect

Bone

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bone

Full Length Article

Type 2 diabetes impairs angiogenesis and osteogenesis in calvarial defects: MicroCT study in ZDF rats

Guavri Caliaperoumal[a], Maité Souyet[a], Morad Bensidhoum[a], Herve Petite[a], Fani Anagnostou[a,b,*]

[a] Laboratoire de Bioingénierie et Biomécanique Ostéo-articulaires, UMR CNRS 7052, CNRS INSIS, Université Paris Diderot Sorbonne Paris Cité, Paris, France
[b] Department of Periodontology, Service of Odontology, Pitié Salpêtrière Hospital, U.F.R. of Odontology Paris 7-Denis Diderot University, Sorbonne Paris Cité Paris, France

ARTICLE INFO

Keywords:
T2DM
Angiogenesis
Osteogenesis
Micro CT
ZDF rat
Bone regeneration

ABSTRACT

Objectives: The present study was motivated by the fact that bone regeneration in the compromised vascular microenvironment of T2DM is challenging and the factors that determine the adverse bone regeneration outcomes are poorly understood. For this purpose the effect of T2DM on osteogenic and angiogenic healing potential of calvarial bone, was evaluated in Zucker diabetic fatty (ZDF) rats, an established rat model for obese T2DM.

Materials and methods: The study used 16-week-old ZDF rats and their age-matched controls, Zucker Lean (ZL). Circular defects of different sizes were created on the animal calvaria, either a single 8-mm-diameter ($n = 6$) defect, or 6-4-2-mm-diameter multidefects ($n = 6$). Bone regeneration was evaluated at 0, 4, 6 and 8 weeks post surgery using *in vivo* micro-CT and after animal sacrifice using *ex vivo* micro-CT. Vascular network parameters within the defects, were quantified by perfusing the animal vasculature with microfil® and scanning it after decalcification.

Results: Compared to results obtained from the ZL rats, defects of 8-mm-diameter in ZDF rats displayed impaired healing kinetics and significantly reduced newly formed bone volume ($p < 0.01$) and surface area ($p < 0.01$), 8 weeks post surgery. Defects of 6-4-2-mm-diameter exhibited bone formation, which was independent of either the size or the diabetic condition. Compared to results from the ZL, in the ZDF rats, vasculature volume and surface area were significantly ($p < 0.05$) reduced in all size-defects.

Conclusion: The present study provided evidence that T2DM impairs bone formation in critical-size calvarial defects and markedly reduces angiogenesis in all defects regardless of the defect size tested.

1. Introduction

Type 2 Diabetes mellitus (T2DM) is a chronic disease that is reaching epidemic proportions worldwide. This disease affects not only the heart, the blood vessels, eyes, kidneys, and nerves but it also adversely affects the skeleton [1]. In addition to complications such as cardiovascular diseases, retinopathy, neuropathy, and nephropathy, T2DM patients, exhibit osteopenia, osteoporosis, high fracture risk [2–4] as well as delayed, and impaired, bone healing and regeneration [5,6]. The rise of the T2DM prevalence, has also increased the number of patients requiring bone reconstruction procedures in the craniomaxillofacial area [7]. Such interventions include restoration of defects arising from periodontal disease, trauma or tumour excision. While it has been clearly established that Type 1 Diabetes mellitus (T1DM) impairs intramembranous and endochondral osteogenesis [5,6]; in spite of the high clinical needs of T2DM patients, pertinent data regarding bone healing in T2DM are scarce and contradictory. For instance, recent studies reported that in ZDF rodent model, insulin treatment reversed the adverse T2DM effects on femoral-defect regeneration but it exerts a differential effect on the osteoblasts at the endocortical and periosteal sites [8]. In the same T2DM model, PTH therapy repairs partially (20% filling) this type of defect while it reversed the T2DM effect on bone mass only on the spine [9]. Moreover, inhibition of sclerostin - a negative regulator of bone formation - improves bone regeneration [10] while it does not play a major role in the pathogenesis of skeletal complications of T2DM [11]. Bone regeneration in the compromised context of T2DM is indeed challenging and needs further research to elucidate the factors that determine the adverse bone regeneration outcomes under diabetic conditions.

The insulin resistance and hyperglycemia associated with T2DM affect the bone matrix [12], the cells [13] and the vasculature [14,15] at molecular and cellular level. Consequently, both angiogenesis and osteogenesis, the two key components in bone repair and regeneration should be compromised. Indeed, angiogenesis precedes endochondral

* Corresponding author at: Laboratoire de Bioingénierie et Bioimagerie Ostéo-Articulaire, Faculté de Médecine, Site Villemin 10 avenue de Verdun, 75010 Cedex Paris, France.
E-mail address: fani.anagnostou@univ-paris-diderot.fr (F. Anagnostou).

https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.04.009
Received 26 May 2017; Received in revised form 12 April 2018; Accepted 13 April 2018
Available online 25 April 2018
8756-3282/ © 2018 Published by Elsevier Inc.

[16] and endomembraneous osteogenesis [17,18] and is crucial for successful bone regeneration [19]. Moreover, impairment of angiogenesis in wound healing has been linked to T2DM-associated angiopathy in various tissues including myocardium, skeletal muscle and skin [20,21] but little is known of its effects in bone healing [22] and, especially, in the craniomaxillofacial area.

In addition to the diabetic microenvironment, other parameters, however, determine bone and vascular formation during the healing of bone defects. For instance, bone formation and angiogenesis are impaired [17] in bone defects larger than the "critical" size of 5-mm diameter. The size, type and anatomical location of the bone defects are relevant and can have a major effect on the final outcome of bone healing [8,23,24]. Furthermore, and although it has been shown that in T1DM long-bone repair depends on the defect-size [25], the relationship between bone formation and angiogenesis, within different bone-defect sizes has not been investigated for the case of T2DM.

Therefore, we hypothesized that craniofacial bone regeneration and angiogenesis in the compromised T2DM milieu, likely depend on the size of the defect and we tested this hypothesis using Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats (a relevant T2DM animal model which exhibits most of the metabolic, microvascular and musculoskeletal features of T2DM encountered in humans) and Zucker Lean (ZL) rats, their age-matched controls [26,27]. We created bone defects of different sizes on the rat calvaria, one of the most commonly used animal models to assess bone regeneration and to screen different biomaterials or tissue engineered constructs in the craniomaxillofacial field [23,24,28]. By focusing on both bone regeneration and angiogenesis alterations in the calvarium during the healing of critical and subcritical bone defects, the present study aimed at investigating factors associated with the adverse bone regeneration outcomes in the T2DM milieu.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult 16-week old, male, obese, Zucker fa/fa rats (ZDF) and their lean fa/+ (ZL) littermates were purchased from Charles River (L'Arbresle, France). Rats were housed, in a temperature-controlled (20–22 °C) room, were exposed to 12-hour light/dark cycles, and had free access to food and water. The animals were handled in accordance with the European Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals (Directive 2010/63/EU). The experimental procedures involving animals in the present study were approved by the Ethics Committee of Paris Diderot University (N°01610.02/S69), Paris, France.

2.2. Blood sample analysis

To evaluate glycemia before surgery on 16-week-old rats, each animal was anesthetized using isofluorane (60% isofluorane; 40% oxygen), a drop of venous blood was collected from the tail, and processed using an Accu-check glucometer and pertinent test strips (Roche Diagnostics, Meylan, France). At 24 weeks of age, before sacrifice, blood samples (approximatively 6 mL each) were collected by cardiac puncture and immediately mixed with heparin (40 U/mL). The blood plasma was separated by centrifugation (700 $\times g$ at 4 °C for 10 min) and stored at −80 °C. The concentrations of glucose, fructosamine, calcium, phosphate and alkaline phosphatase of these plasma samples were then determined using established laboratory techniques (IDEXX laboratory; Alfortville, Fance).

2.3. Experimental design

Three groups of 16-week-old ZL and ZDF rats underwent calvarial-defect procedures (Fig.1). In the first group, composed of 6 ZDF and 6 ZL rats, bone healing was evaluated in 8-mm-diameter, critical-size defects (CSD). The rats were euthanized 8 weeks post surgery. Bone healing within the defects was evaluated using micro-CT with *ex vivo* bone settings. In the second group, composed of 6 ZDF and 6 ZL rats, kinetics of bone healing of the 8-mm CSD and its vascular repair were evaluated. For this purpose, all defects were scanned using *in vivo* bone settings at 0, 4, 6, 8 weeks after surgery. After 8 weeks, animals were deeply anesthetized and injected with Microfil® compound. The excised calvaria were fixed in formalin, decalcified, and scanned again using *ex vivo* blood vessel settings to evaluate vascular repair. A third group of 6 ZDF and 6 ZL rats was used to study bone healing and vascular repair of sub critical size defects (SCSD). For this purpose, three defects of 2-, 4-, 6-mm-diameter respectively, were created on each rat calvaria. 8 weeks post surgery rats were deeply anesthetized and injected with Microfil® compound. The excised calvaria were fixed in formalin, scanned using *ex vivo* bone settings to investigate bone regeneration and then were decalcified, and scanned again using *ex vivo* blood vessel settings to investigate vasculature repair. Four rats (1 ZDF and 3 ZL) were excluded from the vascular micro-CT analysis because of incomplete Microfil® perfusion. We considered that complete Microfil® filling was obtained when all the visible blood vessels on the guts appeared totally filled with silicone. We additionally controlled the complete filling of the brain's median sagittal sinus on micro-CTs of decalcified calvarial specimen, and we excluded incompletely filled samples.

2.4. Animal surgery

2.4.1. Anesthesia

Prior to surgery, the rats were anesthetized using a mixture of ketamine (IMALGENE1000®) at 50 mg/kg of body weight and medetomidine (DOMITOR®) at 0.5 mg/kg of body weight. The anesthetized animals were prepared for surgery by shaving and disinfecting the area around the incision site. Each rat received an intraperitoneal injection of buprenorphine (0.05 mg/kg), for peri-operative analgesia, and of saline water (5 mL/kg), to compensate for fluid losses during surgery.

2.4.2. Surgical procedure

Each rat was transferred onto a heating pad (maintained at 37 °C) on the operating field. An L-shape skin flap was raised and periosteum was reflected. Circular, bicortical, bone defects were drilled on each calvarium using trephines under constant irrigation with physiological saline. Each 8-mm-diameter CSD was centered on the intersection of sagittal and coronal sutures. The 6-mm diameter defects were centered in the frontal bone anterior to the coronal suture. The 4-mm defects were located in the posterior part of the left parietal bone and the 2-mm defects in the posterior part of the right parietal bone. Each calvarial fragment was lifted using an elevator to avoid damaging the dura. Each defect was thoroughly rinsed with physiological saline. The periosteum and skin were sutured and closed in two layers using resorbable vicryl suture 5–0 and 3–0, respectively.

2.4.3. Post-surgery animal care

Each animal received a subcutaneous injection of buprenorphine (0.05 mg/kg) at 30 min, 12, 24, and 36 h after surgery (to maintain continued postoperative analgesia), and was monitored for any complications or abnormal behavior daily during the postoperative period.

2.5. Microfil® injection procedures

To visualize blood vessels, the 24-week old rats were injected with Microfil® compound (Flowtech, Carver, MA, USA). Each animal was deeply anesthetized (as described in § 2.3). The skin from the thorax and the rib cage of each animal was incised to access the heart, and 0.3 mL heparin (5.000 UI/mL) was injected directly in the left ventricle. After 10 min, the left ventricle was catheterized using a 22G canula and the right atrium was cut to remove the contained blood. First, animals were perfused with isotonic saline (200 mL) containing heparin (100 UI/mL) to rinse the blood vessels. Animals were then perfused *via* the

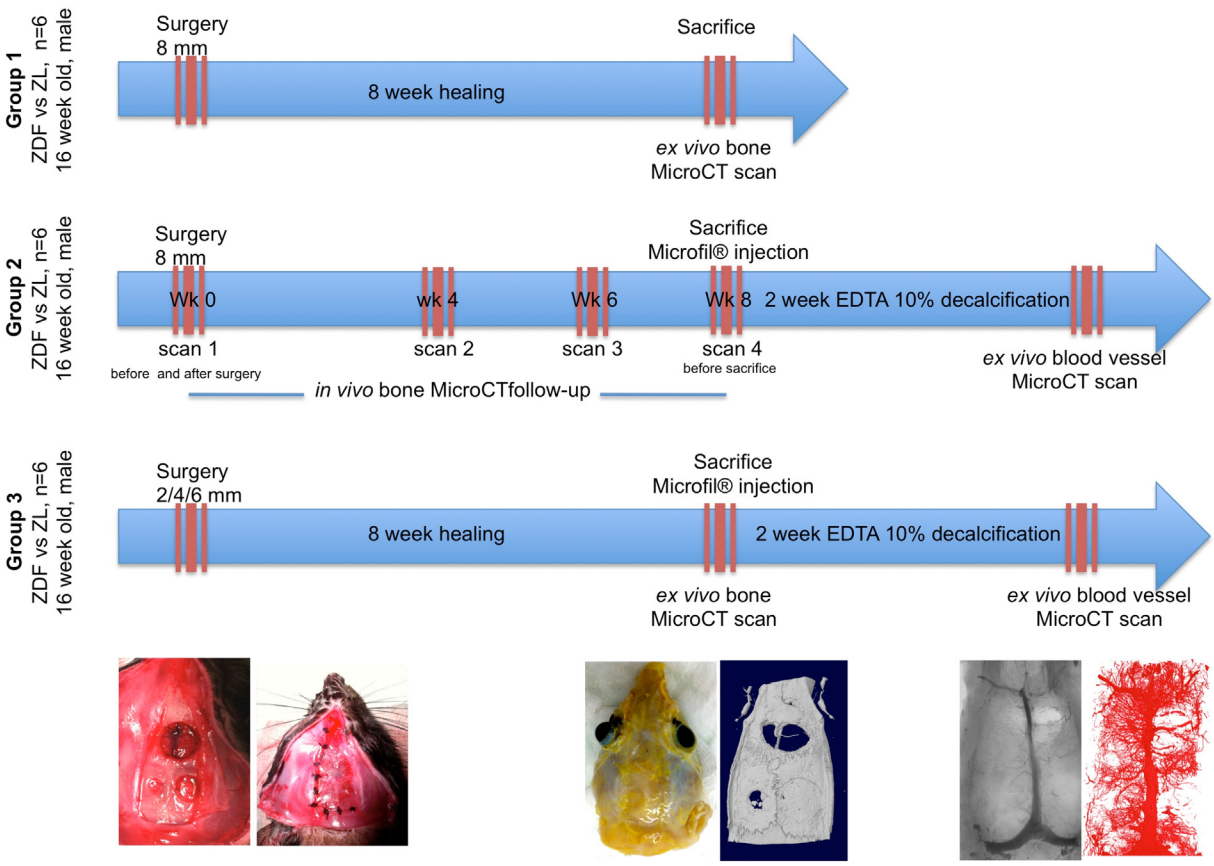


Fig. 1. Experimental design: overview of the procedures that different groups of rat underwent.

intracardiac canula with 50 mL of Microfil® (prepared according to the manufacturer's instructions using 20 mL of Microfil®, 25 mL of the specific diluent, and 5 mL of the specific curing agent). The pressure during filling was of approximately 120 mmHg in order to force Microfil® into the capillary networks without extravasation into the surrounding tissue. Perfused animals were stored at 4 °C for 45 min to allow Microfil's primary setting and then the calvaria was harvested and fixed in formalin for 48 h before scanning.

2.6. Micro-CT imaging and computation

2.6.1. MicroCT settings

Three different micro-CT settings were used in this study (see Supp. data Table 1). MicroCT parameters are reported according to international guidelines [29].

2.6.1.1. In vivo bone settings. For the *in vivo* micro-CT follow-up of bone formation within the calvaria defects, the rats were anesthetized using isofluorane (60% isofluorane; 40% oxygen), placed in the prone position in the micro-CT, and scanned immediately after surgery (day 0) and at 4-, 6- and 8-weeks post-surgery. Images were acquired using Skyscan 1176 High-Resolution micro-CT scanner (Bruker, Belgium), with voltage 50 kV, current 475 μA, exposure for 40 ms and 0.7 degree rotation-step settings, through a 0.5 mm-thick aluminum filter. The initial pixel size with these settings was 35.4 μm. These data are expressed as the difference between the bone surface or volume of the bone measured at the designated week post surgery, and the initial bone surface or volume present in the defect at day 0.

2.6.1.2. Ex vivo bone settings. For the *ex vivo* micro-CT analysis of bone formation within the defects, the calvaria were excised at 8-week post-surgery, fixed in formalin, and scanned using Skyscan1172 High-Resolution Micro-CT with 10 μm resolution, at 80 kV, 100 mA, 200 ms, 0.7 degree rotation step settings, without any filter. The images thus obtained had 26.8 μm pixel size.

2.6.1.3. Ex vivo blood vessel settings. For the *ex vivo* micro-CT determination of intrabony vascular formation, Microfil®-injected, formalin-fixed calvaria explants were first scanned for bone volume and surface area. Because Microfil® and bone had similar radioopacity, decalcification was necessary to visualize the Microfil® separately. For this reason, the bone samples were decalcified using a 14% EDTA (v/v) solution for 2 weeks and imaged using Skyscan1172 CT-scanner at 30 kV, 100 mA, 3700 ms, 0.5 degree rotation step settings, without any filter. The images thus obtained had 3.5 μm pixel size.

2.7. Micro-CT image reconstruction and data computation

The scanned images were reconstructed as a stack of slices of each sample using Nrecon software, 16 bits. **For bone and blood vessels volume computation** within the defect, images were converted to 8 bits, the volume of interest (VOI) was set as a cylinder overlapping the defect with the radius of each original defect and a fixed height of 2 mm according to previously described methods [30]. Bone volume was reported as the amount of binarized object-volume measured within the designated VOI within the threshold gray values 60–255 on CT-an software. Blood vessel volume was reported as the amount of binarized object-volume measured within these VOI within threshold gray values (40–255) on CT-an software. Values regarding the bone or blood vessel thickness, number, and connectivity were calculated using the same thresholds respectively. Though these micro-CT parameters are commonly used to describe trabecular bone [31], they can also be used to investigate 3D network in the healing bone structure of the calvaria or the vasculature [32].

Table 1
Body characteristics of 16 and 24-week-old ZL and ZDF rats.

Age (weeks)	Parameters (units)	ZL	ZDF	p (n = 18)
16	Weight (g)	344.8 ± 4.4	405.5 ± 12.8	< 0.0001****
	Length (cm)	24.9 ± 0.14	24.5 ± 2.3	0.2
24	Weight (g)	387.2 ± 10.3	439.4 ± 16.3	0.049*
	Length (cm)	24.5 ± 0.14	248.6 ± 0.22	0.004**

* $p < 0.05$.
** $p < 0.01$.
**** $p < 0.0001$.

For bone and blood vessels surface computation within the defect, the previously designated VOI was reconstructed in three dimensions using CTvox software to a maximum intensity projection (MIP). A two-dimensional circular projection of the reconstruction was processed using ImageJ software and the new bone surface area was calculated.

2.8. Statistical analysis

Each experiment was conducted using at least 6 rats per group. Numerical data are reported as means ± standard error of the mean (SEM). Mann Withney U tests were used for statistical analyses. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Body weight and blood tests of ZDF and ZL rats

At 16 weeks, the ZDF rats had higher blood glucose levels (by approximately 1.8 fold) and body weight compared to age-matched ZL rats (404.2 ± 13.07 g *vs.* 346.2 ± 4.61 g; $p < 0.001$; Table 1). The 16-week aged rats were operated and during the 8 weeks following surgery both ZDF and ZL rats, gained weight. At 24 weeks of age, the ZDF rats still had significantly ($p < 0.05$) higher (+52.2 g) body weight than the ZL controls (439.4 ± 16.35 g *vs.* 387.2 ± 10.35 g; Table 1). Compared to ZL rats, 24-week aged ZDF rats had higher serum glucose and fructosamine levels (1.75-fold and 1.27-fold, respectively; Table 2). ZDF rats also had elevated serum alkaline phosphatase (2.6-fold) and calcium (1.1-fold) levels but similar phosphate levels compared to age-matched ZL rats.

3.2. The T2DM effect on calvarial bone repair depends on the defect size

Quantitative assessments of new bone formation in the tested calvarial defects were realized by both *ex vivo* and *in vivo* bone micro-CT imaging and analysis. The single scan acquired using *ex vivo* micro-CT (*i.e* one per animal at 8-week post-surgery), showed bone formation in both the ZL and ZDF within 8-mm-diameter defects, especially on the borders of these defects (Fig. 2). There were significant ($p < 0.01$) differences between the ZL and ZDF groups in the bone area (21.76 ± 2.31 mm^2 *vs.* 12.74 ± 1.84 mm^2) and volume (7.16 ± 1.11 mm^3 *vs.* 3.45 ± 0.60 mm^3; $p < 0.01$; Fig. 2A and B). The bone covered 43.31 ± 4. 61% of the initial defect in ZL rats whereas it covered only 25.35 ± 3.67% in ZDF rats (Fig. 2C). Moreover, bone structure thickness (Str.Th), Bone structure number (Str.N), connectivity and Str.Th distribution of the bone within the defects in ZDF rats were decreased significantly ($p < 0.05$; Fig. 2E–I) compared to those within the respective defects in ZL rats. These results provided evidence that, in case of ZDF rats, bone formation in the 8-mm diameter calvaria bone defects was markedly impaired.

At 16 week-old, prior to surgery, compared to ZL, ZDF rats didn't exhibit differences in the tested structural parameters, except for connectivity and the bone mineral density (data not shown). During the 8 post-surgery weeks, *in vivo* micro-CT bone healing follow-up, within the 8-mm-diameter calvaria defects, the ZL and ZDF rats exhibited differences in bone repair kinetics (Fig. 3 A, B, C). At 4 weeks post surgery, the amount of newly formed bone (expressed in terms of volume and surface area within the calvaria defects) was similar both in the ZL and ZDF rats. In fact, new bone formation in ZL rats continued to increase till week 8, whereas in ZDF rats a similar plateau was reached in 4 weeks post-surgery and, subsequently, decreased later. At the 8-weeks end point, the defects in the ZDF rats had significantly ($p < 0.01$) reduced amount of bone; typically 2.87-fold less volume and 3-fold smaller surface area (Fig. 3A and B) Moreover, Str.Th distributions showed different healing patterns in ZL and ZDF during the 8-week time course. ZDF rats have more thin bone structures (150–350 μm) than ZL rat at 4 weeks and their number kept reducing thereafter in ZDF rats while they increased in ZL rats (Fig. 3F-H). Interestingly, micro CT analysis of the calvaria bone prior to surgery, on 16 week-aged rats, displayed no effects of the T2DM condition on the bone micro-architectural parameters except for connectivity density (Fig. 3J–L).

In order to study the impact of diabetes on bone repair in relation to the size of the calvarial defect, various defect sizes (specifically 6, 4 and 2-mm-diameter defects) were made on the same animals in a multi-defect model. At 8 weeks post surgery, micro-CT acquired with *ex vivo* bone settings, revealed bone formation in all defects tested, irrespective of their size or of the diabetic conditions (Fig. 4). Total length bone bridging was observed in all 6-mm diameter defects. The BS/TS percentage was similar 58.62 ± 9.55 *vs.* 71.10 ± 7.21 in ZL and ZDF (Fig. 4). These results imply that T2DM does not affect the amount of bone formation in the case of 6-mm diameter calvaria defect under conditions used in the present study. Complete closures of the calvaria defects were observed in 9/12 of the 4-mm-diameter defects (6/6 in ZL and 3/6 in ZDF; data not shown). Total length bone bridging was observed in 11/12 defects and the BS/TS percentage was similar (96.09 ± 2.02 *vs.* 92.69 ± 5.81) in the ZL and ZDF rats, respectively (Fig. 4). Complete closure of the 2-mm diameter defects was observed only in 3/12 defects (1/6 of the ZL and 2/6 of the ZDF rats; data not shown). Total length bone bridging was observed in 6/12 defects (2/6 in ZL and 4/6 in ZDF rats). The BS/TS percent values (31.77 ± 17.42 and 51.73 ± 18.39 for the ZL and ZDF rats, respectively) were not significantly different (Fig. 4). It is to be noted that, the 2-mm-defect is among the least filled with newly formed bone. This could be explained by the fact that it is located closer to the periosteal incision.

Table 2
Blood sera levels of glucose, fructosamine, alkaline phosphatase, calcium and phosphate of 24 week-old ZL and ZDF rats.

Blood sera levels (units)	ZL	ZDF	p (n = 14)
Glucose (g/L)	2.7 ± 0.2	4.7 ± 0,5	0.002**
Fructosamine (μmmol/L)	133.7 ± 4.3	175.9 ± 14.6	0.029*
Phosphatase alcaline (U/L)	52.7 ± 2.2	138.4 ± 15.7	0.0001***
Calcium (mg/L)	96.6 ± 2.1	107.7 ± 1.6	< 0.0003***
Phosphate (mmol/L)	2.5 ± 0.2	2.41 ± 0.1	0.7731

****$p < 0.0001$.
* $p < 0.05$.
** $p < 0.01$.
*** $p < 0.01$.

3.3. Angiogenesis during calvarial bone repair in T2DM is reduced in all size defects tested

Blood vessel formation within healed calvaria defects was quantified by perfusing the animal vasculature with Microfil® and scanning it after decalcification. At 8 weeks post-surgery, MIP of vascular structures within the 8-mm diameter calvaria defects showed that compared to the ZL rats, the vascular networks were developed to a smaller extent in the ZDF rats (Fig. 5). Assessment of the vasculature showed

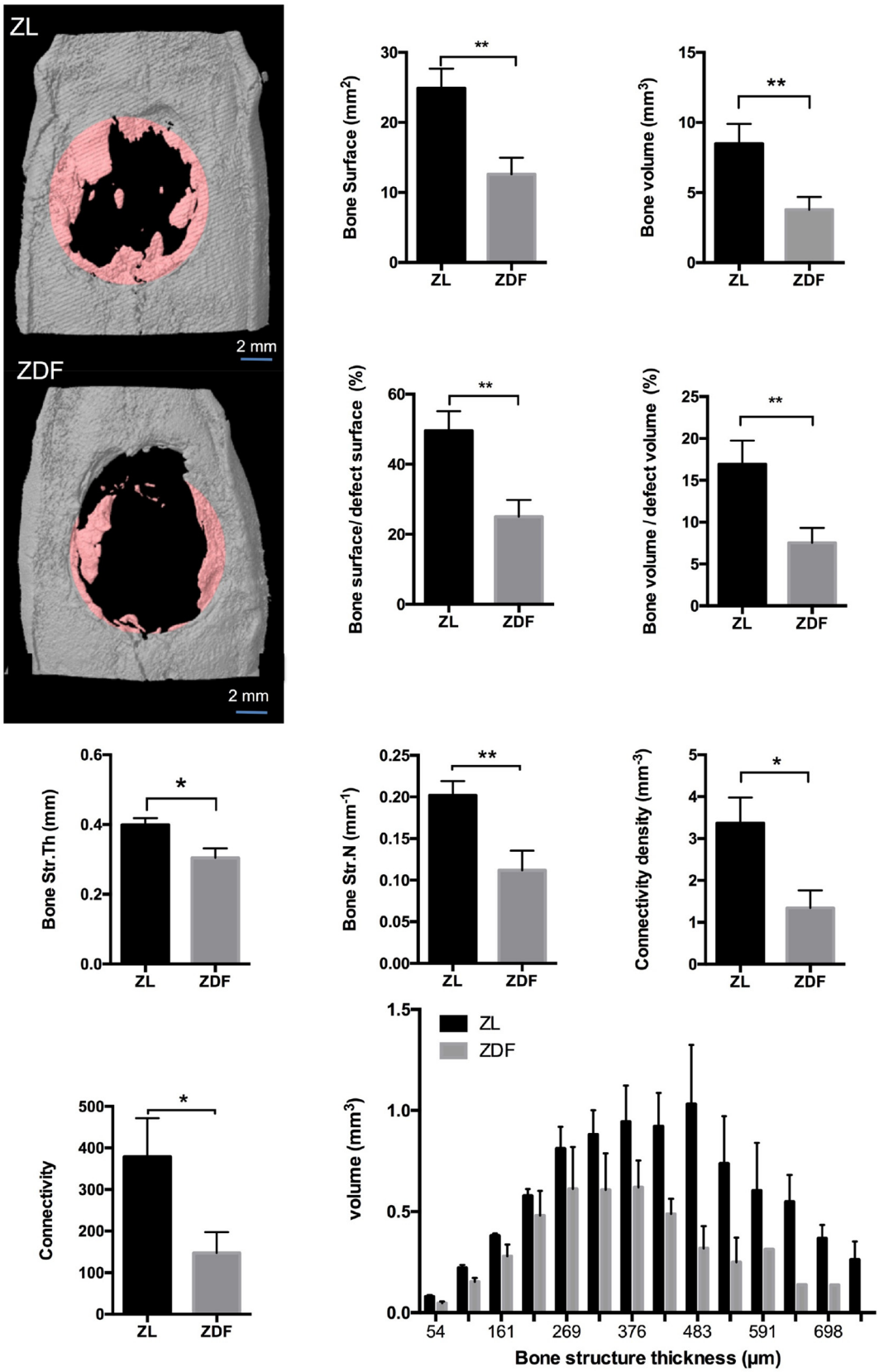


Fig. 2. Micro-CT analysis of bone within 8-mm-diameter calvaria defects 8 weeks post surgery. 3D reconstructions showed healed bone especially at borders of the defect. (A) Total bone surface area (mm^2) and (B) volume (mm^3); (C) bone surface on the initial defect surface (BS/TS) and (D) volume (BV/TV). ZDF rats contained significantly ($p < 0.05$) less bone within the 8-mm critical size defects. (E) Total Str.Th, (F) Str.N, (G) connectivity density, and (H) connectivity of the bone were significantly ($p < 0.05$) decreased in the critical-size defects in ZDF rats. (I) # Distributions of the Tb.Th size were significantly ($p < 0.05$) different in ZDF rats. Data are mean ± SEM ($n = 6$/group). *$p < 0.05$; **$p < 0.01$. Scale bar = 2 mm.

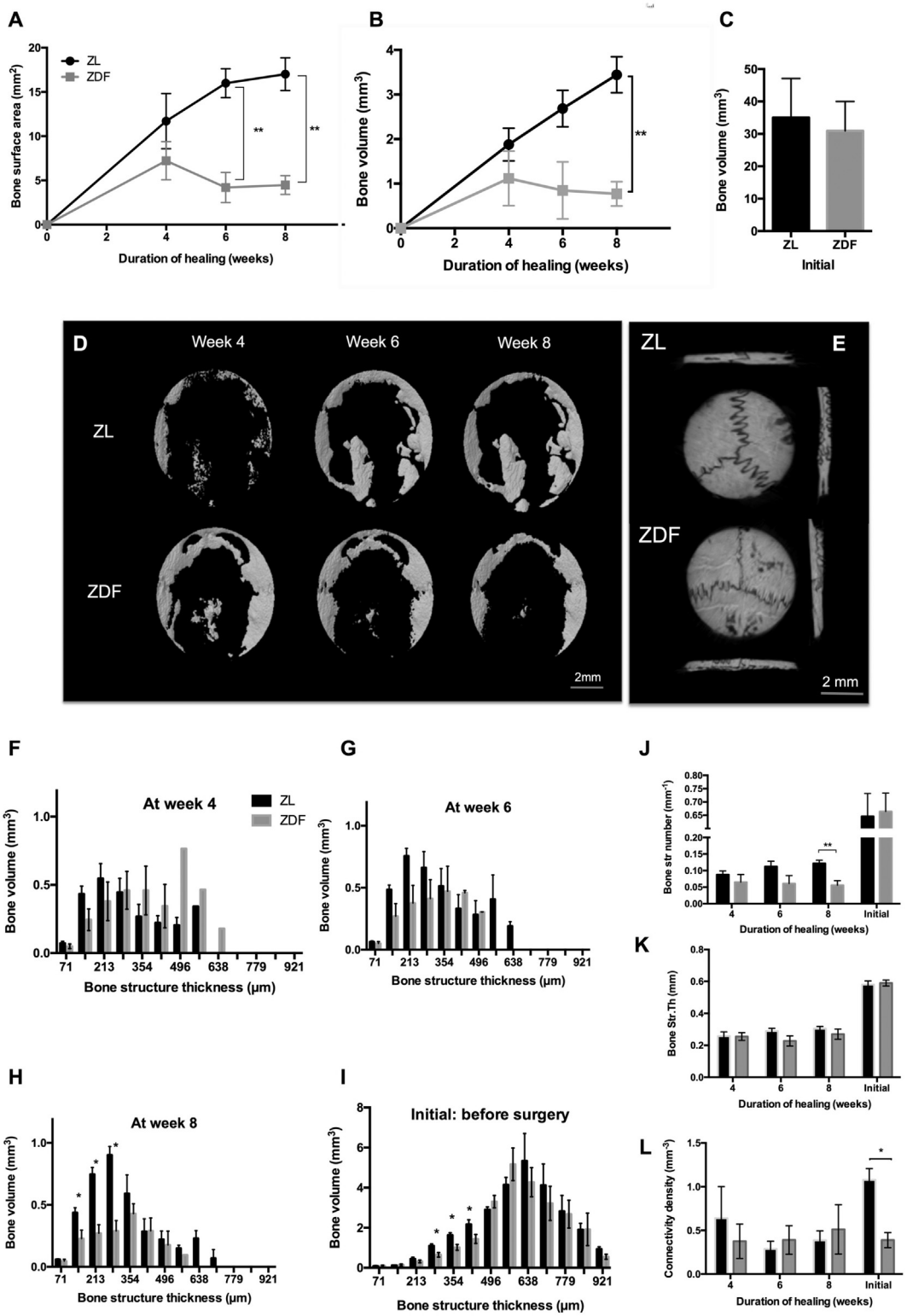


Fig. 3. Micro-CT follow-up of the bone within 8-mm-diameter calvaria defects during 8 weeks. ZL and ZDF rats were scanned immediately (T0) and 4, 6 and 8 weeks after surgery. The amount of bone was expressed as the difference between the amount of bone present at the aforementioned time points and T0. Kinetics of newly–formed bone surface area (mm^2) (A) and volume (mm^3) (B). At 8-weeks, ZDF defects have significantly reduced amount of bone whereas there were no such differences before surgery. Representative maximum intensity projection (MIP) of the bone (D) within the defect at each time point and (E) before surgery. At 4-week, the distributions of the bone Str.Th size were different (F–I) in ZL and ZDF defects. Bone's total Str.N (J), Str.Th (K), connectivity density (L). Data are mean ± SEM ($n = 6$/group); $*p < 0.05$); $**p < 0.01$; Scale bar = 2 mm.

significant ($p < 0.01$) differences between the ZL and ZDF rats in terms of projected surface area (7.82 ± 0.71 mm^2 *vs.* 3.56 ± 0.56 mm^2; Fig. 5A) and total volume (0.41 ± 0.05 mm^3 *vs.* 0.12 ± 0.02 mm^3; Fig. 5C) of the vessels. The blood vessels covered 15.57 ± 1.43% in ZL rats whereas they covered 7.09 ± 1.12% of the initial calvaria defect in the ZDF rats, (Fig. 5B).

Def size		ZL	ZDF	*p* (n=6)
2mm	Bone volume (mm^3)	0.24 ± 0.14	0.73 ± 0.28	0.38
	Bone surface (mm^2)	1 ± 0.55	1.62 ± 0.578	0.67
	Bone surface/defect surface (%)	31.77 ± 17.42	51.73 ± 18.39	0.67
4mm	Bone volume (mm^3)	4.58 ± 0.27	4.22 ± 0.47	0.30
	Bone surface (mm^2)	12.07 ± 0.25	11.64 ± 0.73	0.01*
	Bone surface/defect surface (%)	96.09 ± 2.02	92.69 ± 5.81	0.01*
6mm	Bone volume (mm^3)	12.33 ± 2.05	13.99 ± 0.66	0.67
	Bone surface (mm^2)	16.56 ± 2.70	20.09 ± 2.04	0.99
	Bone surface/defect surface (%)	58.62 ± 9.55	71.10 ± 7.21	0.99

Fig. 4. Micro-CT analysis of bone in 6-, 4-, 2- mm-diameter defects at 8-week post surgery. Explants were imaged using *ex vivo* micro-CT settings. Representative maximum intensity projection (MIP) images of rat calvaria defects (A) and quantification data (B) showed similar bone formation in the ZL and ZDF rat groups. Data are mean ± SEM ($n = 6$/group). Scale bar = 2 mm.

Compared to ZL, the ZDF rats displayed markedly reduced angiogenesis in the 8-mm critical size calvaria defects. Moreover, blood vessel formation was also reduced in the 6-, 4- and 2-mm diameter calvaria defects in the ZDF rats, at 8 weeks post surgery (Fig. 6). In these cases, vascular networks were less spread and had fewer vessels in number (Fig. 6A–C). Significant ($p < 0.01$) differences were observed between the ZL and ZDF rats in terms of the blood vessel area, and volume of the total vasculature within 6-, 4-, and 2-mm healed defects (Fig. 6A–I). Independent of the size, the calvaria defects in the ZDF rats displayed at least 2.25-fold less blood surface area (Fig. 6A–F) and 2-

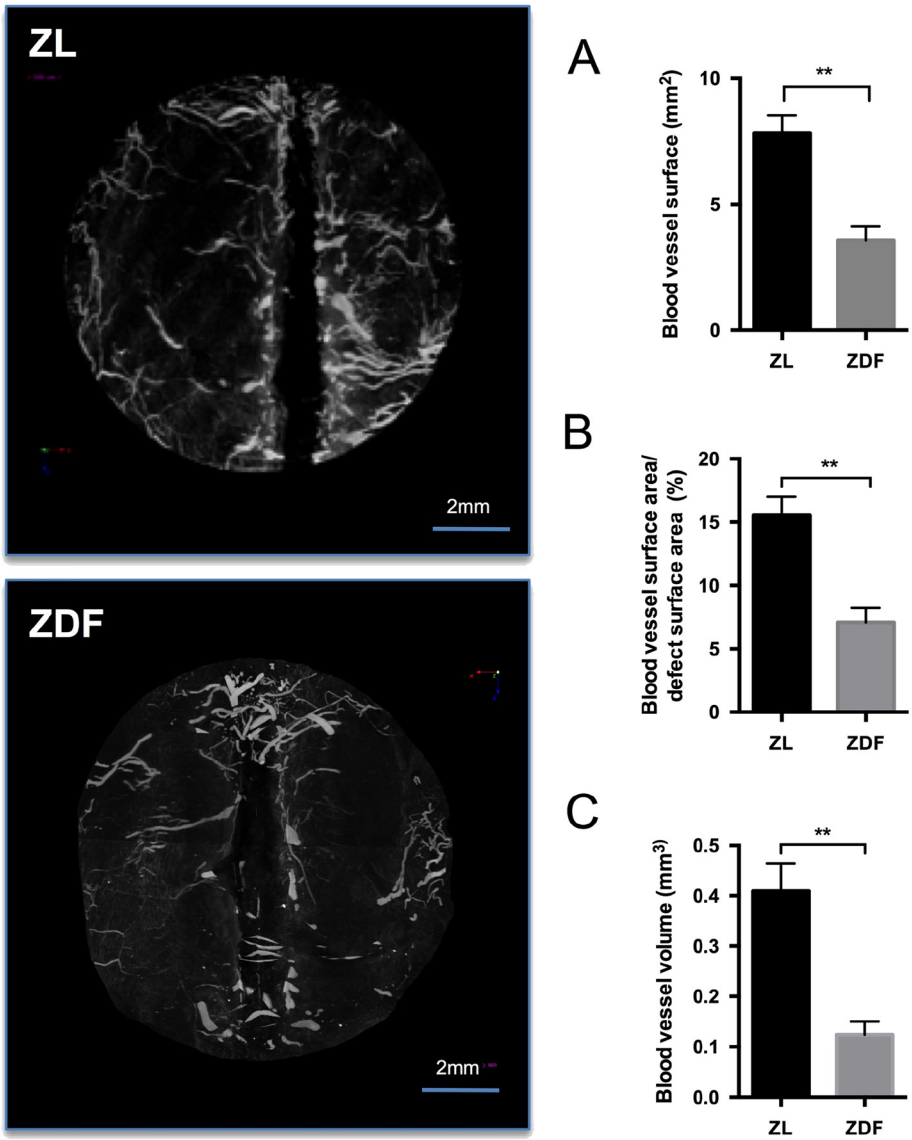


Fig. 5. Micro-CT vasculature analysis in 8-mm-diameter-size-defects 8-week post surgery. Microfil perfused samples of 8-mm critical-size calvaria defects rats were scanned after decalcification using *ex vivo* blood vessel settings. Representative MIP of vascular structures within the healed defect exhibited fewer developed networks in the ZDF than in the ZL rat defects. Blood vessel surface (mm^2) (A), Blood vessel surface reported to the initial defect surface (%) (B), and total blood vessel volume (mm^3) (C) were significantly reduced in the ZDF rats. Data are mean ± SEM ($n = 3$/group). $^*p < 0.05$; $^{***}p < 0.001$. Scale bar = 2 mm.

fold lower volume (Fig. 6G-I) than the respective results obtained from defects in the ZL rats.

Moreover, vascular thickness distributions were significantly different in the ZDF rats when compared to the ZL ones regardless of the defect size (Fig. 7A,E,I). Despite the fact that no differences were observed regarding the amount of bone and of the parameters monitored within the calvaria defects between the ZDF and ZL rats, the ZDF healed defects exhibited significantly lower vascular repair than the ZL rats in this multidefect model.

3.4. Discussion

Despite the clinical need for an increasing T2DM population, nowledge about the impact of T2DM on osteogenic- [13,25], and angiogenic - repair in long bones is poor [33,34] and in the case of the craniomaxillofacial area is rare [35]. This fact motivated the present study to investigate bone and vasculature characteristics, in calvarial defects of various sizes (up to the critical size (CS) in ZDF rats with established diabetes. The results demonstrated, for the first time, that in the long-standing T2DM microenvironment, the bone formation in healed calvaria was significantly ($p < 0.05$) reduced only in 8-mm CS defects; whereas the vascular network was reduced in all ZDF defects regardless of the defect size, even in SCSD.

In order to determine the "critical" defect size in the ZDF rat model, we used micro-CT analysis and compared at first, bone healing as function of increasing size defects in ZL and ZDF rats. Consistent with previous reports [23], this study showed that, in ZL and ZDF rats, the amount of newly-formed bone decreased with the increasing size of the calvaria defect. At 8 weeks post-surgery, and regardless of the presence of diabetic condition, complete closures and significant new bone formation were observed in 6-, 4-, 2-mm diameter defects. The results obtained for the 2- and 4 mm-diameter defects are consistent with other reports in the literature [17,36,37]. In the case of the 6-mm-diameter defects, the present results contradict the published reports [23,38] but direct comparisons are not possible due to differences in the chosen animal strain, the number of defects in the calvarium, the anatomical location with or without involvement of the midsagittal suture [39–43] and differences in the evaluation methods [40,41]. In the case of the

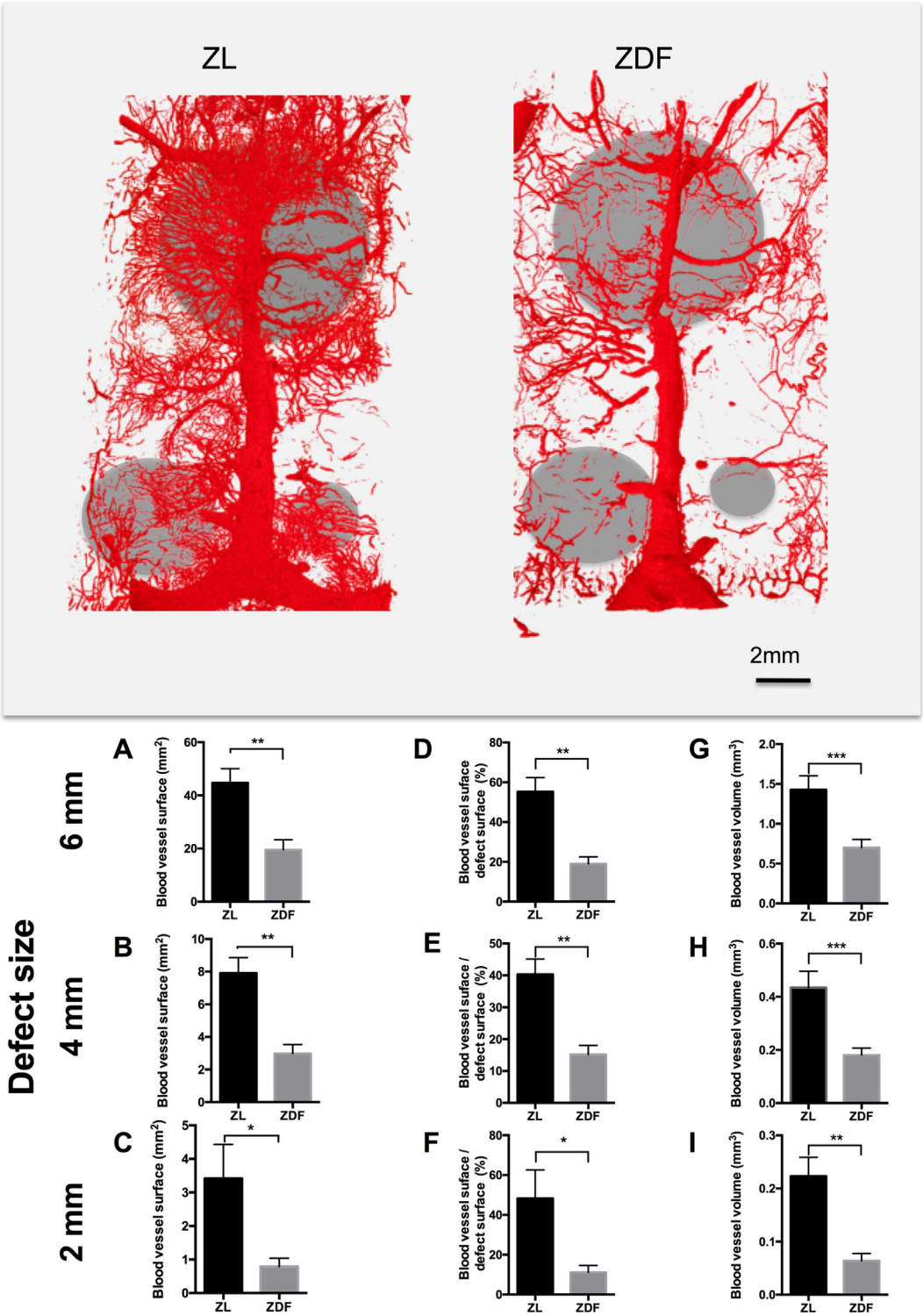


Fig. 6. Micro-CT vasculature analysis in 6-, 4- and 2 mm-diameter defects at 8-week post surgery.
Representative 3D reconstructions of the whole calvaria vasculature scanned after microfil injection and decalcification using *ex vivo* blood vessel settings. Blood vessels showed less developed network in ZDF rats compared to ZL rats. Total vasculature surface (A-B-C), its projected surface area reported to the initial defect surface (D-E-F) and vasculature volume (mm^3) (G-H-I) were significantly reduced within healed defects in ZDF compared to ZL rats. Data are mean ± SEM ($n = 6$). *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, *** $p < 0.001$*. The scale = 2 mm.

8 mm-diameter calvaria defects irrespective of the diabetic condition new bone formation was low and had similar ranges to that described previously [23,28,44]. In ZL and ZDF rats, only the 8-mm-diameter defects could be considered of CS, and therefore, the only one relevant for evaluating bone repair strategies for craniomaxillofacial defects.

Interestingly, the results from the present study showed that bone formed in ZDF rats was reduced only in the case of CSD compared to results obtained from ZL rats and revealed changes in the volume and structure of healed bone. These findings support the reduced calvarial bone healing in CSD described in the case of the T1DM [45–47]. Only a

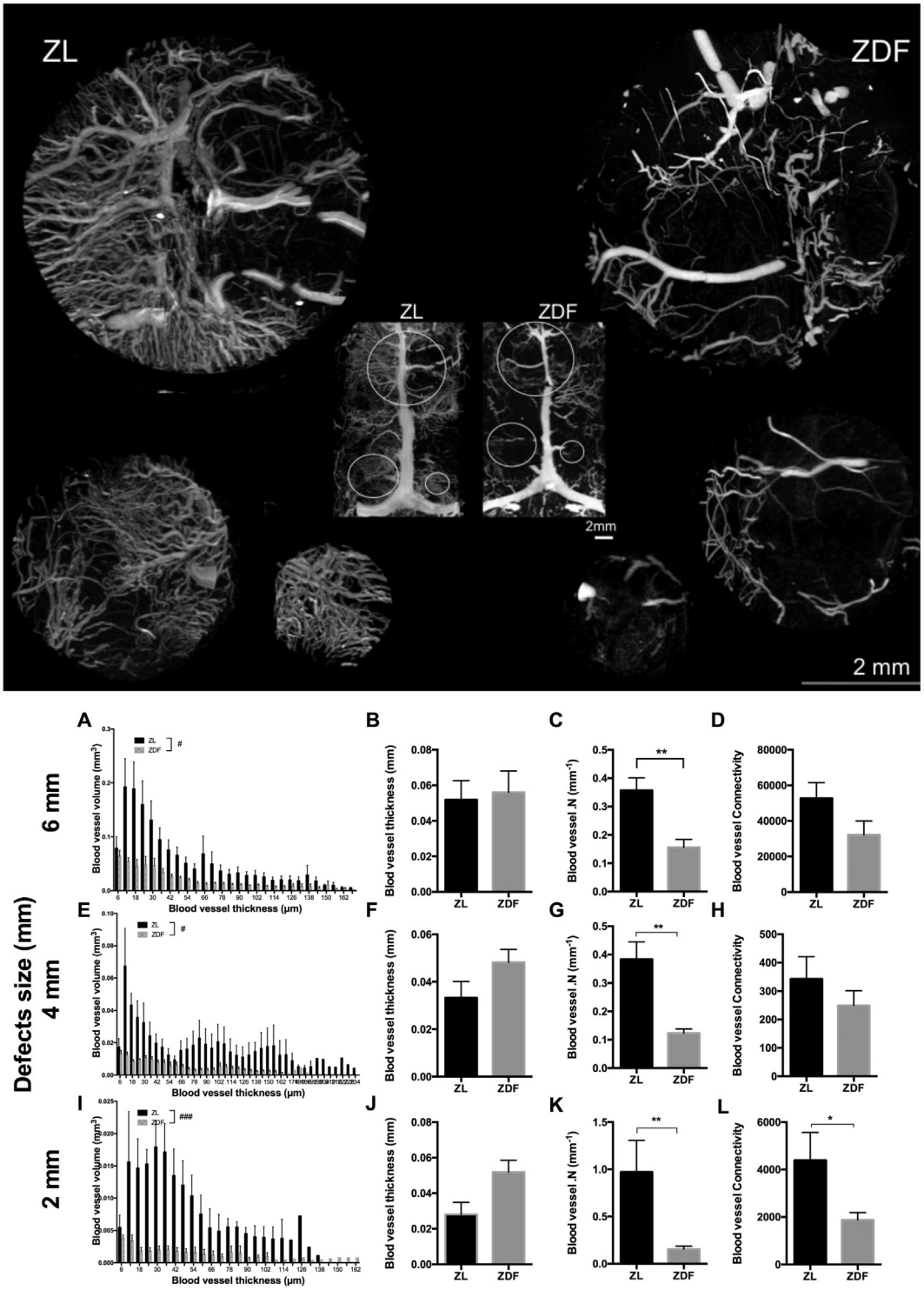


Fig. 7. Blood vessels network parameters in 6–4- 2 mm-diameter size-defects.
Representative MIP images of vascular structures within each healed defect. Blood vessels thickness distribution (A, E, I), Blood vessel thickness (B, F, J) number (C, G, K), and connectivity (D, H, L) for 6- 4- and 2 mm-diameter defects respectively. Vascular thickness distributions in the ZDF rats were significantly different from the distributions in the ZL rats in all defect sizes tested. Data are mean ± SEM ($n = 6$). Distributions are significantly different $^{\#}p < 0.05$; $^{\#\#\#}p < 0.001$; $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$. Scale bar = 2 mm.

few of the earlier studies about the T2DM condition substantiated the impairment in long bone repair in ZDF diabetic rats [13] and mice [33], in femoral [13], tibial defects [33] and distraction model [48]. The bone healing was reported to be dependent on the defect size and impaired only in large femoral defects in BB/OK rats [25]. Taken together, these data support the inference that the size of the bone defect is an important parameter, which needs to be taken into account in diabetic bone healing studies.

Moreover, our results revealed that the vascular network within healed calvarial defects was significantly less developed and with distinct morphological pattern in ZDF rats compared to the ZL ones. These results are consistent with changes in bone vasculature and circulation

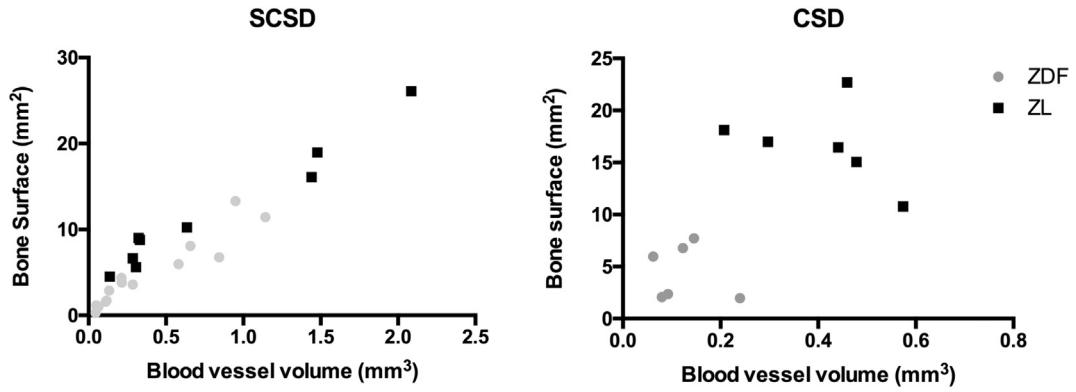


Fig. 8. correlation between vasculature volume repair and bone surface repair in SCSD (A) and in CSD (B).

described in T2DM [14,15,27]. Impaired angiogenesis in diabetes could result from endothelial cell dysfunction, altered progenitor cell mobilization, angiogenic factor deficiency and compromised blood flow [49] but elucidating the mechanism is out of the scope of the present study.

Recent studies have reported that impaired vasculature is strongly associated with various T2DM related bone complications [14,50]; and especially with bone regeneration in long bones [33,34]. The present study, showing that impaired bone regeneration was found along with a less developed vascular network in ZDF calvarial CSD compared to the ZL ones, supports this association [34]; but also stresses the importance of the defect-size. Indeed, capillary bed formation is impaired in all ZDF defects, CSDs and SCSDs, while bone formation is only impaired in ZDF CSD. On the one hand, the blood vessel volume/bone surface ratio remains similar in all SCSDs (Fig. 8A), irrespective of the size or the diabetic status. On the other hand, in CSDs this ratio varies; ZDF and ZL rats have reached their respective maximum bone surface plateau (Fig. 8B). These findings suggest that the size of the defect is also a relevant parameter besides T2DM. Capillary bed formation and blood circulation from one side of the defect to the other, has been described to be crucial in the bone repair of calvaria CSD [17]; our study refines this statement in suggesting that in ZDF/ZL rats, bone defects smaller than 6 mm were not impacted by the size criteria. Therefore the impaired bone repair seen in the present study may be attributed to the altered recruitment of osteoblastic precursor cells and differentiation in the area of the defect under diabetic conditions [13].

To the best of our knowledge, the present study is the first to use micro-CT for the 3D mapping of the total microvasculature of the healing calvaria, up to capillary size (6–8 μm) with regular laboratory equipment. Indeed, in a previous similar study, to investigate both bone and microvascular parameters in T2DM calvaria, the authors concluded that scan resolution might have been an issue if the detection of capillary-sized vessels was desired. Capillary-size vessels (smaller than 12 μm) were not quantified at their resolution (12 μm), which, according to the authors, could have accounted for the lack of significant difference in blood vessel volume among the groups [44]. The settings in our study, allowing both total capillary bed scanning (3,5 μm resolution) and fine bone imaging of the whole calvaria could help further studies in the field, considering that microvasculature impairment seems to be a key factor in bone healing issues (or in other tissues in T2DM environment).

Microfil perfusion technique did not allow hemodynamic assessment of the blood flow as reported in previous studies [14]; and the 8 weeks-post-surgery time point used in the present study, did not allow the observation of the microvascular parameters during the early phases of healing. These two limitations should be taken into consideration as basis for future research endeavors to improve knowledge about the dynamics and relationship between osteogenesis and angiogenesis in endomembraneous diabetic bone repair.

4. Conclusion

Overall, results of the present study revealed impaired bone repair and angiogenesis in a relevant diabetic rodent model; which match the compromised bone healing observed in diabetic patients. These findings provide a new insight into the impact of T2DM on bone-vascular relationship in intramembranous bone healing and highlight the effect of the defect size on bone repair outcomes in a diabetic environment.

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.04.009.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the help of Prof. Rena Bizios for critical review of the paper. This study was supported by the “Fondation de l'Avenir” (ET3-694), and the Institut Français pour la Recherche Odontologique (IFRO).

References

[1] C. Hamann, S. Kirschner, K.-P. Günther, L.C. Hofbauer, Bone, sweet bone—-osteoporotic fractures in diabetes mellitus, Nat. Rev. Endocrinol. 8 (2012) 297–305, http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2011.233.
[2] A.C. Looker, M.S. Eberhardt, S.H. Saydah, Diabetes and fracture risk in older U.S. adults, Bone 82 (2016) 9–15, http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2014.12.008.
[3] A.V. Schwartz, Epidemiology of fractures in type 2 diabetes, Bone 82 (2016) 2–8, http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2015.05.032.
[4] D.E. Sellmeyer, R. Civitelli, L.C. Hofbauer, S. Khosla, B. Lecka-Czernik, A.V. Schwartz, Skeletal metabolism, fracture risk, and fracture outcomes in type 1 and type 2 diabetes, Diabetes 65 (2016) 1757–1766, http://dx.doi.org/10.2337/db16-0063.
[5] M. Retzepi, N. Donos, The effect of diabetes mellitus on osseous healing, Clin. Oral Implants Res. 21 (2010) 673–681, http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0501.2010.01923.x.
[6] H. Jiao, E. Xiao, D.T. Graves, Diabetes and its effect on bone and fracture healing, Curr. Osteoporos. Rep. 13 (2015) 327–335, http://dx.doi.org/10.1007/s11914-015-0286-8.
[7] V. Martin, A. Bettencourt, Bone regeneration: biomaterials as local delivery systems with improved osteoinductive properties, Mater. Sci. Eng. C 82 (2018) 363–371, http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.038.
[8] A.K. Picke, I.G. Alaguero, G.M. Campbell, C.C. Glüer, J. Salbach-Hirsch, M. Rauner, et al., Bone defect regeneration and cortical bone parameters of type 2 diabetic rats are improved by insulin therapy, Bone 82 (2016) 108–115, http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2015.06.001.
[9] C. Hamann, A.-K. Picke, G.M. Campbell, M. Balyura, M. Rauner, R. Bernhardt, et al., Effects of parathyroid hormone on bone mass, bone strength, and bone regeneration in male rats with type 2 diabetes mellitus, Endocrinology 155 (2014) 1197–1206, http://dx.doi.org/10.1210/en.2013-1960.
[10] C. Hamann, M. Rauner, Y. Höhna, R. Bernhardt, J. Mettelsiefen, C. Goettsch, et al., Sclerostin antibody treatment improves bone mass, bone strength, and bone defect regeneration in rats with type 2 diabetes mellitus, J. Bone Miner. Res. 28 (2013) 627–638, http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.1803.
[11] M. Pereira, S. Gohin, N. Lund, A. Hvid, P.J. Smitham, M.J. Oddy, et al., Sclerostin does not play a major role in the pathogenesis of skeletal complications in type 2 diabetes mellitus, Osteoporos. Int. (2016) 1–12, http://dx.doi.org/10.1007/s00198-016-3718-0.
[12] L. Karim, M.L. Bouxsein, Effect of type 2 diabetes-related non-enzymatic glycation on bone biomechanical properties, Bone 82 (2016) 21–27, http://dx.doi.org/10.

1016/j.bone.2015.07.028.
[13] C. Hamann, C. Goettsch, J. Mettelsiefen, V. Henkenjohann, M. Rauner, U. Hempel, et al., Delayed bone regeneration and low bone mass in a rat model of insulin-resistant type 2 diabetes mellitus is due to impaired osteoblast function, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 301 (2011) E1220–E1228, http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00378.2011.
[14] J.N. Stabley, R.D. Prisby, B.J. Behnke, M.D. Delp, Type 2 diabetes alters bone and marrow blood flow and vascular control mechanisms in the ZDF rat, J. Endocrinol. 225 (2015) 47–58, http://dx.doi.org/10.1530/JOE-14-0514.
[15] A. Oikawa, M. Siragusa, F. Quaini, G. Mangialardi, R.G. Katare, A. Caporali, et al., Diabetes mellitus induces bone marrow microangiopathy, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 30 (2010) 498–508, http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.200154.
[16] M. Kampschulte, G.A. Krombach, D.C. Richards, J. Sender, K.S. Lips, U. Thormann, et al., Neovascularization of osteoporotic metaphyseal bone defects: a morphometric micro-CT study, Microvasc. Res. 105 (2016) 7–14, http://dx.doi.org/10.1016/j.mvr.2015.10.005.
[17] A. Udagawa, S. Sato, A. Hasuike, M. Kishida, Y. Arai, K. Ito, Micro-CT observation of angiogenesis in bone regeneration, Clin. Oral Implants Res. 24 (2012) 787–792, http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0501.2012.02458.x.
[18] C. Huang, V.P. Ness, X. Yang, H. Chen, J. Luo, E.B. Brown, et al., Spatiotemporal analyses of osteogenesis and angiogenesis via intravital imaging in cranial bone defect repair, J. Bone Miner. Res. 30 (2015) 1217–1230, http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.2460.
[19] K.K. Sivaraj, R.H. Adams, Blood vessel formation and function in bone, Development 143 (2016) 2706–2715, http://dx.doi.org/10.1242/dev.136861.
[20] Hyperglycemia Inhibits Cardiac Stem Cell–Mediated Cardiac Repair and Angiogenic Capacity, (2014), pp. 1–18, http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007908/-/DC1.
[21] K.T. Nguyen, A.K. Seth, S.J. Hong, M.R. Geringer, P. Xie, K.P. Leung, et al., Deficient cytokine expression and neutrophil oxidative burst contribute to impaired cutaneous wound healing in diabetic, biofilm-containing chronic wounds, Wound Repair Regen. 21 (2013) 833–841, http://dx.doi.org/10.1111/wrr.12109.
[22] A.-K. Picke, J. Salbach-Hirsch, V. Hintze, S. Rother, M. Rauner, C. Kascholke, et al., Sulfated hyaluronan improves bone regeneration of diabetic rats by binding sclerostin and enhancing osteoblast function, Biomaterials 96 (2016) 11–23, http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.04.013.
[23] A. Vajgel, N. Mardas, B.C. Farias, A. Petrie, R. Cimões, N. Donos, A systematic review on the critical size defect model, Clin. Oral Implants Res. 25 (2014) 879–893, http://dx.doi.org/10.1111/clr.12194.
[24] P.S. Gomes, M.H. Fernandes, Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies, Lab. Anim. 45 (2011) 14–24, http://dx.doi.org/10.1258/la.2010.010085.
[25] N. Follak, I. Kl ting, E. Wolf, H. Merk, Improving metabolic control reverses the histomorphometric and biomechanical abnormalities of an experimentally induced bone defect in spontaneously diabetic rats, Calcif. Tissue Int. 74 (2004) 551–560, http://dx.doi.org/10.1007/s00223-003-0069-6.
[26] Etgen_2000_ZDF_profiling, (2012) 1–5.
[27] R.D. Prisby, J.M. Swift, S.A. Bloomfield, H.A. Hogan, M.D. Delp, Altered bone mass, geometry and mechanical properties during the development and progression of type 2 diabetes in the Zucker diabetic fatty rat, J. Endocrinol. 199 (2008) 379–388, http://dx.doi.org/10.1677/JOE-08-0046.
[28] P.P. Spicer, J.D. Kretlow, S. Young, J.A. Jansen, F.K. Kasper, A.G. Mikos, Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect, Nat. Protoc. 7 (2012) 1918–1929, http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2012.113.
[29] M.L. Bouxsein, S.K. Boyd, B.A. Christiansen, R.E. Guldberg, K.J. Jepsen, R. Müller, Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography, J. Bone Miner. Res. 25 (2010) 1468–1486, http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.141.
[30] J.U. Umoh, A.V. Sampaio, I. Welch, V. Pitelka, H.A. Goldberg, T.M. Underhill, et al., In vivo micro-CT analysis of bone remodeling in a rat calvarial defect model, Phys. Med. Biol. 54 (2009) 2147–2161, http://dx.doi.org/10.1088/0031-9155/54/7/020.
[31] Q. Xu, B. Teng, C. Yu, J. Li, L. Song, Y.-X. Lai, et al., Investigation of angiogenesis in bioactive 3-dimensional poly(D, L-lactide-co-glycolide)/nano-hydroxyapatite scaffolds by in vivo multiphoton microscopy in murine calvarial critical bone defect, Acta Biomater. 42 (2016) 389–399, http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2016.06.024.
[32] M.L. Bouxsein, S.K. Boyd, B.A. Christiansen, R.E. Guldberg, K.J. Jepsen, R. Müller, Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography, J. Bone Miner. Res. 25 (2010) 1468–1486, http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.141.
[33] M.L. Brown, K. Yukata, C.W. Farnsworth, D.-G. Chen, H. Awad, M.J. Hilton, et al., Delayed fracture healing and increased callus adiposity in a C57BL/6J murine model of obesity-associated type 2 diabetes mellitus, PLoS One 9 (2014) e99656–11, , http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0099656.
[34] C. Wallner, J. Schira, J.M. Wagner, M. Schulte, S. Fischer, T. Hirsch, et al., Application of VEGFA and FGF-9 enhances angiogenesis, osteogenesis and bone remodeling in type 2 diabetic long bone regeneration, PLoS One 10 (2015) e0118823–19, , http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0118823.
[35] A. Conte, B. Ghiraldini, R.C. Casarin, M.Z. Casati, S.P. Pimentel, F.R. Cirano, et al., Impact of type 2 diabetes on the gene expression of bone-related factors at sites receiving dental implants, Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 44 (2015) 1302–1308, http://dx.doi.org/10.1016/j.ijom.2015.06.001.
[36] T.B. Crump, F. Rivera-Hidalgo, J.W. Harrison, F.E. Williams, I.Y. Guo, Influence of three membrane types on healing of bone defects, Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 82 (1996) 365–374.
[37] G.M. Cooper, M.P. Mooney, A.K. Gosain, P.G. Campbell, J.E. Losee, J. Huard, Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect, Plast. Reconstr. Surg. 125 (2010) 1685–1692, http://dx.doi.org/10.1097/PRS.0b013e3181cb63a3.
[38] A.K. Gosain, L. Song, P. Yu, B.J. Mehrara, C.Y. Maeda, L.I. Gold, et al., Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-beta isoforms, Plast. Reconstr. Surg. 106 (2000) (360–71–discussion 372).
[39] A.S. Plachokova, J. van den Dolder, P.J. Stoelinga, J.A. Jansen, Early effect of platelet-rich plasma on bone healing in combination with an osteoconductive material in rat cranial defects, Clin. Oral Implants Res. 18 (2007) 244–251, http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01327.x.
[40] L. Dupoirieux, D. Pourquier, M.C. Picot, M. Neves, The effect of pentosan polysulphate on bone healing of rat cranial defects, J. Craniomaxillofac. Surg. 27 (1999) 314–320, http://dx.doi.org/10.1054/jcms.1999.0901.
[41] M.E. Pryor, J. Yang, G. Polimeni, K.-T. Koo, M.J. Hartman, H. Gross, et al., Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: radiographic observations, J. Periodontol. 76 (2005) 1287–1292, http://dx.doi.org/10.1902/jop.2005.76.8.1287.
[42] J.P.M. Issa, H.L.A. Defino, Y.C.L. Pereira, J.C. Netto, W. Sebald, M.V.L.B. Bentley, et al., Bone repair investigation using rhBMP-2 and angiogenic protein extracted from latex, Microsc. Res. Tech. 75 (2012) 145–152, http://dx.doi.org/10.1002/jemt.21037.
[43] G. Gómez, S. Korkiakoski, M.-M. González, S. Länsman, V. Ellä, T. Salo, et al., Effect of FGF and polylactide scaffolds on calvarial bone healing with growth factor on biodegradable polymer scaffolds, J. Craniofac. Surg. 17 (2006) 935–942, http://dx.doi.org/10.1097/01.scs.0000231624.87640.55.
[44] Z.S. Patel, S. Young, Y. Tabata, J.A. Jansen, M.E.K. Wong, A.G. Mikos, Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model, Bone (2008) 1–10, http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2008.06.019.
[45] Y.C. Shyng, H. Devlin, P. Sloan, The effect of streptozotocin-induced experimental diabetes mellitus on calvarial defect healing and bone turnover in the rat, Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 30 (2001) 70–74, http://dx.doi.org/10.1054/ijom.2000.0004.
[46] R.B. Santana, L. Xu, H.B. Chase, S. Amar, D.T. Graves, P.C. Trackman, A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes, Diabetes 52 (2003) 1502–1510.
[47] Ş. Ezirganlı, H.O. Kazancıoğlu, A. Mihmanlı, M.Ş. Aydın, R. Sharifov, A. Alkan, The effect of local simvastatin application on critical size defects in the diabetic rats, Clin. Oral Implants Res. 25 (2014) 969–976, http://dx.doi.org/10.1111/clr.12177.
[48] Z. Liu, J. Aronson, E.C. Wahl, L. Liu, D.S. Perrien, P.A. Kern, et al., A novel rat model for the study of deficits in bone formation in type-2 diabetes, Acta Orthop. 78 (2009) 46–55, http://dx.doi.org/10.1080/17453670610013411.
[49] J.N. Stabley, R.D. Prisby, B.J. Behnke, M.D. Delp, Type 2 diabetes alters bone and marrow blood flow and vascular control mechanisms in the ZDF rat, J. Endocrinol. 225 (2015) 47–58, http://dx.doi.org/10.1530/JOE-14-0514.
[50] J. Filipowska, K.A. Tomaszewski, Ł. Niedźwiedzki, J.A. Walocha, T. Niedźwiedzki, The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning, Angiogenesis (2017) 1–12, http://dx.doi.org/10.1007/s10456-017-9541-1.

RESULTATS II

Le risque de fracture est augmenté chez les patients ayant un diabète de type 2 mal équilibré en relation avec la durée de ce dernier [111]. Le risque de fracture est augmenté pour tous les os et plus particulièrement au niveau de la partie proximale du fémur et des vertèbres [110], [206].

Dans un soucis de mieux comprendre la fragilité des os dans le TD2M, et de pouvoir évaluer la contribution du micro-CT dans l'étude de la micro architecture et la vascularisation des os, nous avons mené des études préliminaires sur des rats ZDF et ZL. Nous avons dans un premier temps analysé la micro architecture corticale et trabéculaire des fémurs, au niveau proximal, mi-diaphysaire et distal, puis la vascularisation, et avons tenté de les corréler.

Le volume des travées osseuses et leurs nombres étaient significativement diminués dans la tête, le col et la métaphyse distale des fémurs diabétiques ($p < 0.05$); la porosité de la corticale du col des fémurs ZDF étaient également augmentée ($p < 0.001$). La vascularisation était aussi significativement diminuée dans la partie distale de la diaphyse ZDF.

Pages 85-114
Références de l'article :

Microcomputed tomography of the femur of diabetic rats: alterations of trabecular and cortical bone microarchitecture and vasculature - A feasibility study -

David Zeitoun, **Guavri Caliaperoumal**, Morad Bensidhoum, Jean Marc Constans, Fani Anagnostou, Valérie Bousson,
Accepted article in European Radiology expérimental

84

RESULTATS III

Le TD2M est associé à une modification de la néovascularisation et de la cicatrisation de divers organes dont l'os [116]. Des thérapies basées sur l'utilisation de cellules souches semblent pouvoir pallier aux problèmes liés aux microangiopathies diabètiques, soit en les différenciant en cellules endothéliales ou en utilisant leur sécrétome lors de la régénération tissulaire.

La thérapie cellulaire peut s'appuyer sur diverses sources de cellules. Les BMMSCs ont la capacité de se différencier en cellules endothéliales, en progéniteurs adipocytaires et/ou en ostéoblastes; leur effet paracrin influence l'angiogénèse. Elles migrent vers les sites lésés et libèrent des facteurs de croissance et diverses cytokines, contribuant à la réparation tissulaire [207].
Ces cellules ont également montré leur efficacité dans divers modèles de cicatrisation des plaies cutanées, de revascularisation ou de cicatrisation osseuse [208]. La moelle osseuse est un réservoir de cellules utilisables en application clinique autologue.

Néanmoins, l'intérêt d'une thérapie cellulaire autologue chez le patient diabétique peut être remis en question du fait de l'altération des propriétés de la moelle osseuse par le T2DM [209]. En effet, la fonctionnalité des progéniteurs endothéliaux est modifiée ainsi que le profil cellulaire de la moelle osseuse au profit des adipocytes [210].

Notre étude a évalué certaines fonctions et le potentiel de différenciation des BMMSCs provenant d'un microenvironnement diabétique.

Les résultats ont montré que les cellules souches mésenchymateuses issues de rat ZDF présentent des propriétés modifiées après une culture *ex vivo* dans des conditions normoglycémiques. Ces données posent la question de leur implication dans les troubles vasculaires liés au diabète et de leur utilisation dans une thérapie cellulaire en autologue.

J. Cell. Mol. Med. Vol XX, No X, 2016 pp. 1-15

Type 2 diabetes alters mesenchymal stem cell secretome composition and angiogenic properties

Jonathan Ribot [a], Guavri Caliaperoumal [a], Joseph Paquet [a], Catherine Boisson-vidal [b], Herve Petite [a], Fani Anagnostou [a, c, *]

[a] *Laboratory of Bioingénierie et Biomécanique Ostéo-articulaires-UMR CNRS 7052 Paris 7-Denis Diderot University, Sorbonne Paris Cite, Paris, France*
[b] *INSERM, UMR 1140, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cite, Paris, France*
[c] *Department of Periodontology, Service of Odontology, Pitié Salpêtrière Hospital et Hôtel-Dieu Hospital AP-HP, U.F.R. of Odontology Paris 7-Denis Diderot University, Sorbonne Paris Cite, Paris, France*

Received: June 1, 2016; Accepted: August 6, 2016

Abstract

This study aimed at characterizing the impact of type 2 diabetes mellitus (T2DM) on the bone marrow mesenchymal stem cell (BMMSC) secretome and angiogenic properties. BMMSCs from Zucker diabetic fatty rats (ZDF) (a T2DM model) and Zucker LEAN littermates (control) were cultured. The supernatant conditioned media (CM) from BMMSCs of diabetic and control rats were collected and analysed. Compared to results obtained using CM from LEAN-BMMSCs, the bioactive content of ZDF-BMMSC CM (i) differently affects endothelial cell (HUVEC) functions *in vitro* by inducing increased (3.5-fold; $P < 0.01$) formation of tubule-like structures and migration of these cells (3-fold; $P < 0.001$), as well as promotes improved vascular formation *in vivo,* and (ii) contains different levels of angiogenic factors (e.g. IGF1) and mediators, such as OSTP, CATD, FMOD LTBP1 and 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% or 40%, respectively. These results demonstrate that BMMSCs from T2DM rats have a unique secretome with distinct angiogenic properties and provide new insights into the role of BMMSCs in aberrant angiogenesis in the diabetic milieu.

Keywords: MSCs • diabetes type 2 • secretome • angiogenesis • endothelial cells

Introduction

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is reaching epidemic proportions worldwide. The persistent hyperglycaemic milieu in T2DM is associated with macro- and micro-vascular complications affecting the heart, blood vessels, eyes, kidney and nerves, and the wound-healing process in diabetic patients [1–3]. 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 [4, 5], whereas deficient angiogenesis contributes to impaired wound healing and coronary collateral vessel development [1, 3, 6]. Despite extensive research, the mechanism(s) behind the abnormal angiogenesis balance in diabetic patients is still poorly understood.

Scientific research has provided evidence that the dysfunction of different types of cells, including endothelial, peripheral blood and bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs), is related to the reduced blood vessel regenerative potential in T2DM [7–9]. Endothelial cells migrate in response to soluble mediators that regulate new blood vessel formation [10], but their function is impaired in the diabetic milieu [7, 11, 12]. 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 [13]. The T2DM milieu affects the regenerative potential of BMMSCs as well as their proliferation [8], restricts their multipotency and impairs their capacity to augment post-ischemic neovascularization in diabetic mice [14]. BMMSCs exert a paracrine effect by the release of growth factors and cytokines, such as IGF-1, which stimulate endothelial cell migration [15], inhibit endothelial apoptosis and promote angiogenesis [16]. Moreover, by providing proangiogenic factors, BMMSCs create a favourable microenvironment that promotes neovascularization and tissue regeneration [13, 15, 17]. Although important in this respect, the impact of T2DM on the BMMSC secretome and its angiogenic properties has not yet been characterized.

*Correspondence to: Dr. Fani ANAGNOSTOU.
E-mail: fani.anagnostou@univ-paris-diderot.fr

doi: 10.1111/jcmm.12969

© 2016 The Authors.
Journal of Cellular and Molecular Medicine published by John Wiley & Sons Ltd and Foundation for Cellular and Molecular Medicine.
This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

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) (Leprfa/fa) rats (a model of T2DM) and Zucker Lean control (LEAN) (Leprfa/+/Lepr+/+) rats (their age-matched littermates) [18]. By focusing on the impact of T2DM on BMMSC secretome functions, this study aimed at both elucidating the contribution of MSCs in diabetic-related vascular complications and establishing relevant aspects for future cell therapies in diabetes.

Materials and methods

Animal models

Adult, 8-week-old, male, Swiss nude mice as well as adult, 12- to 13-week-old, male, obese Zucker fa/fa rats (ZDF) and their lean fa/+ littermates (LEAN) were purchased from Charles River (L'Arbresle, France). The animals were housed, operated and killed 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 Committee of the University Paris-Diderot.

The diabetic condition of the rats used in this study was determined on the day of killing them. For this purpose, venous blood was collected, and the respective glycaemic state was evaluated using a glucometer (Roche Diagnostics, Meylan, France). Plasma concentrations of glucose and fructosamine were determined using commercially available kits (Roche Diagnostics) 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 αMEM (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). The cells present in the harvested marrow were then homogenized using complete medium composed of αMEM supplemented with 10% (v/v) foetal 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/cm^2 and cultured at 37°C in a humidified 5% CO_2/95% 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-BMMSC populations, the cells were seeded at 10×10^3 cells/cm^2. The supernatant media were changed twice a week. BMMSCs at passage 2–3 were used for the experiments of this study.

Preparation of conditioned media

BMMSCs were seeded at 10^4/cm^2 in a culture-treated flask and cultured in calf serum-free αMEM under standard cell culture conditions. After 24 hrs, the supernatant was collected, centrifuged (700 × g, 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, anti-LTBP1 or anti-LTBP2 were added to CM (5 ng/mL) and maintained at 37°C for 1 hr before use in experiments with cells.

Culture of HUVECs

The effects of CM on endothelial cells were studied using human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). HUVECs in EGM-2 medium (Lonza, France) supplemented with 5% foetal 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, Alfortville, Ile de France, France).

Cell proliferation

Cells were seeded at the density of 3×10^3 cells/cm^2 in individual wells of 12-well culture plates in αMEM containing 10% FBS. For each time-point, BMMSCs were trypsinized, incubated with Trypan blue and counted using a Malassez chamber.

Migration of human umbilical vein endothelial cells in Boyden chambers

HUVEC migration was determined using commercially available Boyden chambers (Corning Costar, Tewksbury MA, USA) whose two compartments were separated by polycarbonate membranes with 8 μm diameter pores. Aliquots of cells (50×10^3 cells) in 100 μl of αMEM without foetal calf serum were placed in the upper chamber, and the various media of interest to this study were each placed in the bottom chamber. The cell migration experiments were conducted in a humidified, 37°C, 5% CO_2/95% air environment for 24 hrs. The cells that had transversed 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 hrs of culture. At that time, each monolayer was scratched across the respective centre 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 hrs, rinsed twice with PBS and fixed using 4% paraformaldehyde for 30 min. The scar region on each cell monolayer was visualized using light microscopy and photographed before and after the 6-hr 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

© 2016 The Authors.
Journal of Cellular and Molecular Medicine published by John Wiley & Sons Ltd and Foundation for Cellular and Molecular Medicine.

difference in the distance travelled by HUVECs from the edges of each scratch region towards the centre 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% CO_2/95% air environment for 1 hr. Then, 5×10^4 cells in various media were added and cultured in a 37°C, 5% CO_2/95% air environment for 24 hrs. At that time, four random areas were visualized using light microscopy, photographed and analysed 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 10^4 cells per each well of 96-well plates in various media (containing 150 μM of H_2O_2) in a humidified, 37°C, 5% CO_2/95% 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 cell viability after challenge by H_2O_2.

ROS measurement

To measure reactive oxygen species (ROS) production in HUVECs, 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 10^4 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 hr. At that time and after rinsing the cells with PBS, CM from BMMSCs of either diabetic or control rats was added. Oxidative stress was induced using tert-butyl hydroperoxide (Luperox, t-BuOOH Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) at 100 μM. Fluorescence intensity of the samples was measured using a fluorescence spectrophotometer at excitation and emissions wavelengths 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 using total RNA that had been extracted from these cells using 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 sec. denaturation step at 95°C, followed by a 60 sec. annealing and an extension step at 60°C. The Multiplex used contained 84 angiogenic-related genes (the rat angiogenesis RT^2 Profiler PCR Array, Qiagen).

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

ELISA analysis

The level of 7 mediators (VEGF, IL-6, TNFα, MCP-1, FGF-2, IGF1 and PLAU) were determined in the respective supernatant media at each time-point of interest to this study using different ELISA kits and following the manufacturer's instructions. These experiments were conducted in triplicate and repeated on three separate occasions. A five-parameter regression formula was used to calculate concentrations of the respective mediators using standard curves for each mediator assessed.

Proteomic analysis

Each supernatant CM from LEAN and ZDF-BMMSCs was separately concentrated and desalted using an Amicon Ultra-2 Centrifugal device column (Millipore, France). Briefly, 500 μl of each conditioned medium tested was loaded in a column and centrifuged at 4500 × g for 75 min. This treatment resulted in a 10-fold increase in protein concentration. The proteins in the concentrated CM were then analysed using a mass spectrometer (LTQ-Orbitrap, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) 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 αMEM either supplemented with 10% foetal calf serum or serum-free, were freeze-dried using a Christ Alpha 1-2 freezer-drier overnight. At that time, 500 μg protein from each dried CM sample was mixed with 500 μl of ice-cold Matrigel (growth factor reduced Matrigel, VWR, France) and was injected subcutaneously into the flanks of 8-week-old Swiss nude mice [19]. After 14 days, the mice were killed, and each Matrigel implant was excised, placed in 500 μl of RIPA buffer, and processed using a Retsch MM 300 tissue lyser at 30 pulses/min. for 2 min. The haemoglobin content in each excised implant was determined using a commercially available assay (Hemoglobin Colorimetric Assay kit, Cayman Ann Arbor, MI, USA). Plugs were also embedded in paraffin, sectioned, and stained with Masson's trichrome.

Statistical analysis

Each experiment of this study was performed in triplicate and repeated with three independent experiments using different cell preparations. Numerical data are reported as the mean ± standard error of the mean

© 2016 The Authors.

Journal of Cellular and Molecular Medicine published by John Wiley & Sons Ltd and Foundation for Cellular and Molecular Medicine.

(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 value of < 0.05 was considered statistically significant.

Results

CM from BMMSCs of diabetic rats affects HUVEC functions

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

CM from BMMSCs of diabetic rats increases 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 HUVECs on Matrigel in the presence of CM-ZDF, CM-LEAN, αMEM containing 10% FBS (FM) or FBS-free αMEM (NCM) for 24 hrs (Fig. 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 (Fig. 1A

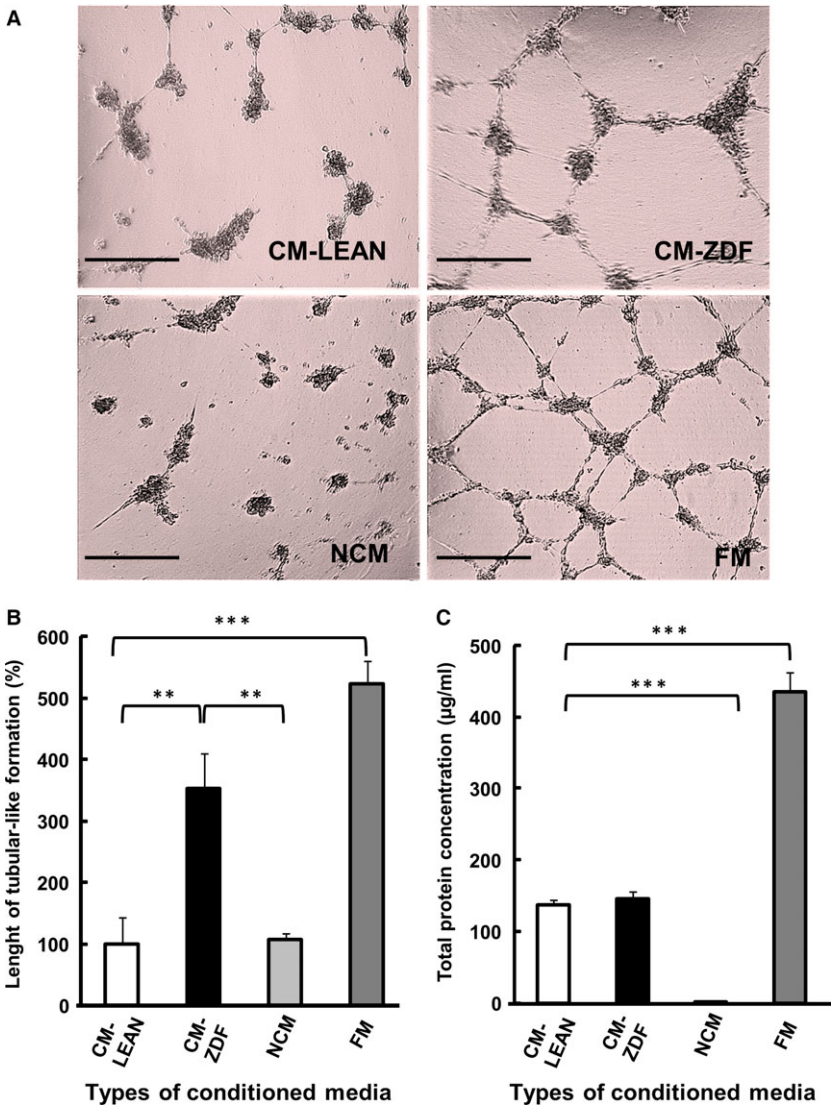


Fig. 1 Conditioned supernatant medium from BMMSCs of diabetic rats promotes tubular-like formation by HUVECs. (**A**) Representative images of HUVECs in CM-LEAN, CM-ZDF, FM or NCM cultured on Matrigel for 24 hrs showing formation of tubular-like structures. Scale bar = 100 μm. (**B**) Quantification of the tubular-like structures formed by HUVECs in CM-LEAN, CM-ZDF, FM or NCM cultured on Matrigel. Data are expressed as a percentage of the results obtained with CM-LEAN (group control). (**C**) Protein content in the supernatant CM-LEAN, CM-ZDF, FM and NCM. Values are mean ± 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% foetal bovine serum (FBS) not exposed to cells. NCM: FBS-free alpha MEM not exposed to cells.

© 2016 The Authors.
Journal of Cellular and Molecular Medicine published by John Wiley & Sons Ltd and Foundation for Cellular and Molecular Medicine.

and B). The protein content in the CM-LEAN and CM-ZDF was similar (Fig. 1C), but lower ($P < 0.01$) than that in the FM (Fig. 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 hrs with CM-LEAN, CM-ZDF or FM, but not when NCM was used as the chemoattractant (Fig. 2A). Compared with either CM-LEAN or FM, CM-ZDF induced significantly ($P < 0.001$) increased (3-fold) migration of HUVECs (Fig. 2B). After 6 hrs, 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 (Fig. 2C and D). 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 viability 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 hrs of culture on the proliferation of HUVECs was assessed. For this purpose, HUVECs were cultured in CM-LEAN, CM- ZDF, FM or NCM, and their proliferation was determined over a period of 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 (Fig. 3A). The HUVECs did not survive in the absence of serum in the supernatant media (Fig. 3A). HUVECs cultured with either CM-LEAN or CM-ZDF survived but did not

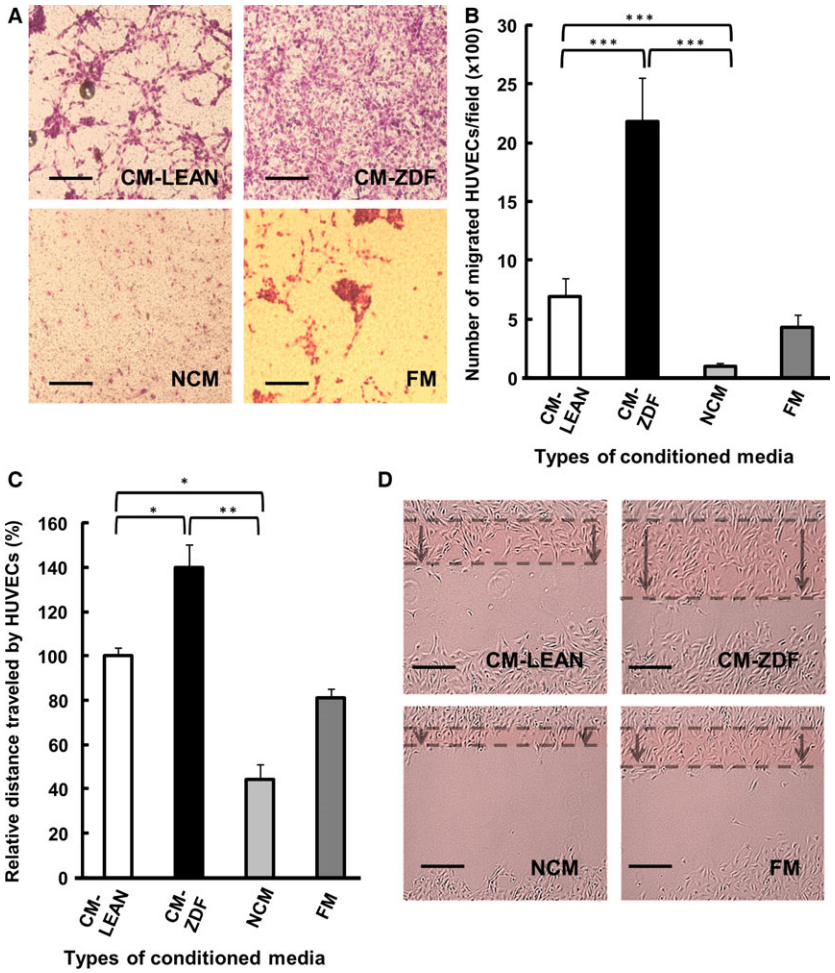


Fig. 2 Conditioned supernatant medium from BMMSCs of diabetic rats induces increased HUVEC migration. HUVEC migration was determined using Boyden chambers. (**A**) Representative images showing HUVEC migration. Stain: Giemsa. Scale bar = 200 μm. (**B**) Number of migrated HUVECs in the presence of CM-LEAN, CM-ZDF, FM or NCM. HUVECs using the *in vitro* scratch wound-healing assay. (**C**) Distance of migrated HUVECs exposed to supernatant CM-LEAN, CM-ZDF, FM or NCM. (**D**) Representative light micrographs of the scratch area after 6 hrs. The dotted lines delineate the original scratched area after 6 hrs. Scale bar = 100 μm. Data are expressed as a percentage of the results obtained from the control (CM-LEAN) group. Values are mean ± 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% foetal bovine serum (FBS), not exposed to cells. NCM: FBS-free alpha MEM not exposed to cells.

© 2016 The Authors.

Journal of Cellular and Molecular Medicine published by John Wiley & Sons Ltd and Foundation for Cellular and Molecular Medicine.

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 (Fig. 3A). The effect of the various supernatant CM on HUVEC viability after challenge with H_2O_2 was assessed by exposing HUVECs to 150 μM of H_2O_2 in each medium of interest to this study for 90 min. HUVECs exposed to CM-LEAN, CM-ZDF or NCM had similar numbers of cells, which were significantly ($P < 0.001$) higher than those observed under FM (Fig. 3B).

Furthermore, upon exposure to either CM-LEAN or CM-ZDF, production of 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 hr of measurement ($P < 0.001$) (Fig. 3C).

CM from BMMSCs of diabetic rats promotes increased neoangiogenesis *in vivo*

To evaluate the proangiogenic potential of the CM-ZDF *in vivo*, Matrigel plugs were implanted in a mouse model. These Matrigel plugs, prepared using either CM-ZDF or CM-LEAN (each containing 500 μg/ml of proteins), as well as either NCM or FM, were injected into the flanks of nude mice and were implanted for a 14-day period. At that time, the explanted plugs containing NCM, CM-LEAN or FM were pale in colour, indicating no or little blood vessel content (Fig. 4A). In contrast, plugs containing CM-ZDF appeared dark red due to the presence of red blood cells, indicating the formation of blood vessels (Fig. 4A and B). Compared to plugs prepared with either CM-LEAN or NCM, the implanted Matrigel plugs containing CM-ZDF had a significant ($\boldsymbol{P} < 0.05$) increase (2.5-fold) in haemoglobin content (Fig. 4C). In conjunction with the *in vitro* results, these *in vivo* data provided evidence that supernatant CM from ZDF-BMMSCs promotes increased angiogenesis *in vivo*.

BMMSCs of diabetic rats differentially express angiogenic genes

The underlying mechanism(s) of the observed increased angiogenesis of the CM-ZDF was explored by determining the expression of 84

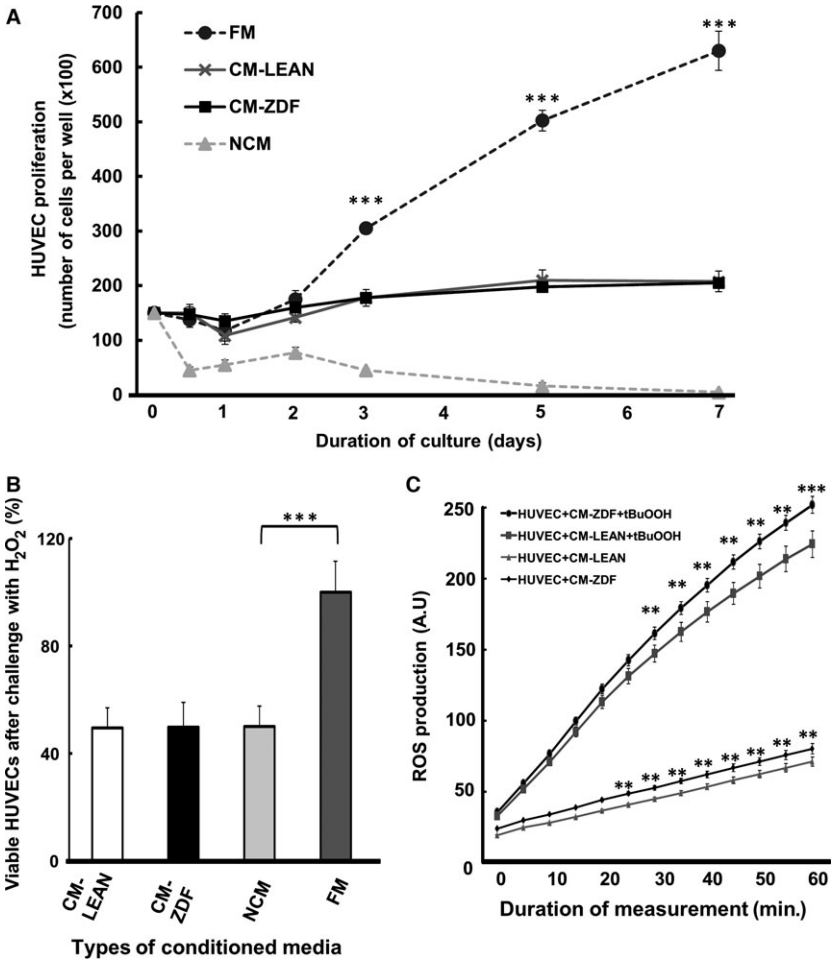


Fig. 3 Conditioned supernatant medium from BMMSCs of either diabetic or healthy rats has no effect on either HUVEC proliferation or viability when challenged by H_2O_2, and a limited effect on reactive oxygen species production. (**A**) Proliferation of HUVECs in the presence of supernatant CM-LEAN, CM-ZDF, FM and NCM cultured for up to 7 days. (**B**) HUVEC apoptosis determined using the MTT assay. HUVECs were exposed to 150 μM of H_2O_2 in 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 hrs. A.U.: arbitrary units. Values are mean ± 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% foetal bovine serum (FBS) not exposed to cells. NCM: FBS-free alpha MEM not exposed to cells.

© 2016 The Authors.
Journal of Cellular and Molecular Medicine published by John Wiley & Sons Ltd and Foundation for Cellular and Molecular Medicine.

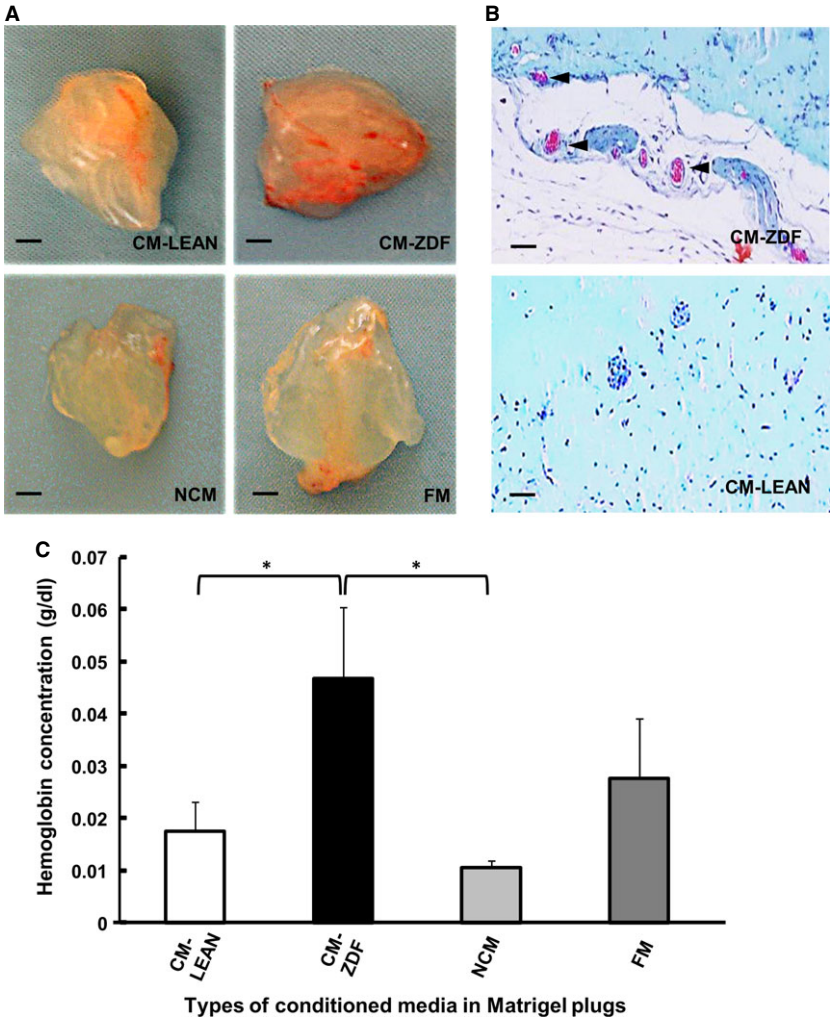


Fig. 4 Conditioned supernatant medium from BMMSCs of diabetic rats enhances *in vivo* angiogenesis. Matrigel plugs (500 μl) containing proteins (500 μg) from freeze-dried supernatant CM-ZDF, CM-LEAN, FM or NCM were injected subcutaneously into the flanks of nude mice. After 14 days, these Matrigel plugs were excised and photographed, and their haemoglobin contents were quantified. **(A)** Representative photographs of the excised Matrigel plugs. Scale bar = 1 mm. **(B)** Representative photograph of sectioned paraffin-embedded Matrigel plugs stained with Masson's trichrome (the arrowhead indicates capillaries with red blood cells). Scale bar = 20 μm **(C)** Quantification of the haemoglobin contents in the excised Matrigel plugs. Values are mean ± 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: FBS-free alpha MEM not exposed to cells.

known angiogenic genes in BMMSCs. Nine pro-angiogenic genes, including alanyl aminopeptidase (ANPEP) (3-fold), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (3-fold), macrophage inflammatory protein 2-alpha (MIP-2) (3-fold), hypoxia-inducible factor 2 (HIF-2) (2-fold), IGF-1 (5.5-fold), interleukin 6 (IL-6) (2-fold), urokinase-type plasminogen activator (PLAU) (2-fold), tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1 (TIE1) (5.5-fold) and tumour necrosis factor alpha (TNFα) (4-fold), were significantly ($P < 0.05$) up-regulated in ZDF-BMMSCs. In addition, eight anti-angiogenic genes, including collagen type XVIII alpha 1 (COL18A1) (2-fold), collagen type IV alpha 3 (COL4A3) (8-fold), coagulation Factor II (F2) (2-fold), interferon gamma (INFγ) (2-fold), Sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1PR1) (3-fold), Serpine1 (3-fold), transforming growth factor beta 1 (TGFβ1) (3-fold) and transforming growth factor beta 3 (TGFβ3) (2-fold), were down-regulated in ZDF-BMMSCs (Fig. 5A). Several other angiogenic mediators, including vascular endothelial growth factor alpha (VEGFα), fibroblast growth factor 2 (FGF2), epidermal growth factor (EGF) and hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF1α), 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 due to ZDF-BMMSCs (Fig. 5B). The concentrations of IL-6, MCP-1 and PLAU were similar in CM from LEAN- and ZDF-BMMSCs. TNFα and FGF were not detected in all media tested (Fig. 5B), while the VEGF concentration was significantly ($P < 0.001$) lower in ZDF-BMMSCs. 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 (Fig. 6A and B). Blocking IGF-1 in CM from ZDF-BMMSCs did not affect the formation of tubular structures (Fig. 6C and D).

© 2016 The Authors.

Journal of Cellular and Molecular Medicine published by John Wiley & Sons Ltd and Foundation for Cellular and Molecular Medicine.

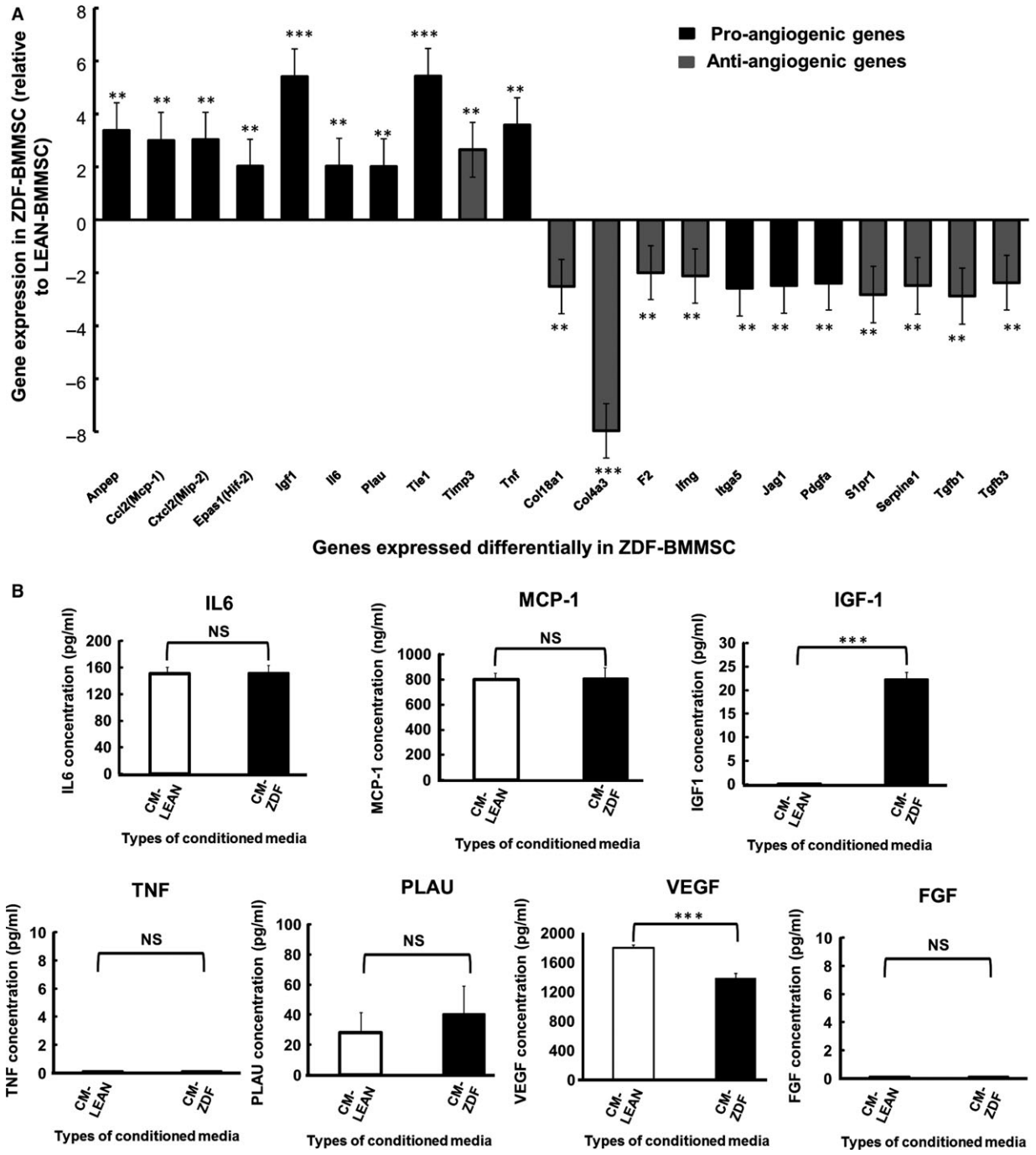


Fig. 5 Expression of angiogenic gene mediators is modified in BMMSCs of diabetic rats. (**A**) Expression of select pro-angiogenic genes (black bars) and anti-angiogenic genes (grey bars) in ZDF-MSCs relative to results obtained from LEAN-MSsC. (**B**) ELISA results of the analysis of overexpressed pro-angiogenic genes in samples from ZDF-MSCs. Values are mean ± 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.

© 2016 The Authors.
Journal of Cellular and Molecular Medicine published by John Wiley & Sons Ltd and Foundation for Cellular and Molecular Medicine.

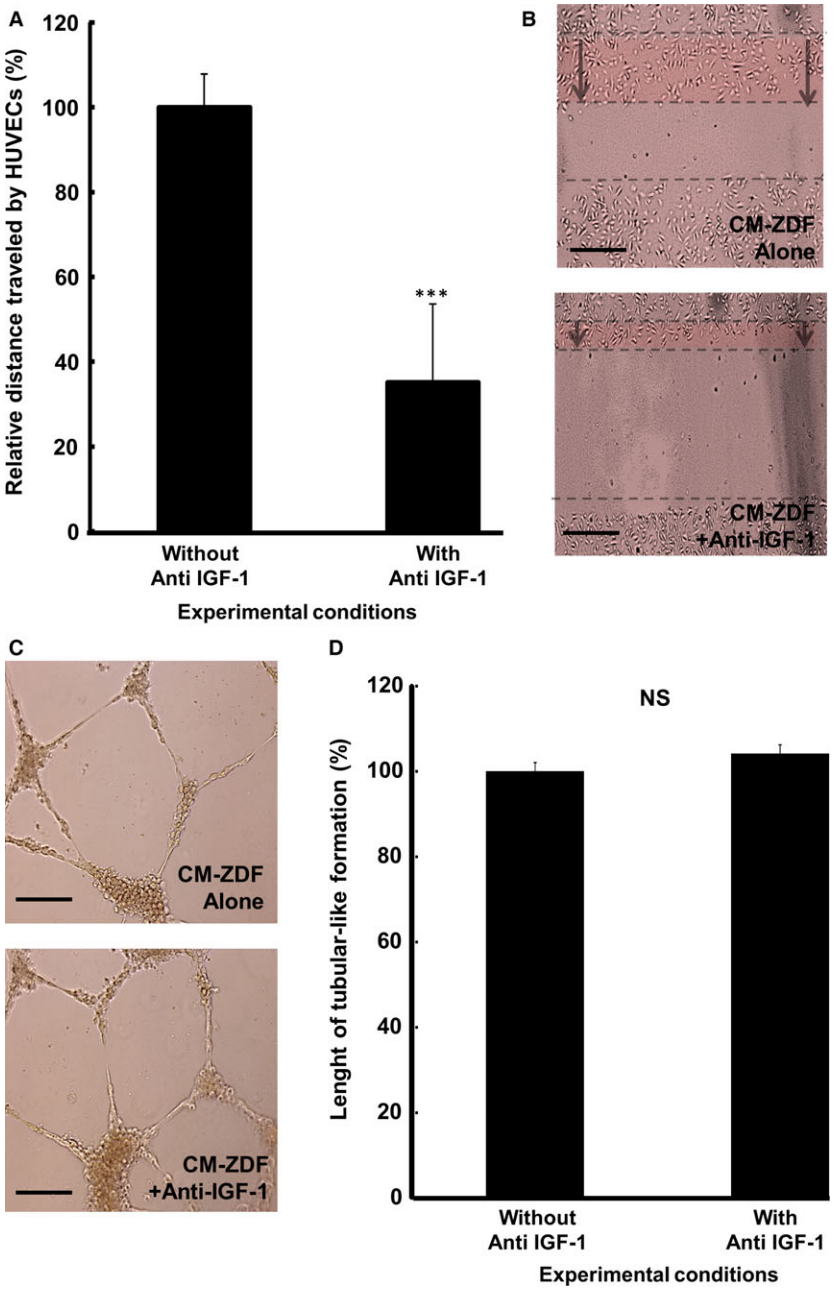


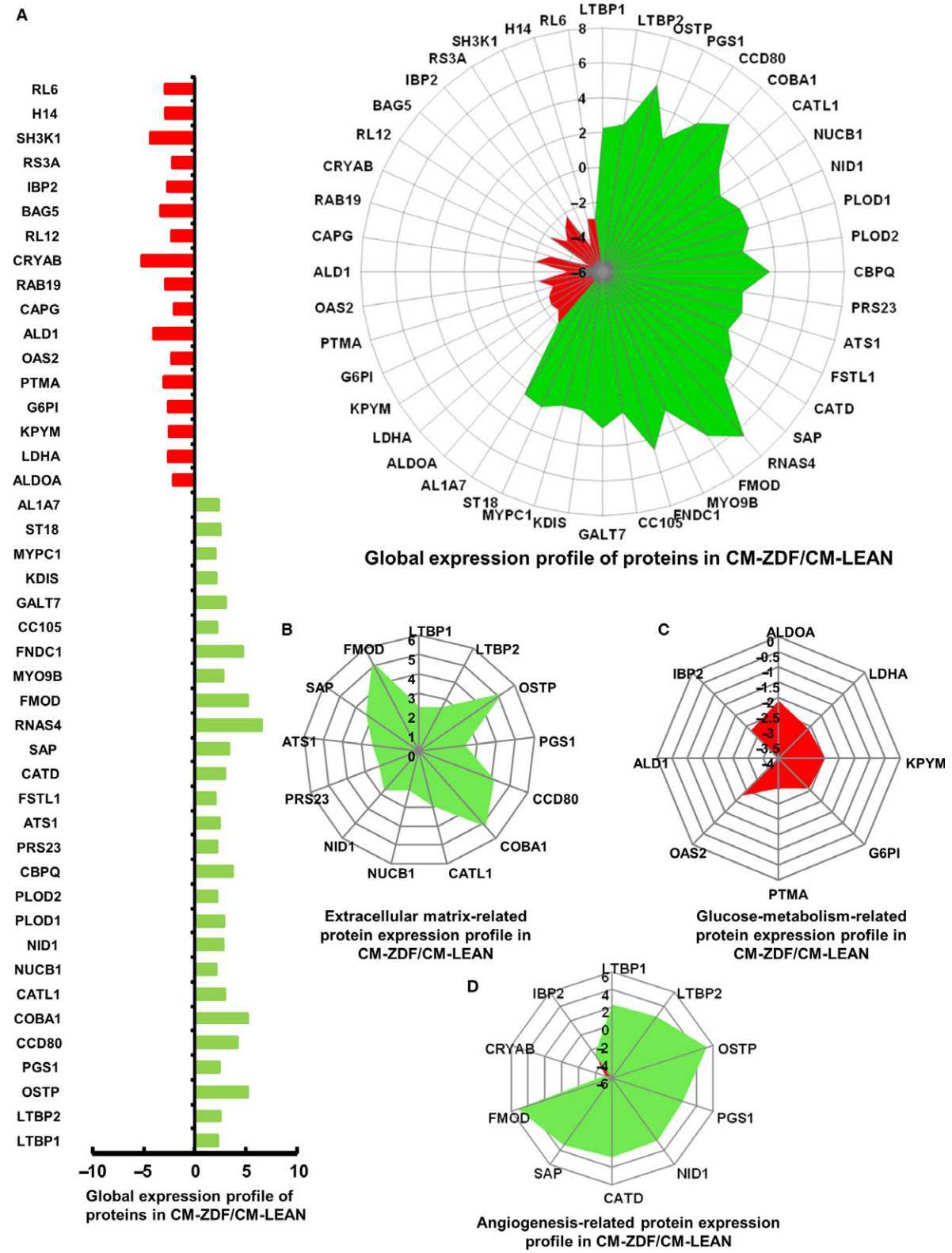
Fig. 6 IGF-1 in CM-ZDF promotes migration of HUVECs but not tubular formation. HUVEC migration assays were performed using the *in vitro* scratch/wound-healing assay. (**A**) Distance of migrated HUVECs exposed to either supernatant CM-ZDF or CM-ZDF containing a blocking antibody for IGF-1. (**B**) Representative light micrographs of the scratch area after 6 hrs. The dotted lines delineate the original scratched area after 6 hrs. Scale bar = 100 μm. (**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 hrs. Scale bar = 100 μm. (**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 with CM-ZDF without anti-IGF-1 (control group). Values are mean ± SEM of four fields on each surface tested. ***$P < 0.001$.

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 2-fold ($P < 0.05$) up-regulation of 27 and down-regulation of 17 proteins in the CM-ZDF (Fig. 7A). Eight proteins related to glucose metabolism, specifically aldolase, fructose-bisphosphate A (ALDOA) (by 2-fold), lactate dehydrogenase A (LDHA) (by 2.5-fold), pyruvate kinase, muscle (KPYM) (by 2.5-fold), glucose-6-phosphate (G6P) (by 2.5-fold), prothymosin, alpha (PTMA) (by 3-fold), 2′-5′-oligoadenylate synthetase 2 (OAS2) (by 2-fold), aldehyde dehydrogenase 1 (ALD1) (by 4-fold) and insulin-like growth factor binding protein 2 (IBP2) (by 2.5-fold), were differentially expressed and down-regulated in the CM of ZDF-BMMSCs (Fig. 7B). This result indicates the possible modification of glucose metabolism in the BMMSCs from diabetic rats.

© 2016 The Authors.

Journal of Cellular and Molecular Medicine published by John Wiley & Sons Ltd and Foundation for Cellular and Molecular Medicine.



© 2016 The Authors.
Journal of Cellular and Molecular Medicine published by John Wiley & Sons Ltd and Foundation for Cellular and Molecular Medicine.

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. Down-regulated and overexpressed proteins are shown in red and green, respectively, in all frames. (**A**) Proteins that were differentially expressed in supernatant CM-ZDF compared to CM-LEAN (**B**) Proteins present in the supernatant CM-ZDF that are related to the extracellular matrix. (**C**) Proteins present in the supernatant CM-ZDF that are related to glucose metabolism. (**D**) Proteins present in the supernatant CM-ZDF that are related to angiogenesis. Values are mean ± 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.

Several proteins whose genes were overexpressed by the ZDF-BMMSCs are either extracellular matrix components or are involved in the process of extracellular matrix remodelling (Fig. 7C), including latent transforming growth factor beta binding protein 1 (LTBP1) (2-fold), latent transforming growth factor beta binding protein 2 (LTBP2) (2-fold), osteopontin (OSTP) (5-fold), phosphatidylglycerophosphate synthase 1 (PGS1) (2-fold), coiled-coil domain containing 80 (CCD80) (4-fold), alamin adenosyltransferase (COBA1) (5-fold), cathepsin L1 (CATL1) (2-fold), nucleobindin 1 (NUCB1) (2-fold), nidogen 1 (NID1) (2-fold), serine protease 23 (PRS23) (2-fold), ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 1(ATS1) (2-fold), serum amyloid P (SAP) (3-fold) and fibromodulin (FMOD) (5-fold).

Some of these components could be related to angiogenesis and may be involved in the observed enhanced chemotactic response of endothelial cells (Fig. 7D). In fact, among the proteins differentially expressed in ZDF-BMMSC CM, seven proteins, specifically LTBP1 (2-fold), LTBP2 (2-fold), OSTP (5-fold), cathepsin D (CATD) (2-fold), SAP (2-fold) and FMOD (5-fold), are related to angiogenesis and were overexpressed (Fig. 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 (Fig. 8A and B) but

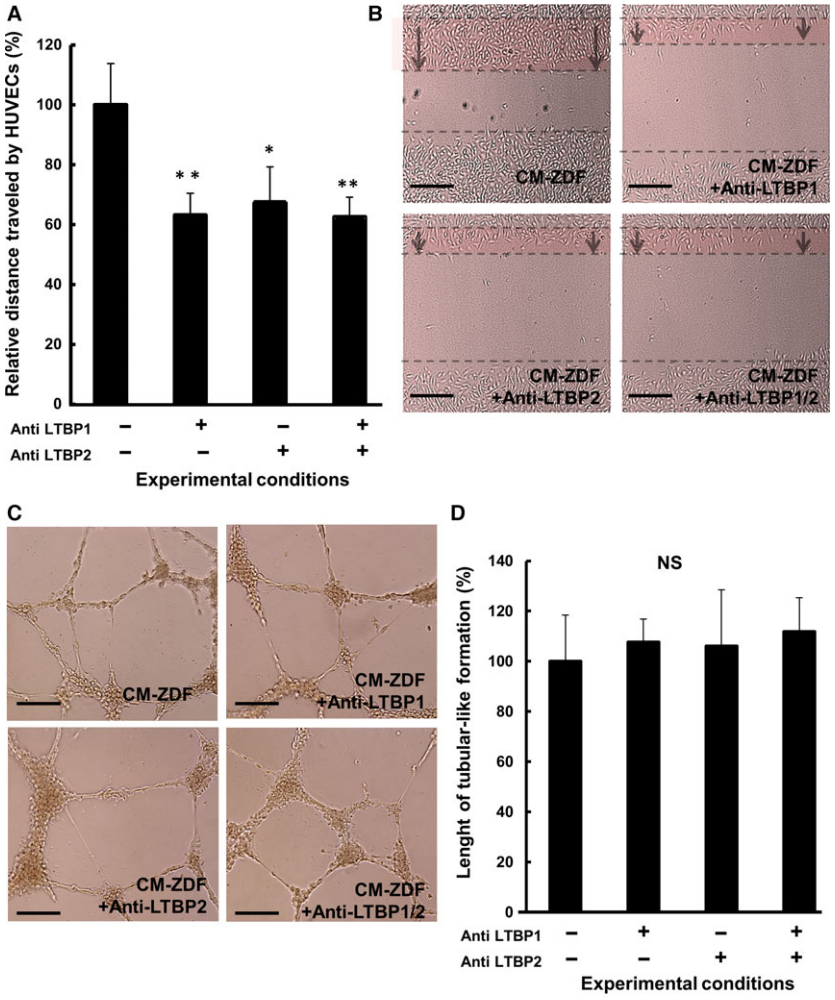


Fig. 8 Specific extracellular matrix proteins (LTBP-1 and LTBP-2) are involved in the enhanced migration of CM-ZDF. HUVEC migration assays were performed using the *in vitro* scratch/wound-healing assay. (**A**) Distances migrated by HUVECs exposed to either supernatant CM-ZDF or CM-ZDF in the presence or absence of blocking antibodies for either LTBP-1 or LTBP-2 or both. (**B**) Representative light micrographs of the scratch area 6 hrs post cell injury. The dotted lines delineate the original scratched area after 6 hrs. Scale bar = 100 μm. (**C**) Representative images of HUVECs in either CM-ZDF or CM-ZDF and in the presence or absence of blocking antibodies for LTBP-1, LTBP-2 or both, cultured on Matrigel for 24 hrs. Scale bar = 100 μm. (**D**) Quantification of the tubular-like structures formed by HUVECs exposed to either CM-ZDF or CM-ZDF in the presence or absence of blocking antibodies for LTBP-1, LTBP-2, or both, cultured on Matrigel for 24 hrs. Data are expressed as percentage of the results obtained when the cells were cultured in CM-ZDF (control group). Values are mean ± SEM of four fields on each surface tested. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$.

© 2016 The Authors.

Journal of Cellular and Molecular Medicine published by John Wiley & Sons Ltd and Foundation for Cellular and Molecular Medicine.

did not affect tubular structure formation (Fig. 8C and D). 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 (Fig. 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 are still unknown [16, 17]. We, therefore, performed a comparative analysis of the BMMSC secretome and its effects on endothelial cells, 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 alters the BMMSC secretome composition and promotes angiogenic capabilities.

The results of this study demonstrated that angiogenesis-related genes are differently expressed in BMMSCs from ZDF rats when compared with results from LEAN animals. In fact, several pro-angiogenic genes were overexpressed, while anti-angiogenic genes were down-regulated (Fig. 5). The up-regulated (over 5-fold) genes included IGF-1 and TIE1, which are critical regulators of angiogenesis [20], MCP-1 and IL-6, homing factors for BMMSCs and EC/EPCs, respectively [21, 22], and IL-6 and TNFα, critical mediators of the inflammatory process. Nevertheless, the expression of several angiogenic genes did not correlate with the released protein levels in the supernatant CM in this study. Analysis of the protein content in the 24-hr 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 (Fig. 5B). However, proteomic analysis did not reveal IGF1 in the CM. This imperfect and variable correlation between ELISA and proteomic analysis can be explained by different levels of sensitivity and dynamic ranges of the methods [23]. The concentrations of IL-6, MCP-1 and PLAU were similar in CM from LEAN- and ZDF-BMMSCs, while that of VEGF was lower in ZDF-BMMSCs. TNFα and FGF were not detected in all media tested. IGF-1 plays a significant role in the physiology of endothelial cells by promoting their migration [20, 24]. IGF-1 is also overexpressed by several types of cells implicated in T2DM-proliferative retinopathy [25, 26]. Under our experimental conditions, IGF-1 released by ZDF-BMMSCs accounted for approximately 60% of the observed enhanced HUVEC migration (Fig. 6A and B). The IGF-1 effect is mediated by activation of the IGF-1 receptor, which triggers several signalling pathways and therefore several cellular responses. For instance, the Ras/Raf pathway is critical for proliferative responses, whereas activation of Rac is important for cell migration [27]. This study provides evidence that IGF-1 might be a key factor in the paracrine action of T2DM-BMMSCs on endothelial cell behaviour, 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 chaperone for VEGF-A, and (ii) increased levels of LTBP1 and LTBP2, regulators of TGF-β availability [28], as well as of OSTP and FMOD, which are components of the extracellular matrix and might be involved in the paracrine action of T2DM-BMMSCs on endothelial cells [29–32]. The role of extracellular matrix components in angiogenesis has been highlighted by both *in vitro* and *in vivo* studies [33, 34]. In this respect, this study revealed a different secretory profile of BMMSCs that may explain how these cells affect the environmental niche and paradoxical angiogenesis in the diabetic milieu. ROS stands at the cross-point of the regulations exerted on the BMMSCs as a signalling molecule in the bone marrow environment [35]. For instance, low levels of ROS are associated with quiescent MSCs, whereas an increased ROS level is typical of proliferating cultures.

In addition, the proteomic analysis of T2DM-BMMSC CM demonstrated a specific secretory phenotype of extracellular matrix remodelling and glucose metabolism. Compared to LEAN-BMMSCs, of the 261 proteins released by ZDF-BMMSCs, 44 were differentially secreted, with 27 at higher and 17 at lower levels (Fig. 7). The 27 overexpressed proteins included extracellular matrix homeostasis and remodelling-related molecules [36]. 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 (Fig. 7C). Impaired glucose metabolism was already observed in T2DM muscle cells [37], but to our knowledge, this is the first report in the BMMSC secretome. Targeting such molecules may offer insight into the underlying mechanisms of T2DM-BMMSC physiology.

Compared with LEAN-BMMSCs, the ZDF-BMMSC 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 were evident on the BMMSCs, even after multiple cell divisions *in vitro* in a normoglycaemic environment. Moreover, these results corroborate literature reports that aspects of the diabetic condition, particularly hyperglycaemia, induce transmissible alterations in many type of cells, including endothelial, vascular smooth muscle, retinal and cardiac cells [38]. In fact, the process by which hypo-methylation of gene promoters leads to deregulated gene expression in T2DM is known as 'metabolic memory' [38, 39] and is implicated in the persistence of vascular complications of diabetes, even after return to normal blood glucose levels [38, 39]. Regarding ZDF rats, alteration of hepatic DNA methylation at early diabetic conditions (12 weeks) was previously reported [40]. 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.

This study is the first to directly compare both *in vitro* and *in vivo* the angiogenic potential of BMMSC-CM from T2DM and control animals. In line with previous studies reporting the angiogenic potential of the BMMSC secretome [17, 41], BMMSC-CM from both, ZDF rats and age-matched LEAN rats also showed angiogenic properties. These results corroborated previous studies establishing that healthy rat BMMSCs and CM-BMMSC improve the formation of HUVEC tubular structure in both paracrine [41, 42] and juxtacrine manners [41]. The CM from BMMSCs, however, affected endothelial cell functions differently. It promoted HUVEC migration and tube formation with no

© 2016 The Authors.
Journal of Cellular and Molecular Medicine published by John Wiley & Sons Ltd and Foundation for Cellular and Molecular Medicine.

change in proliferation. 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 plausible explanation for the differences in effects of CM from BMMSCs on HUVEC functions may be the relative concentrations of paracrine factors. For instance, IGF-1-related effects are mediated by activation of IGF-1 receptors, which trigger, among others, the Rac pathway. This pathway is important for cell migration but not proliferation [27]. Our findings are in line with Gruber *et al.* [43] who suggested that MSCs paracrine effects might not be responsible for the initiation of the angiogenic process, but rather would play a role in guiding the growing blood vessels. However, in contrast with these data, Kinnaird *et al.* [17] reported that human BMMSCs MC increases EC proliferation. The reasons from these mixed and discrepant results are not really surprising if one takes into consideration the differences in isolation methods, species (rat *versus* human) and EC sources use [44]. Moreover, in this study, CM from rat BMMSCs induced vascular formation in matrigel plugs *in vivo.* These findings are in line with previous studies [45] that show the occurrence of functional blood vessels in rBMMSC-CM loaded Matrigel plugs. Taken together, these data indicate that BMMSCs secretome may contribute to EPCs recruitment and subsequent formation of functional vessels.

Another important result of this study is that the CM from T2DM–BMMSCs increased *in vitro* endothelial cell migration and tubular structure formation, as well as *in vivo* vascular formation in matrigel transplants (Fig. 4). The greater angiogenic potential of T2DM–BMMSCs secretome may reflect the interactive actions of multiple bioactive mediators (including IGF-1, LTBP1 and LTBP2) which may alter the functions of endothelial cells, key players in diabetic vascular complications [46]. Angiogenesis results from an equilibrium between pro- and anti-angiogenic factors [46]. The increased angiogenesis observed in this study may arise from a disturbed balance between these pro- and anti-angiogenic factors and highlights the paracrine effect of an altered BMMSCs secretome on endothelial cells. It further illustrates the ambiguous role of angiogenesis in the pathogenesis of diabetic vascular complications. Thus, exacerbated angiogenesis occurs in diabetic retinopathy and nephropathy, whereas reduced angiogenesis contributes to diabetic impaired wound healing. A similar response to that observed in this study had been reported for BMMSCs cultured under *in vitro* hypoxic and high glucose conditions used to mimic the diabetic environment *in vitro* [47, 48]. This increase in angiogenic response may reflect the 'adaptive' BMMSC response to the severe stress conditions of the diabetic milieu. Because CM delivers 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. Last but not least, the findings reported here are somewhat different from the results of Dzhoyashvili *et al.* [49] who have shown that CM from human diabetic adipose tissue exhibited a reduced angiogenic potential. These apparently contradictory data further illustrate the complexity the pathogenesis of diabetic vascular complications and deserve supplementary investigations to fully decipher the molecular basis of MSC paracrine effects in diabetes.

A limitation of this study is the fact that it is difficult to separate the effects of hyperglycaemia from those of obesity. The ZDF rat was chosen as the animal model because these animals 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 [18], making them a clinically relevant model.

In summary, this study provided the first evidence that compared with 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 critically reviewing this article. 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 Francaise pour la Recherche Medicale' (FRM) (FDT20140930864), the 'Fondation de l'Avenir' (ET3-694) and the Institut Français pour la Recherche Odontologique (IFRO).

Author contributions

J.R.: data research, analysis, and interpretation and manuscript writing; G.C.: data analysis; J.P.: data interpretation; C.B-V: data analysis, design and interpretation; H.P.: discussion and final approval of manuscript; F.A.: conception, design, data analysis and interpretation and manuscript writing.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

1. **Martin A, Komada MR, Sane DC.** Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. *Med Res Rev.* 2003; 23: 117–45.
2. **Oikawa A, Siragusa M, Quaini F, *et al.*** Diabetes mellitus induces bone marrow microangiopathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30: 498–508.
3. **Tahergorabi Z, Khazaei M.** Imbalance of angiogenesis in diabetic complications: the mechanisms. *Int J Prev Med.* 2012; 3: 827–38.
4. **Abu El-Asrar AM, Nawaz MI, Kangave D, *et al.*** Angiogenesis regulatory factors in the vitreous from patients with proliferative diabetic retinopathy. *Acta Diabetol.* 2013; 50: 545–51.

© 2016 The Authors.

Journal of Cellular and Molecular Medicine published by John Wiley & Sons Ltd and Foundation for Cellular and Molecular Medicine.

5. **Abu El-Asrar AM, Struyf S, Kangave D, *et al.*** Chemokines in proliferative diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy. *Eur Cytokine Netw*. 2006; 17: 155–65.
6. **Golden SH.** Emerging therapeutic approaches for the management of diabetes mellitus and macrovascular complications. *Am J Cardiol*. 2011; 108: 59B–67B.
7. **Gealekman O, Brodsky SV, Zhang F, *et al.*** Endothelial dysfunction as a modifier of angiogenic response in Zucker diabetic fat rat: amelioration with Ebselen. *Kidney Int*. 2004; 66: 2337–47.
8. **Shin L, Peterson DA.** Impaired therapeutic capacity of autologous stem cells in a model of type 2 diabetes. *Stem Cells Transl Med*. 2012; 1: 125–35.
9. **Roberts AC, Porter KE.** Cellular and molecular mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes. *Diabetes Vasc Dis Res*. 2013; 10: 472–82.
10. **Sumpio BE, Riley JT, Dardik A.** Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002; 34: 1508–12.
11. **Capla JM, Grogan RH, Callaghan MJ, *et al.*** Diabetes impairs endothelial progenitor cell-mediated blood vessel formation in response to hypoxia. *Plast Reconstr Surg*. 2007; 119: 59–70.
12. **Kang L, Chen Q, Wang L, *et al.*** Decreased mobilization of endothelial progenitor cells contributes to impaired neovascularization in diabetes. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009; 36: e47–56.
13. **Watt SM, Gullo F, van der Garde M, *et al.*** The angiogenic properties of mesenchymal stem/stromal cells and their therapeutic potential. *Br Med Bull*. 2013; 108: 25–53.
14. **Yan J, Tie G, Wang S, *et al.*** Type 2 diabetes restricts multipotency of mesenchymal stem cells and impairs their capacity to augment postischemic neovascularization in db/db mice. *J Am Heart Assoc*. 2012; 1: e002238.
15. **Pacini S, Petrini I.** Are MSCs angiogenic cells? New insights on human nestin-positive bone marrow-derived multipotent cells. *Front Cell Dev Biol*. 2014; 2: 20.
16. **Hung SC, Pochampally RR, Chen SC, *et al.*** 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*. 2007; 25: 2363–70.
17. **Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, *et al.*** Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote *in vitro* and *in vivo* arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res*. 2004; 94: 678–85.
18. **Etgen GJ, Oldham B.** Profiling of Zucker diabetic fatty rats in their progression to the overt diabetic state. *Metabolism*. 2000; 49: 684–88.
19. **Benslimane-Ahmim Z, Heymann D, Dizier B, *et al.*** Osteoprotegerin, a new actor in vasculogenesis, stimulates endothelial colony-forming cells properties. *J Throm Haemost*. 2011; 9: 834–43.
20. **Shigematsu S, Yamauchi K, Nakajima K, *et al.*** IGF-1 regulates migration and angiogenesis of human endothelial cells. *Endocr J*. 1999; 46(Suppl): S59–62.
21. **Middleton K, Jones J, Lwin Z, *et al.*** Interleukin-6: an angiogenic target in solid tumours. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2014; 89: 129–39.
22. **Salcedo R, Ponce ML, Young HA, *et al.*** Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood*. 2000; 96: 34–40.
23. **Ranganath SH, Levy O, Inamdar MS, *et al.*** Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. *Cell Stem Cell*. 2012; 10: 244–58.
24. **Bach LA.** Endothelial cells and the IGF system. *J Mol Endocrinol*. 2015; 54: R1–13.
25. **Romaniuk D, Kimsa MW, Strzalka-Mrozik B, *et al.*** Gene expression of IGF1, IGF1R, and IGFBP3 in epiretinal membranes of patients with proliferative diabetic retinopathy: preliminary study. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013: 986217.
26. **Beltramo E, Lopatina T, Berrone E, *et al.*** Extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells induce features of diabetic retinopathy *in vitro*. *Acta Diabetol*. 2014; 51: 1055–64.
27. **Delafontaine P, Song YH, Li Y.** Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24: 435–44.
28. **Tatti O, Vehvilainen P, Lehti K, *et al.*** MT1-MMP releases latent TGF-beta1 from endothelial cell extracellular matrix *via* proteolytic processing of LTBP-1. *Exp Cell Res*. 2008; 314: 2501–14.
29. **Todorovic V, Rifkin D.** LTBPs, more than just an escort service. *J Cell Biochem*. 2012; 113: 410–8.
30. **Kale S, Raja R, Thorat D, *et al.*** Osteopontin signaling upregulates cyclooxygenase-2 expression in tumor-associated macrophages leading to enhanced angiogenesis and melanoma growth *via* alpha9beta1 integrin. *Oncogene*. 2014; 33: 2295–306.
31. **Berchem G, Glondu M, Gleizes M, *et al.*** Cathepsin-D affects multiple tumor progression steps *in vivo*: proliferation, angiogenesis and apoptosis. *Oncogene*. 2002; 21: 5951–5.
32. **Jian J, Zheng Z, Zhang K, *et al.*** Fibromodulin promoted *in vitro* and *in vivo* angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 436: 530–5.
33. **Neve A, Cantatore FP, Maruotti N, *et al.*** Extracellular matrix modulates angiogenesis in physiological and pathological conditions. *BioMed Res Int*. 2014; 2014: 756078.
34. **Sottile J.** Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1654: 13–22.
35. **Lyublinskaya OG, Borisov YG, Pugovkina NA, *et al.*** Reactive oxygen species are required for human mesenchymal stem cells to initiate proliferation after the quiescence exit. *Oxid Med Cell Longev*. 2015; 2015: 502105.
36. **Monnier VM, Mustata GT, Biemel KL, *et al.*** Cross-linking of the extracellular matrix by the maillard reaction in aging and diabetes: an update on 'a puzzle nearing resolution'. *Ann N Y Acad Sci*. 2005; 1043: 533–44.
37. **Gao Y, Wu F, Zhou J, *et al.*** The H19/let-7 double-negative feedback loop contributes to glucose metabolism in muscle cells. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42: 13799–811.
38. **Reddy MA, Zhang E, Natarajan R.** Epigenetic mechanisms in diabetic complications and metabolic memory. *Diabetologia*. 2015; 58: 443–55.
39. **Park LK, Maione AG, Smith A, *et al.*** Genome-wide DNA methylation analysis identifies a metabolic memory profile in patient-derived diabetic foot ulcer fibroblasts. *Epigenetics*. 2014; 9: 1339–49.
40. **Williams KT, Schalinske KL.** Tissue-specific alterations of methyl group metabolism with DNA hypermethylation in the Zucker (type 2) diabetic fatty rat. *Diabetes Metab Res Rev*. 2012; 28: 123–31.
41. **Mohammadi E, Nassiri SM, Rahbarghazi R, *et al.*** Endothelial juxtaposition of distinct adult stem cells activates angiogenesis signaling molecules in endothelial cells. *Cell Tissue Res*. 2015; 362: 597–609.
42. **Li H, Zuo S, He Z, *et al.*** Paracrine factors released by GATA-4 overexpressed mesenchymal stem cells increase angiogenesis and cell survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010; 299: H1772–81.
43. **Gruber R, Kandler B, Holzmann P, *et al.*** Bone marrow stromal cells can provide a

© 2016 The Authors.
Journal of Cellular and Molecular Medicine published by John Wiley & Sons Ltd and Foundation for Cellular and Molecular Medicine.

local environment that favors migration and formation of tubular structures of endothelial cells. *Tissue Eng*. 2005; 11: 896–903.

44. **Bronckaers A, Hilkens P, Martens W, *et al.*** Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis. *Pharmacol Ther*. 2014; 143: 181–96.
45. **Rahbarghazi R, Nassiri SM, Khazraiinia P, *et al.*** Juxtacrine and paracrine interactions of rat marrow-derived mesenchymal stem cells, muscle-derived satellite cells, and neonatal cardiomyocytes with endothelial cells in angiogenesis dynamics. *Stem Cells Dev*. 2013; 22: 855–65.
46. **Costa PZ, Soares R.** Neovascularization in diabetes and its complications. Unraveling the angiogenic paradox. *Life Sci*. 2013; 92: 1037–45.
47. **Page P, DeJong J, Bandstra A, *et al.*** Effect of serum and oxygen concentration on gene expression and secretion of paracrine factors by mesenchymal stem cells. *Int J Cell Biol*. 2014; 2014: 601063.
48. **Deschepper M, Oudina K, David B, *et al.*** Survival and function of mesenchymal stem cells (MSCs) depend on glucose to overcome exposure to long-term, severe and continuous hypoxia. *J Cell Mol Med*. 2011; 15: 1505–14.
49. **Dzhoyashvili NA, Efimenko AY, Kochegura TN, *et al.*** Disturbed angiogenic activity of adipose-derived stromal cells obtained from patients with coronary artery disease and diabetes mellitus type 2. *J Transl Med*. 2014; 12: 337.

© 2016 The Authors.

Journal of Cellular and Molecular Medicine published by John Wiley & Sons Ltd and Foundation for Cellular and Molecular Medicine.

4. Discussion

A l'heure où le diabète prend des proportions pandémiques, nous nous sommes intéressés dans le cadre de cette thèse à l'étude de l'impact du diabète de type 2 (TD2M) sur l'os et en particulier sur la réparation des os maxillo-faciaux d'origine endomembranaire.
Les résultats montrèrent, pour la première fois, que dans un microenvironnement diabétique bien établi, la réparation osseuse de la calvaria n'était significativement altérée que dans les défauts de taille critique (CSD-8mm) ($p<0,01$), alors que la réparation vasculaire était diminuée dans tous les défauts, même les plus petits ($p<0,01$). Le T2DM peut altérer plusieurs paramètres systémiques et/ou locaux du remodelage et de la réparation osseuse. Pour cette étude nous avons donc choisi le rat ZDF, qui présente les complications musculosqueléttiques et les altérations systémiques liées au T2DM.

4.1. Impact du T2DM sur les paramètres systémiques

Chez le rat ZDF âgé de 24 semaines, à 8 semaines postopératoire, au niveau sérique *in vivo*, nous avons relevé une augmentation de la calcémie (x2,5) et de l'ALP (x2,5) alors que la phosphatémie restait inchangée (Tab 2 Art 1). Nos résultats rejoignent ceux de Hamann et al. [205] pour la calcémie et la phosphatémie, sur des rats âgés de 21 semaines, à 12 semaines postopératoires sur des défauts fémoraux. Hamann et al.[205], ont aussi observé une baisse du taux d'ostéocalcine et de la P1NP marqueurs de la formation osseuse, ainsi qu'une augmentation du taux de CTX marqueur de la résorption osseuse. Dans un contexte de réparation osseuse, la machinerie cellulaire semble orienter la balance résorption/formation au profit de la résorption chez rat ZDF.

4.2. Impact du T2DM sur les paramètres microstructuraux de l'os et de la vasculature

Les résultats de nos travaux relèvent des modifications de certains paramètres de la microarchitecture des os crâniens ZDF de 16 et 24 semaines. En effet, l'indice de connectivité de la calvaria est 2,7 fois moins important chez le rat ZDF âgé de 16 semaines, avant chirurgie (Fig 3L Art 1). On y distingue également moins de trabécules de petites tailles chez le rat ZDF (Fig 3I Art 1). Cette altération de la connectivité n'a pas été observée au niveau du fémur. Néanmoins, des études rapportent une augmentation de l'indice de connectivité résultant d'une réorganisation anarchique des travées ZDF [205], [211], [212].
De même, le suivi post opératoire de la distribution des trabécules suivant leur taille dans l'os cicatriciel de calvaria, montre un nombre de trabécules moindre à 8 semaines postopératoire chez les rats ZDF (Fig 3J Art1), au détriment des travées de petites tailles. Au niveau des fémurs, cette même baisse significative du volume totale de l'os trabéculaire des rats ZDF comparés à ceux des rats ZL a été observé sur 3 sites différents; la tête, le col, et la métaphyse distale (Tab1 Art2). La baisse du volume de l'os trabéculaire rejoint les résultats des études sur les vertèbres [212], [213] et sur la métaphyse distale du fémur [211]. Cette baisse est expliquée par un

nombre et une épaisseur de travées diminués [205], [211] ou par une diminution de l'épaisseur seule [212].
Ces différentes études ont été réalisées à une résolution de 12 et 20 microns, avec des rats âgés de 9 à 33 semaines. Notre étude quant à elle a été réalisée à une résolution de 6 et 35 microns avec des rats âgés de 24 semaines. La différence d'âge des rats donc de l'antériorité de l'établissement du diabète et les différences de résolution de l'imagerie pourraient expliquer en partie certaines des différences de résultats entre ces différentes études.

Nos études microscanners ont aussi mis en évidence une atteinte de la vascularisation osseuse chez le rats ZDF. Le réseau vasculaire des rats ZDF était moins développé au niveau des os crâniens (Fig 6 Art 1) ainsi qu'au niveau des os longs (Fig 4 article 2). Néanmoins, il est à noter que les modifications de la vascularisation au niveau du fémur variaient en fonction du site (Tab 3 Art 2) ; elles étaient plus marquées au niveau distal de la métaphyse.
Les mécanismes conduisant à ces changements ne sont pas encore clairement élucidés, plusieurs hypothèses telles que ; l'interaction de la vascularisation avec les unités de remodelage osseux via une messagerie moléculaire complexe, le recrutement de pericytes à visée ostéoprogénitrice[214], ou encore l'atteinte vasomotrice de l'artère nourricière principale du fémur des rats ZDF [215], ont été avancées.

4.3. Impact du T2DM sur la réparation osseuse

En parallèle au statut diabétique, notre étude a permis d'identifier l'implication d'autres paramètres majeurs tels que la taille du défaut ou en encore sa situation anatomique, dans la réparation osseuse.
D'après les données bibliographiques, il semblerait que la taille du défaut soit un paramètre important à prendre en compte quand on évalue la cicatrisation osseuse. Notre étude par microscanner de la réparation osseuse, de défaut de taille croissante, a montré que la quantité d'os formé diminuait avec la taille du défaut aussi bien chez les rats ZDF que chez les rats ZL. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de Vajgel et al. [146].
A 8 semaines postopératoires, indépendamment de la condition diabétique, nous avions retrouvé beaucoup d'os néoformé voir des fermetures complètes de défauts de 2-, 4-, et 6mm. Pour les défauts de 2- et 4mm ceci corroborent les résultats de la littérature [216]-[218]. Quant aux résultats concernant les défauts de 6mm, ils sont en contradiction avec certaines études précédentes qui les considèrent comme des défauts de taille critique. Néanmoins la comparaison directe n'est pas possible dans la mesure où plusieurs paramètres diffèrent; la souche de rat, le nombre de défaut par calvaria, la localisation anatomique précise, l'implication de la suture sagittale médiane [219]-[223], ou encore les méthodes d'évaluation [220], [221].
Nous avons également constaté que le défaut de 2mm était le moins réparé. Ce dernier était systématiquement réalisé à proximité de l'incision périostée contrairement au défaut de 4mm, ce qui nous amène à penser que le rôle du périoste est à prendre en compte lors de la disposition des défauts à comparer.

Quant aux défauts de 8mm, aussi bien chez les rats diabétiques que les contrôles, la quantité d'os formé était faible, comparable aux données de la littérature [146], [185], [196]. Pour les rats ZDF et ZL, seuls les défauts de 8mm peuvent être considérés comme étant de taille critique ; donc les seuls adaptés à l'évaluation de stratégies

de réparation osseuse crâniofaciale.
Les différences significatives (p<0,01) en termes de surface et de volume de l'os réparé entre les ZDF et les ZL ne furent constatées qu'au niveau des CSD. Cette diminution de la réparation osseuse des CSD de la calvaria a aussi été décrite dans le cas du T1DM [145], [180], [224]. Quelques études ont également mis en évidence une altération de la réparation des os longs ; chez les rats ZDF [205], les souris diabétiques [225], au niveau du fémur [205], du tibia [225] et dans des modèles de distraction osseuse [149]. La réparation osseuse y est dépendante de la taille du défaut ; elle n'y est altérée que dans les grands défauts fémoraux des rats BB/OK [152].

L'un de nos premiers soucis fut de confirmer que la taille critique, définie pour d'autres souches de rats dans la littérature était la même pour le rat diabétique ZDF. En effet, l'utilisation d'un défaut de taille critique permettrait d'apprécier pleinement la contribution des biomatériaux testés. Un défaut trop grand quant à lui pourrait rendre les résultats de l'expérimentation inutilisables en occultant les effets biologiques, alors qu'un défaut trop petit, cicatriserait trop vite, ne nous laissant pas le temps d'investiguer les évènements biologiques en présence. Le CSD est donc de 8mm pour notre modèle de défaut de calvaria de rat ZDF.

4.4. Impact du diabète sur la réparation vasculaire

Dans la mesure où la plupart des complications du diabète ont une origine angiopathique, l'étude de la l'atteinte vasculaire de l'os réparé nous a semblé être une approche intéressante.
A 8 semaines postopératoire, le réseau vasculaire dans les défauts était moins volumineux, moins étendu, avec une architecture de réseau différente chez les ZDF comparés aux ZL. Ces résultats corroborent les changements constatés dans le réseau vasculaire et la circulation sanguine de la moelle osseuse des os longs décrits chez les T2DM [213], [215], [226]. Cette altération de l'angiogénèse dans le T2DM, peut avoir comme origine le dysfonctionnement des cellules endothéliales, un moindre recrutement des cellules progénitrices, un déficit en facteur angiogénique, ou une circulation sanguine altérée [215].
De plus, le lit vasculaire à 16 semaines, lors de la chirurgie, peut probablement être différent chez les rats ZDF, induisant par conséquent une réparation vasculaire moindre à 24 semaines, soit 8 semaines postopératoire. Il est aussi possible qu'au sein de la calvaria du même animal, il puisse y avoir des différences de densité vasculaire entre différents sites (à l'image du fémur), induisant des variations de potentiel de réparation.

4.5. Relation entre l'altération de la réparation vasculaire et osseuse

Plusieurs études relient l'atteinte vasculaire à diverses complications osseuses consécutives au T2DM [215], [227]; et plus particulièrement à la régénération osseuse des os longs[225], [228]. Cette association est également retrouvée dans notre étude où l'on retrouve une altération de la réparation osseuse et un réseau vasculaire moins développé dans les CSD des rats ZDF en comparaison aux rats ZL. Notre étude relève également l'importance de la taille du défaut dans cette association atteinte

vasculaire/atteinte osseuse. En effet, le réseau capillaire est également altéré dans les SCSD des rats ZDF, mais sans induire de différence sur le volume ou la surface d'os formé.
Nous constatons d'une part, dans les SCSD une corrélation entre le volume de vaisseaux présents dans le défaut, et la surface d'os formé dans ce dernier ; plus il y a de vaisseaux plus il y a de surface de l'os formé dans les défauts osseux. D'autre part, pour les CSD, il semblerait qu'on ait atteint un plateau en terme de formation osseuse, lequel plateau est distinct pour les ZDF et les ZL. La quantité d'os et de vaisseaux présents dans les CSD (8mm) des rats ZDF est comparable à celle présente dans les défauts de 4mm des ZDF, soit moins d'os et de vaisseaux que dans les défauts ZDF de 6mm. Alors que dans les CSD des ZL, il y a moins de vaisseaux que dans les défauts ZL de 6mm mais autant d'os.

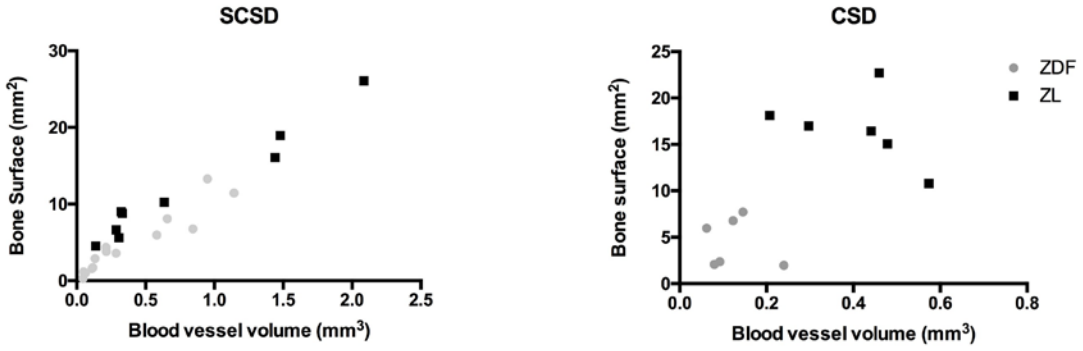


Figure 15 : Corrélation entre le volume de vaisseaux et la surface d'os formé dans les SCSD et les CSD.

La taille du défaut semble avoir un impact aussi important que le T2DM sur la cicatrisation osseuse. Le bourgeonnement capillaire, ainsi qu'un réseau vasculaire permettant la circulation du sang d'un bout à l'autre du défaut, ont été décrits comme indispensable à la réparation des CSD [218]; notre étude confirmant que les défauts inferieurs à 6mm n'ont pas d'altération primaire de la cicatrisation osseuse alors que la réparation vasculaire est atteinte affine ce propos.
En effet, il semblerait que le déficit de réparation osseuse lié au déficit de réparation vasculaire des ZDF dans les SCSD, soit compensé par d'autres voies de formation osseuse ; (i) le recrutement de cellules bordantes des berges de la plaie, qui sont proportionnellement plus nombreuses dans les petits défauts, (ii) l'hyperinsulinémie des ZDF qui a pour conséquence une néoformation osseuse consécutive à l'hyperproduction de matrice cellulaire par les OB diabétiques [229].

Quant aux CSD, cette compensation n'a pas pu se faire chez les ZDF. Ceci peut être attribué à une altération du recrutement des précurseurs ostéoblastiques et de la différentiation aux abords du CSD diabétiques [205]. Par contre chez le ZL, elle a pu avoir lieu dans la mesure où, malgré le fait qu'il y ait moins de vaisseaux dans le défaut de 8mm que dans celui de 6mm, il y a la même quantité d'os.

4.6. Altération des BMMSC de l'hôte diabétique

4.6.1. Altération du sécrétome des BMMSC ZDF

In vitro, le profil protéique des milieux conditionnés (CM) issue de la culture pendant 24h dans un milieu sans sérum, de BMMSC de rats ZDF de 12 semaines, montre une

augmentation des protéines pro-angiogéniques et de celles favorisant la formation de matrice extracellulaire ; alors que les protéines liées au métabolisme glucidique sont moins exprimées par rapport au CM-ZL (Fig 7 art 3). L'augmentation du potentiel chémo-attractant des cellules angioprogénitrices du CM-ZDF est confirmée *in vitro* par les tests de migration des HUVECs (Fig 8 art 3). L'augmentation du potentiel angiogénique du CM-ZDF est confirmée *in vitro* par la formation plus importante de microtubules sur matrigel par les HUVECs au contact de ce dernier, et *in vivo* par la formation d'un réseau vasculaire plus important après implantation sous-cutanée de plug de matrigel contenant du CM-ZDF chez la souris nude.

4.6.2. Altération de la différenciation ostéoblastique des BMMSC ZDF

De même la différenciation ostéoblastique de BMMSC ZDF conduit à une plus importante minéralisation du tapis cellulaire à J25.

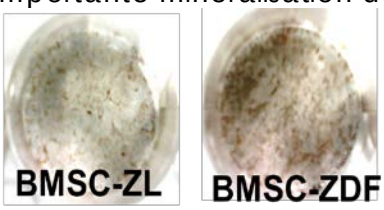


Figure 16 Coloration von Kossa des tapis cellulaires après culture de BMMSC ZDF et de BMSC ZL dans un milieu ostéoblastique pendant 25 jours. Communication affichée, IADR européen, Budapest 2014.

A la lumière de ces constations *in vitro, et in vivo*, il semblerait que l'organisme des rats ZDF active différents mécanismes permettant de compenser son déficit de formation osseuse et vasculaire. *In vitro et in vivo*, dans un environnement normo-glycémique cela aboutit à une minéralisation exacerbée des tapis cellulaires ou à la formation de réseau vasculaire plus dense ; alors qu'*in vivo* dans un environnement T2DM cela ne permet pas de compenser le déficit de réparation vasculaire et osseuse. Nos futures études devraient nous permettre (i) d'affiner ces constations en fonction de l'âge des rats et de la durée de leur diabète ; (ii) de comprendre les cascades moléculaires sous-jacentes, afin d'identifier les molécule-clés à incorporer dans nos thérapeutiques.

4.6.3. Altération du nombre et de la prolifération des BMMSC ZDF

Nos résultats montrent une diminution du nombre et du potentiel de prolifération des cellules mononuclées présentes dans la moelle osseuse des rats ZDF (Fig 17), corroborant les études animales et cliniques sur les patients T2DM dans la littérature.

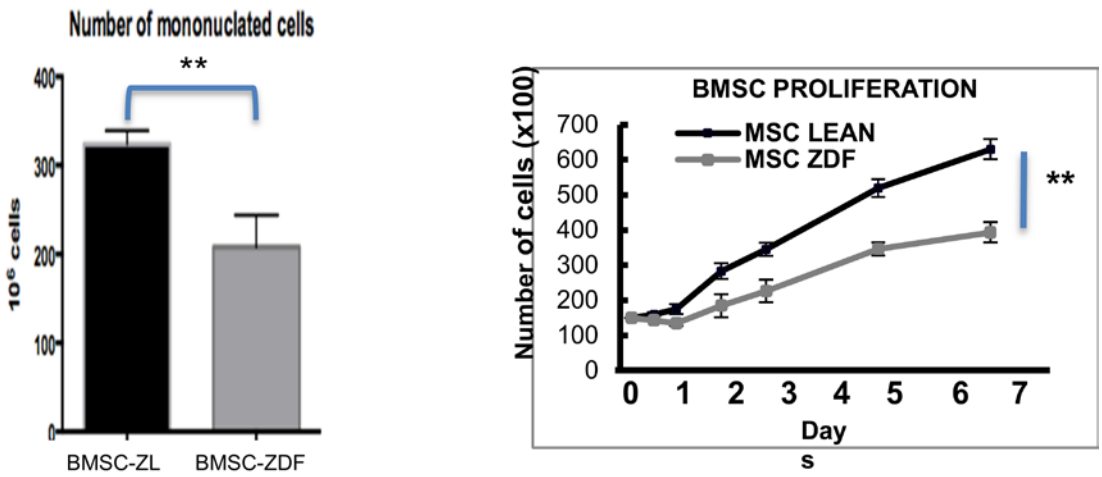


Figure 17 Nombre de cellules mononuclées présentes dans la MO et leur prolifération. Communication affichée, IADR européen, Budapest 2014

De plus, contrairement à notre CM de BMMSC-ZDF qui présente des propriétés angiogéniques accrues, le milieu conditionné issu de la culture de CSM issus du tissu adipeux humain aurait un potentiel angiogénique diminué[230].

Nos futures études devront donc déterminer si les cellules stromales de l'hôte diabétique, de part leur nombre et leur taux de prolifération affaiblis, sont incorporables dans les futurs produits d'ingénieries tissulaires. Chaque type de CSM-T2DM en fonction de son origine (MO, adipocyte, périostes, EPC) devra être étudié afin de déterminer son potentiel de prolifération, de différenciation ostéoblastique/endothéliale, son potentiel ostéogène et angiogène afin de sélectionner le type cellulaire, le mieux adapté à l'amélioration de la réparation vasculaire et/ou osseuse dans un environnement T2DM.

4.7. Limitations liées à la technique de l'étude de la microvascularisation dans l'os

A notre connaissance, cette étude est la première à utiliser le microscanner pour une cartographie 3D de toute l'architecture vasculaire de la calvaria cicatrisée, à une résolution permettant la mise en évidence de tout le réseau capillaire (6-8µm) avec un équipement conventionnel de laboratoire. En effet, de précédentes études qui ont analysé à la fois les paramètres osseux et vasculaires après cicatrisation au niveau de calvaria diabétique, n'ont pas pu analyser les vaisseaux de la taille des capillaires. Leur résolution de 12µm rendait invisible les structures inférieurs à 12µm, ce qui selon les auteurs auraient pu expliquer l'absence de détection des différences significatives de réparation vasculaire de leurs matériaux testés [196]. Nos réglages ont permis de réaliser une imagerie précise de l'os et de la microvascularisation à une résolution de 3,5µm, ce qui pourra être une aide précieuse pour de futures études voulant évaluer l'architecture microvasculaire, laquelle semble intimement liée à la réparation osseuse.

Quant à l'analyse des images obtenues, des logiciels permettant la superposition tridimensionnelle des différents clichés aux différents temps, pourrait nous permettre de quantifier plus finement les volumes d'os néoformé. De même, l'analyse

microarchitecturale de l'os des SCSD (rendu impossible par l'injection de microfil avant le scanner), ainsi que l'étude leur cinétique de réparation osseuse (scanner *in vivo*), pourraient révéler une altération de ces paramètres malgré une absence de différence significative en terme de volume et de surface d'os formé chez les animaux diabétiques.
De plus, cette technique ne permet pas de cerner les différentes populations cellulaires impliquées dans la réparation ; une analyse histologique et histomorphométrique est nécessaire. La technique d'injection de Microfil ne permet pas non plus d'apprécier les variations de l'hémodynamie au niveau du défaut en réparation. Pour finir, cette étude ne nous a pas permis d'observer la réparation vasculaire aux temps précoces.
Ces limites doivent être prises en compte lors de futures études impliquant cette relation dynamique entre l'angio- et l'ostéo- genèse dans la réparation osseuse endomembranaire diabétique.

5. Perspectives

Plusieurs mécanismes moléculaires plausibles ont été avancés pour expliquer l'altération de la réparation osseuse chez les diabétiques : une altération de la différentiation ostéoblastique, une diminution de la prolifération et du potentiel de formation osseuse des ostéoblastes pendant les phases critiques de la réparation osseuse [115]. Dans le T1DM l'hyperglycémie et l'insulinopénie semblent être à l'origine de la pathologie osseuse diabétique. La pathogénie osseuse dans le T2DM est plus complexe et les futures études devraient s'intéresser à l'atteinte microvasculaires en amont afin de comprendre leurs interrelations et d'élaborer des produits d'ingénierie cellulaire spécifique aux diabétiques.

A travers notre modèle d'étude, nous avons pu identifier 2 paramètres majeurs impliqués dans la cicatrisation des défauts de calvaria diabétiques ; (i) **le statut diabétique**, qui peut altérer le métabolisme phosphocalcique ou encore diminuer le nombre de cellules ostéoprogénitrices présentes sur le site ; (ii) les caractéristiques du défaut osseux ; **la taille du défaut**, plus ce dernier est grand, moins il cicatrise spontanément ; la **situation anatomique du défaut**, selon qu'il soit sur l'os pariétal, frontal ou encore nasal, selon la vascularisation ou le contenu en os spongieux du site initial, selon que l'on soit proche des incisions chirurgicales, ou de sutures osseuses, les zones seront plus ou moins propice à la réparation osseuse.

Nos études futures devraient viser à vérifier ces propos et à améliorer la cicatrisation osseuse diabétique en nous concentrant sur 3 axes :

- la mise en évidence des perturbations cellulaires et moléculaires liées aux TD2M conduisant à la perturbation de la cicatrisation osseuse et vasculaire des défauts osseux.
- L'évaluation de l'atteinte fonctionnelle des CSMs provenant d'un environnement T2DM (de diverses origines anatomiques), afin de déterminer si elles peuvent entrer dans l'élaboration de produits d'ingénierie tissulaire

« autologue ».

- Elaborer des produits d'ingénierie palliant les déficits mis en évidence précédemment, et les tester à l'aide de notre modèle pour évaluer leur apport réel dans la réparation osseuse et l'amélioration de l'architecture vasculaire de l'os néoformé.

REFERENCES

Barone R (2010) Anatomie comparée des mammifères domestiques,
Tome 2, Arthrologie et myologie. Éditions Vigot, Paris

Sharkey, L. and S. Hill: Structure of bone marrow, in D. Weiss and W. KJ. (eds):
Schalm's Veterinary hematology (ed 6th). Ames, Blackwell Publishing Ltd, 2010, pp 8-13

[1] M. E. Doyle and S. M. Jan de Beur, "The skeleton: endocrine regulator of phosphate homeostasis.," *Curr Osteoporos Rep*, vol. 6, no. 4, pp. 134–141, Dec. 2008.

[2] G. Karsenty and P. Mera, "Molecular bases of the crosstalk between bone and muscle," *Bone*, Apr. 2017.

[3] M. Ferron, J. Wei, T. Yoshizawa, A. Del Fattore, R. A. DePinho, A. Teti, P. Ducy, and G. Karsenty, "Insulin Signaling in Osteoblasts Integrates Bone Remodeling and Energy Metabolism," *Cell*, vol. 142, no. 2, pp. 296–308, Jul. 2010.

[4] K. Fulzele and T. L. Clemens, "Novel functions for insulin in bone," *Bone*, vol. 50, no. 2, pp. 452–456, Feb. 2012.

[5] G. S. Travlos, "Normal structure, function, and histology of the bone marrow.," *Toxicol Pathol*, vol. 34, no. 5, pp. 548–565, 2006.

[6] R. B. Martin, D. B. Burr, N. A. Sharkey, and D. P. Fyhrie, *Skeletal Tissue Mechanics*. Springer, 2015.

[7] S. Kumar, T. R. Nagy, and S. Ponnazhagan, "Therapeutic potential of genetically modified adult stem cells for osteopenia.," *Gene Ther.*, vol. 17, no. 1, pp. 105–116, Jan. 2010.

[8] C. Colnot, X. Zhang, and M. L. Knothe Tate, "Current insights on the regenerative potential of the periosteum: molecular, cellular, and endogenous engineering approaches.," *J. Orthop. Res.*, vol. 30, no. 12, pp. 1869–1878, Dec. 2012.

[9] A. Ozaki, M. Tsunoda, S. Kinoshita, and R. Saura, "Role of fracture hematoma and periosteum during fracture healing in rats: interaction of fracture hematoma and the periosteum in the initial step of the healing process.," *J Orthop Sci*, vol. 5, no. 1, pp. 64–70, 2000.

[10] C. Colnot, "Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration.," *J Bone Miner Res*, vol. 24, no. 2, pp. 274–282, Feb. 2009.

[11] Z. Lin, A. Fateh, D. M. Salem, and G. Intini, "Periosteum: biology and applications in craniofacial bone regeneration.," *J. Dent. Res.*, vol. 93, no. 2, pp. 109–116, Feb. 2014.

[12] A. K. Gosain, L. Song, P. Yu, B. J. Mehrara, C. Y. Maeda, L. I. Gold, and M. T. Longaker, "Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-beta isoforms.," *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 106, no. 2, pp. 360–71– discussion 372, Aug. 2000.

[13] L. Uddströmer and V. Ritsilä, "Healing of membranous and long bone defects. An experimental study in growing rabbits.," *Scand J Plast Reconstr Surg*, vol. 13, no. 2, pp. 281–287, 1979.

[14] R. S. Taichman, "Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche.," *Blood*, vol. 105, no. 7, pp. 2631–2639, Apr. 2005.

[15] M. Marenzana and T. R. Arnett, "The Key Role of the Blood Supply to Bone.," *Bone Res.*, vol. 1, no. 3, pp. 203–215, Sep. 2013.

[16] P. J. Bouletreau, S. M. Warren, J. A. Spector, Z. M. Peled, R. P. Gerrets, J. A. Greenwald, and M. T. Longaker, "Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing.," *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 109, no. 7, pp. 2384–2397, Jun. 2002.

[17] C. J. Percival and J. T. Richtsmeier, "Angiogenesis and intramembranous osteogenesis," *Dev. Dyn.*, vol. 242, no. 8, pp. 909–922, Jun. 2013.

[18] G. S. Travlos, "Histopathology of bone marrow.," *Toxicol Pathol*, vol. 34, no. 5, pp. 566–

598, 2006.
[19] G. D. M. Collett and A. E. Canfield, “Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification.,” *Circ. Res.*, vol. 96, no. 9, pp. 930–938, May 2005.
[20] T. A. Franz-Odendaal, B. K. Hall, and P. E. Witten, “Buried alive: how osteoblasts become osteocytes.,” *Dev. Dyn.*, vol. 235, no. 1, pp. 176–190, Jan. 2006.
[21] M. S. Rahman, N. Akhtar, H. M. Jamil, R. S. Banik, and S. M. Asaduzzaman, “TGF-β/BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation,” *Bone Res.*, vol. 3, pp. 15005–20, Apr. 2015.
[22] K. A. Hing, “Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering?,” *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*, vol. 362, no. 1825, pp. 2821–2850, Dec. 2004.
[23] Y. Kameo, K.-I. Tsubota, and T. Adachi, *Bone Adaptation*, vol. 2. Tokyo: Springer, 2018.
[24] S. Sam and C. Crowde, “Bone Remodeling, Histomorphology and Histomorphometry,” in *Bone Histology*, CRC Press, 2012, pp. 1–21.
[25] T. A. Einhorn and L. C. Gerstenfeld, “Fracture healing: mechanisms and interventions,” *Nature Reviews Rheumatology*, vol. 11, no. 1, pp. 45–54, Sep. 2014.
[26] O. Chaparro and I. Linero, “Regenerative Medicine: A New Paradigm in Bone Regeneration,” in *Advanced Techniques in Bone Regeneration*, no. 12, InTech, 2016.
[27] N. C. Keramaris, G. M. Calori, V. S. Nikolaou, E. H. Schemitsch, and P. V. Giannoudis, “Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF.,” *Injury*, vol. 39, pp. S45–57, Sep. 2008.
[28] X. Sun, Y. Kang, J. Bao, Y. Zhang, Y. Yang, and X. Zhou, “Modeling vascularized bone regeneration within a porous biodegradable CaP scaffold loaded with growth factors,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 21, pp. 4971–4981, Jul. 2013.
[29] A. Khojasteh, H. Behnia, N. Naghdi, M. Esmaeelinejad, Z. Alikhassy, and M. Stevens, “Effects of different growth factors and carriers on bone regeneration: a systematic review.,” *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, vol. 116, no. 6, pp. e405–23, Dec. 2013.
[30] K. D. Hankenson, M. Dishowitz, C. Gray, and M. Schenker, “Angiogenesis in bone regeneration.,” *Injury*, vol. 42, no. 6, pp. 556–561, Jun. 2011.
[31] W. Ji, H. Wang, J. J. J. P. van den Beucken, F. Yang, X. F. Walboomers, S. Leeuwenburgh, and J. A. Jansen, “Local delivery of small and large biomolecules in craniomaxillofacial bone.,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, no. 12, pp. 1152–1164, Sep. 2012.
[32] R. Lanza, R. Langer, and J. P. Vacanti, *Principles of Tissue Engineering*. Academic Press, 2013.
[33] A. Oryan, S. Alidadi, and A. Moshiri, “Current concerns regarding healing of bone defects,” *Hard Tissue*, vol. 2, no. 2, 2013.
[34] “Des biomatériaux à l'ingénierie tissulaire : perspectives en réparation osseuse,” pp. 1–27, Mar. 2016.
[35] J. Trueta and J. D. MORGAN, “The vascular contribution to osteogenesis. I. Studies by the injection method.,” *J Bone Joint Surg Br*, vol. 42, pp. 97–109, Feb. 1960.
[36] J. Trueta and M. H. HARRISON, “The normal vascular anatomy of the femoral head in adult man.,” *J Bone Joint Surg Br*, vol. 35, no. 3, pp. 442–461, Aug. 1953.
[37] M. BROOKES and R. G. HARRISON, “The vascularization of the rabbit femur and tibio-fibula.,” *J. Anat.*, vol. 91, no. 1, pp. 61–72, Jan. 1957.
[38] J. D. CUMMING and M. E. NUTT, “Bone-marrow blood flow and cardiac output in the rabbit.,” *J. Physiol. (Lond.)*, vol. 162, no. 1, pp. 30–34, Jun. 1962.
[39] T. R. Arnett, “Acidosis, hypoxia and bone.,” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 503, no. 1, pp. 103–109, Nov. 2010.
[40] J. S. Harrison, P. Rameshwar, V. Chang, and P. Bandari, “Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers.,” *Blood*, vol. 99, no. 1, p. 394, Jan. 2002.
[41] E. Schipani, C. Maes, G. Carmeliet, and G. L. Semenza, “Regulation of osteogenesis-angiogenesis coupling by HIFs and VEGF.,” *J Bone Miner Res*, vol. 24, no. 8, pp. 1347–1353, Aug. 2009.
[42] T. Suda, K. Takubo, and G. L. Semenza, “Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche.,” *Cell Stem Cell*, vol. 9, no. 4, pp. 298–310, Oct. 2011.
[43] T. C. Dandajena, M. A. Ihnat, B. Disch, J. Thorpe, and G. F. Currier, “Hypoxia triggers a

HIF-mediated differentiation of peripheral blood mononuclear cells into osteoclasts.," *Orthod Craniofac Res*, vol. 15, no. 1, pp. 1–9, Feb. 2012.

[44] H. Al Hadi, G. R. Smerdon, and S. W. Fox, "Hyperbaric oxygen therapy suppresses osteoclast formation and bone resorption.," *J. Orthop. Res.*, vol. 31, no. 11, pp. 1839–1844, Nov. 2013.

[45] J. C. Utting, A. M. Flanagan, A. Brandao-Burch, I. R. Orriss, and T. R. Arnett, "Hypoxia stimulates osteoclast formation from human peripheral blood.," *Cell Biochem. Funct.*, vol. 28, no. 5, pp. 374–380, Jul. 2010.

[46] H. B. Kristensen, T. L. Andersen, N. Marcussen, L. Rolighed, and J.-M. Delaisse, "Increased presence of capillaries next to remodeling sites in adult human cancellous bone.," *J Bone Miner Res*, vol. 28, no. 3, pp. 574–585, Mar. 2013.

[47] A. M. Parfitt, "The mechanism of coupling: a role for the vasculature," *Bone*, vol. 26, no. 4, pp. 319–323, Apr. 2000.

[48] B. Roche, V. David, A. Vanden-Bossche, F. Peyrin, L. Malaval, L. Vico, and M.-H. Lafage-Proust, "Structure and quantification of microvascularisation within mouse long bones: what and how should we measure?," *Bone*, vol. 50, no. 1, pp. 390–399, Jan. 2012.

[49] T. J. Thompson, P. D. Owens, and D. J. Wilson, "Intramembranous osteogenesis and angiogenesis in the chick embryo.," *J. Anat.*, vol. 166, pp. 55–65, Oct. 1989.

[50] E. J. Mackie, Y. A. Ahmed, L. Tatarczuch, K.-S. Chen, and M. Mirams, "Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton.," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 40, no. 1, pp. 46–62, 2008.

[51] C. Colnot, C. Lu, D. Hu, and J. A. Helms, "Distinguishing the contributions of the perichondrium, cartilage, and vascular endothelium to skeletal development.," *Dev. Biol.*, vol. 269, no. 1, pp. 55–69, May 2004.

[52] C. Maes, T. Kobayashi, M. K. Selig, S. Torrekens, S. I. Roth, S. Mackem, G. Carmeliet, and H. M. Kronenberg, "Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels.," *Dev. Cell*, vol. 19, no. 2, pp. 329–344, Aug. 2010.

[53] E. Zelzer, W. McLean, Y.-S. Ng, N. Fukai, A. M. Reginato, S. Lovejoy, P. A. D'Amore, and B. R. Olsen, "Skeletal defects in VEGF(120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis.," *Development*, vol. 129, no. 8, pp. 1893–1904, Apr. 2002.

[54] E. Zelzer and B. R. Olsen, "Multiple roles of vascular endothelial growth factor (VEGF) in skeletal development, growth, and repair.," *Curr. Top. Dev. Biol.*, vol. 65, pp. 169–187, 2005.

[55] J. Dai and A. B. M. Rabie, "VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification.," *J. Dent. Res.*, vol. 86, no. 10, pp. 937–950, Oct. 2007.

[56] W. De Spiegelaere, P. Cornillie, C. Casteleyn, C. Burvenich, and W. Van den Broeck, "Detection of hypoxia inducible factors and angiogenic growth factors during foetal endochondral and intramembranous ossification.," *Anat Histol Embryol*, vol. 39, no. 4, pp. 376–384, Aug. 2010.

[57] Y. Wang, C. Wan, L. Deng, X. Liu, X. Cao, S. R. Gilbert, M. L. Bouxsein, M.-C. Faugere, R. E. Guldberg, L. C. Gerstenfeld, V. H. Haase, R. S. Johnson, E. Schipani, and T. L. Clemens, "The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development.," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 117, no. 6, pp. 1616–1626, Jun. 2007.

[58] R. J. Pignolo and M. Kassem, "Circulating osteogenic cells: implications for injury, repair, and regeneration.," *J Bone Miner Res*, vol. 26, no. 8, pp. 1685–1693, Aug. 2011.

[59] E. F. Eriksen, G. Z. Eghbali-Fatourechi, and S. Khosla, "Remodeling and vascular spaces in bone.," *J Bone Miner Res*, vol. 22, no. 1, pp. 1–6, Jan. 2007.

[60] A. M. Parfitt, "The bone remodeling compartment: a circulatory function for bone lining cells.," *J Bone Miner Res*, vol. 16, no. 9, pp. 1583–1585, Sep. 2001.

[61] E. Lana-Elola, R. Rice, A. E. Grigoriadis, and D. P. C. Rice, "Cell fate specification during calvarial bone and suture development.," *Dev. Biol.*, vol. 311, no. 2, pp. 335–346, Nov. 2007.

[62] M. L. Brandi and P. Collin-Osdoby, "Vascular biology and the skeleton.," *J Bone Miner Res*, vol. 21, no. 2, pp. 183–192, Feb. 2006.

[63] M. Grellier, L. Bordenave, and J. Amédée, “Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering.,” *Trends in Biotechnology*, vol. 27, no. 10, pp. 562–571, Oct. 2009.

[64] K. Usami, H. Mizuno, K. Okada, Y. Narita, M. Aoki, T. Kondo, D. Mizuno, J. Mase, H. Nishiguchi, H. Kagami, and M. Ueda, “Composite implantation of mesenchymal stem cells with endothelial progenitor cells enhances tissue-engineered bone formation.,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 90, no. 3, pp. 730–741, Sep. 2009.

[65] B. F. Eames and J. A. Helms, “Conserved molecular program regulating cranial and appendicular skeletogenesis,” *Dev. Dyn.*, vol. 231, no. 1, pp. 4–13, 2004.

[66] B. Balczerski, S. Zakaria, A. S. Tucker, A. G. Borycki, E. Koyama, M. Pacifici, and P. Francis-West, “Distinct spatiotemporal roles of hedgehog signalling during chick and mouse cranial base and axial skeleton development.,” *Dev. Biol.*, vol. 371, no. 2, pp. 203–214, Nov. 2012.

[67] M. Brookes and W. J. Revell, *Blood Supply of Bone*. London: Springer Science & Business Media, 2012.

[68] C. Maes, S. Goossens, S. Bartunkova, B. Drogat, L. Coenegrachts, I. Stockmans, K. Moermans, O. Nyabi, K. Haigh, M. Naessens, L. Haenebalcke, J. P. Tuckermann, M. Tjwa, P. Carmeliet, V. Mandic, J.-P. David, A. Behrens, A. Nagy, G. Carmeliet, and J. J. Haigh, “Increased skeletal VEGF enhances beta-catenin activity and results in excessively ossified bones.,” *EMBO J.*, vol. 29, no. 2, pp. 424–441, Jan. 2010.

[69] A. E. Vieira, C. E. Repeke, S. de B. Ferreira Junior, P. M. Colavite, C. C. Biguetti, R. C. Oliveira, G. F. Assis, R. Taga, A. P. F. Trombone, and G. P. Garlet, “Intramembranous bone healing process subsequent to tooth extraction in mice: micro-computed tomography, histomorphometric and molecular characterization.,” *PLoS ONE*, vol. 10, no. 5, p. e0128021, 2015.

[70] S. M. Chim, J. Tickner, S. T. Chow, V. Kuek, B. Guo, G. Zhang, V. Rosen, W. Erber, and J. Xu, “Angiogenic factors in bone local environment.,” *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 24, no. 3, pp. 297–310, Jun. 2013.

[71] Y. Liu, A. D. Berendsen, S. Jia, S. Lotinun, R. Baron, N. Ferrara, and B. R. Olsen, “Intracellular VEGF regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation.,” *J. Clin. Invest.*, vol. 122, no. 9, pp. 3101–3113, Sep. 2012.

[72] C. Maes, G. Carmeliet, and E. Schipani, “Hypoxia-driven pathways in bone development, regeneration and disease.,” *Nature Reviews Rheumatology*, vol. 8, no. 6, pp. 358–366, Mar. 2012.

[73] C. Maes, E. Araldi, K. Haigh, R. Khatri, R. Van Looveren, A. J. Giaccia, J. J. Haigh, G. Carmeliet, and E. Schipani, “VEGF-independent cell-autonomous functions of HIF-1α regulating oxygen consumption in fetal cartilage are critical for chondrocyte survival.,” *J Bone Miner Res*, vol. 27, no. 3, pp. 596–609, Mar. 2012.

[74] Y. Wang, C. Wan, S. R. Gilbert, and T. L. Clemens, “Oxygen sensing and osteogenesis.,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1117, no. 1, pp. 1–11, Nov. 2007.

[75] J. D. Boerckel, B. A. Uhrig, N. J. Willett, N. Huebsch, and R. E. Guldberg, “Mechanical regulation of vascular growth and tissue regeneration in vivo.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 108, no. 37, pp. E674–80, Sep. 2011.

[76] F. A. Dinenno, H. Tanaka, B. L. Stauffer, and D. R. Seals, “Reductions in basal limb blood flow and vascular conductance with human ageing: role for augmented alpha-adrenergic vasoconstriction.,” *J. Physiol. (Lond.)*, vol. 536, no. 3, pp. 977–983, Nov. 2001.

[77] J. F. Griffith, D. K. W. Yeung, P. H. Tsang, K. C. Choi, T. C. Y. Kwok, A. T. Ahuja, K. S. Leung, and P. C. Leung, “Compromised bone marrow perfusion in osteoporosis.,” *J Bone Miner Res*, vol. 23, no. 7, pp. 1068–1075, Jul. 2008.

[78] S. A. Bloomfield, H. A. Hogan, and M. D. Delp, “Decreases in bone blood flow and bone material properties in aging Fischer-344 rats.,” *Clin. Orthop. Relat. Res.*, no. 396, pp. 248–257, Mar. 2002.

[79] R. D. Prisby, M. W. Ramsey, B. J. Behnke, J. M. Dominguez, A. J. Donato, M. R. Allen, and M. D. Delp, “Aging reduces skeletal blood flow, endothelium-dependent vasodilation, and NO bioavailability in rats.,” *J Bone Miner Res*, vol. 22, no. 8, pp. 1280–1288, Aug. 2007.

[80] J. F. Griffith, Y.-X. J. Wang, H. Zhou, W. H. Kwong, W. T. Wong, Y.-L. Sun, Y. Huang, D. K. W. Yeung, L. Qin, and A. T. Ahuja, "Reduced bone perfusion in osteoporosis: likely causes in an ovariectomy rat model.," *Radiology*, vol. 254, no. 3, pp. 739–746, Mar. 2010.

[81] B. Thompson and D. A. Towler, "Arterial calcification and bone physiology: role of the bone-vascular axis.," *Nat Rev Endocrinol*, vol. 8, no. 9, pp. 529–543, Sep. 2012.

[82] J. A. Kanis, H. Johansson, A. Oden, and E. V. McCloskey, "Assessment of fracture risk.," *Eur J Radiol*, vol. 71, no. 3, pp. 392–397, Sep. 2009.

[83] V. Yoon, N. M. Maalouf, and K. Sakhaee, "The effects of smoking on bone metabolism.," *Osteoporos Int*, vol. 23, no. 8, pp. 2081–2092, Aug. 2012.

[84] D. A. Hanley, J. P. Brown, A. Tenenhouse, W. P. Olszynski, G. Ioannidis, C. Berger, J. C. Prior, L. Pickard, T. M. Murray, T. Anastassiades, S. Kirkland, C. Joyce, L. Joseph, A. Papaioannou, S. A. Jackson, S. Poliquin, J. D. Adachi, Canadian Multicentre Osteoporosis Study Research Group, "Associations among disease conditions, bone mineral density, and prevalent vertebral deformities in men and women 50 years of age and older: cross-sectional results from the Canadian Multicentre Osteoporosis Study.," *J Bone Miner Res*, vol. 18, no. 4, pp. 784–790, Apr. 2003.

[85] C. R. Perry, "Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes.," *Clin. Orthop. Relat. Res.*, no. 360, pp. 71–86, Mar. 1999.

[86] K. J. Burg, S. Porter, and J. F. Kellam, "Biomaterial developments for bone tissue engineering.," *Biomaterials*, vol. 21, no. 23, pp. 2347–2359, Dec. 2000.

[87] P. V. Giannoudis and I. Pountos, "Tissue regeneration. The past, the present and the future.," *Injury*, vol. 36, no. 4, pp. S2–5, Nov. 2005.

[88] H. Lu, D. Kraut, L. C. Gerstenfeld, and D. T. Graves, "Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation.," *Endocrinology*, vol. 144, no. 1, pp. 346–352, Jan. 2003.

[89] L. G. Raisz, "Physiology and pathophysiology of bone remodeling.," *Clin. Chem.*, vol. 45, no. 8, pp. 1353–1358, Aug. 1999.

[90] L. Guariguata, D. R. Whiting, I. Hambleton, J. Beagley, U. Linnenkamp, and J. E. Shaw, "Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035.," *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 103, no. 2, pp. 137–149, Feb. 2014.

[91] G. de Lagasnerie, A.-S. Aguadé, P. Denis, A. Fagot-Campagna, and C. Gastaldi-Menager, "The economic burden of diabetes to French national health insurance: a new cost-of-illness method based on a combined medicalized and incremental approach.," *Eur J Health Econ*, vol. 19, no. 2, pp. 189–201, Mar. 2018.

[92] C. Bommer, V. Sagalova, E. Heesemann, J. Manne-Goehler, R. Atun, T. Bärnighausen, J. Davies, and S. Vollmer, "Global Economic Burden of Diabetes in Adults: Projections From 2015 to 2030.," *Diabetes Care*, p. dc171962, Feb. 2018.

[93] A. Hartemann and A. Grimaldi, *Guide pratique du diabète*. Elsevier Masson, 2013.

[94] I. D. Federation, *IDF Diabetes Atlas*. 2015.

[95] A. Grimaldi, "Diabète," in *Du symptôme à la prescription en médecine générale*, Elsevier, 2009, pp. 769–774.

[96] K. Fulzele, R. C. Riddle, D. J. DiGirolamo, X. Cao, C. Wan, D. Chen, M.-C. Faugere, S. Aja, M. A. Hussain, J. C. Brüning, and T. L. Clemens, "Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition.," *Cell*, vol. 142, no. 2, pp. 309–319, Jul. 2010.

[97] M. Ferron and J. Lacombe, "Regulation of energy metabolism by the skeleton: osteocalcin and beyond.," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 561, pp. 137–146, Nov. 2014.

[98] J. M. Tarr, K. Kaul, M. Chopra, E. M. Kohner, and R. Chibber, "Pathophysiology of diabetic retinopathy.," *ISRN Ophthalmol*, vol. 2013, no. 146, pp. 343560–13, 2013.

[99] C. Ott, K. Jacobs, E. Haucke, A. N. Santos, T. Grune, and A. Simm, "Role of advanced glycation end products in cellular signaling," *Redox Biology*, vol. 2, no. C, pp. 411–429, Feb. 2014.

[100] C. C. Kartha, S. Ramachandran, and R. M. Pillai, *Mechanisms of Vascular Defects in Diabetes Mellitus*. Cham: Springer, 2017.

[101] Z. Tahergorabi and M. Khazaei, "Imbalance of angiogenesis in diabetic complications: the mechanisms.," *Int J Prev Med*, vol. 3, no. 12, pp. 827–838, Dec. 2012.

[102] T. Yamada, A. Sato, T. Nishimori, T. Mitsuhashi, A. Terao, H. Sagai, M. Komatsu, T. Aizawa, and K. Hashizume, “Importance of hypercoagulability over hyperglycemia for vascular complication in type 2 diabetes.,” *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 49, no. 1, pp. 23–31, Jul. 2000.

[103] A. Martin, M. R. Komada, and D. C. Sane, “Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus.,” *Med Res Rev*, vol. 23, no. 2, pp. 117–145, Mar. 2003.

[104] C. R. Kruse, M. Singh, J. A. Sørensen, E. Eriksson, and K. Nuutila, “The effect of local hyperglycemia on skin cells in vitro and on wound healing in euglycemic rats.,” *J. Surg. Res.*, vol. 206, no. 2, pp. 418–426, Dec. 2016.

[105] D. A. Antonetti, R. Klein, and T. W. Gardner, “Diabetic retinopathy.,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 366, no. 13, pp. 1227–1239, Mar. 2012.

[106] T. Nakagawa, T. Kosugi, M. Haneda, C. J. Rivard, and D. A. Long, “Abnormal angiogenesis in diabetic nephropathy.,” *Diabetes*, vol. 58, no. 7, pp. 1471–1478, Jul. 2009.

[107] T. Nakagawa, W. Sato, T. Kosugi, and R. J. Johnson, “Uncoupling of VEGF with endothelial NO as a potential mechanism for abnormal angiogenesis in the diabetic nephropathy.,” *J Diabetes Res*, vol. 2013, no. 4, pp. 184539–7, 2013.

[108] R. Bouillon, “Diabetic bone disease.,” *Calcified Tissue International*, vol. 49, no. 3, pp. 155–160, Sep. 1991.

[109] P. Vestergaard, “Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes—a meta-analysis,” *Osteoporos Int*, vol. 18, no. 4, pp. 427–444, 2007.

[110] M. Janghorbani, R. M. Van Dam, W. C. Willett, and F. B. Hu, “Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture.,” *Am. J. Epidemiol.*, vol. 166, no. 5, pp. 495–505, Sep. 2007.

[111] A. V. Schwartz, “Epidemiology of fractures in type 2 diabetes,” *Bone*, vol. 82, no. C, pp. 2–8, Jan. 2016.

[112] L. Cozen, “Does diabetes delay fracture healing?,” *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 82, pp. 134–140, Jan. 1972.

[113] C. Marin, F. P. Luyten, B. Van der Schueren, G. Kerckhofs, and K. Vandamme, “The Impact of Type 2 Diabetes on Bone Fracture Healing.,” *Front Endocrinol (Lausanne)*, vol. 9, p. 6, 2018.

[114] K. M. Thrailkill, C. K. Lumpkin, R. C. Bunn, S. F. Kemp, and J. L. Fowlkes, “Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues.,” *AJP: Endocrinology and Metabolism*, vol. 289, no. 5, pp. E735–45, Nov. 2005.

[115] J. Starup-Linde and P. Vestergaard, “Biochemical bone turnover markers in diabetes mellitus - A systematic review.,” *Bone*, vol. 82, pp. 69–78, Jan. 2016.

[116] M. Retzepi and N. Donos, “The effect of diabetes mellitus on osseous healing.,” *Clinical Oral Implants Research*, vol. 21, no. 7, pp. 673–681, Jul. 2010.

[117] J. Verhaeghe, E. van Herck, W. J. Visser, A. M. Suiker, M. Thomasset, T. A. Einhorn, E. Faierman, and R. Bouillon, “Bone and mineral metabolism in BB rats with long-term diabetes. Decreased bone turnover and osteoporosis.,” *Diabetes*, vol. 39, no. 4, pp. 477–482, Apr. 1990.

[118] J. C. Krakauer, M. J. McKenna, N. F. Buderer, D. S. Rao, F. W. Whitehouse, and A. M. Parfitt, “Bone loss and bone turnover in diabetes.,” *Diabetes*, vol. 44, no. 7, pp. 775–782, Jul. 1995.

[119] T. Shibata, S. Takeuchi, S. Yokota, K. Kakimoto, F. Yonemori, and K. Wakitani, “Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma agonist, JTT-501, on diabetic complications in Zucker diabetic fatty rats.,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 130, no. 3, pp. 495–504, Jun. 2000.

[120] C. Picherit, M.-N. Horcajada, J. Mathey, B. Chanteranne, C. Puel, P. Lebecque, M.-J. Davicco, V. Coxam, and J.-P. Barlet, “Isoflavone consumption does not increase the bone mass in osteopenic obese female zucker rats.,” *Ann. Nutr. Metab.*, vol. 47, no. 2, pp. 70–77, 2003.

[121] S. Botolin, M.-C. Faugere, H. Malluche, M. Orth, R. Meyer, and L. R. McCabe, “Increased bone adiposity and peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma2 expression in type I diabetic mice.,” *Endocrinology*, vol. 146, no. 8, pp. 3622–3631, Aug. 2005.

[122] M. Hie, M. Shimono, K. Fujii, and I. Tsukamoto, “Increased cathepsin K and tartrate-resistant acid phosphatase expression in bone of streptozotocin-induced diabetic rats.,” *Bone*, vol. 41, no. 6, pp. 1045–1050, Dec. 2007.

[123] L. R. McCabe, “Understanding the pathology and mechanisms of type I diabetic bone loss.,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 102, no. 6, pp. 1343–1357, Dec. 2007.

[124] T. A. Einhorn, A. L. Boskey, C. M. Gundberg, V. J. Vigorita, V. J. Devlin, and M. M. Beyer, “The mineral and mechanical properties of bone in chronic experimental diabetes.,” *J. Orthop. Res.*, vol. 6, no. 3, pp. 317–323, 1988.

[125] K. Suzuki, N. Miyakoshi, T. Tsuchida, Y. Kasukawa, K. Sato, and E. Itoi, “Effects of combined treatment of insulin and human parathyroid hormone(1-34) on cancellous bone mass and structure in streptozotocin-induced diabetic rats.,” *Bone*, vol. 33, no. 1, pp. 108–114, Jul. 2003.

[126] M. Saito, K. Fujii, Y. Mori, and K. Marumo, “Role of collagen enzymatic and glycation induced cross-links as a determinant of bone quality in spontaneously diabetic WBN/Kob rats.,” *Osteoporos Int*, vol. 17, no. 10, pp. 1514–1523, Oct. 2006.

[127] A. C. Looker, M. S. Eberhardt, and S. H. Saydah, “Diabetes and fracture risk in older U.S. adults,” *Bone*, vol. 82, no. C, pp. 9–15, Jan. 2016.

[128] J. W. Folk, A. J. Starr, and J. S. Early, “Early wound complications of operative treatment of calcaneus fractures: analysis of 190 fractures.,” *J Orthop Trauma*, vol. 13, no. 5, pp. 369–372, Jun. 1999.

[129] D. J. Gehling, B. Lecka-Czernik, and N. A. Ebraheim, “Orthopedic complications in diabetes.,” *Bone*, vol. 82, pp. 79–92, Jan. 2016.

[130] H. F. Morris, S. Ochi, and S. Winkler, “Implant survival in patients with type 2 diabetes: placement to 36 months.,” *Ann. Periodontol.*, vol. 5, no. 1, pp. 157–165, Dec. 2000.

[131] R. K. Dubey, D. K. Gupta, and A. K. Singh, “Dental implant survival in diabetic patients; review and recommendations.,” *Natl J Maxillofac Surg*, vol. 4, no. 2, pp. 142–150, Jul. 2013.

[132] C. C. Eskow and T. W. Oates, “Dental Implant Survival and Complication Rate over 2 Years for Individuals with Poorly Controlled Type 2 Diabetes Mellitus.,” *Clin Implant Dent Relat Res*, vol. 19, no. 3, pp. 423–431, Jun. 2017.

[133] R. Margonar, C. E. Sakakura, M. Holzhausen, M. T. Pepato, J. R. C. Alba, and J. E. Marcantonio, “The influence of diabetes mellitus and insulin therapy on biomechanical retention around dental implants: a study in rabbits.,” *Implant Dent*, vol. 12, no. 4, pp. 333–339, 2003.

[134] A. Gandhi, H. A. Beam, J. P. O'Connor, J. R. Parsons, and S. S. Lin, “The effects of local insulin delivery on diabetic fracture healing.,” *Bone*, vol. 37, no. 4, pp. 482–490, Oct. 2005.

[135] N. Follak, I. Klöting, and H. Merk, “Influence of diabetic metabolic state on fracture healing in spontaneously diabetic rats.,” *Diabetes Metab. Res. Rev.*, vol. 21, no. 3, pp. 288–296, May 2005.

[136] N. Follak, I. Klöting, E. Wolf, and H. Merk, “Histomorphometric evaluation of the influence of the diabetic metabolic state on bone defect healing depending on the defect size in spontaneously diabetic BB/OK rats.,” *Bone*, vol. 35, no. 1, pp. 144–152, Jul. 2004.

[137] J. La Fontaine, C. Chen, N. Hunt, E. Jude, and L. Lavery, “Type 2 Diabetes and Metformin Influence on Fracture Healing in an Experimental Rat Model.,” *J Foot Ankle Surg*, vol. 55, no. 5, pp. 955–960, Sep. 2016.

[138] R. A. Kayal, J. Alblowi, E. McKenzie, N. Krothapalli, L. Silkman, L. Gerstenfeld, T. A. Einhorn, and D. T. Graves, “Diabetes causes the accelerated loss of cartilage during fracture repair which is reversed by insulin treatment.,” *Bone*, vol. 44, no. 2, pp. 357–363, Feb. 2009.

[139] R. A. Kayal, D. Tsatsas, M. A. Bauer, B. Allen, M. O. Al-Sebaei, S. Kakar, C. W. Leone, E. F. Morgan, L. C. Gerstenfeld, T. A. Einhorn, and D. T. Graves, “Diminished bone formation during diabetic fracture healing is related to the premature resorption of cartilage associated with increased osteoclast activity.,” *J Bone Miner Res*, vol. 22, no. 4, pp. 560–568, Apr. 2007.

[140] M. Retzepi, M. P. Lewis, and N. Donos, “Effect of diabetes and metabolic control on de novo bone formation following guided bone regeneration,” *Clinical Oral Implants*

Research, vol. 21, no. 1, pp. 71–79, Nov. 2009.
[141] W. A. Tyndall, H. A. Beam, C. Zarro, J. P. O'Connor, and S. S. Lin, “Decreased platelet derived growth factor expression during fracture healing in diabetic animals.,” *Clin. Orthop. Relat. Res.*, no. 408, pp. 319–330, Mar. 2003.
[142] S. R. Thaller, T. J. Lee, M. Armstrong, H. Tesluk, and J. S. Stern, “Effect of insulin-like growth factor type 1 on critical-size defects in diabetic rats.,” *J Craniofac Surg*, vol. 6, no. 3, pp. 218–223, May 1995.
[143] R. B. Santana and P. C. Trackman, “Controlled release of fibroblast growth factor 2 stimulates bone healing in an animal model of diabetes mellitus.,” *Int J Oral Maxillofac Implants*, vol. 21, no. 5, pp. 711–718, Sep. 2006.
[144] G. Mangialardi and P. Madeddu, “Bone Marrow-Derived Stem Cells: a Mixed Blessing in the Multifaceted World of Diabetic Complications.,” *Curr. Diab. Rep.*, vol. 16, no. 5, p. 43, May 2016.
[145] R. B. Santana, L. Xu, H. B. Chase, S. Amar, D. T. Graves, and P. C. Trackman, “A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes.,” *Diabetes*, vol. 52, no. 6, pp. 1502–1510, Jun. 2003.
[146] A. Vajgel, N. Mardas, B. C. Farias, A. Petrie, R. Cimões, and N. Donos, “A systematic review on the critical size defect model.,” *Clinical Oral Implants Research*, vol. 25, no. 8, pp. 879–893, Aug. 2014.
[147] J. L. Fowlkes, R. C. Bunn, L. Liu, E. C. Wahl, H. N. Coleman, G. E. Cockrell, D. S. Perrien, C. K. Lumpkin, and K. M. Thrailkill, “Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) and RUNX2-related osteogenic genes are down-regulated throughout osteogenesis in type 1 diabetes mellitus.,” *Endocrinology*, vol. 149, no. 4, pp. 1697–1704, Apr. 2008.
[148] L. Liu, J. Aronson, and B. Lecka-Czernik, “Rosiglitazone disrupts endosteal bone formation during distraction osteogenesis by local adipocytic infiltration.,” *Bone*, vol. 52, no. 1, pp. 247–258, Jan. 2013.
[149] Z. Liu, J. Aronson, E. C. Wahl, L. Liu, D. S. Perrien, P. A. Kern, J. L. Fowlkes, K. M. Thrailkill, R. C. Bunn, G. E. Cockrell, R. A. Skinner, and C. K. Lumpkin Jr, “A novel rat model for the study of deficits in bone formation in type-2 diabetes,” *Acta Orthopaedica*, vol. 78, no. 1, pp. 46–55, Jul. 2009.
[150] J. Verhaeghe, G. Oloumi, E. van Herck, R. van Bree, J. Dequeker, T. A. Einhorn, and R. Bouillon, “Effects of long-term diabetes and/or high-dose 17 beta-estradiol on bone formation, bone mineral density, and strength in ovariectomized rats.,” *Bone*, vol. 20, no. 5, pp. 421–428, May 1997.
[151] H. A. Beam, J. R. Parsons, and S. S. Lin, “The effects of blood glucose control upon fracture healing in the BB Wistar rat with diabetes mellitus.,” *J. Orthop. Res.*, vol. 20, no. 6, pp. 1210–1216, Nov. 2002.
[152] N. Follak, I. Kl ting, E. Wolf, and H. Merk, “Improving Metabolic Control Reverses the Histomorphometric and Biomechanical Abnormalities of an Experimentally Induced Bone Defect in Spontaneously Diabetic Rats,” *Calcified Tissue International*, vol. 74, no. 6, pp. 551–560, Jun. 2004.
[153] J. T. Siqueira, S. C. Cavalher-Machado, V. E. Arana-Chavez, and P. Sannomiya, “Bone formation around titanium implants in the rat tibia: role of insulin.,” *Implant Dent*, vol. 12, no. 3, pp. 242–251, 2003.
[154] K. Wongdee and N. Charoenphandhu, “Osteoporosis in diabetes mellitus: Possible cellular and molecular mechanisms.,” *World J Diabetes*, vol. 2, no. 3, pp. 41–48, Mar. 2011.
[155] B. Frerich, N. Lindemann, J. Kurtz-Hoffmann, and K. Oertel, “In vitro model of a vascular stroma for the engineering of vascularized tissues,” *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 30, no. 5, pp. 414–420, Oct. 2001.
[156] A. Kampmann, D. Lindhorst, P. Schumann, R. Zimmerer, H. Kokemüller, M. Rücker, N.-C. Gellrich, and F. Tavassol, “Additive effect of mesenchymal stem cells and VEGF to vascularization of PLGA scaffolds.,” *Microvascular Research*, vol. 90, pp. 71–79, Nov. 2013.
[157] D. Lindhorst, F. Tavassol, C. von See, P. Schumann, M. W. Laschke, Y. Harder, K.-H. Bormann, H. Essig, H. Kokemüller, A. Kampmann, A. Voss, R. Mülhaupt, M. D. Menger,

N.-C. Gellrich, and M. Rücker, “Effects of VEGF loading on scaffold-confined vascularization.,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 95, no. 3, pp. 783–792, Dec. 2010.

[158] A. L. Alpan, H. Toker, and H. Ozer, “Ozone Therapy Enhances Osseous Healing in Rats With Diabetes With Calvarial Defects: A Morphometric and Immunohistochemical Study.,” *J. Periodontol.*, vol. 87, no. 8, pp. 982–989, Aug. 2016.

[159] M. C. Durmuşlar, U. Balli, A. Türer, M. E. Önger, and H. H. Çelik, “Radiological and Stereological Evaluation of the Effect of Rifampin on Bone Healing in Critical-Size Defects.,” *J Craniofac Surg*, vol. 27, no. 6, pp. 1481–1485, Sep. 2016.

[160] O. M. Tepper, R. D. Galiano, J. M. Capla, C. Kalka, P. J. Gagne, G. R. Jacobowitz, J. P. Levine, and G. C. Gurtner, “Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures.,” *Circulation*, vol. 106, no. 22, pp. 2781–2786, Nov. 2002.

[161] G. F. Muschler, V. P. Raut, T. E. Patterson, J. C. Wenke, and J. O. Hollinger, “The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine.,” *Tissue Eng Part B Rev*, vol. 16, no. 1, pp. 123–145, Feb. 2010.

[162] W. G. E. J. Schoonen, W. M. A. Westerink, and G. J. Horbach, “High-throughput screening for analysis of in vitro toxicity.,” *EXS*, vol. 99, pp. 401–452, 2009.

[163] J. N. Kirkpatrick, S. E. Fedson, and R. Verdino, “Ethical dilemmas in device treatment for advanced heart failure.,” *Curr Opin Support Palliat Care*, vol. 1, no. 4, pp. 267–273, Dec. 2007.

[164] J. An, V. Rosen, K. Cox, N. Beauchemin, and A. K. Sullivan, “Recombinant human bone morphogenetic protein-2 induces a hematopoietic microenvironment in the rat that supports the growth of stem cells.,” *Exp. Hematol.*, vol. 24, no. 7, pp. 768–775, Jun. 1996.

[165] J. Glowacki, “A review of osteoinductive testing methods and sterilization processes for demineralized bone.,” *Cell Tissue Bank*, vol. 6, no. 1, pp. 3–12, 2005.

[166] A. J. Salgado, O. P. Coutinho, and R. L. Reis, “Bone tissue engineering: state of the art and future trends.,” *Macromol Biosci*, vol. 4, no. 8, pp. 743–765, Aug. 2004.

[167] P. S. Gomes and M. H. Fernandes, “Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies,” *Laboratory Animals*, vol. 45, no. 1, pp. 14–24, Jan. 2011.

[168] J. P. Schmitz and J. O. Hollinger, “The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions.,” *Clin. Orthop. Relat. Res.*, no. 205, pp. 299–308, Apr. 1986.

[169] J. O. Hollinger and J. C. Kleinschmidt, “The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials.,” *J Craniofac Surg*, vol. 1, no. 1, pp. 60–68, Jan. 1990.

[170] M. A. K. Liebschner, “Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone.,” *Biomaterials*, vol. 25, no. 9, pp. 1697–1714, Apr. 2004.

[171] Y. Zhang, L. Wang, F. Deng, H. Qiu, and X. Wu, “Determination of a critical size calvarial defect in senile osteoporotic mice model based on in vivo micro-computed tomography and histological evaluation,” *Archives of Gerontology and Geriatrics*, vol. 61, no. 1, pp. 44–55, May 2015.

[172] W. Xiao, Z. Hu, T. Li, and J. Li, “Bone fracture healing is delayed in splenectomic rats.,” *Life Sci.*, vol. 173, pp. 55–61, Mar. 2017.

[173] E. Aikawa, M. Nahrendorf, J.-L. Figueiredo, F. K. Swirski, T. Shtatland, R. H. Kohler, F. A. Jaffer, M. Aikawa, and R. Weissleder, “Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo.,” *Circulation*, vol. 116, no. 24, pp. 2841–2850, Dec. 2007.

[174] A. T. Harder and Y. H. An, “The mechanisms of the inhibitory effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on bone healing: a concise review.,” *J Clin Pharmacol*, vol. 43, no. 8, pp. 807–815, Aug. 2003.

[175] K. Stetzer, G. Cooper, R. Gassner, R. Kapucu, R. Mundell, and M. P. Mooney, “Effects of fixation type and guided tissue regeneration on maxillary osteotomy healing in rabbits.,” *J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 60, no. 4, pp. 427–36– discussion 436–7, Apr. 2002.

[176] T. A. Najjar and D. Kahn, “Comparative study of healing and remodeling in various bones.,” *J Oral Surg*, vol. 35, no. 5, pp. 375–379, May 1977.

[177] O. O. Aalami, R. P. Nacamuli, A. Salim, K. D. Fong, K. A. Lenton, H. M. Song, T. D.

Fang, and M. T. Longaker, “Differential transcriptional expression profiles of juvenile and adult calvarial bone.,” *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 115, no. 7, pp. 1986–1994, Jun. 2005.

[178] J. Hollinger, D. E. Mark, D. E. Bach, A. H. Reddi, and A. E. Seyfer, “Calvarial bone regeneration using osteogenin.,” *J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 47, no. 11, pp. 1182–6– discussion 1187, Nov. 1989.

[179] C. Bosch, B. Melsen, and K. Vargervik, “Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials.,” *J Craniofac Surg*, vol. 9, no. 4, pp. 310–316, Jul. 1998.

[180] Y. C. Shyng, H. Devlin, and P. Sloan, “The effect of streptozotocin-induced experimental diabetes mellitus on calvarial defect healing and bone turnover in the rat,” *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 30, no. 1, pp. 70–74, Feb. 2001.

[181] T. L. Aghaloo, A. D. Le, E. G. Freymiller, S. Avera, K. Shimizu, and R. D. Nishimura, “Immunohistochemical analysis of cortical and cancellous bone after radiation and the effect of platelet-rich plasma on autogenous bone grafting.,” *Int J Oral Maxillofac Implants*, vol. 21, no. 4, pp. 535–542, Jul. 2006.

[182] M. Khadra, N. Kasem, H. R. Haanaes, J. E. Ellingsen, and S. P. Lyngstadaas, “Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy.,” *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, vol. 97, no. 6, pp. 693–700, Jun. 2004.

[183] A. Pourzarandian, H. Watanabe, A. Aoki, S. Ichinose, K. M. Sasaki, H. Nitta, and I. Ishikawa, “Histological and TEM examination of early stages of bone healing after Er:YAG laser irradiation.,” *Photomed Laser Surg*, vol. 22, no. 4, pp. 342–350, Aug. 2004.

[184] T. Yoshino, A. Aoki, S. Oda, A. A. Takasaki, K. Mizutani, K. M. Sasaki, A. Kinoshita, H. Watanabe, I. Ishikawa, and Y. Izumi, “Long-term histologic analysis of bone tissue alteration and healing following Er:YAG laser irradiation compared to electrosurgery.,” *J. Periodontol.*, vol. 80, no. 1, pp. 82–92, Jan. 2009.

[185] P. P. Spicer, J. D. Kretlow, S. Young, J. A. Jansen, F. K. Kasper, and A. G. Mikos, “Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect,” *Nat Protoc*, vol. 7, no. 10, pp. 1918–1929, Sep. 2012.

[186] R. Yang, C. M. Davies, C. W. Archer, and R. G. Richards, “Immunohistochemistry of matrix markers in Technovit 9100 New-embedded undecalcified bone sections.,” *Eur Cell Mater*, vol. 6, pp. 57–71– discussion 71, Dec. 2003.

[187] M. L. Bouxsein, S. K. Boyd, B. A. Christiansen, R. E. Guldberg, K. J. Jepsen, and R. Müller, “Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography,” *J Bone Miner Res*, vol. 25, no. 7, pp. 1468–1486, Jun. 2010.

[188] J. Schortinghuis, J. L. Ruben, H. J. A. Meijer, A. L. J. J. Bronckers, G. M. Raghoebar, and B. Stegenga, “Microradiography to evaluate bone growth into a rat mandibular defect.,” *Archives of Oral Biology*, vol. 48, no. 2, pp. 155–160, Feb. 2003.

[189] A. M. Parfitt, “Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units (summary of proposed system).,” *Bone*, vol. 9, no. 1, pp. 67–69, 1988.

[190] K. S. Stok, B. A. Besler, T. H. Steiner, A. V. Villarreal Escudero, M. A. Zulliger, M. Wilke, K. Atal, A. Quintin, B. Koller, R. Müller, and D. Nesic, “Three-Dimensional Quantitative Morphometric Analysis (QMA) for In Situ Joint and Tissue Assessment of Osteoarthritis in a Preclinical Rabbit Disease Model.,” *PLoS ONE*, vol. 11, no. 1, p. e0147564, 2016.

[191] J. H. Waarsing, J. S. Day, and H. Weinans, “An improved segmentation method for in vivo microCT imaging.,” *J Bone Miner Res*, vol. 19, no. 10, pp. 1640–1650, Oct. 2004.

[192] N. Bonnet, N. Laroche, L. Vico, E. Dolleans, D. Courteix, and C. L. Benhamou, “Assessment of trabecular bone microarchitecture by two different x-ray microcomputed tomographs: a comparative study of the rat distal tibia using Skyscan and Scanco devices.,” *Med Phys*, vol. 36, no. 4, pp. 1286–1297, Apr. 2009.

[193] D. Chappard, N. Retailleau-Gaborit, E. Legrand, M. F. Baslé, and M. Audran, “Comparison Insight Bone Measurements by Histomorphometry and μCT,” *J Bone Miner Res*, vol. 20, no. 7, pp. 1177–1184, Feb. 2005.

[194] S.-Y. Park, K.-H. Kim, K.-T. Koo, K.-W. Lee, Y.-M. Lee, C.-P. Chung, and Y.-J. Seol,

"The evaluation of the correlation between histomorphometric analysis and micro-computed tomography analysis in AdBMP-2 induced bone regeneration in rat calvarial defects," *Journal of Periodontal & Implant Science*, vol. 41, no. 5, p. 218, 2011.

[195] P. Blery, P. Pilet, A. V. Bossche, A. Thery, J. Guicheux, Y. Amouriq, F. Espitalier, N. Mathieu, and P. Weiss, "Vascular imaging with contrast agent in hard and soft tissues using microcomputed-tomography.," *J Microsc*, vol. 262, no. 1, pp. 40–49, Apr. 2016.

[196] Z. S. Patel, S. Young, Y. Tabata, J. A. Jansen, M. E. K. Wong, and A. G. Mikos, "Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model," *Bone*, pp. 1–10, Oct. 2008.

[197] C. L. Duvall, "Quantitative microcomputed tomography analysis of collateral vessel development after ischemic injury," *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, vol. 287, no. 1, pp. H302–H310, Apr. 2004.

[198] S. Mukundan, K. B. Ghaghada, C. T. Badea, C.-Y. Kao, L. W. Hedlund, J. M. Provenzale, G. A. Johnson, E. Chen, R. V. Bellamkonda, and A. Annapragada, "A liposomal nanoscale contrast agent for preclinical CT in mice.," *AJR Am J Roentgenol*, vol. 186, no. 2, pp. 300–307, Feb. 2006.

[199] C. L. Duvall, D. Weiss, S. T. Robinson, F. M. F. Alameddine, R. E. Guldberg, and W. R. Taylor, "The role of osteopontin in recovery from hind limb ischemia.," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 28, no. 2, pp. 290–295, Feb. 2008.

[200] Y. Katsuda, T. Ohta, K. Miyajima, Y. Kemmochi, T. Sasase, B. Tong, M. Shinohara, and T. Yamada, "Diabetic complications in obese type 2 diabetic rat models.," *Exp. Anim.*, vol. 63, no. 2, pp. 121–132, 2014.

[201] J. Kim, C.-S. Kim, E. Sohn, Y. M. Lee, and J. S. Kim, "KIOM-79 inhibits aldose reductase activity and cataractogenesis in Zucker diabetic fatty rats.," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 63, no. 10, pp. 1301–1308, Oct. 2011.

[202] S. Hoshi, Y. Shu, F. Yoshida, T. Inagaki, J. Sonoda, T. Watanabe, K.-I. Nomoto, and M. Nagata, "Podocyte injury promotes progressive nephropathy in zucker diabetic fatty rats.," *Lab. Invest.*, vol. 82, no. 1, pp. 25–35, Jan. 2002.

[203] J. P. Vora, S. M. Zimsen, D. C. Houghton, and S. Anderson, "Evolution of metabolic and renal changes in the ZDF/Drt-fa rat model of type II diabetes.," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 7, no. 1, pp. 113–117, Jan. 1996.

[204] C. L. Oltman, L. J. Coppey, J. S. Gellett, E. P. Davidson, D. D. Lund, and M. A. Yorek, "Progression of vascular and neural dysfunction in sciatic nerves of Zucker diabetic fatty and Zucker rats.," *AJP: Endocrinology and Metabolism*, vol. 289, no. 1, pp. E113–22, Jul. 2005.

[205] C. Hamann, C. Goettsch, J. Mettelsiefen, V. Henkenjohann, M. Rauner, U. Hempel, R. Bernhardt, N. Fratzl-Zelman, P. Roschger, S. Rammelt, K. P. Gunther, and L. C. Hofbauer, "Delayed bone regeneration and low bone mass in a rat model of insulin-resistant type 2 diabetes mellitus is due to impaired osteoblast function," *AJP: Endocrinology and Metabolism*, vol. 301, no. 6, pp. E1220–E1228, Nov. 2011.

[206] P. Vestergaard, "Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes—a meta-analysis," *Osteoporos Int*, vol. 18, no. 4, pp. 427–444, Oct. 2006.

[207] Q.-Y. Dong, L. Chen, G.-Q. Gao, L. Wang, J. Song, B. Chen, Y.-X. Xu, and L. Sun, "Allogeneic diabetic mesenchymal stem cells transplantation in streptozotocin-induced diabetic rat.," *Clin Invest Med*, vol. 31, no. 6, pp. E328–37, Dec. 2008.

[208] N. Napoli, R. Strollo, A. Paladini, S. I. Briganti, P. Pozzilli, and S. Epstein, "The alliance of mesenchymal stem cells, bone, and diabetes.," *Int J Endocrinol*, vol. 2014, no. 5, pp. 690783–26, 2014.

[209] G. Spinetti, D. Cordella, O. Fortunato, E. Sangalli, S. Losa, A. Gotti, F. Carnelli, F. Rosa, S. Riboldi, F. Sessa, E. Avolio, A. P. Beltrami, C. Emanueli, and P. Madeddu, "Global remodeling of the vascular stem cell niche in bone marrow of diabetic patients: implication of the microRNA-155/FOXO3a signaling pathway.," *Circ. Res.*, vol. 112, no. 3, pp. 510–522, Feb. 2013.

[210] M. A. Piccinin and Z. A. Khan, "Pathophysiological role of enhanced bone marrow adipogenesis in diabetic complications.," *Adipocyte*, vol. 3, no. 4, pp. 263–272, Oct. 2014.

[211] C. Hamann, M. Rauner, Y. Höhna, R. Bernhardt, J. Mettelsiefen, C. Goettsch, K.-P. Günther, M. Stolina, C.-Y. Han, F. J. Asuncion, M. S. Ominsky, and L. C. Hofbauer, "Sclerostin antibody treatment improves bone mass, bone strength, and bone defect regeneration in rats with type 2 diabetes mellitus," *J Bone Miner Res*, vol. 28, no. 3, pp. 627–638, Feb. 2013.

[212] S. Reinwald, R. G. Peterson, M. R. Allen, and D. B. Burr, "Skeletal changes associated with the onset of type 2 diabetes in the ZDF and ZDSD rodent models.," *AJP: Endocrinology and Metabolism*, vol. 296, no. 4, pp. E765–74, Apr. 2009.

[213] R. D. Prisby, J. M. Swift, S. A. Bloomfield, H. A. Hogan, and M. D. Delp, "Altered bone mass, geometry and mechanical properties during the development and progression of type 2 diabetes in the Zucker diabetic fatty rat.," *J. Endocrinol.*, vol. 199, no. 3, pp. 379–388, Dec. 2008.

[214] M.-H. Lafage-Proust, B. Roche, M. Langer, D. Cleret, A. Vanden-Bossche, T. Olivier, and L. Vico, "Assessment of bone vascularization and its role in bone remodeling.," *Bonekey Rep*, vol. 4, p. 662, 2015.

[215] J. N. Stabley, R. D. Prisby, B. J. Behnke, and M. D. Delp, "Type 2 diabetes alters bone and marrow blood flow and vascular control mechanisms in the ZDF rat," *Journal of Endocrinology*, vol. 225, no. 1, pp. 47–58, Mar. 2015.

[216] T. B. Crump, F. Rivera-Hidalgo, J. W. Harrison, F. E. Williams, and I. Y. Guo, "Influence of three membrane types on healing of bone defects.," *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, vol. 82, no. 4, pp. 365–374, Oct. 1996.

[217] G. M. Cooper, M. P. Mooney, A. K. Gosain, P. G. Campbell, J. E. Losee, and J. Huard, "Testing the Critical Size in Calvarial Bone Defects: Revisiting the Concept of a Critical-Size Defect," *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 125, no. 6, pp. 1685–1692, Jun. 2010.

[218] A. Udagawa, S. Sato, A. Hasuike, M. Kishida, Y. Arai, and K. Ito, "Micro-CT observation of angiogenesis in bone regeneration," *Clinical Oral Implants Research*, vol. 24, no. 7, pp. 787–792, Mar. 2012.

[219] A. S. Plachokova, J. van den Dolder, P. J. Stoelinga, and J. A. Jansen, "Early effect of platelet-rich plasma on bone healing in combination with an osteoconductive material in rat cranial defects.," *Clinical Oral Implants Research*, vol. 18, no. 2, pp. 244–251, Apr. 2007.

[220] L. Dupoirieux, D. Pourquier, M. C. Picot, and M. Neves, "The effect of pentosan polysulphate on bone healing of rat cranial defects.," *J Craniomaxillofac Surg*, vol. 27, no. 5, pp. 314–320, Oct. 1999.

[221] M. E. Pryor, J. Yang, G. Polimeni, K.-T. Koo, M. J. Hartman, H. Gross, A. Agelan, J. M. Manns, and U. M. E. Wikesjö, "Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: radiographic observations.," *J. Periodontol.*, vol. 76, no. 8, pp. 1287–1292, Aug. 2005.

[222] J. P. M. Issa, H. L. A. Defino, Y. C. L. Pereira, J. C. Netto, W. Sebald, M. V. L. B. Bentley, M. M. Iyomasa, and E. Ervolino, "Bone repair investigation using rhBMP-2 and angiogenic protein extracted from latex.," *Microsc. Res. Tech.*, vol. 75, no. 2, pp. 145–152, Feb. 2012.

[223] G. Gómez, S. Korkiakoski, M.-M. González, S. Länsman, V. Ellä, T. Salo, M. Kellomäki, N. Ashammakhi, and E. Arnaud, "Effect of FGF and polylactide scaffolds on calvarial bone healing with growth factor on biodegradable polymer scaffolds.," *J Craniofac Surg*, vol. 17, no. 5, pp. 935–942, Sep. 2006.

[224] Ş. Ezirganlı, H. O. Kazancıoğlu, A. Mihmanlı, M. Ş. Aydın, R. Sharifov, and A. Alkan, "The effect of local simvastatin application on critical size defects in the diabetic rats.," *Clinical Oral Implants Research*, vol. 25, no. 8, pp. 969–976, Aug. 2014.

[225] M. L. Brown, K. Yukata, C. W. Farnsworth, D.-G. Chen, H. Awad, M. J. Hilton, R. J. O'Keefe, L. Xing, R. A. Mooney, and M. J. Zuscik, "Delayed Fracture Healing and Increased Callus Adiposity in a C57BL/6J Murine Model of Obesity-Associated Type 2 Diabetes Mellitus," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 6, pp. e99656–11, Jun. 2014.

[226] A. Oikawa, M. Siragusa, F. Quaini, G. Mangialardi, R. G. Katare, A. Caporali, J. D. van Buul, F. P. J. van Alphen, G. Graiani, G. Spinetti, N. Kraenkel, L. Prezioso, C. Emanueli, and P. Madeddu, "Diabetes mellitus induces bone marrow microangiopathy.," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 30, no. 3, pp. 498–508, Mar.

2010.
[227] J. Filipowska, K. A. Tomaszewski, Ł. Niedźwiedzki, J. A. Walocha, and T. Niedźwiedzki, "The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning," *Angiogenesis*, pp. 1–12, Feb. 2017.
[228] C. Wallner, J. Schira, J. M. Wagner, M. Schulte, S. Fischer, T. Hirsch, W. Richter, S. Abraham, U. Kneser, M. Lehnhardt, and B. Behr, "Application of VEGFA and FGF-9 Enhances Angiogenesis, Osteogenesis and Bone Remodeling in Type 2 Diabetic Long Bone Regeneration," *PLoS ONE*, vol. 10, no. 3, pp. e0118823–19, Mar. 2015.
[229] H. Jiao, E. Xiao, and D. T. Graves, "Diabetes and Its Effect on Bone and Fracture Healing," *Curr Osteoporos Rep*, vol. 13, no. 5, pp. 327–335, Aug. 2015.
[230] N. A. Dzhoyashvili, A. Y. Efimenko, T. N. Kochegura, N. I. Kalinina, N. V. Koptelova, O. Y. Sukhareva, M. V. Shestakova, R. S. Akchurin, V. A. Tkachuk, and Y. V. Parfyonova, "Disturbed angiogenic activity of adipose-derived stromal cells obtained from patients with coronary artery disease and diabetes mellitus type 2.," *J Transl Med*, vol. 12, no. 1, p. 337, Dec. 2014.

ANNEXES

Liste des publications

1) Type 2 diabetes alters mesenchymal stem cell secretome composition and angiogenic properties. Ribot J, **Caliaperoumal G**, Paquet J, Boisson-Vidal C, Petite H, Anagnostou F.
J Cell Mol Med. 2017 Feb;21(2):349-363. doi: 10.1111/jcmm.12969. Epub 2016 Sep 19.

2) Type 2 diabetes impairs angiogenesis and osteogenesis in calvarial defects: MicroCT study in ZDF rats.
Caliaperoumal G, Souyet M, Bensidhoum M, Petite H, Anagnostou F.
Bone. 2018 Jul;112:161-172. doi: 10.1016/j.bone.2018.04.009. Epub 2018 Apr 25.

3) Microcomputed tomography of the femur of diabetic rats: alterations of trabecular and cortical bone microarchitecture and vasculature - A feasibility study -
David Zeitoun, **Guavri Caliaperoumal**, Morad Bensidhoum, Jean Marc Constans, Fani Anagnostou, Valérie Bousson,
Under revisons in Investigative Radiology Journals

Actes de congrès

Poster

1) IADR Brésil (international) 2012: communication affichée
Human Adipose Derived Stem Cell-Coral Constructs and Bone Formation Caliaperoumal G., Struillou X., Petite H, Anagnostou F.

2) IADR Dubrovnik (européen) 2014:communication affichée
Diabetic bone repair: calvarial ZDF-rat model in-vitro and in-vivo study
CALIAPEROUMAL, M. SOUYET, M.BENSIDHOUM, H. PETITE, and F. ANAGNOSTOU

3) BIOMAT (européen) 2015 : communication affichée
Diabetic bone repair: calvarial ZDF-rat model in-vitro and in-vivo study
CALIAPEROUMAL, M. SOUYET, M.BENSIDHOUM, H. PETITE, and F. ANAGNOSTOU

Oral

IADR Budapest (européen) 2011 : communication orale, ***prix Robert Frank***
Human Adipose Derived Stem Cell-Coral Constructs and Bone Formation
Caliaperoumal G., Struillou X., Petite H, Anagnostou

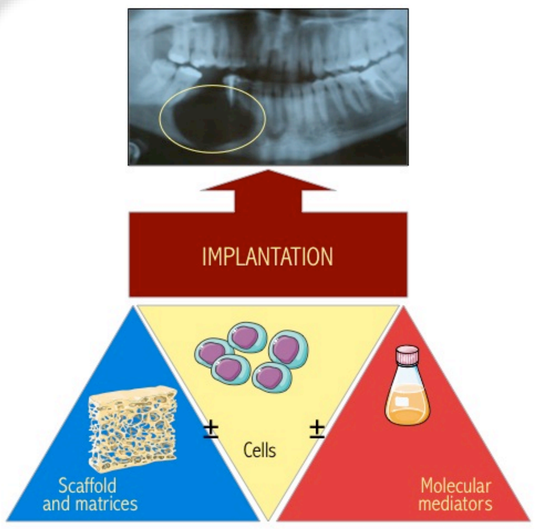
IADR /Hatton Unilever Competition

Poster n°

Human Adipose Derived Stem Cell-Coral Constructs and Bone Formation

***Caliaperoumal G.*[1], *Struillou X.*[3,4], *Petite H*[1], *Anagnostou F.*[1,2]**

1 Laboratoire de Bioingénierie et Biomécanique Ostéoarticulaire, B2OA U.M.R.-C.N.R.S. 7052, Paris, France ; 2 Department of Periodontology, Pitié-Salpetrière Hospital AP-HP, Paris 7-Denis Diderot University, U.F.R. of Odontology, Paris, France. 3 Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire, LIOAD UMRS 791 INSERM, Nantes france. 4 UFR d'odontologie Université de Nantes, Periodontology



Biohybrid material

Rational: In our clinical specialities, we regularly face large bone defects with complex shapes and forms. Those wounds don't heal spontaneously. Therefore bone regeneration techniques are developed. The ideal "filling" material for bone regeneration should have osteogenic capacity, should be easy to handle in operating conditions and must be able to face the mechanical strains within the implantation site.

Actual regeneration procedures mostly consist on bone and bone substitute grafting. Grafts and substitutes used to treat bone defects, present several disadvantages: hemorreagia with autografts, viral contamination risks with allografts, poor osteogenic potential with alloplastic grafts. Therefore bio-hybrid materials are developed. They consist on a combination of scaffold, cells and molecular mediators. In the present study, we used coral-hADSC bio-hybrid.

Coral is a well-documented, natural porous biomaterial, used since the 70's. It has good mechanical properties and it is osteoconductive. Its biocompatibility has been tested *in vivo, in vitro*, and in clinical essays(*Le Guéhennec L, 2004*).

Human adipose derived stromal cells (hADSCs) are mesenchymal stromal cells (*Zuk and al. 2005*), obtained from lipoaspiration procedures. Compared to bone marrow stromal cells (that are commonly used), they are easier to harvest, they are available in large quantities, and patients recover faster from the harvesting procedure. hADSCs are proven to be multipotent (*Bajada and al. 2008)*, but their osteoblastic differentiation *in vitro* seems to be unpredictable, and their osteogenic capacity *in vivo* has not been much investigated.

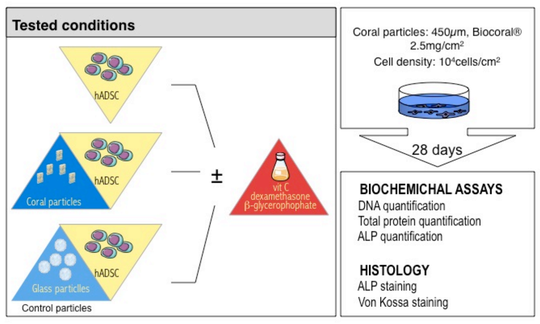
Aim of the study: we have decided to conduct this study to investigate osteogenic potential of human adipose derived stromal cell-coral construct.

In the first part, we have tested *in vitro* whether coral interfered with hADSC's proliferation and differentiation. Then we used the same cells to built cell-coral constructs, to investigate *in vivo,* the osteogenic potential of such a construct.

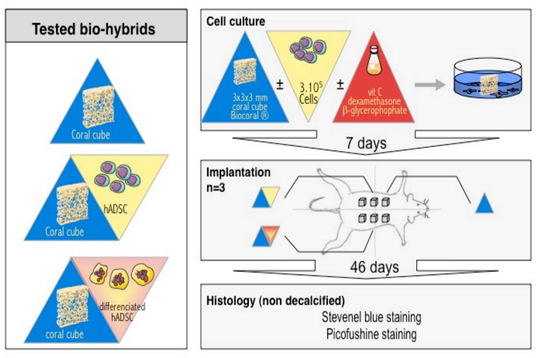
Material and methods: for the *in vitro* part of our study, we plated cells at a density of 10 000 cells per cm², we added either 2,5 mg per cm² of coral particles or glass particles (we used glass particles as a control 3D scaffold). Then cells were cultures with their scaffolds for 28 days, either with control or osteogenic media. Biochemical assays and histology were undertaken at several key time points.

For the second part of our study, cells harvested from the same donor, tested previously *in vitro* were used to build implantable cell-coral constructs. 300 000 cells were statically loaded on each 3mm coral cube. Then, cells were cultured on the cube either with osteogenic or control media for 7 days. Then the cell-coral constructs were subcutaneously implanted in a nude mouse for a 46 days period. After animal sacrifice, specimens were harvest and underwent non-decalcified histology.

Material and methods : hADSCs behaviour when cultured with coral particles



Material and methods: *Osteogenic potential of hADSC-coral constructs*



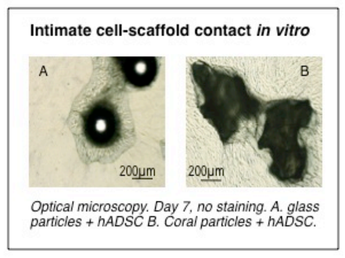
Results: In the first part of the study we found that cultured in osteogenic media, neither glass nor coral particles interfered with cell proliferation, during the 30 days of culture. We also noticed that cells grow on the particles, they seem to be completely tolerated. On the other hand, in control media, the presence of particles (glass and coral) "restrains" cell proliferation from day 16. However, we noticed close cell-scaffold contact in that culture media too.(Fig 1)

When cultured in osteogenic media ALP specific activity increases from day 16, and is at its high most on day 21 before reducing. Whereas in control media all three tested conditions undergo the same slow and linear ALP increase from day 16 to 30. **Cell cultures with coral particles have significantly the highest ALP specific activity on day 21**. *(p<0,001)(Fig 2)*

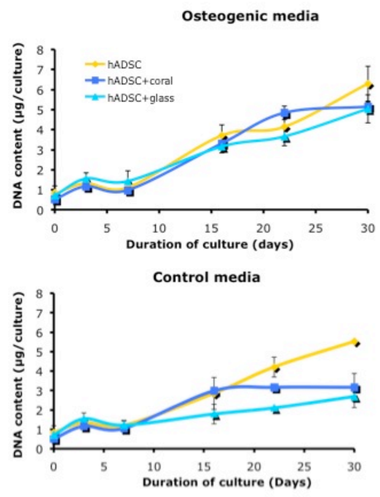
From day 21 ALP staining is really positive in plates cultured in osteogenic media. We also notice that ALP staining is especially positive on sites close to particles (glass and coral).On day 28, we notice that the same ALP positive sites on day 21, form mineral deposits (positivated by VK staining). VK staining is so positive at day 28 with coral particles that sites of mineral deposit on coral particles are more obvious without staining. **There is a greater amount of mineral deposits next to coral particles.**(Fig 3)

The histological observation of cell-coral constructs implanted subcutaneously in nude mice for 46 days showed that, all cubes (loaded with differentiated and undifferentiated cells) were totally colonized by cells. There was surface dissolution on all scaffolds. None of the constructs presented bone formation. However in biohybrids with differentiated cells, we could see large number of blood vessels and less surface dissolution (Fig 4)

hADSCs proliferation when cultured with coral particles (Fig 1)

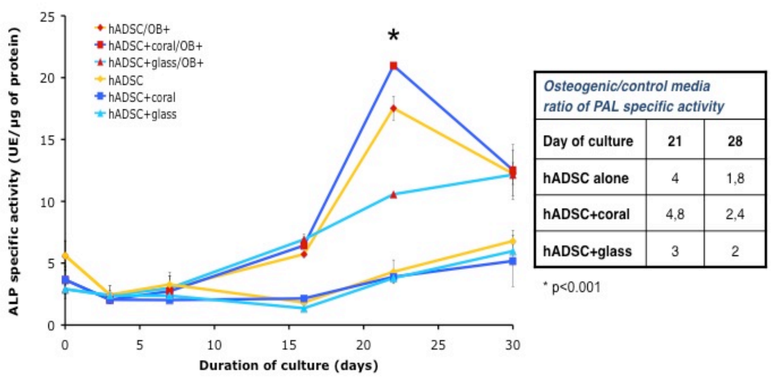


Optical microscopy. Day 7, no staining. A. glass particles + hADSC B. Coral particles + hADSC.



- *Close cell-particles contact*
- *Culture with particles in control media reduces hADSC proliferation*

hADSCs osteoblastic differentiation when cultured with coral particles (Fig 2)



Osteogenic/control media ratio of PAL specific activity		
Day of culture	21	28
hADSC alone	4	1,8
hADSC+coral	4,8	2,4
hADSC+glass	3	2

* p<0.001

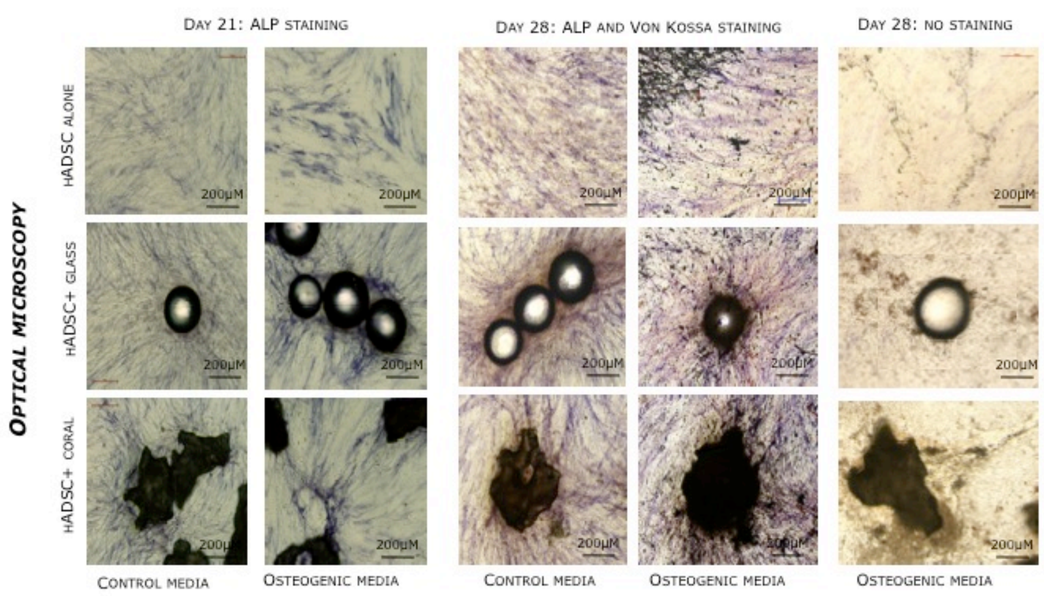
hADSCs specific ALP activity is higher when cultured with coral particles

Conclusion and perspectives: All tested coral scaffolds are tolerated by hADSC, proliferation and differentiation are not disturbed in osteogenic media, and it seems that coral scaffold enhances mineral deposits. In order to confirm the last statements we need to further investigate osteogenic differentiation marker such as osteocalcin or collagen 1, and we need to quantify mineral deposits.

After implantation the tested bio-hybrids didn't form bone. Even if we witnessed total cell colonisation and numerous blood vessels, we just noticed surface dissolution. In order to further investigate the osteogenic potential of the constructs, we need to optimize cell loading conditions on scaffolds, to study the survival of the implanted cells, and finally we have to look for their faith after implantation.

hADSCs osteoblastic differentiation when cultured with coral particles (Fig 3)

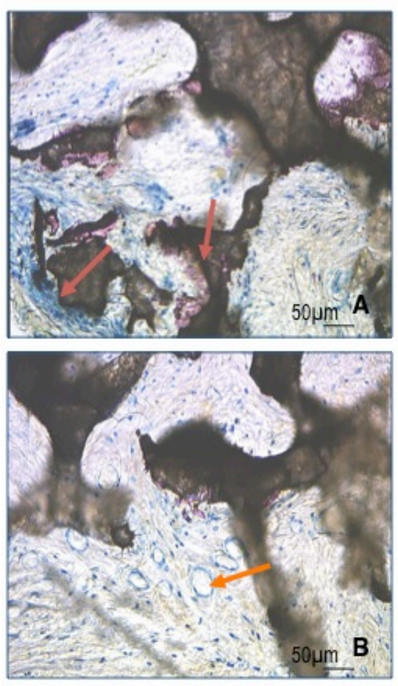
Greater mineral deposits arround coral particles



Osteogenic potential of hADSC-coral constructs (Fig 4)

- Cubes are totally cell-colonised
- Surface dissolution
- Fibrotic encapsulation
- No bone formation

- Bio-hybrids with differentiated cells
  - Greater number of blood vessels
  - Less surface dissolution



Optical microscopy. 46 days post-implantaion. Stevenel blue and picrofushine staining. Coral cube loaded with undifferentiated hADSC (A) and differentiated hADSC (B).

Diabetic bone repair: calvarial ZDF-rat model in-vitro and in-vivo study

IADR
Poster #237

G. CALIAPEROUMAL[1,3], M. SOUYET[2,3], H. PETITE[3], and F. ANAGNOSTOU[1,3]

[1]Université Paris Diderot-Paris 7, PARIS, France, [2]Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile,
[3]Laboratoire de Bioingénierie et Bioimagerie Ostéo-Articulaire(B2OA) UMR CNRS 7052, Paris, France

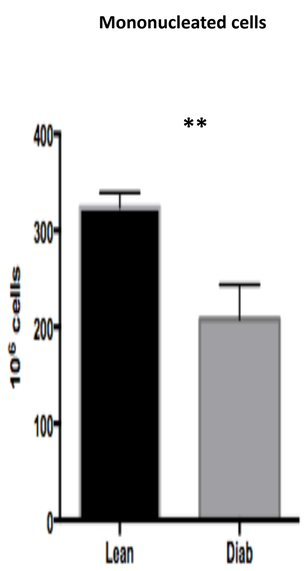
Objectives: Diabetic patients are known to have higher infection risks, lower osteogenic capacities and therefore unpredictable bone repair. Grafts and substitutes have been widely used and studied to enhance diabetic bone repair without providing satisfactory reproducible results. Nowadays, biohybrids (scaffolds and osteogenic factors and/or stem cells) are engineered to offer an efficient alternate treatment, whereas the repairing ability of the diabetic bone is still unknown. This study aims to figure out the ***osteogenic and angiogenic repairing potential of diabetic calvarial bone in vivo* and of diabetic cells *in vitro*.**

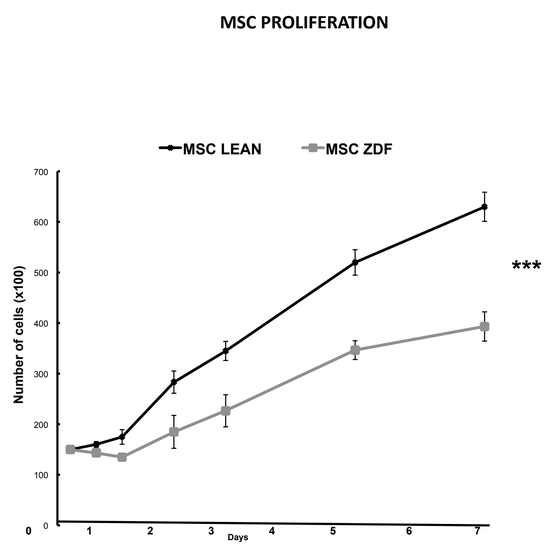
Q1: Does Diabetes impact stromal cells' osteogenic potentiel?

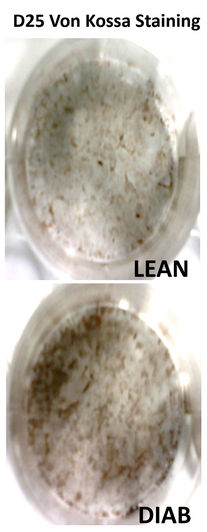
Mat and meth: Zucker Diabetic Fatty rats (ZDF) *vs* Zucker lean rats (ZL), n=4, 20 week old
Cells were harvested from the bone marrow (BMSCs), were amplified and underwent osteogenic differenciation.

Results There is a greater number of progenitor cells in the bone marrow harvested from lean rats, n=4; *p≤0.001*
Non diabetic BMSCs proliferate at an higher rate.
Diabetic cells show larger amount of mineral deposits on D25

Answer: Diabetes affects BMSCs ostegenesis related functions





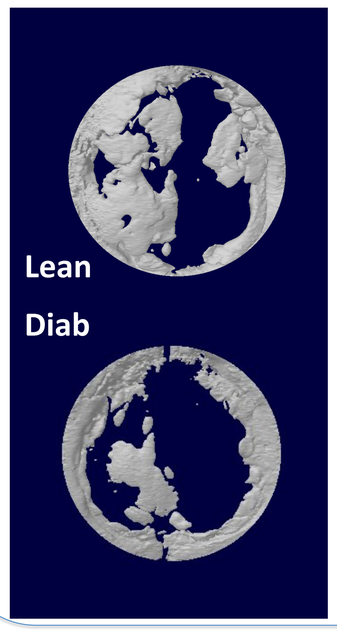


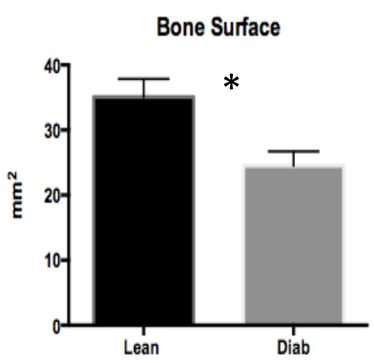
Q2: Do critical size calvarial defects (8mm) heal better in non diabetic rats?

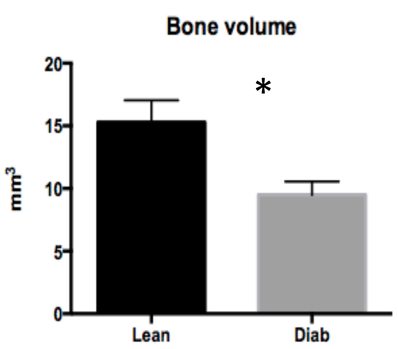
Mat and meth: Zucker Diabetic Fatty rats (ZDF) *vs* Zucker lean rats (ZL), n=5, 16 week old. Central 8mm circular defect. Bone healing was evaluated 8 weeks post-op, using microCT analysis

Results: microCT results show significantly less repair in ZDF diabetic critical size defect (9.496 ± 1.066 *vs* 15.30 ± 1.74 mm^3; n=5, p≤0.03).

Answer: *Zucker Diabetic Fatty (ZDF)* rat, has impaired bone healing

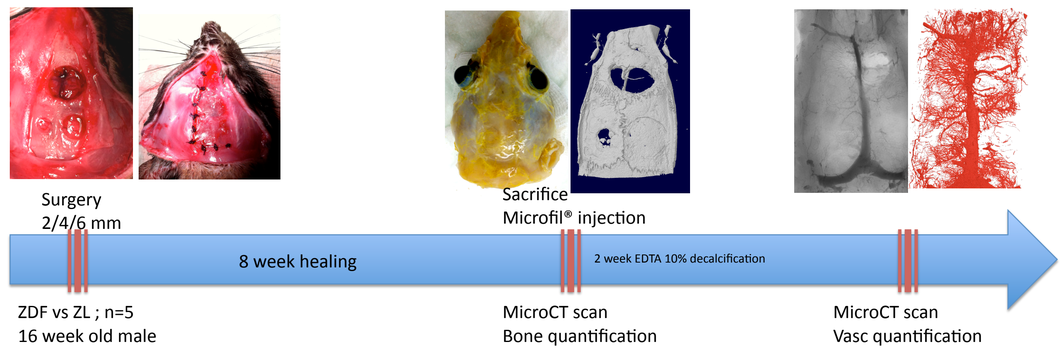






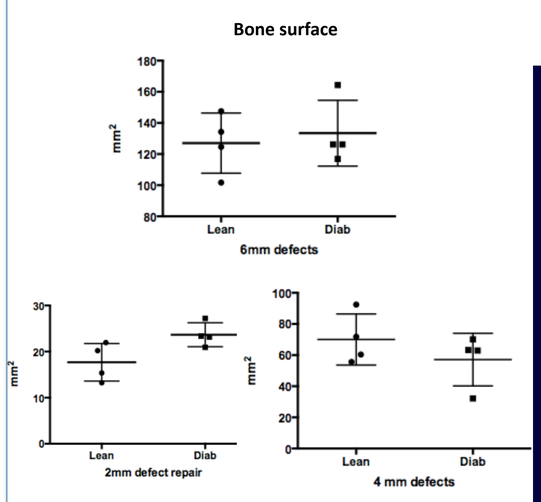
Q3: Do subcritical size calvarial defects undergo better angiogenic and osteogenic repair in non diabetic rats?

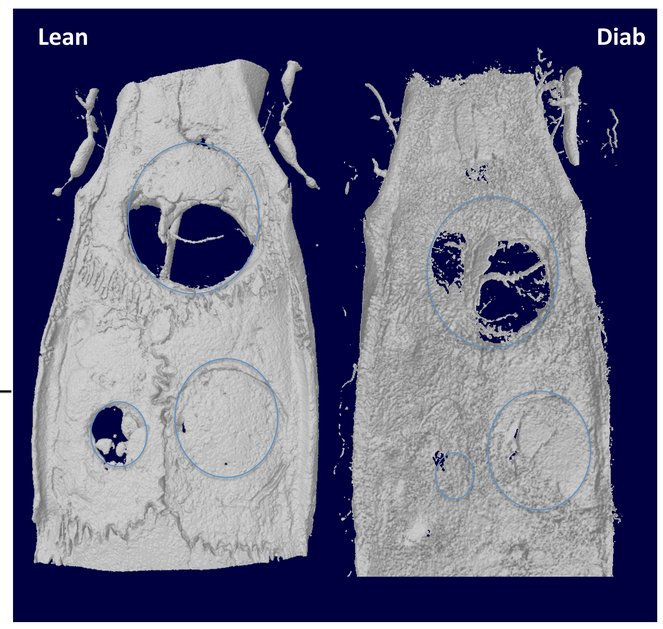
Mat and meth:
Zucker Diabetic Fatty rats (ZDF) vs Zucker lean rats (ZL), n=4, 16 week old.
2; 4 and 6 mm circular defect. Periosteum flap was replaced and sutured.
8 weeks post-op, animals were sacrificed, perfused with heparinised serum and injected microfil compound (sillicon that casts in vessels) calvariae harvested for microCT analysis.(before and after decalcification)

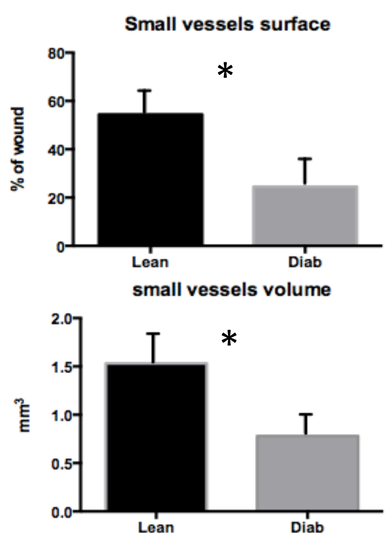


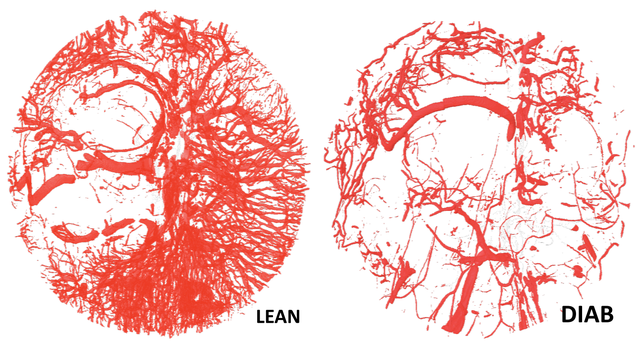
Results:
MicroCT shows no differences in bone healing in sub critical size defects.
There is significantly higher vascular repair in non diabetic rats.

Answer: angiogenic YES! Osteogenic NO!









Conclusion:

- diabetes impacts BMSC proliferation and osteoblastic differenciation *in vitro*
- diabetes impacts repair of critical size defects
- There aren't any relevant differences on 2-4 or 6 mm subcritical size defects bone repair, whereas non diabetic rat achieve greater vascular repair *in vivo*.

Keywords: Bone, Bone repair and Diabetes
Student Presenter. This abstract is based on research that was funded entirely or partially by an outside source: Fondation Avenir, IFRO

Diabetic bone repair: calvarial ZDF-rat model in-vitro and in-vivo study

G. CALIAPEROUMAL[1,2], M. SOUYET[2,3], M.BENSIDHOUM[1], H. PETITE[1], and F. ANAGNOSTOU[1,2]

1. Laboratoire de Bioingénierie et Bioimagerie Ostéo-Articulaire UMR 7052 B2OA, CNRS, Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité,
2. Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, France
3. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

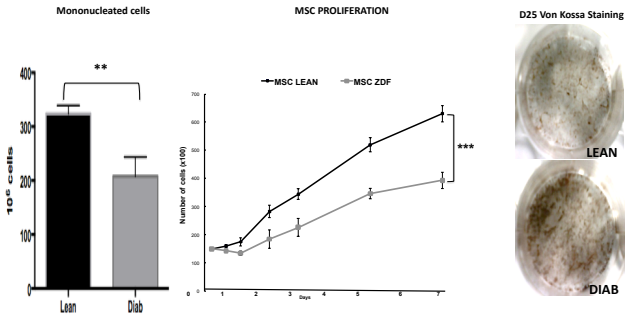
Objectives: Diabetic patients are known to have higher infection risks, lower osteogenic capacities and therefore unpredictable bone repair. Grafts and substitutes have been widely used and studied to enhance diabetic bone repair without providing satisfactory reproducible results. Nowadays, biohybrids (scaffolds and osteogenic factors and/or stem cells) are engineered to offer an efficient alternate treatment, whereas the repairing ability of the diabetic bone is still unknown. This study aims to figure out the ***osteogenic and angiogenic repairing potential of diabetic calvarial bone in vivo* and of diabetic cells *in vitro*.**

Q1: Does Diabetes impact stromal cells' osteogenic potentiel?

Mat and meth: Zucker Diabetic Fatty rats (ZDF) *vs* Zucker lean rats (ZL), n=4, 20 week old
Cells were harvested from the bone marrow (BMSCs), were amplified and underwent osteogenic differenciation.

Results: There is a greater number of progenitor cells in the bone marrow harvested from lean rats, n=4; *p≤0.001*
Non diabetic BMSCs proliferate at an higher rate.
Diabetic cells show larger amount of mineral deposits on D25

Answer: Diabetes affects BMSCs ostegenesis related functions

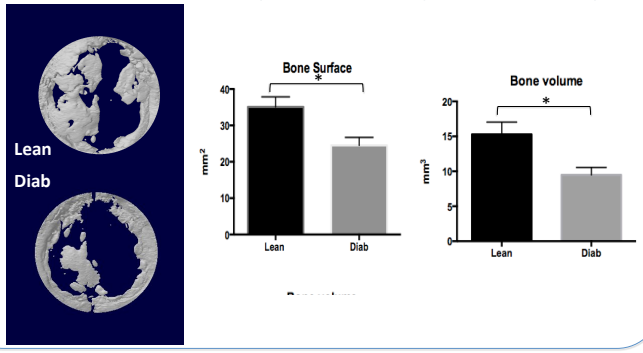


Q2: Do critical size calvarial defects (8mm) heal better in non diabetic rats?

Mat and meth: Zucker Diabetic Fatty rats (ZDF) *vs* Zucker lean rats (ZL), n=5, 16 week old. Central 8mm circular defect. Bone healing was evaluated 8 weeks post-op, using microCT analysis

Results: microCT results show significantly less repair in ZDF diabetic critical size defect (9.496 ± 1.066 *vs* 15.30 ± 1.74 mm³; n=5, p≤0.03).

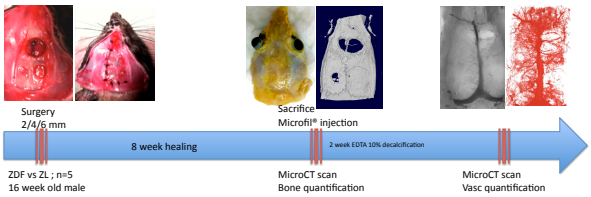
Answer: *Zucker Diabetic Fatty (ZDF)* rat, has impaired bone healing



Q3: Do subcritical size calvarial defects undergo better angiogenic and osteogenic repair in non diabetic rats?

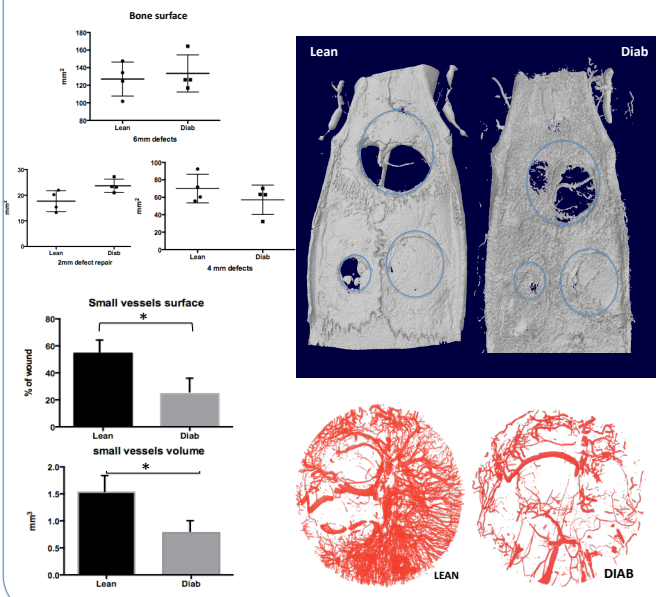
Mat and meth:

Zucker Diabetic Fatty rats (ZDF) vs Zucker lean rats (ZL), n=4, 16 week old.
2; 4 and 6 mm circular defect. Periosteum flap was replaced and sutured.
8 weeks post-op, animals were sacrificed, perfused with heparinised serum and injected with microfil compound(sillicon that casts in vessels). Calvariae were harvested for microCT analysis.(before and after decalcification)



Results: MicroCT shows no differences in bone healing in sub critical size defects.
There is significantly higher vascular repair in non diabetic rats.

Answer: angiogenic YES! Osteogenic NO!



Conclusion:

- diabetes impacts BMSC proliferation and osteoblastic differenciation *in vitro*
- diabetes impacts repair of critical size defects
- there aren't any relevant differences on 2-4 or 6 mm subcritical size defects bone repair, whereas non diabetic rat achieve greater vascular repair *in vivo*.

Student Presenter. This poster is based on research that was funded entirely or partially by an outside source: Fondation Avenir, IFRO

Abstract

Now that diabetes reaches pandemic proportions, this thesis focuses on the effect of T2DM on bone. Very few studies document the effect of T2DM on maxillo-facial bone and their endomembranous repair.
After a short review on bone, diabetes and animal study models, we will showcase our results of the impact of T2DM on, (i) vascular and bone repair of calvarial defects in ZDF rats; (ii) the vascular and bone microarchitechture of ZDF rat's femur; (iii) the secretome and angiogenic properties of zdf rat's bone marrow stromal cells (BMMSC).

These studies showed an alteration of bone repair in critical size defects, and impaired vascular repair in critical and subcritical T2DM defects. We also found evidences of bone and vascular microarchitecture impairment in ZDF femur. At a cellular level, T2DM BMMSCs have an unique angiogenic profile. These findings may contribute to the better understanding of the adverse vascular healing in T2DM and provide successful bone healing therapies for patients with T2DM.